



FREQUÊNCIA DE HEMOCROMATOSE HEREDITÁRIA POR MUTAÇÃO NO GENE HFE EM PACIENTES DA SERRA GAÚCHA

Mariele Boeno de Vargas^a, Elias da Rosa Hoffmann^{a*}

a) Curso de Biomedicina, Centro Universitário da Serra Gaúcha, Caxias do Sul, RS.

Informações de Submissão

*Orientador:
Elias da Rosa Hoffmann. Biomédico. Mestre em Patologia. Especialista em Docência no Ensino Superior.
CEP: 95020-472.
E-mail: mariiele.boeno@gmail.com

Palavras-chave:

Hemocromatose. HFE. Hemocromatose clássica. Sobrecarga de ferro. Ferritina.

Resumo

A Hemocromatose Hereditária é uma doença genética autossômica e recessiva que causa dano ao metabolismo do ferro levando a sobrecarga do íon em diversos órgãos, causando desde lesão celular até insuficiência funcional. É um dos distúrbios mais comuns em caucasianos descendentes de europeus, no Brasil há estudos e dados pouco representativos. O diagnóstico precoce indica melhor prognóstico. Objetiva-se identificar a frequência das três principais mutações do gene HFE, C282Y, H63D e S65C, e decorrentes portadores de HH na Serra Gaúcha; através de um estudo de caráter observacional do tipo transversal e retrospectivo com resultados analíticos de exames realizados no período de janeiro de 2015 a dezembro de 2019, a fim de avaliar a prevalência da mutação no gene HFE e genótipos, traçando o perfil epidemiológico da patologia valendo-se de banco de dados fornecido por um laboratório local. Foram encontrados 22 pacientes, 72,7% tiveram mutação do gene HFE, sendo 54,5% heterozigose em H63D. A maioria dos pacientes eram do sexo masculino em média com 53 anos. Com dados escassos e sem significância estatística entre as variáveis, as frequências estudadas se mostraram dentro do esperado para a população, como gênero, etnia e idade. A mutação, embora não a esperada, esteve de acordo com o perfil populacional considerando uma população “normal” testada e não doentes suspeitos. Com probandos reduzidos os resultados seguiram um padrão anteriormente já publicado; a C282Y não foi expressiva e houve entendimento de que indica apenas piora no quadro prognóstico do paciente e que a H63D apresenta manifestação clínica importante.

1 INTRODUÇÃO

A hemocromatose hereditária (HH) é uma doença autossômica recessiva que leva à sobrecarga de ferro e pode ser classificada de acordo com o gene causador da mutação sendo o gene HFE a mais comum, assim também chamada de hemocromatose clássica (HHC).⁽¹⁾

O ferro é um importante íon com funções metabólicas distintas, mas com destaque na eritropoese, na HH ele é progressivamente depositado em diversos tecidos como fígado, pâncreas, coração, articulações, entre outros, causando lesão celular ou tecidual, fibrose e insuficiência funcionais, em especial ligados à oxidação celular. Este é um dos distúrbios genéticos mais comuns em caucasianos descendentes do norte europeu, chegando a atingir um em cada 220 a 250 indivíduos; as frequências alélicas também tendem a ter frequência relacionada ao local de origem da mutação. Afeta em sua maioria homens, em proporção de aproximadamente 5 a 7:1, acredita-se que a apresentação clínica em mulheres seja menor e mais tardia devido as perdas fisiológicas de ferro em períodos menstruais e gestacionais. ^(2,3) A manifestação de sintomas costuma ocorrer por volta da 4ª ou 5ª década de vida, sendo que nas mulheres costuma ocorrer de 5 a 10 anos mais tarde do que o observado em homens, porém os sintomas são inespecíficos, dificultando a investigação da hemocromatose, sendo suspeita normalmente após elevadas dosagem de saturação de transferrina (ST), transferrina (Tf) e ferritina o que pode levar ao agravamento do quadro, uma vez que a patologia tende a ser silenciosa e continuar progredindo, retardando o tratamento e contribuindo para insuficiência dos órgãos. Os sinais clínicos mais evidentes são hiperpigmentação da pele, hepatomegalia, diabetes *mellitus*, hipotireoidismo, arritmias, entre outros. Pacientes com HH tem risco aumentado cerca de 20 vezes para carcinoma hepático e maior frequência de desenvolvimento de cirrose hepática. ^(3,4)

No Brasil, estudos populacionais da HH são escassos e não representam de forma satisfatória a população, considerando a extensão territorial e miscigenação do país. Segundo Cançado et al., a frequência da mutação C282Y chega a ser de três a oito vezes menor em brasileiros do que nos norteeuropeus, mas a frequência do alelo H63D e S65C se assemelha a destas populações. Segundo Martinelli, embora a prevalência no país seja considerada desconhecida, estudos realizados no Sudeste encontraram prevalência de heterozigotos para C282Y de 1,2 a 2,8% e de 31,1 a 32,6% para H63D; o primeiro bem abaixo das prevalências internacionais e o segundo mantendo-se aproximado. Um estudo realizado entre o estado de São Paulo e o Sul do país em 2016, encontrou resultados expressivos em comparação com os outros dados nacionais, considerando que as regiões escolhidas são expressivamente caucasianas. Neste, dos 90 pacientes com suspeita clínica, 50% apresentaram mutação para pelo menos um gene, novamente a mutação em homozigose de C282Y foi de 4,44% e a H63D 3,33% também em homozigose. ^(2,4,5)

O diagnóstico de HH baseia-se na expressão clínica da sobrecarga de ferro e a associação à mutação genética, afinal se não ligada ao HFE deve ser investigada a causa seja ela primária ou secundária, entretanto nem sempre a genotipagem é realizada e o tratamento pode se dar de maneira

inadequada agravando o quadro clínico. Estima-se que 40 a 70% dos homozigotos de C282Y desenvolverão evidência laboratorial de sobrecarga e pelo menos 50% desenvolverão complicações secundárias. Observa-se a baixa representatividade dos estudos publicados no Brasil em contraste aos internacionais, há também a divergência de frequências populacionais entre os polimorfismos dentro das regiões do país, mais acentuada quando comparada a outros continentes. Estima-se que 2/3 dos pacientes com HH sejam decorrentes da HHC, ainda assim os estudos de frequência polimórfica são raros e com baixos participantes. Pensando nestes dados o presente estudo foi desenvolvido a fim de entender a frequência em uma das regiões com perfil caucasiano relevante e elevada descendência europeia, buscando agregar conhecimento ao estudo da doença que parece ser esquecida mesmo diante de evidências clínicas de sobrecarga.^(6,7)

