

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS - UFAL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

LAÍS FLÁVIA VIEIRA GOES

**Estudo das Frequências das Mutações C282Y e H63D do Gene HFE e de
Moduladores de Gravidade da Hemocromatose Hereditária em Uma Amostra
da População de Alagoas**

Maceió
2013

LAÍS FLÁVIA VIEIRA GOES

Estudo das Frequências das Mutações C282Y e H63D do Gene HFE e de Moduladores de Gravidade da Hemocromatose Hereditária em Uma Amostra da População de Alagoas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Dr. Tiago Gomes de Andrade

Maceió
2013

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas

Biblioteca Central

Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecária Responsável: Fabiana Camargo dos Santos

G598e Goes, Laís Flávia Vieira.

Estudo das frequências das mutações C282Y e H63D do gene HFE e de moduladores de gravidade da hemocromatose hereditária em uma amostra da população / Laís Flávia Vieira Goes. – 2013.

93 f. : il.

Orientador: Tiago Gomes de Andrade.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Maceió, 2013.

Bibliografia: f. 73-82.

Apêndices: f. 83-90.

Anexos: f. 91-93.

1. Gene HFE – Mutações. 2. Ferritina sérica. 3. Ferro – Absorção.
4. Mutação C282Y. 5. Mutação H63D. I. Título.

CDU: 616.152:616-056.7



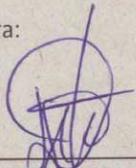
Universidade Federal de Alagoas
Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

ICBS - UFAL – Campus A. C. Simões
Av. Lourival Melo Mota, 5/N
Cidade Universitária – Maceió-AL
CEP: 57072-900
E-mail: ppgcs9@gmail.com
Fone: 82 3214 1850

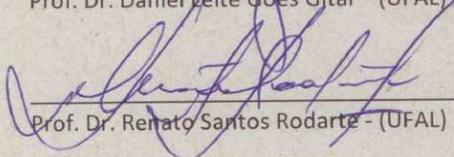
Defesa da Dissertação de Mestrado da mestranda Laís Flávia Vieira Goes, intitulada: “Estudo das frequências das mutações C282Y e H63D do gene HFE e de moduladores de gravidade da hemocromatose hereditária em uma amostra da população de Alagoas”, orientada pelo Prof. Dr. Tiago Gomes de Andrade, apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Alagoas, em 16 de maio de 2013.

Os membros da Banca Examinadora consideraram a candidata Aprovada.

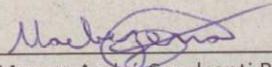
Banca Examinadora:



Prof. Dr. Daniel Leite Góes Gitaí – (UFAL)



Prof. Dr. Renato Santos Rodarte – (UFAL)



Prof. Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra – (UFPE)

A Deus que me permitiu alcançar essa vitória, iluminando os meus caminhos com a
Sua força e Sua graça.

A minha mãe e aos meus irmãos, Murilo e Larissa, pela confiança e por não
medirem esforços para tornarem meu caminho cada vez mais leve.

Ao meu noivo, Adelson, pelo carinho, compreensão e o incentivo.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Tiago que é um exemplo de orientador e pesquisador e que desde o princípio acreditou e confiou em meu trabalho. Te agradeço imensuravelmente pela oportunidade, pela paciência e pelos aprendizados que me proporcionou.

Ao meu pai por ter me proporcionado o acesso ao conhecimento e ao estudo, em busca de dias melhores.

Aos amigos do LABMEG e do LBCM, Aline, Diego, Thalita, Bruna e Karol. Obrigada pela paciência, por estarem sempre disponíveis a me auxiliar e pelos diversos momentos de distração, que foram essenciais.

Aos professores Daniel Gitaí e Renato Rodart, por me acolherem no LBCM, quando enfrentamos dificuldades de acesso em nosso laboratório. Agradeço também pela grande contribuição científica em minha pesquisa em todos os momentos que precisei de um esclarecimento.

Ao Daniel Coimbra que sempre se dispôs a me auxiliar, principalmente na elaboração dos dados estatísticos de minha pesquisa. Você foi fundamental.

Aos meus tios, avós, primos, em especial, a tia Lúcia e a Bebel, que me impulsionaram em busca desse sonho.

Aos meus queridos amigos, Renata, Janayna, Ramon (in memoriam) Erika, Gilberto e Flávia pela torcida e palavras de força nos momentos difíceis.

Ao laboratório Lacel, em especial a Susy, a Gleyci, a Erlane, a Kariny e ao Michael. Obrigada por estarem sempre prontos a me ajudar em minha luta, pela compreensão e paciência.

Ao Márcio (LABCHAMA), seu incentivo e aprendizado foram fundamentais.

Ao Hemoar, Hemoal e Hemopac por permitirem o acesso aos pacientes que participaram desta pesquisa.

A todos os alunos e professores do Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde.

As agências de financiamento CAPES e FAPEAL.

“ Sabei que o SENHOR é Deus; foi ele que nos fez, e não nós a nós
mesmos; somos povo seu e ovelhas do seu pasto. Entrai
pelas portas dele com gratidão, e em seus átrios com louvor;
louvai-o, e bendizei o seu nome. ”

Salmos 100:3-4

RESUMO

A Hemocromatose Hereditária (HH) é uma doença autossômica recessiva com diagnóstico baseado principalmente na pesquisa de mutações no gene HFE (C282Y,H63D). É caracterizada pelo aumento da absorção intestinal de ferro, resultando no acúmulo deste em vários órgãos. A ausência de tratamento ou tratamento inadequado pode levar ao desenvolvimento de patologias mais graves associadas à doença e destruição de órgãos onde ocorre este depósito de ferro. A contribuição de cada genótipo para o desenvolvimento da patologia ainda é controverso e depende da interação com fatores moduladores de gravidade. Além disto, não existem estudos sobre a frequência das mutações associadas à HH em Alagoas. Desta forma, objetivou-se, neste trabalho, determinar a prevalência das mutações C282Y e H63D no gene HFE na população geral e suspeita de HH, e correlacionar os genótipos identificados com os sintomas clínicos e o perfil nutricional de pacientes com suspeita de hemocromatose hereditária (HH) no estado de Alagoas. Foram selecionados para a pesquisa um grupo de 164 pessoas para avaliação das frequências das mutações na população geral e um grupo de 97 pacientes com ferritina sérica aumentada em Alagoas, que são considerados suspeitos de HH. Em seus prontuários foram analisados os sintomas clínicos e os resultados laboratoriais de ferritina sérica, assim como, se estes desenvolveram alguma complicação mais grave da doença. Todos os suspeitos de HH responderam ao QFCA para avaliação de ingestão diária de ferro e consumo de álcool. As frequências genótípicas encontradas na população geral e suspeita foram 24,4% e 20,62% de heterozigotos H63D, 3% e 10,31% de heterozigotos C282Y, 3% e 2,06% de homozigotos H63D, 0,6% e 5,15% de heterozigotos compostos. Os principais sintomas relatados pelos pacientes foram fadiga, artralgia e diabetes. Os valores médios de ferritina para as mulheres foi menor que para os homens. Mais de 50% dos participantes são obesos e 22,86% destes desenvolveram esteatose hepática. Quanto a ingestão diária de ferro, os homens apresentaram ingestão mais elevada que as mulheres. Foi observada uma correlação positiva entre ingestão de álcool e níveis de ferritina. Observou-se que a frequência genotípica para heterozigotos H63D, tanto na população geral quanto suspeita de HH, é maior que para os demais genótipos. Resultados iguais a estes foram encontrados em outros trabalhos publicados em todo o mundo, onde na população geral prevalece a mutação H63D, apresentando baixa frequência de C282Y. Porém entre os suspeitos de HH, encontramos resultados já relatados na literatura, que menciona a mutação C282Y, principalmente os homozigotos, como a mais frequente. Entretanto, a frequência da mutação C282Y é proporcionalmente maior na população suspeita de HH que na população geral. Além disto, identificamos nesta pesquisa que os fatores ambientais moduladores (ingestão de ferro, álcool, obesidade, ingestão de vitamina C) da HH podem estar atuando como agravantes da doença em portadores das mutações ou naqueles pacientes sem diagnóstico genético.

Palavras chave: Gene HFE. Ferritina. Ferro. C282Y. H63D.

ABSTRACT

The hereditary hemochromatosis is an autosomal recessive disease, with diagnosis based primarily on the research of HFE gene mutations (C282Y,H63D). It is characterized by increased intestinal iron absorption, resulting in accumulation in various organs. The absence of treatment or inadequate treatment, can lead to the development of severe pathologies associated disease and organ damage occurs where this iron is deposit. The contribution of each genotype for the development of pathology is still controversial and depends on factors interacts with modulators of gravity. Further, there aren't studies on the frequency of mutations associated with HH in Alagoas. With this, aimed to determine the prevalence of C282Y and H63D the HFE gene in the general population and suspicious HH, and correlate genotypes identified with clinical symptoms and the nutritional profile of the patients with suspicions of hereditary hemochromatosis (HH) in the state of Alagoas. Were selected for the search a group of 164 individuals for evaluation of the mutation in the general population and a group of 97 patients with increased serum ferritin in Alagoas, who are considered suspected of HH. In their records, were analyzed clinical symptoms and laboratory results of serum ferritin, as, if these developed anything most serious complication of the disease. All HH suspicious answered the FFQ for evaluation of daily intake of iron and alcohol consumption. The genotypic frequencies found in the general population and suspicious were 24,4% and 20,62% heterozygotes for H63D, 3% and 10,31% heterozygotes for C282Y, 3% and 2,06% homozygotes for H63D, 0,6% and 5,15% for composed heterozygotes. The main symptoms reported by patients were fatigue, arthralgia and diabetes. The mean values of ferritin for women were lower than for men. More of 50% of the participants are obese and 22.86% of these developed hepatic steatosis. As the daily intake of iron, the men presented higher intake than women. It was observed a positive correlation between alcohol intake and ferritin. It was observed that the genotype frequency for heterozygotes H63D, both in the general population as suspicious of HH, it is greater than for the other genotypes. Results similar were found in other studies in all the word, where in the general populations, prevails the H63D mutation, presenting low frequency of C282Y. But among those suspected of HH, found results reported in the literature, that mentions of the C282Y mutation, principally the homozygotes, the most frequent. However, the frequency of the C282Y mutation is proportionally higher in the suspected HH than in the general population. Furthermore, we identified in this research that environmental factors modulators (iron intake, alcohol, obesity, intake of vitamin C) of the HH may be acting as aggravating of the disease in patients with mutations or in those patients without genetic diagnosis.