2 REFERENCIAL TEÓRICO

5.1 Metabolismo do Ferro

O ferro (Fe) é um importante íon que está presente na composição de enzimas e proteínas indispensáveis ao ser humano, como a hemoglobina, mioglobina, síntese de DNA, no citocromo, catalase e peroxidase atuantes na geração de energia oxidativa, inativação de radicais livres, dentre outros. Desempenha assim fundamental função no metabolismo energético celular, sua concentração em adultos varia de 3,5 a 5g e tem uma regulação eficiente, substituindo pela absorção dietética o que é excretado diariamente, mesmo em mulheres que tem perdas de ferro maiores decorrentes do ciclo menstrual; embora os mecanismos de excreção sejam menos desenvolvidos que os de absorção e distribuição. Aproximadamente 67% da concentração total do ferro está no heme da hemoglobina (Hb), responsável pelo transporte de oxigênio (CANÇADO; et al, 2010; SANTOS; et al, 2009; TERADA, C.T.; et al, 2009).

O heme possui um íon de ferro central e é parte constitucional da hemoglobina sendo importante na oxigenação dos tecidos; é sintetizado no tecido eritroide em sua maioria, mas todas as células nucleadas possuem esta capacidade. Sua formação ocorre no citosol e na mitocôndria e é regulada por uma série de enzimas originadas de acordo com a deficiência ou excesso de ferro. A síntese do heme está diretamente ligada a proteínas e elementos reguladores de ferro, o IRP e IRE; a ligação deste complexo é ativado ou inativado de acordo com a disponibilidade de ferro dentro da

célula, se houver excesso a ligação entre IRP e IRE não ocorre permitindo a formação livre da molécula heme (GROTTO, H.Z.W.; et al, 2010).

Diversas enzimas atuam no processo de síntese do heme e ao final do processo a ferroquelatase (FC) acrescenta o ferro ao anel de Proto IX; os níveis de ferro intracelular e a hipóxia regulam a expressão da FC que é sintetizada no citosol e conduzida posteriormente para a mitocôndria. A degradação do heme libera o ferro e realoca os anéis tetrapirrólicos linearmente formando a biliverdina no fígado, que a excretará pela bile. Como já mencionado, a síntese do heme pode ocorrer em todas as células nucleadas sendo a maioria sintetizada nas células eritroides e o segundo órgão a produzi-lo é o fígado; no qual é controlado pela atividade da ALAS-N e via hemoxigenase e incorporado com proteínas microssomais (GROTTO, H.Z.W.; et al, 2010).

A absorção intestinal é uma das formas de obtenção do ferro que pode ser obtido de forma orgânica ou não na dieta. A forma orgânica proveniente da quebra da hemoglobina e mioglobina presente na carne vermelha correspondem a 1/3 do total de heme adquirido, que é mais bem absorvido; enquanto ovos e laticínios fornecem uma quantidade menor de ferro heme. O ferro inorgânico, não heme, encontra-se na forma férrica e provem de vegetais e grãos; alguns fatores podem favorecer a absorção, como a acidez e agentes como o açúcar. A absorção ocorre pelo epitélio duodenal superior através da borda em escova e o transporte do ferro do intestino à corrente sanguínea ocorre em três fases descritas a seguir. 1ª fase: o transporte pela transportadora de metal divalente (DMT-1), transportadora de metais localizada na membrana da borda em escova do enterócito, é realizado após o Fe^{3+} ser convertido em Fe^{2+} , esta conversão é mediada pela redutase citocromo b duodenal (Dcytb). Embora menos estabelecida, a absorção do heme parece ocorrer através da proteína bifuncional denominada proteína transportador do heme-1 (HCP-1) posicionada também na membrana das células do duodeno; o heme liga-se a esta proteína e adentra o citoplasma intacto. A HCP-1 é regulada pela quantidade de ferro intracelular, se houver deficiência ela migra do citoplasma para a membrana e se excesso de ferro se redistribui da membrana para o citoplasma; a hipóxia também induz a HCP-1 a captar mais heme, aproveitando todo o heme da dieta antes que seja eliminado (GROTTO, H.Z.W.; et al, 2010).

Uma vez dentro da célula o ferro é liberado da protoporfirina pela heme oxigenase e então é considerado um pool de ferro não heme sendo destinado de acordo com a demanda. Se não houver demanda pelo ferro ele se liga à ferritina e será excretado em momento oportuno de descamação do epitélio intestinal. Se houver demanda ele será transportado para o meio extracelular, plasma, passando da membrana pela HFE e o receptor de transferrina (TfR) e no exterior imediatamente se

liga a transferrina (Tf); esta foi a 2ª fase, de transporte intracelular. Na fase de transporte o principal elemento é a ferroportina (FPN) que se localiza na extremidade basolateral de várias células, dentre elas os enterócitos duodenais, hepatócitos e macrófagos. A FPN é o único mecanismo de efluxo do ferro; sua expressão aumenta em situação de hipóxia e déficit férrico, sendo seletiva para Fe^{2+} . A Tf tem afinidade pelo ferro em sua forma Fe^{3+} , então após externalizado pela FPN ele precisa ser oxidado a esta forma novamente e a responsável é a hefaestina (GROTTO, H.Z.W.; et al, 2010).

A maior parte do ferro usado na eritropoese provem da fagocitose de hemácias senescentes pelos macrófagos do baço, medula óssea e das células de Kupffer no fígado, em menor escala. Os macrófagos reconhecem alterações na membrana do processo de eritose e realizam o catabolismo intracelular delas através de um complexo enzimático presente na membrana do retículo endoplasmático gerando como produtos ferro, bilirrubina e monóxido de carbono. O ferro pode ser retido no macrófago em moléculas de ferritina ou exportado pela FPN, que depois é oxidado pela ceruloplasmina e é transportado pela Tf até locais de reuso, em sua maioria a medula óssea. A Tf tem capacidade de transportar até 12 mg de Fe pelo plasma, mas dificilmente atinge esse pico, quando isto ocorre o ferro circula livremente pelo plasma na forma não ligada a Tf (NTBI), este se acumula nos tecidos parenquimais contribuindo para o dano celular quando há sobrecarga férrica (GROTTO, H.Z.W.; et al, 2010).

A internalização do ferro é iniciada pela ligação da Tf a um receptor específico (TfR) presente na superfície celular, a afinidade entre o TfR e a Tf parece estar ligada a produção de proteína produzida pelo gene HFE, também presente na membrana celular dos eritroblastos. Este complexo tem importância no momento de endocitose importante no efluxo de ferro e internalização do mesmo. Alguns órgãos, como coração e fígado, são capazes de captar o ferro quando a Tf está saturada ou em sua ausência. Outra proteína reguladora ainda pouco conhecida é TfR2, bastante semelhante a TfR, porém com menor afinidade pela Tf diférrica, mutações nesta têm sido descritas em pacientes com HH (GROTTO, H.Z.W.; et al, 2010).

A estocagem do ferro é nas células reticuloendoteliais do fígado, baço e medula óssea na forma de ferritina e hemossiderina. A ferritina é constituída de apoferritina, proteína livre do ferro, em forma solúvel. A hemossiderina corresponde à forma degradada da ferritina, a concha proteica é desintegrada e o ferro forma agregados. A regulação intracelular do ferro ocorre através das proteínas reguladoras IRP 1 e 2, que controlam a expressão pós-transcricional dos genes moduladores da captação e estocagem do ferro. Na ausência de ferro a IRP1 liga-se aos IRE's, se saturado a IRP2 é inativada, não ocorrendo a ligação IRP2-IRE. O ferro é usualmente excretado pelas secreções

corpóreas, descamação das células intestinais e epidermais ou sangramento menstrual. Uma vez que não há um mecanismo específico para eliminar o excesso de ferro, precisa haver ligação entre absorção, utilização e estoque para que haja homeostase e esta é feita pela hepcidina (HPN). Em experimentos animais verificou-se que camundongos deficientes de HPN desenvolviam sobrecarga férrica, em especial no fígado, pâncreas e coração e depleção nos macrófagos, e os que tinham expressão aumentada de HPN desenvolviam anemia microcítica-hipocrômica ao nascer e logo morriam. O receptor da HPN é a FPN e sua interação controla os níveis de ferro nos enterócitos, hepatócitos e macrófagos. A sobrecarga de ferro aumenta a expressão de HPN e a hipóxia e anemia diminuem; foi demonstrado que a IL-6 também pode agir estimulando a produção de HPN em estados inflamatórios. As moléculas HFE regulam a expressão de HPN de acordo com os níveis de ferro circulante, havendo aumento dos níveis de ferro elas estimulam a síntese pelo fígado que inibirá a absorção do ferro intestinal e a liberação pelos macrófagos. Logo, mutações nessas proteínas levariam a absorção continuada intestinal e acúmulo nos tecidos parenquimais (GROTTO, H.Z.W.; et al, 2010).

5.2 Hemocromatose Hereditária

A Hemocromatose Hereditária (HH) é um distúrbio no metabolismo do ferro tendo como característica o aumento inapropriado na absorção do íon que leva a sobrecarga em diferentes tecidos, uma vez que o organismo não é capaz de excretá-lo por via fisiológica. Há diferentes síndromes relacionadas à sobrecarga de ferro, as Primárias se originam em desordens genéticas, são exemplos a HH do gene HFE (Tipo 1), Juvenil (Tipo 2), Hemojuvelina (Tipo 2A), Hpcidina (Tipo 2B), do gene receptor de Transferrina (Tipo 3), gene da Ferroportina (Tipo 4), mutação da DMT1 ou neonatal, entre outros. As síndromes secundárias podem se originar com o tempo decorrente de outras patologias que não as genéticas, por exemplo: anemias hemolíticas (talassemias e falciforme), anemia aplástica, doença hepática crônica, porfiria cutânea tarda, síndrome mielodisplásica, etc. (CANÇADO, R.D; et al, 2009).

Caracterizada como doença autossômica recessiva, tem como principal associação o gene HFE. Foi descoberta ainda no século XIX por Trousseau e Troisier através das características clínicas, mas denominada hemocromatose em 1889; somente em 1996 Feder et al, identificaram o gene da hemocromatose no braço curto do cromossomo 6, este pertencia ao complexo de histocompatibilidade de classe I da HLA-H, que só mais tarde foi denominado HFE. Feder et al, descreveram duas

mutações missenses (C282Y e H63D) do gene que representou 88% dos 178 probandos; o gene HFE é localizado em 6p21.3, 4,6 megabases teloméricas de HLA-A e cobre aproximadamente 10 kilobases. A HFE é uma proteína transmembranar que se associa a beta₂-microglobulina de cadeia leve da classe I e está envolvida na regulação da homeostase do ferro, como já citado, pela regulação da absorção do íon devido a sua presença na membrana dos enterócitos. O produto da HFE se liga ao TfR e reduz sua afinidade pela Tf carregada de ferro de 5 a 10 vezes; modelos usando camundongos deficientes em HFE desenvolveram sobrecarga de ferro semelhante à HH observada em humanos fornecendo as evidências para tais afirmações. Já foram relatadas 37 variantes alélicas do gene HFE, no entanto este projeto enfocará nas 3 mais recorrentes, C282Y, H63D e S65C (CANÇADO, R.D.; et al, 2009; HANSON, E.H.; et al, 2000).

O desenvolvimento da patologia depende além da expressão genotípica, a homozigose de gene C282Y apresenta maior probabilidade de desenvolver a expressão clínica de sobrecarga. Estima-se que a prevalência de C282Y é de 3 a 8 vezes menor no Brasil do que em indivíduos do nordeste europeu, enquanto a frequência reduzida de H63D e S65C é semelhante. Observou-se que a frequência da mutação do gene era maior que o número de indivíduos diagnosticados com hemocromatose levantando a hipótese de penetrância incompleta do gene mutante. Estima-se que 40 a 70% dos indivíduos homozigotos para a mutação C282Y irão desenvolver evidência laboratorial da sobrecarga, enquanto 50% dos homens e 25% das mulheres desenvolverão complicações clínicas secundárias ao acúmulo ferro. Vale lembrar que a expressão fenotípica parece sofrer influência de fatores externos, clínicos e ambientais, além do genótipo, que interferem no desencadeamento clínico da doença, sendo mais expressiva essa interação em pacientes heterozigotos (CANÇADO, R.D.; et al, 2007).

5.3 Variantes genéticas

As variantes genéticas apresentadas aqui são as de maior relevância no cenário atual devido a sua maior frequência e expressão fenotípica, são elas C282Y, H63D e S65C. Quando há uma alteração no nucleotídeo 845 do gene HFE, uma adenina é adicionada onde deveria haver uma guanina, este produz uma tirosina (Y) onde deveria produzir cisteína (C) na posição de aminoácido 282 do produto da HFE; gerando assim a mutação C282Y. Ela interrompe o transporte e associação na superfície celular da beta₂-microglobulina, acredita-se que resulte em maior perda da função proteica do que as demais, o que também justificaria a maior frequência de expressão clínica ser

derivada da homozigose desta mutação. Como consequência da interrupção no transporte da beta₂-microglobulina, a transferrina permanece livre e se liga ao receptor TfR acarretando a sobrecarga (HANSON, E.H.; et al, 2000; SANTOS, P.J.C.L; et al, 2009).