Keywords: HFE gene. Ferritin. Iron. C282Y. H63D

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1 - Frequência dos genótipos para as mutações do gene HFE na população geral do Brasil.....30
- Quadro 2 - Produtos obtidos após restrição para as duas mutações de acordo com os genótipos: normal, heterozigoto e homozigoto.....43

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Absorção intestinal de ferro.....	23
Figura 2 - Mecanismo de expressão de hepcidina.....	25
Figura 3 - Algoritmo proposto pela AASLD para diagnóstico e tratamento da HH.....	33
Figura 4 - Gel de agarose de 3,0% do resultado da restrição para a Mutação C282Y.....	43
Figura 5 - Gel de agarose de 3,0% do resultado da restrição para a mutação H63D.....	44
Figura 6 - Histograma e curva de distribuição dos dados em relação à ferritina.....	49
Figura 7 - Diferença entre os valores de ferritina para os homens e para as Mulheres.....	50
Figura 8 - Sintomas relatados pelos pacientes com HH.....	52
Figura 9 - Diagrama de dispersão de dados do genótipo C282Y/H63D quanto à ingestão de álcool e os níveis de ferritina.....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Frequências genótípicas dos pacientes com suspeita de HH e da população geral.....	47
Tabela 2 - Frequências das mutações que exibiram genótipos para a mutação H63D e/ou C282Y.....	47
Tabela 3 - Frequência dos genótipos de acordo com etnia na população geral.....	48
Tabela 4 - Frequência étnica para cada genótipo do gene HFE em suspeitos de HH.....	49
Tabela 5 - Média da dosagem de ferritina sérica em cada genótipo.....	51
Tabela 6 - Frequência dos níveis de ferritina.....	51
Tabela 7 - Frequência das complicações da HH encontradas entre os pacientes.....	52
Tabela 8 - Frequência de obesidade entre os genótipos da HH.....	53
Tabela 9 - Relação entre a ingestão de ferro e o valor médio de ferritina.....	54
Tabela 10 - Níveis de ingestão de ferro nos diferentes genótipos da HH.....	55
Tabela 11 - Níveis de ferritina e ferro sérico de pacientes obtidas próximo a aplicação do QFCA.....	56
Tabela 12 - Relação entre os genótipos com a ingestão de álcool e ferritina.....	57

Tabela 13 - Média da ingestão de vitamina C em cada grupo genotípico.....	58
Tabela 14 - Níveis de ingestão de vitamina C nos genótipos da HH.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AASLD	American Association for the Study of Liver Diseases
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotranferase
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BMPS	Bone Morphogenetic Proteins
BMP6	Bone Morphogenetic Proteins 6
Co	Cobalto
Cu	Cobre
Dcytb	Citocromo B Duodenal
dL	Decilitros
DMT1	Transportador de Metal Divalente
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
Fe	Ferro
Fe ²⁺	Ferro na forma ferroso
Fe ³⁺	Ferro na forma férrica
FPN	Ferroportina
GGT	Gama glutamil transferase
HAMP	Hepcidin Antimicrobial Peptide
HCP1	Proteína Carreadora do Heme 1
HFE	Hemochromatosis
HH	Hemocromatose Hereditária
HJV	Hemojuvelin
HLA	Antígenos Leucocitários Humanos

HPN	Hepcidina
IREG1	Transporte regulador do ferro 1
IRES	Elementos Responsivos do Ferro
IRPS	Proteínas Reguladoras de Ferro
IRP1	Proteína Reguladora de Ferro 1
IRP2	Proteína Reguladora de Ferro 2
JAK2	Janus Kinase
kDa	Quilodanton
Mg	Miligramas
µl	Microlitro
Mn ²⁺	Manganês
Ng	Nanograma
OMG	Organização Mundial de Saúde
Pb	Pares de bases
PCR	Polymerase Chain Reaction
QFCA	Questionário de Frequência de Consumo Alimentar
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RNA _m	RNA Mensageiro
RSMAD	Receptor Mothers against decapentaplegic homolog
SMAD1	Mothers against decapentaplegic homolog 1
SMAD4	Mothers against decapentaplegic homolog 4
SMAD5	Mothers against decapentaplegic homolog 5
SMAD8	Mothers against decapentaplegic homolog 8
SPSS	Statistical Package for Social Science for Windows
TAE	Tampão Tris-Acetato-EDTA

TF	Transferrina
Trf1	Receptor de Transferrina 1
Trf2	Receptor de Transferrina 2
WT	Wild type
Zn ²⁺	Zinco

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1	Metabolismo e Homeostase do Ferro.....	20
2.1.1	Absorção Intestinal do Ferro.....	20
2.1.2	Reciclagem de Hemácias.....	21
2.1.3	Transporte do Ferro.....	21
2.1.4	Armazenamento de ferro.....	22
2.1.5	Regulação da Absorção de Ferro.....	23
2.1.6	Patologias Associadas ao Ferro.....	26
2.2	Hemocromatose Hereditária.....	26
2.2.1	Mutações do Gene HFE.....	27
2.2.2	Frequências das Mutações C282Y e H63D no Mundo e no Brasil.....	29
2.2.2.1	População Geral.....	29
2.2.2.2	Pacientes com diagnóstico de Hemocromatose Hereditária.....	31
2.2.3	Diagnóstico da HH.....	31
2.2.4	Tratamento da HH.....	33
2.3	Moduladores de Gravidade da Hemocromatose Hereditária.....	33
2.3.1	Ingestão de Ferro.....	34
2.3.2	Ingestão de álcool.....	35
2.3.3	Obesidade e Esteatose.....	35
2.3.4	Variações Hormonais.....	36
2.3.5	Doenças hepáticas crônicas associadas a HH	36

2.4	Justificativa da pesquisa.....	37
3	OBJETIVOS.....	38
3.1	Objetivo geral.....	38
3.2	Objetivos específicos.....	38
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	39
4.1	Seleção de pacientes com suspeita de HH e composição da amostra para estudo de frequência das mutações na população geral.....	39
4.2	Avaliação Nutricional e Ingestão de Álcool	40
4.3	Extração de DNA.....	40
4.4	Determinação dos genótipos.....	41
4.5	Análise estatística.....	44
5	RESULTADOS.....	46
5.1	Investigação das Mutações C282Y e H63D nas Amostras da População Geral e com Suspeita de HH.....	46
5.2	Avaliação dos genótipos da HH em relação a etnia.....	48
5.3	Avaliação dos dados laboratoriais e sintomas clínicos em relação aos genótipos de HH.....	49
5.4	Avaliação da Esteatose Hepática e Obesidade em HH	53
5.5	Avaliação nutricional de ingestão de ferro.....	54
5.6	Avaliação da Ingestão de Álcool	56
5.7	Avaliação da Ingestão de Vitamina C	58
6	DISCUSSÃO.....	60
6.2	Investigação das Mutações C282Y e H63D nas Amostras da população Geral e com Suspeita de HH.....	62

6.3	Avaliação dos dados laboratoriais e sintomas clínicos em relação ao de HH.....,	65
6.4	Avaliação da Esteatose Hepática e Obesidade em HH.....	67
6.5	Avaliação nutricional de ingesta de ferro.....	67
6.6	Avaliação da Ingestão de Álcool.....	69
6.7	Avaliação da Ingestão de Vitamina C.....	70
7	CONCLUSÕES.....	72
	REFERÊNCIAS.....	73
	APÊNDICE.....	83
	ANEXO.....	91

1 INTRODUÇÃO

Considerada uma das doenças genéticas mais comuns, a Hemocromatose Hereditária (HH) tem seu diagnóstico baseado, muitas vezes, em sintomas clínicos e alterações laboratoriais, como aumento de ferro sérico, ferritina e saturação de transferrina. Sabe-se, no entanto, que esses resultados são insuficientes para diagnosticar se um paciente desenvolveu a Hemocromatose como consequência de uma alteração genética. Para confirmar a patologia, deve ser feito um estudo do gene HFE e outros genes associados aos distúrbios do metabolismo do ferro (HAMP, HJV, TRF1) e identificar se o paciente possui as mutações que causam a HH.

No Brasil, ainda são poucos os relatos de frequência das mutações responsáveis por esta doença. Além disso, apenas uma pequena parte da população com suspeita de HH tem acesso ao diagnóstico molecular. Com base em alguns estudos feitos em regiões brasileiras distintas, foram identificadas diferenças na prevalência dessas mutações. As diferentes frequências regionais ocorrem, possivelmente, devido às diferenças nas composições de grupos étnicos que compõem o país. Em Alagoas, não existem estudos publicados sobre a prevalência destas mutações.

Fatores como a dieta, onde há o aumento na ingestão de ferro, induz o surgimento dos sintomas da HH em pacientes com risco de desenvolvê-la. Além disso, a ingestão de álcool, obesidade, idade, sexo e a existência de outros alelos de HFE ou de outros genes como HAMP, TRF1 e HJV podem ser considerados importantes no desenvolvimento da HH, pois atuam como moduladores de gravidade e podendo acentuar as manifestações da doença.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a prevalência das principais mutações causadoras da HH, C282Y e H63D, na população geral e em pacientes que foram identificados por sintomatologia clínica e diagnóstico laboratorial com suspeita de HH. Além disso, avaliar a contribuição de potenciais moduladores de gravidade na manifestação clínica da doença nos pacientes estudados.

Nossos resultados corroboram outros estudos no Brasil com uma maior prevalência da mutação H63D, tanto na população geral, quanto em pacientes. Identificamos ainda que o grupo de pacientes, em geral, possui uma ingestão

excessiva de ferro, álcool, vitamina C e um índice aumentado de obesidade que podem estar associados com o quadro de hemocromatose apresentado.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Metabolismo e Homeostase do Ferro

O ferro é uma substância mineral essencial para o funcionamento celular da cadeia respiratória, síntese de ácidos nucleicos, nas reações de transferências de elétrons e para o metabolismo energético. Atua principalmente na síntese de hemoglobina dos eritrócitos, da mioglobina nos músculos e dos citocromos no fígado (DOMINGOS,2007).

O ferro pode ser encontrado na forma ferrosa (Fe^{2+}) ou férrica (Fe^{3+}), sendo oxidante ou redutor. No organismo, o mineral, na forma férrica ou ferrosa, pode estar ligado a proteínas ou atuar como componentes de compostos heme, impedindo assim, as reações oxidativas e os danos ao organismo (NASCIMENTO et.al, 2012). O heme é formado por uma anel tetrapirrólico com um íon de Fe no meio e é sintetizado em todas as células que possuem núcleo, porém, é encontrado em maior quantidade nos eritrócitos. O controle do ferro deve ser rigoroso, pois o excesso desse mineral pode causar graves danos ao organismo, pois ao unir-se com o oxigênio, pode causar lesões nas células e aos tecidos (GROTTO, 2010).

O ferro é absorvido no intestino de acordo com as necessidades do organismo, sendo expelido através da descamação de pele e mucosas, do suor ou hemorragia, e em mulheres, também através da menstruação. As principais formas de aquisição do ferro são através da ingestão alimentar e da reciclagem de hemácias (CANÇADO, 2010).

2.1.1 Absorção Intestinal do Ferro

Em uma dieta de 14 a 18 mg/dia de ferro, apenas 1 a 2 mg são absorvidos no epitélio duodenal, na forma não heme, proveniente de vegetais e grãos, ou na forma heme, proveniente de ovos, carnes, laticínios, hemoglobina e mioglobina. Um indivíduo adulto tem cerca de 4 a 5 g de ferro em seu organismo, sendo 2,5 g sob a forma de hemoglobina, ou através da reciclagem de hemácias (CANÇADO, 2007).

Na superfície do Enterócito, sob forma de Fe^{3+} , o ferro inorgânico, através da ferredutase citocromo b duodenal (Dcytb), é convertido em Fe^{2+} . Liga-se ao transportador de metal divalente, DMT1, e é levado ao interior dos enterócitos (Figura 1). Além do ferro, é também transportado Mn^{2+} (Manganês), Co^{2+} (Cobalto), Cu^{2+} (Cobre) e Zn^{2+} (Zinco) (SIAH. Et.al, 2006) .