Na mutação H63D, há alteração no nucleotídeo 187 do gene onde uma Guanina substitui uma Citosina, então o aspartato (D) substitui a histidina (H) na posição de aminoácido 63 na proteína HFE. No entanto esta mutação não parece causar o mesmo dano a beta₂-microglobulina que a descrita anteriormente, sendo assim considerado portador da patologia, porém quando aparece em heterozigose com C282Y, o indivíduo apresenta elevado risco de desenvolver clinicamente a doença, às vezes este risco é igualado ao de homozigose para C282Y (HANSON, E. H.; et al, 2000; SANTOS, P.J.C.L; et al, 2009).

Na alteração S65C é codificado cisteína (C) no lugar de serina (S) na posição 65 da proteína, o nucleotídeo específico alterado não é descrito em nenhuma das fontes encontradas. Esta alteração gera uma forma muito branda de HH. As mutações S65C e H63D isoladamente geram um risco diminuído para a sintomatologia, mesmo quando em homozigose, entretanto quando associadas ao gene C282Y ou a outras condições patológicas do metabolismo férrico, como talassemias, elas desempenham papel importante na predisposição do acúmulo patológico do ferro. A detecção da S665C se mantém devido a maior frequência de detecção, em homozigose e heterozigose, em casos clínicos de HH do que as demais mutações já identificadas (CANÇADO, R.D.; et al, 2010; HANSON, E. H.; et al, 2000).

5.4 Fisiopatologia

A HPN é regulada pela HFE, Hemojuvelina (HJL) e TfR2 de acordo com os níveis de ferro circulantes, havendo aumento dos níveis de ferro elas estimulam a síntese pelo fígado que inibe a absorção do ferro intestinal e diminui a liberação pelos macrófagos, porém na HH há uma redução na síntese da HPN que faz com não ocorra a inibição da absorção intestinal. Assim há o aumento continuado da absorção intestinal e liberação aumentada pelos macrófagos, como em situações de hipóxia, como este não é o caso ocorre o acúmulo patológico do íon. Os locais onde há maior acúmulo férrico são o fígado, baço, miocárdio, pâncreas, hipófise e articulações (CANÇADO, R.D.; et al, 2010; GROTTTO, H.Z.W.; et al, 2010).

Uma hipótese é de que a proteína HFE associada a beta₂-microglobulina se liga ao TfR reduzindo a sua afinidade com a transferrina, controlando a entrada de ferro no organismo. Sugere-

se que a interação anômala entre TfR e HFE na membrana basolateral dos enterócitos acarretaria no aumento de absorção intestinal, conseqüentemente na sobrecarga férrica; a outra é a de regulação da HPN também explicada aqui (SANTOS, P. C. J. L.; et al, 2009).

Acredita-se que há problemas tanto na captação quanto no transporte e armazenamento, implicando TfR e ferritina, então portadores de HH expressam estes de forma acentuada facilitando a entrada do ferro nas células. O ferro livre, NTBI, é o que está relacionado à toxicidade, com a mutação ainda pouco esclarecida, se sabe que a capacidade da ST de armazenamento é ultrapassada e o íon fica livre no plasma conseguindo penetrar mais fácil e rápido nas células do que quando ligado a Tf. O NTBI é um catalisador de reações oxidativas e sintetizador de radicais superóxidos e radicais hidroxilas livres que causa danos às membranas de diversas organelas pela peroxidação lipídica causada pela conversão do superóxido em peróxido de hidrogênio (H₂O₂), conseqüentemente haverá dano celular, fibrose reativa, esclerose e insuficiência funcional (CANÇADO, R.D.; et al, 2010; AYMONE, W.C., et al, 2013).

A síntese destes radicais livres em pacientes com HH leva a uma produção aumentada de colágeno no interior dos lipócitos hepáticos que são substituídos gradativamente por fibrose em órgãos parenquimatosos onde há o maior acúmulo do ferro. A existência de fatores como consumo alcoólico excessivo, infecções por HCV e hepatopatia crônica são agravantes do processo acelerando-o. Uma vez que o ferro está envolvido no percurso imune de neutrófilos e macrófagos, a sobrecarga pode levar a disfunção dos linfócitos NK, diminuição da citotoxicidade dos neutrófilos e mudar a proporção de linfócitos T CD4 e CD (CANÇADO, R.D.; et al, 2010; AYMONE, W.C.; et al, 2013).

As queixas mais relatadas são fadiga, artralgia/artrite, dor abdominal, diminuição da libido, impotência sexual, amenorreia, perda de peso, letargia e astenia. Os sinais clínicos mais frequentes são hepatomegalia, hiperpigmentação da pele, hipogonadismo, artropatia, esplenomegalia, chegando à diabetes mellitus, cirrose hepática, miocardiopatia e/ou arritmia, hipogonadismo, cirrose hepática, carcinoma hepatocelular e risco aumentado para infecções bacterianas, no entanto a maioria das complicações são distúrbios primários comuns e inespecíficos podendo o a sobrecarga de ferro passar despercebido na maioria dos estágios citados (HANSON, E.H.; et al, 2000; AYMONE, W.C.; et al, 2013).

O fígado é o primeiro órgão afetado e 95% dos sintomáticos apresentam hepatomegalia, que costuma preceder alterações nos testes de função hepática, como AST e ALT, e sintomas. Um estudo relatou que probandos não cirróticos relataram fraqueza, letargia e perda de libido com maior frequência que os cirróticos, mas a dor abdominal foi mais frequente em cirróticos; esta dor possui

caráter crônico e localiza-se na região epigástrica ou no hipocôndrio direito; a proporção de pacientes cirróticos na pesquisa clínica foi de 22 a 60%. A hepatomegalia pode evoluir para esteatose hepática, fibrose, cirrose e carcinoma hepatocelular, a cirrose é um dos principais fatores para desenvolvimento do carcinoma hepatocelular. O câncer hepático é uma complicação frequente em pacientes com HH e o carcinoma hepatocelular primário chega a ser 200 vezes mais comum, sendo responsável por cerca de 30 a 45% das mortes entre portadores de HHC, em pacientes com este câncer a prevalência foi de 11 a 15%. No entanto já foram relatados casos de pacientes com HH e carcinoma hepatocelular sem cirrose, observando-se aumento na frequência de colangiocarcinoma (HANSON, E.H.; et al, 2000; AYMONE, W.C.; et al, 2013).