Já a internalização do heme se dá através da heme-1 (HCP1), onde este se liga à membrana da borda em escova, à proteína transmembrana 50-kDa, HCP1, que transporta intacta a molécula. (Figura 1) A HCP1 também é expressa em rins, fígado e é regulada de acordo com o nível de ferro dentro das células, aumentando ou diminuindo a internalização do ferro nos enterócitos. A hipóxia também induz a produção de HCP1, aumentando a captação de heme, para o aumento da produção de eritrócitos (GROTTO, 2010).

2.1.2 Reciclagem de Hemácias

Outra forma de obtenção do ferro é através do reaproveitamento de hemácias senescentes. Após 120 dias de vida, as hemácias são fagocitadas por macrófagos. O ferro liberado pode continuar no macrófago, armazenado sob a forma de ferritina, ou pode ser levado à corrente sanguínea. Na circulação sanguínea, esse ferro pode voltar à medula óssea, onde será reaproveitado na produção de novos eritrócitos ou continuar livre na corrente (WANG e PANTOPOULOS, 2011).

2.1.3 Transporte do Ferro

Dentro da célula, o ferro é liberado da Protoporfirina pela heme oxigenase, fazendo parte do ferro não heme e podendo ser armazenado ou liberado na corrente sanguínea. Parte desse ferro livre é oxidado a forma Fe^{2+} e passa ao plasma, através da ferroportina (FPN), também conhecida como IREG1, sendo este o único mecanismo de efluxo do ferro conhecido. A função da ferroportina é exportar o ferro das células para o sangue e é altamente expressa na deficiência de ferro e na hipóxia (GROTTO, 2010).

Ao chegar na corrente sanguínea, o ferro é transformado em Fe^{3+} através da oxidase haefastina, havendo assim sua ligação a transferrina sérica. A transferrina é uma beta-1-microglobulina de alto peso molecular, sintetizada pelo fígado, que

possui afinidade pelo ferro e é uma proteína transportadora do ferro no sangue. Ligada à transferrina, o ferro é levado à corrente sanguínea, onde será encaminhado a medula óssea para a produção de eritrócitos ou serão armazenados em outros tecidos, como nos hepatócitos, por exemplo (LORENZII, 2003; CANÇADO, 2001). O complexo transferrina-receptor é responsável pelo retorno do ferro à célula quando necessário ao organismo.

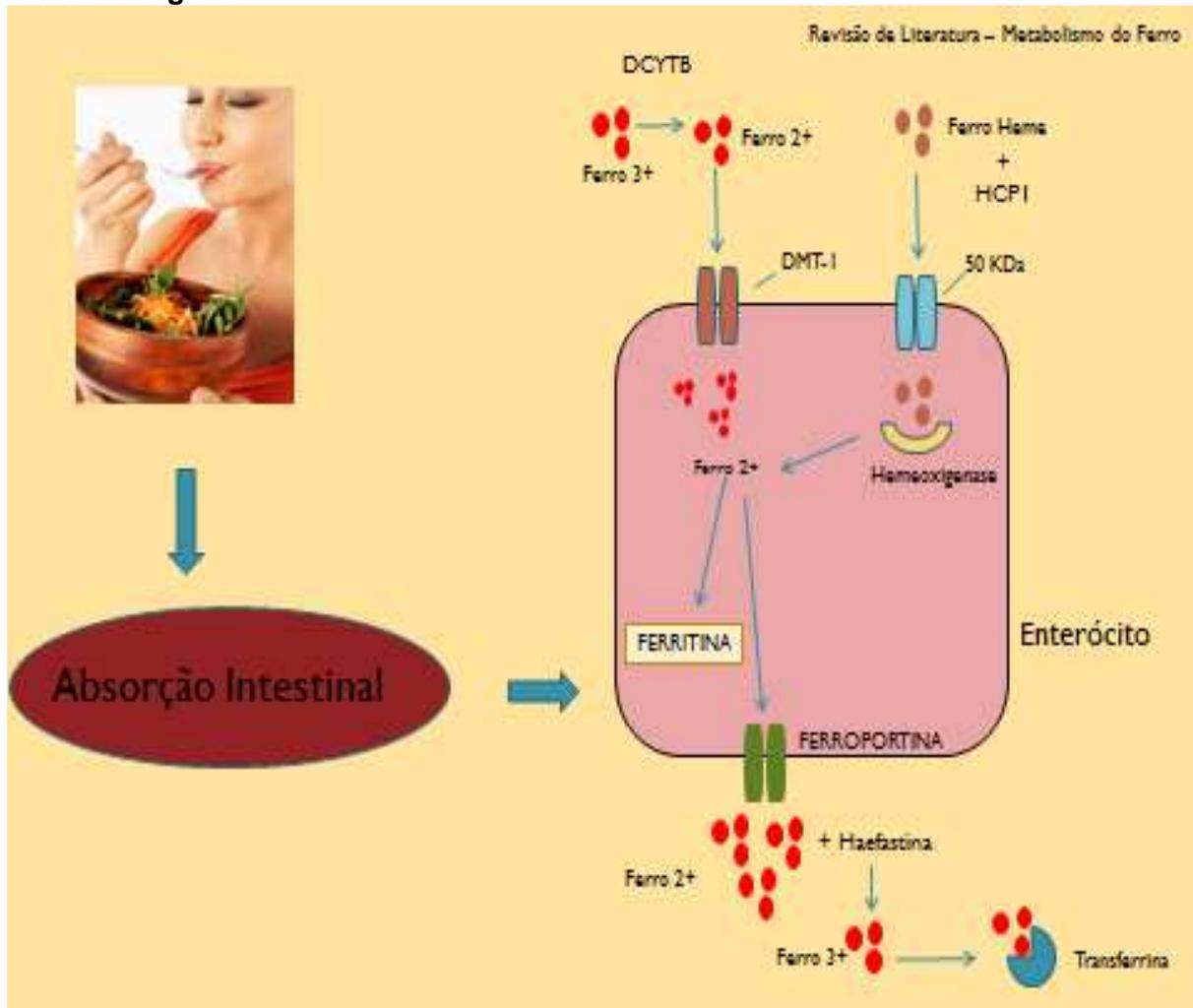
2.1.4 Armazenamento de ferro

Se o organismo não estiver necessitando de ferro, este mineral é captado pela apoferritina no citoplasma celular, onde parte deste fica armazenado sob a forma de ferritina. A ferritina é o principal composto de armazenamento de ferro (Figura 1). É uma proteína citosólica de 24 subunidades composta pela apoferritina e um cerne oxiidróxido férrico, que facilitam o ingresso e a saída de ferro na molécula. É encontrada em quase todas as células, porém nos hepatócitos e macrófagos da medula óssea possui uma reserva disponível para a produção de hemácias e outras proteínas (CANÇADO, 2010; BURTIS e ASHWOOD, 1998; WANG et.al, 2010).

A ferritina tem capacidade de armazenar 4.500 átomos de ferro que devem ser utilizados sempre que o organismo necessitar. Em média 400mg de ferro no organismo, devem estar estocados sob a forma de ferritina. Quando os níveis de ferro ultrapassam os valores desejáveis do organismo, ou seja, encontram-se aumentados na corrente sanguínea, este é armazenado como ferritina no tecidos e órgãos. Além de ser o principal marcador de aumento de ferro no organismo, a ferritina também é uma proteína de fase aguda, aumentando 25% em processos inflamatórios, principalmente no fígado (BEATON e ADAMS, 2012).

Outra forma de armazenar o ferro é como Hemossiderina, que diferentemente da ferritina, é insolúvel em água e libera o ferro lentamente. (BURTIS e ASHWOOD, 1998) Em menor quantidade que a ferritina, é encontrada nos lisossomos dos histiócitos e células de Kupfer, podendo ser observada em maior quantidade em indivíduos com sobrecarga de ferro (CANÇADO e CHIATONNE, 2009).

Figura 1 - Absorção intestinal de ferro. Após a alimentação, o ferro inorgânico é absorvido sob a forma 3^+ . Através da DCYTB é oxidado a forma 2^+ e é internalizado no enterócito, através do receptor de membrana DMT-1. Na célula, este ferro pode ser armazenado sob a forma de ferritina ou ser levado a corrente sanguínea através da ferroportina. Já o ferro heme, ligado a HCP1 é levado ao interior do enterócito através do receptor de membrana 50KDa. Na célula, esse ferro heme é oxidado a ferro 2^+ pela Hemoxigenase, que novamente pode ser estocado sob a forma de ferritina ou levado ao plasma através da ferroportina. Na corrente sanguínea, esse Fe^{2+} liga-se a Haefastina e é transformado em 3^+ . Liga-se a transferrina e é transportado a outras células e órgãos.



Fonte: Autora, 2013

2.1.5 Regulação da Absorção de Ferro

O estoque de ferro no organismo é o que determina a absorção intestinal deste mineral. A descoberta das proteínas IRPs, IRP1 e IRP2, que são as chamadas proteínas reguladoras de ferro, permitiram um melhor entendimento sobre a regulação do ferro. É comprovado que todas as células do organismo codificam essas proteínas e que elas regulam a entrada e a saída de ferro nas células, através

do controle na síntese da ferritina e dos receptores de transferrina. Ocorre que, as IRPs ligam-se à estruturas encontradas no RNAm da ferritina ou dos receptores de transferrina, os chamados elementos responsivos ao ferro (IREs), aumentando ou diminuindo suas expressões (ZHANG e ENNS, 2009 ; HOFFBRAND e MOSS, 2011).

Se a quantidade de ferro intracelular estiver reduzida, as IRPs se ligam aos IREs no RNAm dos receptores da transferrina, aumentando sua estabilidade e a síntese dos receptores de transferrina, atuando diretamente no aumento da absorção de ferro (PIETRANGELO, 2010; HOFFBRAND e MOSS, 2011).

Para que haja uma regulação de ferro no organismo, deve haver uma interação entre a absorção, a utilização e a quantidade de ferro estocado. O uso e o estoque de ferro é coordenado pelo hormônio peptídeo circulante, Hecpidina (HPN). Grotto (2010) relata em seu artigo, que existem trabalhos com animais que desenvolviam deficiência na HPN e possuíam sobrecarga de ferro, e aqueles que superexpressavam a HPN, apresentavam anemias graves.

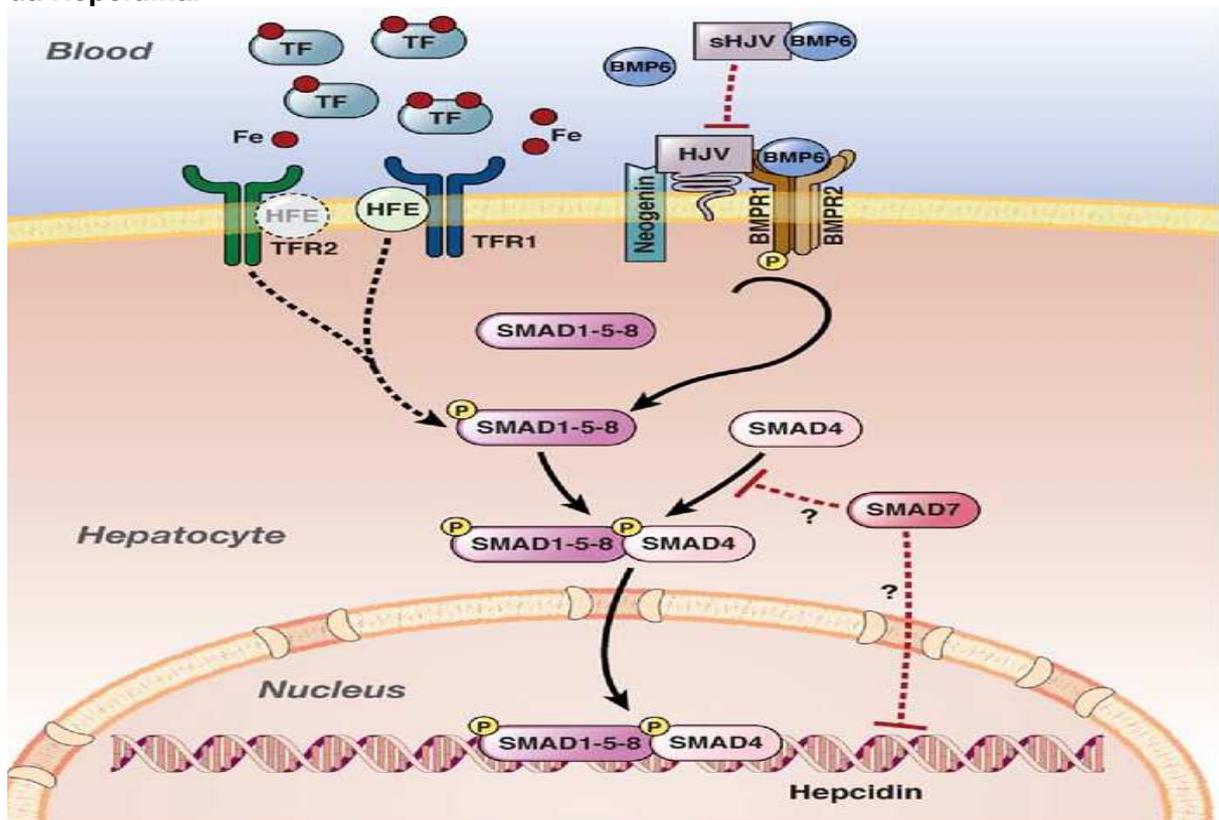
A Hecpidina é sintetizada no fígado e codificada pelo gene HAMP. Possui como receptor a ferroportina. Essa interação causa a fosforilação da tirosina da FPN (Ferroportina) pela enzima Jak2, internalizando, desfosforilando, ubiquitinando e degradando em um compartimento lisossomo/endossomo esse receptor, impedindo que o ferro seja exportado através da FPN, sendo estocado na célula como ferritina (PIETRANGELO, 2010).

O gene HAMP é ativado através das BMPs (bone morphogenetic proteins), citocinas responsáveis pela proliferação, diferenciação, apoptose e migração tecidual. As BMPs ligam-se aos seus receptores, em especial a BMP6, e fosforilam as RSMAD (SMAD1, SMAD5 e SMAD8) que interagem com a SMAD4 no citoplasma celular. (Figura 1) O complexo migra para o núcleo, ativando a transcrição dos gene HAMP e estimulando a síntese de hepcidina. Há relatos, também, que a Hecpidina diminui a síntese de Dcytb e DMT-1 (CHEN E CHLOUPKOVÁ, 2009; GROTTTO, 2008).

A transferrina também tem grande importância nessa regulação férrica. Ela compete com a proteína HFE pelos receptores de transferrina Trf1 e Trf2, na tentativa de controlar a entrada de ferro nas células. Ao mesmo tempo, a interação de HFE com Trf2, permite que o organismo identifique os níveis de ferro e ativem as

RSMADs, induzindo a síntese de Hecpidina, quando necessário (Figura 2) (GROTTO, 2008; BACON et.al, 2011).

Figura 2 - Mecanismo de expressão de hepcidina. As BMPs, mais especificamente, a BMP6, ligam-se aos seus receptores (BMP1 e BMP2) para iniciar a ativação do gene HAMP. Essa interação fosforila as SMADs (1,5 e 8), ligam-se as SMAD4, que ativa a transcrição do gene HAMP, estimulando a produção de hepcidina. Ao mesmo tempo, supõe que a SMAD4 ativa a SMAD7 que atua diretamente na estimulação de HAMP e síntese de hepcidina. A proteína HFE liga-se aos TRF1, impedindo que haja a ligação destes receptores pela transferrina, impedindo a entrada de ferro na células. Quando a proteína HFE liga-se aos TRF2, ela, também, ativa as Smads, induzindo a produção da Hecpidina.



Fonte: PIETRANGELO, 2010

Outros genes estão associados ao metabolismo do ferro, como é o caso do HJV (Hemojuvelina), que também é responsável pelo aumento na expressão de hepcidina, porém tratam-se de estudos que ainda estão em fase de desenvolvimento. A identificação de novas proteínas associadas a homeostase do ferro, serão essenciais para o melhor entendimento deste mecanismo (D'ALESSIO et. al, 2012).

2.1.6 Patologias Associadas ao Ferro

Tanto a deficiência desse mineral quanto o seu aumento na absorção tornam-se prejudiciais à saúde. A deficiência de ferro no organismo, causada pela má absorção ou pela dieta deficiente causa problemas sérios na produção de eritrócitos, podendo desenvolver anemias graves. Outros fatores que podem causar a diminuição dessa taxa de ferro no organismo são a menstruação, a hemorragia (principalmente gastrointestinal), gestação, alguns tipos de parasitas e alterações genéticas associadas ao metabolismo do ferro (CANÇADO e CHIATTONE, 2010; CANÇADO et. al, 2007).

A patologia em que ocorre a elevação de ferro no organismo é chamada de hemocromatose, e pode ser de dois tipos: primária e secundária. A hemocromatose primária ou hereditária é uma das patologias mais graves que causam aumento de ferro no organismo, pois são síndromes genéticas causadas por mutações em determinados genes associados à absorção de ferro no organismo (DEUGNIER et. al, 2008).

Quanto à hemocromatose secundária ou adquirida, é um tipo de doença que causa hiperferremia, porém sem causa genética, mas associada a outras patologias. Existem várias doenças que podem causar esse aumento de ferro, como é o caso das talassemias, anemias autoimunes, doenças crônicas do fígado (Hepatites), doenças alcoólicas crônicas, porfiria cutânea tardia, transfusão de células vermelhas, aceruloplasminemia e outras. Até mesmo a dieta rica em ferro é capaz de desenvolver esse tipo de hemocromatose (SIDDIQUE e KOWDLEY, 2012).

2.2 Hemocromatose Hereditária

Hemocromatose Hereditária (HH) é uma doença autossômica recessiva, caracterizada por distúrbio no metabolismo do ferro, aumentando sua absorção intestinal (FERREIRA,2008; OLYNYK,2008). Esse aumento resulta no acúmulo de ferro no organismo depositando-se no fígado, coração, pâncreas, glândula pituitária e articulações. As manifestações clínicas são: fadiga, artralgia, diminuição da libido, arritmias cardíacas, diabetes mellitus, cirrose hepática, hiperpigmentação, hipotireidismo e carcinoma hepatocelular (LYON e FRANK ,2001; MACLAREN, et.al.2008; PIETRANGELO,2010).

É considerada uma das alterações genéticas mais comuns entre a população caucasiana do Norte Europeu, afetando um a cada 200-300 indivíduos, com idade média de 30 a 40 anos. Desenvolve-se em homens e mulheres de forma igualitária, porém, as manifestações mais graves são desenvolvidas pelos homens. Acredita-se que essa diferença entre os sexos ocorre porque as mulheres possuem alguns fatores fisiológicos, como a gravidez e a menstruação, que dificultam o desenvolvimento da doença ou a HH acaba se desenvolvendo mais tardiamente (TAVILL, 2001; MACLAREN et.al., 2008).

HFE é o principal gene responsável pela hemocromatose hereditária. Este gene foi descoberto em 1996 por Feder et.al, que foi o precursor do descobrimento das patologias associadas ao aumento de ferro no organismo. Até o momento, foram descritas 3 mutações que estão relacionadas ao gene HFE (C282Y, H63 e S65C) (SIAH et.al, 2006; GAC e FÉREC, 2005).

Estudos publicados com populações de todo o mundo demonstram que a prevalência das mutações em europeus (caucasianos) é bem maior que nativos americanos. Ásia, Islândia e África apresentaram baixa frequência de HH (HANSON, 2001).

Além das mutações em HFE, existem outras mutações identificadas em genes diferentes, que apresentam fenótipos similares. São mutações mais raras e podem ser encontradas nos genes TfR2 (Receptor de transferrina), Ferroportina, Hemojuvelina (HJV) e Hpcidina (HAMP). Dentre essas, destaca-se como a mais comum, a mutação no gene que expressa a ferroportina (PIETRANGELO,2005).

2.2.1 Mutações do Gene HFE

O gene HFE está localizado no complexo HLA-A no braço curto do cromossomo 6. Ele é responsável pela codificação da proteína HFE, uma glicoproteína transmembrana com 343 aminoácidos, responsável pela regulação da absorção de ferro através da ligação com os receptores de transferrina e da indução da síntese proteica da hepcidina. A proteína HFE é expressa nos enterócitos e hepatócitos estando altamente relacionada com o controle do mecanismo de absorção do ferro no organismo.

Em 1996, foram descritas duas mutações encontradas em mais de 85% dos pacientes com fenótipo compatível com HH (FEDER et.al.,1996). A mutação mais

comum responsável por HH é a que leva a uma substituição do nucleotídeo 845, de uma cistina por uma tirosina do aminoácido 282 na proteína HFE. Outra mutação comum, causa a substituição do nucleotídeo 187, do aspartato por histidina na posição 63 da proteína HFE (BATTS, 2007). As mutações C282Y e H63D alteram a estrutura da proteína HFE, havendo perda ou diminuição de suas funções, impedindo seu transporte para a superfície das células, sua ligação aos receptores que controlam a entrada e a saída de ferro na célula e a regulação na produção de hormônios que controlam os níveis de ferro no organismo (HANSON, BURKE e IMPERATORE, 2001).

Há duas hipóteses para a função da proteína HFE e a fisiopatologia da hemocromatose. A primeira é que esta proteína, em conjunto com beta 2 microglobulina, liga-se ao receptor de transferrina (TRF1), reduzindo a afinidade Transferrina – TRF1, impedindo que o ferro seja absorvido, havendo um controle da entrada do ferro na célula e no organismo (GRIFFITHS et.al., 2007; OLYNYK et.al.2008). Com a mutação C282Y, a proteína HFE perde sua função e não exerce seu papel biológico e a transferrina se encontra livre para se ligar ao seu receptor, havendo o transporte de ferro e, conseqüentemente, seu aumento no organismo.

A segunda hipótese é que a proteína HFE regula, através da ligação aos TRFS, a síntese da hepcidina, hormônio que inibe a exportação de ferro da célula para a corrente sanguínea controlando a ferroportina. Para se ligar a transferrina, o ferro é transportado, dentro da célula, para a membrana basolateral pela ferroportina e é levado ao plasma. Quando ocorre a mutação, diminui a expressão da hepcidina, conseqüentemente, não ocorre ligação hepcidina -ferroportina e esta última fica livre para que uma maior quantidade de ferro seja exportada para o sangue (SEBASTIANI et.al., 2007; NEMETH e GANZ, 2009).