Outra importante complicação da HH é o comprometimento cardíaco sendo a principal causa de morbimortalidade mesmo com baixa incidência, cerca de 15%, no qual apresentam sobrevida de um ano após diagnóstico sem tratamento. Envolve principalmente disfunção diastólica, insuficiência cardíaca global, aumento de arritmias. As arritmias incluem extrassístoles ventriculares, taquicardias supraventriculares e ventriculares, fibrilação ventricular e podem ter variados graus de bloqueio (IGLESIAS, C.P.K.; et al, 2018; AYMONE, W.C.; et al, 2013).

O principal distúrbio endócrino encontrado na HH é o diabetes *mellitus* acometendo de 30 a 60% dos pacientes e piorando o prognóstico. Embora pouco elucidado, acredita-se que o acúmulo do ferro nas células beta pancreáticas cause danos celulares e resistência à insulina, diminuindo também a secreção da mesma. Em estado pré-cirrótico 20% dos pacientes possuem hiperglicemia e em presença de cirrose 70%. A segunda endocrinopatia mais frequente é o hipogonadismo hipogonadotrópico, causado pela deficiência de gonadotrofina resultado da deposição de ferro na hipófise ou hipotálamo. Distúrbios na tireoide, paratireoide ou adrenal raramente são observados (HANSON, E.H.; et al, 2000; AYMONE, W.C.; et al, 2013).

A hiperpigmentação cutânea aparece em 27 a 85% dos doentes, resultado do aumento da melanina e ferro na pele, ocorre na maioria dos sintomáticos em fases mais avançadas da patologia. É mais generalizada e difusa, mas pode ser mais pronunciada na face, pescoço, dorso da mão, antebraços, pernas, região genital e em cicatrizes. Distrofia das unhas, perda de pelos pelo corpo e atrofia da pele também podem ocorrer (HANSON, E.H.; et al, 2000; AYMONE, W.C.; et al, 2013).

As artropatias ocorrem em 20 a 70% dos sintomáticos, podendo afetar o segundo e terceiro metacarpo, punho, ombro, joelhos e pés. Os metacarpos estão frequentemente rígidos e dolorosos associados a pequenos cistos com osteófitos em forma de gancho; os punhos, joelhos, quadris e outras articulações são decorrentes da deposição de pirofosfato de cálcio com condrocalcinose que ocorre

em 36 a 72% dos casos; a condrocalcinose é radiologicamente semelhante à osteoartrite degenerativa. As artropatias podem surgir em qualquer fase da patologia, podendo surgir ou agravar mesmo após o tratamento da sobrecarga; são degenerativas e não inflamatórias, podendo levar a uma intensa destruição articular (HANSON, E.H.; et al, 2000; AYMONE, W.C.; et al, 2013).

Os sintomas aparecem entre a quarta e quinta década de vida, sendo de 5 a 10 anos mais tardio em mulheres devido à lactação, gravidez e ciclo menstrual, os homens têm maior propensão a desenvolver a forma clínica da doença. A apresentação clínica também varia de acordo com o sexo, sendo fadiga, artralgia e hiperpigmentação mais frequente em mulheres e os homens com maior frequência de doença hepática. A sobrevida de pacientes sintomáticos é mais baixa que da população geral, porém ainda não bem esclarecida, mas se o tratamento foi iniciado antes do surgimento de cirrose esta passa a ser considerada igual à da população geral (HANSON, E.H.; et al, 2000).

5.5 Diagnóstico

Até 1990 o diagnóstico de sobrecarga era realizado através de biopsia hepática e achado histológico, ainda hoje é considerado como padrão ouro na detecção da sobrecarga, pois possibilita, além da detecção histológica do aumento e dosagem da concentração de ferro, a avaliação do grau de lesão já ocasionada, também é o método mais confiável para estabelecer a presença de cirrose e associar ao prognóstico de carcinoma. Em pacientes com HH é comum encontrar graus III e IV de presença férrica, graduações menos intensas também podem ser encontradas em estágios iniciais da doença. O índice hepático de ferro, valor do ferro hepático dividido pela idade, superiores a 1,9 são encontrados em 85 a 90% dos pacientes com HH, este achado em biopsia somado a presença da mutação no HFE, especialmente C282Y/C282Y, já confirma o diagnóstico (SANTOS, P. C. J. L.; et al, 2009).

Atualmente, devido ao caráter invasivo da biopsia e seus riscos associados são utilizados métodos bioquímicos de detecção bem como o diagnóstico molecular confirmatório. Duas dosagens consecutivas de saturação de transferrina (ST) com valor acima de 45%, ou >50% em mulheres e >60% em homens; ferritina >200 mg/ml em mulheres e >300 mg/ml em homens, e a presença da mutação C282Y já confirmam o diagnóstico de HH. A pesquisa molecular do HFE é indicada para pacientes com dosagens de ferritina e ST persistentemente elevados, com aumento do ferro tecidual e para parentes de primeiro grau de indivíduos já diagnosticados (SANTOS, P. C. J. L.; et al, 2009; CANÇADO, R.D.; et al, 2010).

A ST é o primeiro parâmetro laboratorial alterado, sendo também barato, de fácil mensuração e mais sensível na avaliação do acúmulo de ferro. Ao exceder 50% em mulheres e 60% em homens ele tem 92% de sensibilidade, 93% de especificidade e valor preditivo positivo de 86%. A ST é importante na detecção precoce e se eleva antes do aparecimento de sintomas e sinais relativos à sobrecarga (AYMONE, W.C.; et al, 2013; CANÇADO, R.D.; et al, 2010).

A ferritina quando constantemente elevada é associada aos sinais e sintomas clínicos da patologia, além disso, tem valor preditivo no que diz respeito a danos hepáticos; quando a dosagem for igual ou superior a 1.000 mg/ml é considerado extremamente provável a presença de fibrose hepática. Nestes casos e caso haja aumento de transaminases ou hepatomegalia a biópsia é recomendada para avaliar a extensão dos danos ao fígado. Este tipo de exame histológico é essencial na confirmação de sobrecarga, identificar o padrão de distribuição periportal e hepatocítica dos depósitos de ferro, avaliar semiquantitativamente o excesso, identificar a presença de fibrose ou cirrose e detectar lesões malignas potenciais (AYMONE, W.C.; et al, 2013; CANÇADO, R.D.; et al, 2010).