A mutação H63D não impede que a proteína HFE alcance a membrana das células e se ligue aos receptores de transferrina TRF1 e TRF2, porém a afinidade com estes receptores torna-se diminuída (HERRUZO e MUÑOZ, 2007). Por isso, o fenótipo expresso por pacientes com a mutação H63D é mais leve.

É mais comum em indivíduos que desenvolveram a HH apresentarem fenótipo quando possuem genótipos homocigotos para C282Y, apresentando-se em maior frequência entre os indivíduos com a patologia. Vários estudos demonstram que a mutação C282Y/C282Y expressam os fenótipos de forma mais acentuada que os demais genótipos (ARANDA et.al., 2010; ROSSI et.al., 2001). Esta mutação

é responsável pelo desenvolvimento de graves sintomas da doença, causando graves danos aos órgãos (FIX e KOWDLEY, 2008).

Os heterozigotos compostos desenvolvem sintomas clínicos graves, semelhantemente aos homozigotos C282Y, contribuindo fortemente para o desenvolvimento da HH (DEUGNIER e MOSSER, 2008; AGUILAR-MARTINEZ et.al, 2001).

A contribuição da mutação H63D para a HH tem apresentado controvérsias. Muitos estudos demonstram que a presença da mutação H63D, não apresenta risco de desenvolver a HH. (PIETRANGELO, 2010) Outros estudos demonstram que os homozigotos H63D desenvolvem um aumento de ferritina sérica e saturação de transferrina em algumas populações. Por outro lado, parâmetros normais de ferritina são encontrados na maioria dos heterozigotos H63D, bem como em heterozigotos C282Y (TOMATSU et. al., 2003).

2.2.2 Frequências das Mutações C282Y e H63D no Mundo e no Brasil

2.2.2.1 População Geral

Na Espanha, Ásia e Islândia, a frequência das mutações do gene HFE na população geral é de 1:200 para 1:300 indivíduos brancos homozigotos C282Y (PIETRANGELO, 2010). No norte da Europa e norte da América, heterozigotos C282Y possuem prevalência de 9,2%, enquanto no sul da Europa essa prevalência encontra-se diminuída (1-3%). Na Índia, África e Austrália, homozigotos C282Y não foram encontrados e heterozigotos encontram-se em porcentagens muito baixas.

O genótipo heterozigoto para H63D apresenta frequência elevada na população geral, com 18-20% na Europa, destacando-se a Espanha com 32%. Os mesmos resultados foram encontrados na América do Norte. Na Ásia e África, apesar de serem muito baixas as frequências para todos os genótipos mutados, aqueles heterozigotos para H63D encontram-se em frequências de 2-17%. Em algumas regiões, quase 90% da população possui genótipo sem mutações (HANSON et.al, 2001; MERRYWEATHER-CLARKE et al., 1997).

O crescimento da publicação de artigos estrangeiros, principalmente na Europa, sobre a HH, tem demonstrado a importância da doença em todo o mundo.

Apesar de haverem poucos relatos da hemocromatose nos países da América do Sul, o Brasil tem apresentado grande relevância ao assunto (CANÇADO. 2010).

A mistura de etnias no Brasil e a dimensão geográfica do país podem resultar em frequências alélicas e genóticas diferentes em relação aos demais países. Porém, ainda é necessário que sejam realizados vários estudos nas diferentes regiões brasileiras, para definir a mutação mais frequente (BITTENCOURT et.al, 2002).

A frequência alélica de C282Y na população brasileira em geral é ainda menor que a encontrada nos outros países do mundo. Concomitantemente, a mutação H63D apresenta frequência semelhante entre as populações mundiais, apresentando maior frequência alélica na população geral. O quadro 1 demonstra os resultados encontrados para a população geral em algumas regiões do Brasil.

Em São Paulo, Pereira, et. al (2001), observaram as diferentes frequências alélicas de acordo com os grupos étnicos mais frequentes em uma população brasileira de 395 participantes. Daqueles que tinham cor de pele branca, 3,7% possuíam a mutação C282Y e 20,3%, a mutação H63D. A população negra possuía 0,5% e 6,4% das respectivas mutações. E os mulatos, 0,7% e 13%. Resultados aproximados a estes foram encontrados em Agostinho et, al (1999), demonstrando que a mutação H63D no Brasil é mais frequente, principalmente entre os brancos.

Quadro 1 - Frequência dos genótipos para as mutações do gene HFE no Brasil.

População Estudada (n)	C282Y/C282Y (%)	C282Y/W T (%)	H63D/H63D (%)	H63D/W T (%)	C282Y/H63D (%)	WT/WT (%)	Estudo e Ano
Campinas, SP (201)	*	3,4	1	22,9	0	72,7	Perícole et.al, 2005
Região Norte (800)	0	0,62	1	26,75	*	71,63	Torres et. Al, 2008
Paraná (289)	0,3	3,2	*	*	*	96,5	Jackowisky et.al, 2004
Salvador, BA (130)	0	0,77	0	22	*	77,3	Menezes et.al, 2010
São Paulo, SP (156)	0	2,7	0	18,3	0	79	Bueno et.al, 2006

WT – Wild type * - Não avaliado

Fonte: Autora, 2013

2.2.2.2 Pacientes com diagnóstico de Hemocromatose Hereditária

A mutação C282Y é considerada a causa mais frequente do desenvolvimento de HH e da forma mais grave, com fenótipo acentuado, principalmente causando graves distúrbios hepáticos.

A frequência genotípica, na Europa, em pacientes com provável suspeita de HH, é de mais de 80% de homozigotos para C282Y. Estudos realizados na França demonstram valores de 96,3% e 80,2% de pacientes com homozigose para C282Y (BRISSOT et.al, 1999; MURA e RAGUENES, 1999). Na América do Norte, a prevalência de homozigotos C282Y/C282Y em pacientes com HH é comparada à Europa, com 60-80% (HANSON, 2001).

Para homozigotos H63D, alguns trabalhos relatam frequências de 1 a 3% na Europa e 1 a 8% na América do Norte e Austrália (HANSON, 2001). Em média 2/3 da população brasileira com hemocromatose hereditária, possuem uma das mutações do gene HFE. Os outros 1/3, provavelmente, são acometidos por outras mutações em outros genes (DOMINGOS, 2007).

Em um estudo realizado em São Paulo por BITTENCOURT e colaboradores (2009), a prevalência para homozigotos C282Y em pacientes com suspeita de HH apresentou-se maior que H63D nos pacientes, onde 47% dos participantes apresentaram este genótipo. Enquanto 11% apresentaram-se heterozigotos para H63D.

É comum, no Brasil e no mundo, encontrar entre os pacientes com hiperferremia, a presença da mutação C282Y mais evidente, apresentando também valores mais altos de ferritina e saturação de transferrina em relação aos demais genótipos. É possível que o desenvolvimento destes fenótipos sofram influência de fatores ambientais e culturais, que acentuam os sintomas em portadores da doença (CANÇADO, et.al, 2007; CANÇADO e CHIATTONE, 2012).

2.2.3 Diagnóstico da HH

O diagnóstico da HH é baseado nos sintomas clínicos e laboratoriais e confirmado através do teste molecular que identifica a presença das mutações (C282Y, H63D e S65C) causadoras da doença (HANSON, IMPERATORE e BURKE, 2001). Alguns testes laboratoriais são essenciais para determinar a sobrecarga de

ferro, e o possível desenvolvimento da HH. Entre os principais, está a dosagem de ferritina que atua como principal marcador de suspeita da doença, determinando os primeiros sinais de sobrecarga de ferro no organismo. É considerado o teste mais sensível para estes fins (LYON e FRANK, 2001).

Outro exame muito importante é a saturação de transferrina (ST). Normalmente, 20 a 50% dos sítios de ligação da transferrina encontra-se ligadas ao ferro. Para saber se a ST encontra-se elevada, é calculada a razão ferro sérico pela capacidade total de combinação do ferro. Valores acima de 50% são considerados preocupantes e indicativos de HH (BACON et.al, 2011).

Capacidade total de ligação do ferro, dosagem de ferro, capacidade latente de ligação de ferro, também são testes usados para identificar a HH e devem ser analisados em conjunto com a dosagem de ferritina. Porém, nem sempre encontram-se acima dos valores de referência em pacientes com esta patologia. Devem ser usados apenas como testes de controle da doença (BEATON e ADMS, 2007; TAVILL,2001).

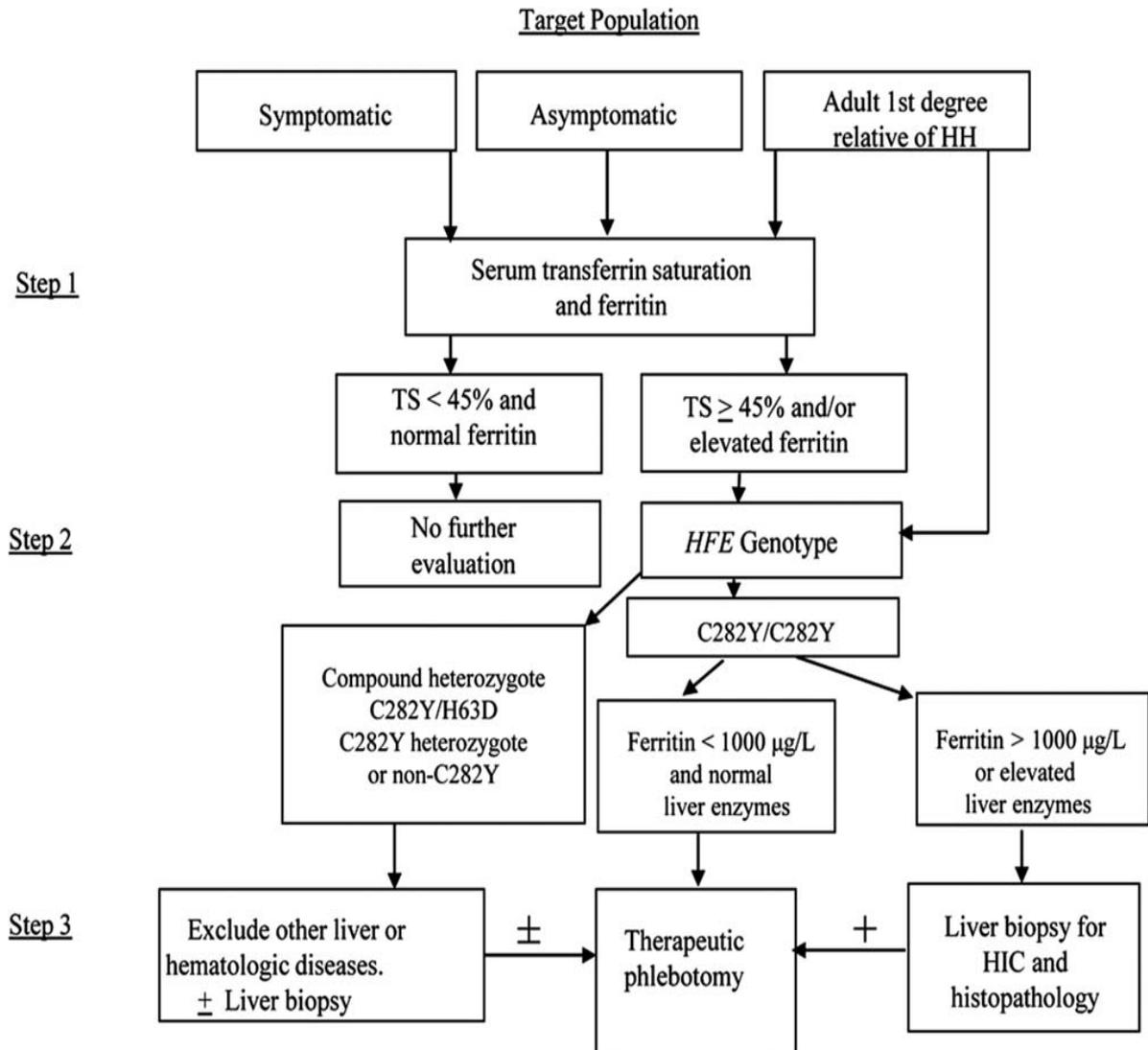
A HH só é diagnosticada verdadeiramente após a realização dos testes moleculares. Através de métodos utilizados na biologia molecular, principalmente a Reação de Cadeia em Polimerase (PCR), é possível determinar a presença das mutações no gene HFE ou qualquer outro gene identificado como essencial no metabolismo do ferro (HAMP, HJV, TRF).

A biópsia de fígado, também apresenta grande importância no diagnóstico da HH e no acompanhamento de pacientes com a doença. É possível saber se o grau de depósito de ferro no órgão está alto e o nível de agressão do mesmo. Os hepatócitos podem ser lesados até causarem uma cirrose ou um câncer hepático (AGUILAR-MARTINEZ et.al., 2011).

Para avaliar os níveis de agressão do fígado, também são dosados os níveis das enzimas específicas Aspartato aminotransferase (AST) e Alanina aminotransferase (ALT), a fim de determinar o nível de agressão aos hepatócitos (V.R.: Até 40,0 U/L e até 41,0 U/L) (BACON, et.al, 2011).

As etapas de diagnóstico da HH podem ser demonstradas através da figura 3, que mostra um algoritmo seguido pelos médicos, quando há suspeita de Hemocromatose Hereditária em algum paciente, recomendado pela AASLD (Associação Americana para o Estudo de Doenças do Fígado).

Figura 3 - Algoritmo proposto pela AASLD para diagnóstico e tratamento da HH.



Fonte: TAVILL, 2011

2.2.4 Tratamento da HH

A flebotomia periódica ou sangria terapêutica é o método mais eficaz para o tratamento da HH. Consiste na retirada de 200 a 400ml de sangue por punção venosa, para controlar os níveis de ferro no organismo. A quantidade de sessões de sangria é determinada pelo médico hematologista, podendo variar de acordo com os níveis de ferritina do pacientes e a resposta ao tratamento (TAVILL, 2001).

Associado à flebotomia, é necessário que o paciente faça um a dieta adequada, evitando alimentos ricos em ferro, suplementos de ferro, excesso de vitamina C e álcool (HURREL e EGLI, 2010).

2.3 Moduladores de Gravidade da Hemocromatose Hereditária

Vários estudos demonstram que existem moduladores de gravidade da Hemocromatose Hereditária. Fatores como a dieta e o consumo de álcool podem interferir diretamente no surgimento da doença em pessoas que possuem a mutação, podendo desenvolver altos níveis de ferro e ferritina no sangue se possuírem uma dieta rica em ferro. Alimentos ricos em vitamina C, por outro lado, aumentam a absorção de ferro no organismo (MILWARD, et. al, 2008). Pacientes com HH que possuem um alto ou moderado consumo de álcool, tem grandes chances de desenvolver a doença e causar graves complicações hepáticas, aumentando os níveis de ferritina e causando danos aos hepatócitos (BEATON e ADAMS, 2007).

Fatores como idade, sexo, menstruação, gravidez, e a presença de outros alelos mutados de HFE ou outros genes em estudo ou já descobertos (HAMP, HJV, FPN, TRF1), podem ser considerados importantes no desenvolvimento da HH. Estes podem determinar diferentes manifestações para a doença entre os pacientes com o mesmo genótipo (BUENO, DUCH e FIGUEIREDO, 2006).

2.3.1 Ingestão de Ferro

As duas formas de ingestão de ferro, ferro heme e ferro não heme, são encontrados em diferentes tipos de alimentos. O ferro heme é encontrado em carne vermelha e frutos do mar, estando em menor quantidade em frango e peixe. O ferro não heme é encontrado em vegetais, legumes e cereais (HURRELL e EGLI, 2010).

A absorção do ferro heme é maior que ferro não heme, porém quando associados a outros fatores alimentares, a absorção de ferro não hemínico torna-se similar ao hemínico. Esses fatores que aumentam a absorção de ferro são carne, vitamina C, peixe, frutas cítricas, alimentos lácticos e peptídeos contendo cisteína (HEATH, et.al, 2003; MILWARD, et. al, 2008).

A ingestão diária de ferro deve ser de no máximo 18mg/dia, segundo recomendações da ANVISA (Associação Nacional de Vigilância Sanitária), e apenas 1 a 2mg de ferro são absorvidas desta ingestão. Porém, essa absorção torna-se aumentada na presença das mutações da HH. E como apenas 1mg de ferro é excretado por dia (através da secreção e descamação gastrintestinal e da pele) e o

organismo não pode aumentar essa quantidade de excreção, o ferro acumula-se nas células e na corrente sanguínea (CANÇADO,2010). Existem alguns alimentos que diminuem a absorção de ferro, como é o caso de chás, café, alimentos ricos em cálcio, proteínas e magnésio.

Recomenda-se, portanto, que pacientes portadores da HH tenham uma dieta pobre em alimentos que possuem alto teor de ferro, suplementos férricos, bem como os alimentos que aumentam a absorção do mineral (CANÇADO, 2010).

2.3.2 Ingestão de álcool

A ingestão de álcool altera significativamente os níveis de ferritina sérica e aumenta as complicações da HH, principalmente a cirrose e o câncer hepático (GOOT et.al, 2012). Entende-se que a ingestão de etanol prejudica os hepatócitos, pois a substância é metabolizada no fígado e através de mecanismos de oxidação que degradam a molécula de etanol, acabando por danificar as células hepáticas. Essa destruição celular acaba liberando enzimas encontradas neste órgão como ALT, AST, GGT (Gama glutamil transferase) e dependendo do grau de agressão, a ferritina (LEE e KOWDLEY, 2012).

Além disso, o álcool, até mesmo em doses leves, é responsável pelo aumento do transporte de ferro duodenal, pois ele inibe a expressão de hepcidina, principalmente em homens (FINDIK, 2010).

2.3.3 Obesidade e Esteatose

A obesidade é um fator muito importante para o aumento da ferritina, principalmente em pacientes com Hemocromatose Hereditária. Os obesos geralmente possuem uma dieta desregrada, rica em alimentos com alto teor de ferro e outros alimentos que aumentam a absorção do mineral. Esta falta de controle alimentar tende a aumentar os níveis de ferro na corrente sanguínea e o seu consequente depósito sobre a forma de ferritina (ROSSI et.al, 2001; ARANDA et. al, 2010).

As complicações hepáticas decorrente da obesidade podem ser causadas pelo acúmulo de gordura no fígado (esteatose hepática) que juntamente com o depósito de ferro no órgão, acabam levando os hepatócitos a um alto nível de

agressão, causando fibrose, cirrose ou carcinoma hepatocelular. Diante desta destruição celular, ocorre a liberação do ferro que estava estocado dentro das células, contribuindo para o aumento da ferritina na circulação sanguínea (DANTAS et.al, 2002).

Há estudos que relatam, por outro lado, que a obesidade pode regular a absorção de ferro através de mecanismos inflamatórios. Essa inflamação induz o aumento da produção de hepcidina, diminuindo a absorção de ferro e em muitos casos, causando anemia. Porém, este mecanismo ainda necessita de pesquisas adicionais, pois ainda não está bem estabelecido (MACCLUNG e KARL, 2008).

2.3.4 Variações Hormonais

A gravidez, menstruação, menopausa e métodos contraceptivos resultam em variações hormonais que interferem nos níveis de ferro do organismo de forma contrária aos que foram citados acima.

Em muitos casos, na gravidez, é necessário fazer uso de suplementos férricos para suprir a deficiência de ferro causada por hematopoese aumentada e para suprir as carências nutricionais do feto e da gestante. Em pessoas com HH, a gravidez atua como um fator favorável importante para a diminuição dos níveis de ferro (BRANDÃO et. al, 2011).

A menstruação é um dos principais fatores que influenciam para evitar o desenvolvimento da HH em mulheres, pois a perda sanguínea mensal que estas sofrem, acabam regulando os níveis férricos na corrente sanguínea mais facilmente que os homens (CANÇADO e CHIATTONE, 2010).

Um mecanismo contrário ocorre na menopausa. Como não se tem mais a perda de sangue mensal, os níveis de ferritina aumentam em portadores da HH. O fato de as mulheres desenvolverem a HH mais tardiamente que homens, pode, também, ser devido a este fator (CONTE, 2000).

2.3.5 Doenças hepáticas crônicas associadas a HH

Doenças como Hepatites, anemias, distúrbios intestinais e esquistossomose aceleram o desenvolvimento da HH. São consideradas doenças crônicas que afetam o fígado, causando a ruptura dos hepatócitos e fibrose. Juntamente com o depósito

de ferro nesse órgão, o paciente pode ser acometido por uma cirrose ou carcinoma hepático (CAUZA et.al, 2003). Nesses casos, o fenótipo da HH torna-se mais severo e os níveis de ferritina tendem a ser sempre extremamente elevados.

2.4 Justificativa da pesquisa

É importante avaliar o número de portadores da HH em uma região como método de prevenção, tratamento e conhecimento científico sobre a patologia. Além disso, como não existem registros publicados sobre a frequência das mutações C282Y e H63D do gene HFE em Alagoas, comparar os resultados encontrados em nosso estado com as demais regiões do Brasil e do mundo, possui uma grande contribuição epidemiológica e social para a doença.

Não há protocolos estabelecidos para a realização de exames em Alagoas. A implantação do teste molecular da HH contribui para o acesso dos pacientes alagoanos com suspeita de HH ao diagnóstico, tendo como base a prestação de serviços à comunidade.

A dieta, a ingestão de álcool, e obesidade são considerados moduladores de gravidade importantes para o desenvolvimento da doença em pessoas com as mutações. E estudar os principais fatores que influenciam o desenvolvimento da HH e determinar os genótipos que expressam fenótipo mais severo diante destes moduladores é importante para se estabelecer medidas de controle com o intuito de reduzir os sintomas e complicações da doença, assim como evitar a progressão para os sintomas mais severos. O estudo da interação de moduladores ambientais com os genótipos da HH na manifestação da doença pode fornecer informações úteis na identificação de grupos e fatores de risco, além de uma melhor avaliação prognóstica dos pacientes.

Com base nisto, os objetivos do trabalho foram avaliar a frequência das mutações C282Y e H63D do gene HFE na população geral e suspeita de HH, a relação entre os genótipos e a manifestação clínica dos pacientes estudados, a identificação de potenciais moduladores de gravidade da doença e sua interação com os genótipos da HH.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Determinar a frequência das mutações C282Y e H63D no gene HFE em uma amostra da população geral e em pacientes com suspeita de Hemocromatose Hereditária, correlacionando os genótipos identificados com os sintomas clínicos e o perfil nutricional dos pacientes no estado de Alagoas.