A Ressonância Magnética Nuclear (RNM) tornou-se um importante aliado no diagnóstico de sobrecarga, permitindo a quantificação indireta do conteúdo do ferro em diferentes órgãos além de não ser invasiva, no entanto apresenta baixa sensibilidade quando as concentrações não são elevadas. Atualmente, na Europa e EUA é o exame de preferência para diagnóstico e acompanhamento de pacientes com sobrecarga transfusional. A estimativa de concentração hepática de ferro pode ser realizada por tomografia computadorizada. Nos doentes com cirrose e carcinoma hepatocelular concomitantemente é indicado realizar semestralmente um screening com ultrassom e α -fetoproteína (AYMONE, W.C.; et al, 2013; CANÇADO, R.D.; et al, 2010).

O diagnóstico molecular é indicado em dosagens elevadas de ST e ferritina, manifestações inexplicáveis de doença hepática, diabetes mellitus tipo 2 com hepatomegalia, elevação de enzimas hepáticas, artropatias precoces, cardiopatias atípicas, pacientes de primeiro grau e disfunções sexuais precoces. A presença da mutação indica a alteração genética e maior predisposição ao desenvolvimento do fenótipo da doença, mas por si só não diagnostica HH, pois a penetrância alélica e a expressão fenotípica são baixas, não sendo possível prever quem desenvolverá o quadro clínico. O maior risco está relacionado a mutação em homozigose de C282Y e intermediário para C282Y/H63D ou H63D/H63D e baixo para os genótipos C282Y/WT e H63D/WT, sendo caracterizados como portadores e quando associados a fatores ambientais tem maior predisposição as complicações (SANTOS, P. C. J. L.; et al, 2009; CANÇADO, R.D.; et al, 2010).

Em indivíduos obesos ou com quadro inflamatório a ST pode aparecer normal ou diminuída, nestes casos a dosagem da proteína C reativa auxilia na confirmação de inflamação se elevada. A ferritina também pode estar elevada sem que ocorra a sobrecarga, assim a ST continua normal, ocorre em casos de doença inflamatória ou infecciosa, necrose hepatocelular, hepatites virais, alcoolismo, síndromes metabólicas e neoplasias, entre outros. A constatação de sobrecarga sem mutação no HFE, embora pouco frequente, possa ocorrer e outras causas devem ser investigadas. Se o paciente tiver menos de 30 anos é provável mutação no gene da hemojuvelina ou hepcidina, se tiver mais de 30 anos pode ser mutação no gene da ferroportina ou do Tfr₂. O diagnóstico precoce minimiza a progressão e as complicações da HH, e mesmo que o diagnóstico genotípico seja de difícil detecção o tratamento deve ser iniciado assim que constatada a sobrecarga (AYMONE, W.C.; et al, 2013; CANÇADO, R.D.; et al, 2010).

5.6 Tratamento

O tratamento baseia-se na remoção do excesso de ferro, uma vez que não há via fisiológica para este, o mais utilizado é a flebotomia terapêutica, que é seguro, econômico e eficaz. Deve ser iniciado assim que constatado a sobrecarga, em especial antes de desenvolver diabetes e cirrose, se iniciado antes do desenvolvimento de cirrose a sobrevida dos pacientes tornam-se semelhantes à de indivíduos normais. A flebotomia, popularmente conhecida por sangria, consiste na remoção de 350 a 500 ml de sangue periférico, representando de 200 a 250 mg de ferro. O intervalo varia de acordo com a resposta e tolerância do paciente, variando de uma ou duas vezes por semana ou quinzenal, durando meses ou até anos até que os estoques em excesso se esgotem, ocorrendo com o aparecimento de anemia microcítica, Hb \cong 11 g/dL e VCM < 75 fL. O objetivo é atingir ferritina <50 ng/ml e a ST <45% (AYMONE, W.C.; et al, 2013; CANÇADO, R.D.; et al, 2010; SANTOS, P. C. J. L.; et al, 2009).

O valor do hematócrito (Ht) antes de cada flebotomia não podendo cair mais de 20% em relação a última dosagem, a Hb também deve ser dosada antes de cada procedimento mantendo-se na faixa de 11 g/dL sem elevação imediata, os níveis de ferritina e ST devem ser verificados a cada 3 ou 4 flebotomias. A partir da estabilização dos níveis séricos de ferritina e depleção do excesso, a flebotomia deve ser realizada em intervalos regulares que variam entre os pacientes, a fim de manter os valores de ferritina entre 100 e 200 ng/ml e os de ST entre 20 e 30%. A média anual para o

procedimento é de 4 a 6 vezes no homem e 2 a 4 nas mulheres (AYMONE, W.C.; et al, 2013; CANÇADO, R.D.; et al, 2010).

Alguns pacientes não toleram a flebotomia devido a anemias, disfunções cardíacas ou cirrose avançada, pode-se fazer uso de quelantes férricos, como a deferoxamina. Ela deve ser administrada por via subcutânea por infusão contínua, no entanto existem complicações com o uso crônico dela, como lesões retinianas e de nervo acústico. Outros quelantes foram testados, a deferiprona possui um efeito colateral significativo, agranulocitose, com risco maior que a flebotomia, e recentemente o deferasirox com poucos danos colaterais, sendo uma boa alternativa a flebotomia em alguns casos (AYMONE, W.C.; et al, 2013).

A associação de eritrocitaférese e eritropoetina para remoção rápida de ferro tem eficácia comprovada, embora pouco estudado. É um esquema mais complexo e caro, mas pode ser alternativa para pacientes com complicações graves que requerem tratamento intensivo (CANÇADO, R.D.; et al, 2010).

Há orientação nutricional para os pacientes com HH, sendo recomendado uma dieta balanceada e evitar o consumo de compostos com alto teor de ferro, como carne vermelha e bife de fígado; frutos do mar, como ostras cruas devido a possível contaminação por *Vibrio vulnificus* (que pode ser fatal); compostos a base de vitamina C, uma vez que ela aumenta a absorção de ferro; ingestão de bebidas alcoólicas. Encoraja-se uma dieta rica em proteínas, vitamina B12 e folato, que acelera a eritropoese intensificada pela flebotomia (AYMONE, W.C.; et al, 2013; CANÇADO, R.D.; et al, 2010).

Os resultados pós-flebotomia mais esperados são melhora de astenia, da hiperpigmentação da pele, das alterações hepáticas e função cardíaca, a artralgia tem piora após as primeiras sessões, com melhora posterior, controle da diabete e, às vezes, redução do uso de insulina. As principais causas de morte em pacientes com HH não tratados são: insuficiência cardíaca e/ou arritmias, insuficiência hepática e carcinoma hepatocelular (CANÇADO, R.D.; et al, 2010).