3.2 Objetivos Específicos

- Implantar em Alagoas os testes genéticos para as mutações H63D e C282Y no gene HFE em Alagoas;
- Determinar as frequências alélicas e genótípicas das mutações H63D e C282Y do gene HFE em uma amostra da população geral e em pacientes com suspeita de HH no estado de Alagoas;
- Fazer uma análise comparativa das frequências entre as populações estudadas.
- Correlacionar os genótipos encontrados com sintomas clínicos, complicações da doença, além dos resultados laboratoriais de ferritina sérica, obtidos a partir dos prontuários dos pacientes;
- Correlacionar os genótipos encontrados com os valores para ingestão diária de ferro, álcool e vitamina C, obtidos a partir da avaliação nutricional dos pacientes.

4 METODOLOGIA

4.1 Seleção de pacientes com suspeita de HH e composição da amostra para estudo de frequência das mutações na população geral

Foram selecionados para a pesquisa os pacientes que fazem tratamento por flebotomia no Centro de serviços hemoterápicos do município de Arapiraca (HEMOAR) e do município de Maceió (HEMOAL e HEMOPAC). Todos os pacientes tiveram seus prontuários analisados, tendo como critério de seleção para a pesquisa, aqueles que possuíam os resultados dos exames com aumento de ferritina sérica. Todos os pacientes fazem acompanhamento com um profissional hematologista. Os valores de referência utilizados para ferritina foram de até 290ng/dl para as mulheres e 320ng/dl para homens.

Foram obtidas as seguintes informações sobre os pacientes: idade, sexo, etnia, principais sintomas clínicos associados a HH (fadiga, artralgia, diminuição da libido, arritmias cardíacas), complicações da HH (diabetes mellitus, cirrose hepática, hiperpigmentação, hipotireoidismo ou carcinoma hepatocelular), valores de ferritina sérica no início da descoberta da doença e os valores durante o tratamento, histórico familiar de pessoas com suspeita de HH ou diagnosticados com a patologia, peso e altura. O IMC (Índice de Massa Corpórea) foi calculado dividindo-se o peso pela altura ao quadrado de cada indivíduo. Este cálculo gera um índice que é comparado à tabela da Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade, caracterizando se o indivíduo está obeso. Os valores de referência para o cálculo de peso ideal é 18,5 a 24,9; para sobrepeso é 25,0 a 29,9; para obesidade grau 1 é 30 a 34,9; obesidade grau 2 é 35 a 39,9; e obesidade grau 3, acima de 40. Foram excluídos da pesquisa aqueles que realizavam flebotomia nos hemocentros, porém não apresentaram alterações laboratoriais relacionadas à HH, ou que faziam tratamento para outra patologia e aqueles que se recusaram a fazer parte desta pesquisa.

Para o estudo das mutações em uma amostra da população de Alagoas, foram selecionados 164 indivíduos voluntários. Informações sobre idade, sexo e etnia foram obtidas por autodeclaração.

Todos os dados foram coletados após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido. O estudo foi aprovado no Comitê de Ética da Universidade Federal de Alagoas – UFAL (protocolo 007112/2011-01). A pesquisa

foi desenvolvida no Laboratório de Biologia Molecular do Campus Arapiraca da UFAL.

4.2 Avaliação Nutricional e Ingestão de Álcool

Para avaliar a ingestão diária de ferro, os pacientes com suspeita de HH responderam ao Questionário de Frequência de Consumo Alimentar, padronizado por Schieri (1998), proposto para brasileiros maiores de 12 anos.

Este questionário consiste em um método de avaliação qualitativo e quantitativo de ingestão de ferro, composto por 80 alimentos fonte deste mineral, onde o entrevistado descreve a frequência e a quantidade ingerida de cada alimento.

Para avaliar quantitativamente a ingestão diária de ferro de cada paciente, foi utilizado o programa de avaliação e prescrição nutricional AVANUTRI 4.0.111, que determina a quantidade deste, existente em determinadas quantidades dos alimentos ingeridos. Os valores de referência para ferro utilizados foram de 14 a 18mg/dia (GROTTO, 2010).

Foi calculada também a ingestão diária de vitamina C, seguindo os mesmos métodos para a ingestão de ferro. Adotou-se como valores de referência 60 a 75mg/dia de vitamina C. (ANVISA, 1998)

Para determinar se o paciente apresentava um alto consumo de álcool, definiu-se consumo excessivo de bebida alcoólica a ingestão diária referida de etanol acima de 60 g por dia e durante período de, pelo menos, 5 anos (Scotet et al, 2003). 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.

4.3 Extração de DNA

Os pacientes que concordaram em fazer parte da pesquisa, após assinarem o termo de consentimento livre e esclarecido, foram submetidos a uma coleta de aproximadamente 5 ml de sangue por punção venosa realizada por profissional apto

a este procedimento. Todos os passos para a coleta foram seguidos criteriosamente desde a assepsia ao material descartável. O sangue foi coletado em tubos de ensaio contendo anticoagulante K₃EDTA (Shandong Weigao Group Medical Polimer) para posterior extração do DNA.

A extração de DNA foi realizada utilizando o Flexigene DNA kit (Qiagen, Germany), segundo recomendações do fabricante. A técnica consiste na adição de 750 µL de uma solução de lise de células (FG1) a 300µl de sangue total, invertendo o tubo 5 vezes. A solução foi centrifugada por 2 minutos a 10.000rpm para garantir que todas as hemácias foram lisadas. O sobrenadante é descartado, cuidadosamente para não perder o pellet de leucócitos. Após inversão dos tubos em papel absorvente por 2 minutos para secagem, os leucócitos são ressuspensos e lisados por 150 µL de uma solução de desnaturação (FG2 - tampão desnaturante), e 1,5 µL Qiagen Protease ao mesmo tempo, para que ocorra a digestão de proteínas. As amostras foram incubadas a 65 ° C por 5 minutos. Foi adicionado 150 µL de isopropanol 100% para precipitar o DNA. Neste momento, o precipitado de DNA deve ser observado em meio aos reagentes do tubo. Após centrifugação a 14.000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado, sem que o pellet fosse perdido. O DNA foi lavado em 150 µL etanol 70% e centrifugado por mais 5 minutos a mesma velocidade. Por fim, após descartar o etanol e aguardar a secagem por, no mínimo 10 minutos, o DNA foi ressuspensado em 200 µL de solução de hidratação (FG3) – Tris Cl 10mM Ph 8,5, incubado a 65 ° C por 10 minutos e armazenado a -20° C. Para avaliar se o DNA foi realmente extraído, foi feito um gel de agarose de 0,8% com tampão TAE por 30 minutos e avaliados sob luz ultravioleta após corar com brometo de etídeo.

4.4 Determinação dos genótipos

O diagnóstico das mutações C282Y e H63D foi realizado utilizando o método de PCR-RFLP, com conjuntos de iniciadores e enzimas de restrição específicos para cada mutação.

PCR (Polymerase Chain Reaction): Foram realizadas duas reações de amplificação por amostra, visto que foram utilizados iniciadores específicos (primers) para cada mutação do gene HFE. Os primers possuem as seguintes sequências:

5'TGGCAAGGGTAAACAGATCC3' e 5' CTCCAGGCACTCCTCTCAACC 3' para a mutação C282Y com amplificação de fragmentos de 390pb e 5' GCCACATCTGGCTTGAAATT3' e 5' ACATGGTTAAGGCCTGTTGC3' para H63D, amplificando 208pb. A amplificação ocorreu em um termociclador Biocycler com uma desnaturação de 5 minutos a 95°C, seguida de 35 ciclos, onde a amplificação ocorreu sob as seguintes condições: 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 57,1°C e 40 segundos a 72°C. Finalizou com uma etapa de extensão a 72°C por 10 minutos. Para um volume final de 25 µL, as reações foram padronizadas com 40 ng de DNA, tampão 1X, MgCl₂ 1,5 mM, dNTP 0,2 mM, primers (5pmoles de cada), enzima Taq polimerase 0,5u (Invitrogen) e H₂O Milliq. O resultado final foi visualizado por eletroforese em gel de agarose 1,5%, utilizando 5 µL da reação de PCR, corado com solução de brometo de etídeo (0,5 µg/ml) e fotografado sob luz ultravioleta.

Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP): As reações de restrição são específicas para cada tipo de mutação, de forma que as enzimas de restrição utilizadas são diferentes. As restrições para a pesquisa da mutação C282Y foram realizadas utilizando 20 µl do produto de PCR, 6,9 µL de água Milliq, 3µL (1X) de tampão 10x (50Mm KCL; 10 Mm Tris HCL Ph 7,4; 0,1 Mm EDTA; 1Mm dithiothreitol; 200 µg/ml BSA E 50% de glicerol) e 0,1 µl da enzimas de restrição Rsa1 (1u). As reações foram incubadas por 16 horas a 37°C e depois incubadas a 65°C por 20 minutos. Para a mutação H63D, foram realizadas as restrições utilizando 20 µl do produto de PCR, 6,9 µL de água Milliq, 3µL (1X) de tampão 10x (50Mm KCL; 10 Mm Tris HCL Ph 7,4; 0,1 Mm EDTA; 1Mm dithiothreitol; 200 µg/ml BSA E 50% de glicerol) e 0,1 µl da enzimas de restrição BCL1 (1u). As reações foram incubadas por 16 horas a 37°C. Ao volume final de 30µL por reação foram adicionados 5 µL de azul de bromofenol (0,25%). Com 35 µL, foi feita a análise do perfil eletroforético dos produtos de PCR que foram submetidos a restrição, em gel de agarose a 3%, corados com brometo de etídeo 0,5µg/ml. No quadro 2, podemos observar as enzimas de restrição utilizadas para definir os genótipos nas amostras, seus sítios de clivagem e os resultados para cada genótipo descritos em pares de bases.

Quadro 2 - Produtos obtidos após restrição para as duas mutações de acordo com os genótipos: normal, heterozigoto e homozigoto

Mutação	Enzima de restrição/ Sítio de clivagem	Fragmentos Obtidos (pb)		
		Normal	Homozigoto	Heterozigoto
C282Y	RSAI GT↓AC	250,140	250,111 e 29	250, 140,111 e 29
H63D	BCLI T↓GATCA	137 e 71	208	208, 137 e 71

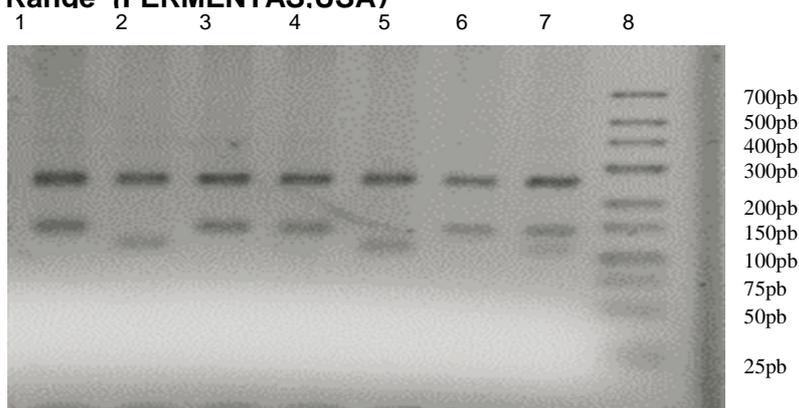
pb – pares de bases

Fonte: Autora, 2013

Os produtos das digestões foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 3%. Os padrões eletroforéticos das restrições podem ser observados nas figuras 4 e 5.