3 METODOLOGIA

Trata-se de um estudo observacional do tipo transversal e retrospectivo com resultados analíticos laboratoriais para avaliar a frequência da mutação no gene HFE além da prevalência de cada genótipo. Os dados foram extraídos do sistema Tasy, utilizado em um laboratório hospitalar na

Serra Gaúcha, o qual disponibilizou acesso ao banco de dados para realização da presente pesquisa. As variáveis sexo, idade, grupo étnico, naturalidade, hemoglobina, hematócrito, resultado do exame molécula (PCR) para mutação no HFE, ferritina, saturação da transferrina foram transcritos para planilha Excel na qual não foi mais viável a identificação dos pacientes. Os testes moleculares considerados foram os realizados entre janeiro de 2015 a dezembro de 2019, totalizando 22 pacientes, dos quais 5 foram excluídos por não conter dados de ferritina. Os resultados obtidos foram relacionados a literatura existente acerca do tema valendo-se das bases de dados Scielo, PubMed e Science direct. Os dados foram transcritos para planilha do Excel, através da exportação para o SPSS foi realizado a análise estatísticas dos dados, testes qui-quadrado e de normalidade Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk.

A presente pesquisa segue as normativas e protocolos da Resolução nº466 de 12 de dezembro de 2012 do Ministério da Saúde no referente as questões éticas ao manejo e armazenamento de dados dos pacientes estudados, sendo todos os nomes e dados pessoais que possam identifica-los sendo omitidos, inclusive das tabelas utilizadas para execução do projeto. Esta pesquisa está amparada pela submissão a Plataforma Brasil, avaliada pelo CEP da instituição coparticipe e do Centro Universitário da Serra Gaúcha- FSG, sob parecer nº 4.316.732.

4 ANÁLISE E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Foram estudados 22 pacientes que realizaram o teste no período pesquisado, 17, 77,3%, eram do sexo masculino, dos quais 13 positivaram para mutação HFE; e 5, 22,7%, do feminino, das quais 3 eram positivos. Quanto a idade 18,2% (4) dos pacientes tinham 38 anos, com idade mínima de 27 anos e máxima de 82 anos. Dois pacientes não haviam realizado hemograma no laboratório, dos demais a Hemoglobina manteve a média de 15 g/dl, com uma mínima de 11,0 e máxima de 18,0 g/dl; o Hematócrito apresentou média de 43,6%, mínima de 34 e máxima de 50%.

Quadro 1: Frequência da mutação do gene HFE em pacientes atendidos entre 01/2015 a 12/2019 em um laboratório da serra

HFE	Frequência	Porcentagem
Negativo	6	27,3
Heterozigose H63D	12	54,5
Heterozigose C282Y	2	9,1
Homozigose S65C	1	4,5
H63D/S65C	1	4,5
Total	22	100,0

Quanto ao diagnóstico molecular de HFE 6 pacientes tiveram resultados negativos e 72,7% tiveram alguma mutação detectada, conforme se observa no quadro 1, no quadro 2 é possível visualizar a mutação com maior ocorrência para cada gênero. A etnia dos pacientes teve pouca variação não fugindo do esperado, com 20 pacientes de etnia Branca, 1 negra e 1 parda. Assim como a naturalidade em sua maioria caxienses, 59,1%, as demais foram: Farroupilha, Três Passos, Cacique Doble, Nova Prata, Flores da Cunha e Planalto. Três pacientes não apresentavam este dado. A dosagem de ferritina foi apresentada em 17 pacientes com valor médio de 679,6 ng/ml, mínima de 12,0 ng/ml, máxima de 1512,0 ng/ml e desvio padrão de 422,8. Com exceção dos dois mínimos 12 e 93,0 ng/ml, todos os resultados foram acima de 123 ng/ml. O Índice de Saturação da Transferrina foi dosado em apenas 12 pacientes, com mínima de 24%, máxima de 64% e média de 42,5%. Apenas dois pacientes tiveram o mesmo resultado, 44%, os demais se mantiveram em torno dos valores descritos.

Quadro 2: Frequência da mutações do HFE de acordo com o gênero dos pacientes positivos na serra gaúcha.

Sexo	HFE					Total
	Negativo	Hetero H63D	Hetero C282Y	Homo S65C	H63D/S65C	
Masculino	4	9	2	1	1	17
Feminino	2	3	0	0	0	5
Total	6	12	2	1	1	22

Foram realizados os testes de normalidade Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk, porém devido ao banco de dados com n reduzido os testes não se mostraram eficientes, não podendo comprovar a normalidade ou não dos dados. Foram realizadas análises qui-quadrado entre as variáveis, porém nenhuma apresentou relevância estatística, $p \leq 0,05$, mesmo quando já comprovado a correlação dos testes, como sexo e presença de mutação HFE; esta divergência também pode se dar pelo tamanho da amostra, portanto os dados serão discutidos considerando os dados de frequências estatísticas.

A pesquisa realizada mostrou que a maior prevalência de positividade de Hemocromatose Hereditária pela mutação HFE são em pacientes do sexo masculino, sendo 13 dos 16 casos positivos, o que já foi descrito de forma unânime na literatura. Cançado et al⁽⁶⁾ publicou em 2007 estudo em que 50% dos participantes tinha entre 31 e 50 anos, embora 36,2% dos estudados tenham se mantido nesta faixa-etária, a maior frequência foi aos 38 anos com 4 pacientes, mas as médias foram próximas. Neste mesmo estudo de Cançado et al⁽⁶⁾ a frequência de mutação foi 76% assemelhando-se ao atual com 72,7% mesmo em populações e amostras distintas; entretanto para Cançado et al⁽⁶⁾ em São Paulo não houve nenhum paciente com a mutação S65C, enquanto na Serra Gaúcha houve um paciente em homozigose para a mutação e um em heterozigose com H63D (H63D/S65C). Para Cançado et al⁽⁶⁾ a mutação mais frequente foi C282Y, mas no presente estudo a heterozigose para H63D se mostrou mais frequente. O que estaria de acordo com estimativas realizadas para o Brasil, como no estudo de Herkenhoff et al⁽⁵⁾, realizado no Sul e em São Paulo, no qual houve frequência de 33,33% de heterozigose para H63D. Quando se trata de pacientes saudáveis é mais comum encontrar este tipo de mutação fora da Europa, a C282Y sendo mais comum quando investigados pacientes considerados doentes, como se vê no estudo de Cançado et al⁽⁶⁾ já citado, mas segundo Bueno et al⁽⁸⁾ em população italiana também deveria ter um índice de frequência elevado para a mutação.

Quanto a naturalidade dos pacientes a grande maioria é natural de Caxias do Sul ou regiões próximas e 90,9% deles se autoconsideram brancos, sendo um pardo e um negro, estes últimos tiveram mutação heterozigótica para H63D; o que corrobora a percepção de que é comum em descendentes de europeus, embora a presença em outros grupos étnicos não seja descartada, em estudo de Cançado e Chittone⁽⁴⁾ no qual há um compilado de estudos produzidos no Brasil há presença mesmo que muito baixa de mutações H63D e C282Y em população negra e parda, em proporções semelhantes a encontradas na presente pesquisa.

Dois casos apresentados na pesquisa chamaram a atenção pela baixa dosagem de ferritina, 12,0 ng/ml e 93,0 ng/ml, com heterozigose para H63D detectada, este é um padrão incomum entre os

pacientes, porém eles podem ter sido submetidos a flebotomia terapêutica mesmo antes do resultado do teste molecular, que pode ser indicado pelo médico diante de repetidas dosagens de ferro e ferritina elevados, assim o teste molecular pode ter sido realizado posteriormente para confirmação diagnóstica e dosagem de ferritina, IST, ferro e hemograma para acompanhamento da sobrecarga, conforme diretrizes terapêutica pré-estabelecidas pela Associação de Hematologia e Hemoterapia⁽⁹⁾.

As demais dosagens de ferritina se mostraram bastante elevadas com média de 679,0 ng/ml, o que pode ser considerado normal para a patologia e anterior ao início de tratamento adequado. O índice de saturação de transferrina por outro lado, mostrou-se relativamente normal com apenas 3 pacientes acima de 50%, vale lembrar que apenas 12 dos probandos continham esta informação. Quanto a hemoglobina e hematócrito, alguns pacientes tiveram valores um pouco acima dos parâmetros considerados normais, mas nenhum apresentou anemia ou valores preocupantes mesmo para a patologia e questão.

Castilhos et al⁽¹⁰⁾ em estudo publicado em 2017 e realizado na mesma região do atual obteve dados para sexo e idade muito próximos, porém com uma amostra mais significativa. Entretanto eles relataram maior índice de pacientes normais 54,4% contra 27,3% dos encontrados nesta pesquisa. O segundo maior percentual para Castilhos et al⁽¹⁰⁾ foi de heterozigose para H63D (31%), seguido por heterozigose de C282Y (6,2%), enquanto apenas 1,1% apresentou homozigose para C282Y, eles não investigaram S65C. Entretanto no presente estudo o maior percentual foi de H63D selvagem com 54,5% seguido de pacientes normais e 9,1% C282Y selvagem; não foi registrado homozigose para C282Y, apenas para S65C que correspondeu a 4,5% da amostra. Embora com estas variações os dados foram contabilizados próximos seguindo uma mesma linha já traçada para o perfil da patologia; como descrito por Ferreira et al⁽¹¹⁾, Bueno et al⁽⁸⁾ e Cançado em mais de uma oportunidade.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar de possuir uma amostra com baixo número de participantes e, portanto, diversos dados não poderem ser diretamente relacionados, as frequências encontradas isoladamente puderam indicar um padrão característico da hemocromatose hereditária por mutação no gene HFE em pacientes da Serra Gaúcha e corroborar dados tidos por estimativas nacionais e atingindo similaridade com estudo antes publicado na mesma região.

A estatística encontrada para H63D demonstrou não apenas a presença deste genótipo na população como sua manifestação clínica nos pacientes, visível especialmente na ferritina elevada,

contrapondo a ideia de que a C282Y deveria ser a mutação mais preocupante sendo ela com pior prognóstico apenas.

Sugere-se que sejam investigados dados de outros laboratórios da região afim de obter maiores informações sobre a HH na Serra Gaúcha uma vez que mesmo com um n tão baixo, diversas estatísticas reveladas no país se mostraram presentes e puderam ser confirmadas pelo estudo.

Os pesquisadores assumem não haver conflito de interesses e não obtiveram suporte financeiro de nenhuma entidade ou pessoa física, além dos pesquisadores principais.

6 REFERÊNCIAS

- (1) Hanson EH, Imperatore G, Burke W. Human genome epidemiology (HuGE) Reviews. HFE Gene and Hereditary hemochromatosis: A HuGE Review. **American Journal of Epidemiology**. v. 154, n 3, 154: 193-206, 2001.
- (2) Martinelli ALC. Hemocromatose hereditária: muito além do HFE. **Sociedade Brasileira de Hepatologia**. Julho/2011.
- (3) Aymone WC, Valiati V, Resem MGFS, Peres W. Hemocromatose Hereditária. **Jornal Brasileiro de Medicina**. v. nov/ dez, vol 101, nº6, 2013.
- (4) Cançado RD, Chiattoni CS. Visão atual da hemocromatose hereditária. **Ver. Bras. Hematol. Hemoter**. 2010; 32(6): 469-475
- (5) Herkenhoff ME, Pitlovanciv AK, Remualdo VR. Prevalence of C282Y and H63D mutations in the HFE gene in patients from São Paulo and Southern Brazil. **Jornal Brasileiro de Patologia Medica Laboratorial**. v.52, n 1, p. 21-24, fev 2016.
- (6) Cançado RD, Guglielmi ACO, Vergueiro CSV, Rolim EG, Figueiredo MS, Chiattoni CS. Estudo das mutações C282Y, H63D e S65C do gene HFE em doentes brasileiros com sobrecarga de ferro. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter**. 2007; 29(4):351-360.

- (7) Santos PCJL, Cançado RD, Terada CT, Shinohara EMG. Alterações moleculares associadas a hemocromatose hereditária. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. 31(3): 192-202, 2009.
- (8) Bueno S, Duch CR, Figueiredo MS. Mutations in the HFE gene (C282Y, H63D, S65C) in a Brazilian population. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter**. 2006; 28(4): 293-295
- (9) Associação Brasileira de Hematologia e Hemoterapia. Acesso <<https://abhh.org.br/?s=hemocromatose>>.
- (10) Castilhos AC, Canci BT, Alves MK, Goulart KOB. Hemocromatose hereditária: estudo de alterações laboratoriais relacionadas com polimorfismos. **J. Bras. Patol. Med. Lab**. 2017;53(4):227-232
- (11) Ferreira ACS, Oliveira VC, Caxito FA, Gomes KB, Castro AM, Pardini VC. Prevalence of C282Y and H63D mutations in the HFE gene of Brazilian individuals with clinical suspicion of hereditary hemochromatosis. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter**. 2008; 30(5): 379-383