Figura 4 - Gel de agarose de 3,0% do resultado da restrição para a mutação

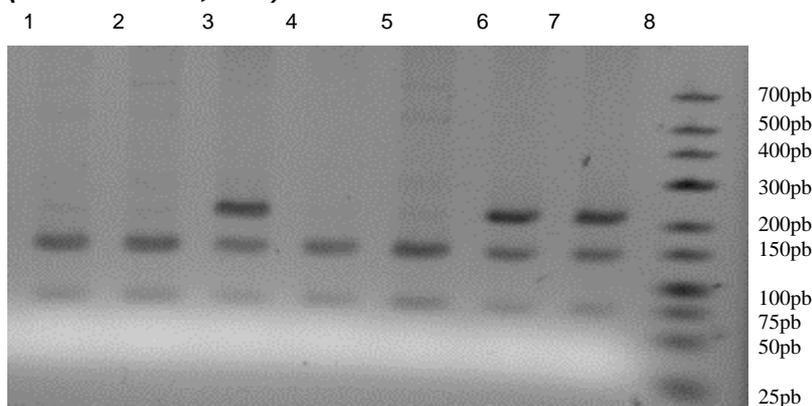
C282Y. 1 – Homozigoto Normal (WT/WT); 2– Homozigoto Mutado (C282Y/C282Y); 3– Homozigoto Normal (WT/WT) ; 4– Homozigoto Normal (WT/WT) 5– Homozigoto Mutado (C282Y/C282Y) 6– Homozigoto Normal (WT/WT) 7– Heterozigoto (C282Y/WT) 8 - Marcador Gene Ruler Low Range (FERMENTAS.USA)



Fonte: Autora, 2013

Figura 5 - Gel de agarose de 3,0% do resultado da restrição para a mutação

H63D. 1 – Homozigoto Normal (WT/WT); 2 - Homozigoto Normal (WT/WT); 3– Heterozigoto (H63D/WT) ; 4– Homozigoto Normal (WT/WT) 5– Homozigoto Normal (WT/WT) 6– Heterozigoto (H63D/WT) 7– Heterozigoto (H63D/WT) 8 - Marcador Gene Ruler Low Range (FERMENTAS,USA)



Fonte: Autora, 2013

4.5 Análise estatística

Foi criada uma planilha com os dados dos pacientes e as variáveis estudadas foram submetidas ao programa SPSS v16.0. A partir desta, foram realizadas as média das idades, valores de ferritina, ingestão diária de ferro e comparadas entre os genótipos, através da ANOVA. Para avaliar se as populações estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg, foi utilizado o teste do Qui-quadrado.

Para avaliação da frequência alélica e genotípica nas duas populações estudadas utilizamos o teste χ^2 . Para a média de ferritina, por se tratar de uma distribuição que não é normal, foram utilizados testes não paramétricos nas determinações estatísticas. O Teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para demonstrar a distribuição não normal evidenciada.

Dados categóricos como genótipos e perfil clínico; as comparações entre os genótipos da população geral e suspeita de HH foram analisados através do teste χ^2 e o teste exato de Fisher. O teste do χ^2 , também foi utilizado para determinar a frequência da esteatose entre os obesos. histograma e curva de distribuição dos dados em relação à ferritina.

Para determinar a diferença entre os valores de ferritina para os homens e para as mulheres foi realizada a mediana e Box em percentil (25 e 75%), e whiskers

representando valores mínimo e máximo de ferritina entre os gêneros, através do Teste de Mann-Whitney U.

Foi aplicado ANOVA com post hoc DMS para comparação das médias de ferritina entre os grupos genotipados. O teste t de Student foi utilizado para comparar os valores de ingesta de ferro, ingesta de vitamina C e ferritina entre os indivíduos genotipados. Para correlacionar os genótipos à ingestão de álcool, ferro e ferritina foi aplicado o teste de correlação de Spearman.

Foi realizada análise descritiva de ferritina e vitamina C entre os genótipos, utilizando como critérios os percentis (25%, 50% e mais de 50%). Não foi realizado teste estatístico, apenas análise descritiva entre os sintomas clínicos, valores de ferritina, etnia, ingestão de vitamina C e os genótipos da HH, devido ao tamanho amostral pequeno para alguns grupos de genótipos.

5 RESULTADOS

5.1 Investigação das Mutações C282Y e H63D nas Amostras da População Geral e com Suspeita de HH

Dos 164 sujeitos analisados na população geral, 35,37% (58) são homens e 64,63% (106) são mulheres, com idade média de 29,12 (\pm DP 11,24). 31 (18,90%) mulheres e 19 (11,58%) homens apresentaram uma das mutações do gene HFE.

Foram analisados os prontuários de 97 pacientes com idade entre 20 e 60 anos, com idade média de 47,56 (\pm DP 11,077) que fazem tratamento por flebotomia e que possuíam valores de ferritina superiores a 320 ng/dl para homens e 290 ng/dl para mulheres.

Destes, 13 (13,41%) são mulheres e 84 (86,59%) são homens, com média de idade de 46,54 (\pm DP 15,186) e 47,71 (\pm DP 10,411), respectivamente.

As amostras estudadas encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg para os três alelos na população geral e suspeita de HH. ($P > 0,05$).

A maior frequência genotípica observada em nossa amostra da população geral foi de heterozigotos para H63D (24,4%). Heterozigotos para C282Y e homozigotos H63D foram encontrados em 3%. Não foi encontrado nenhum homozigoto para C282Y. Um indivíduo desta amostra (0,6%) foi heterozigoto composto.

Dos 97 pacientes suspeitos de HH, 39 (40,21%) apresentaram uma das mutações do gene HFE. O genótipo mutado com maior frequência foi de heterozigotos H63D, sendo apresentada em 20,62% dos pacientes. 10,31% são heterozigotos para C282Y. Os homozigotos para as duas mutações apresentaram frequências baixas (2,06%). 5,15% foram heterozigotos compostos. Cinquenta e oito (59,79%) das amostras não apresentaram genótipo mutado para nenhuma das mutações do gene HFE. As tabelas 2 e 3 apresentam as frequências alélicas e genotípicas observadas na população geral e no grupo de pacientes.

Podemos observar que o alelo mais frequentemente encontrado nas populações estudadas é H63D. Embora a frequência do alelo C282Y seja baixa nas duas populações, há uma diferença significativa nas frequências desta mutação, sendo mais elevada em pacientes com HH do que na população geral.

Quando comparadas as frequências dos genótipos entre a população geral e a população suspeita, observamos que há diferença estatística significativa entre os dois grupos. ($p < 0,0008$) (tabela 1) No entanto, os heterozigotos para H63D apresentam-se mais frequentes em ambas as populações. Porém, há uma frequência de 10,3% de heterozigoto C282Y na população suspeita, e apenas 3% na população geral. Homozigoto C282Y foi encontrado somente na população suspeita (2%).

Tabela 1 - Frequências genótípicas dos pacientes com suspeita de HH e da população geral.

GENÓTIPO	Pop. Geral	Pop. Suspeita	*Valor de p
	FREQUÊNCIA(%)	FREQUÊNCIA(%)	
WT/WT	68,9% (113)	59,79% (58)	0,0008
WT/H63D	24,4% (40)	20,62% (20)	
H63D/H63D	3,0%(5)	2,06% (2)	
WT/C282Y	3,0%(5)	10,31% (10)	
C282Y/C282Y	0%	2,06% (2)	
C282Y/H63D	1 (0,6%)	5,15% (5)	

Teste Qui-quadrado

Fonte: Autora, 2013.

Na tabela 2, podemos observar que apesar da predominância da mutação H63D nas duas populações em estudo, houve maior frequência desta mutação na população geral (88,5%) do que naquela com suspeita de HH (61,4%). Uma maior frequência da mutação C282Y foi observada na população com suspeita de HH (38,6%) do que na população geral (11,5%; $p = 0,0019$)

Tabela 2 - Frequência das mutações que exibiram genótipos para a mutação H63D e/ou C282Y

MUTAÇÕES	Pop. Geral	Pop. Suspeita	*Valor de p
	FREQUÊNCIA(%)	FREQUÊNCIA(%)	
H63D	46 (88,5%)	27 (61,4%)	0,0019
C282Y	6 (11,5%)	17 (38,6%)	
Total	52	44	

Teste Qui-quadrado.

Fonte: Autora, 2013.

5.2 Avaliação dos genótipos da HH em relação à etnia

O grupo da população geral é formado por 40 (24,4%) brancos, 10 (6,1%) negros e 114 (69,5%) mulatos (pardos). Dos 97 pacientes com suspeita de HH, 12 não responderam ao questionário de etnia, totalizando 85 indivíduos. Destes, mais de 50% dos pacientes declararam-se brancos e aproximadamente 40% declararam-se mulatos. Negros e índios apresentaram frequência mais baixa entre os participantes (5,88% e 1,18%).

Apesar de não apresentar diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$), podemos observar nas tabelas 3 e 4 que possuem mais mulatos com mutações do gene HFE na população geral em Alagoas do que brancos, estando em maior frequência entre eles o genótipo heterozigoto H63D.

Quando avaliada a relação entre a etnia e os genótipos da HH de 85 pacientes com suspeita de HH, pode ser observado que os mulatos apresentam maior frequência de genótipo heterozigoto para H63D (12,94%) (Tabela 4). Para a mutação C282Y, tanto homozigotos quanto heterozigotos foram encontrados como maior frequência entre os brancos (2,35% e 8,23%). Os heterozigotos compostos foram encontrados principalmente entre aqueles com etnia branca (4,71%). Não foram encontrados negros e índios com mutações no gene HFE. (Tabela 4) Porém, não foi encontrada diferença significativa entre os alelos e genótipos de brancos e mulatos. ($p > 0,05$).

Tabela 3 - Frequência dos genótipos de acordo com etnia na população geral.

Genótipo	Etnia					
	Branco		Negro		Mulato	
	N	%	N	%	N	%
WT/WT	27	67,5%	7	70,0%	79	69,3%
H63D/WT	12	30,0%	1	10,0%	27	23,7%
H63D/H63D	0	0%	1	10,0%	4	3,5%
WT/C282Y	1	2,5%	1	10,0%	3	2,6%
C282Y/C282Y	0	0%	0	0%	0	0%
C282Y/H63D	0	0%	0	0%	1	0,9%

wt = wild-type

Fonte: Aurora, 2013.

Tabela 4 - Frequência étnica para cada genótipo do gene HFE em suspeitos de HH.

Genótipo	ETNIA % (N)			
	Branco	Mulato	Negro	Índio
WT/WT	29,41% (25)	22,35% (19)	5,88% (5)	1,18% (1)
H63D/WT	8,23% (7)	12,94% (11)	0%	0%
H63D/H63D	1,18% (1)	0%	0%	0%
WT/C282Y	8,23% (7)	2,35% (2)	0%	0%
C282Y/C282Y	2,35% (2)	0%	0%	0%
C282Y/H63D	4,71% (4)	1,18% (1)	0%	0%

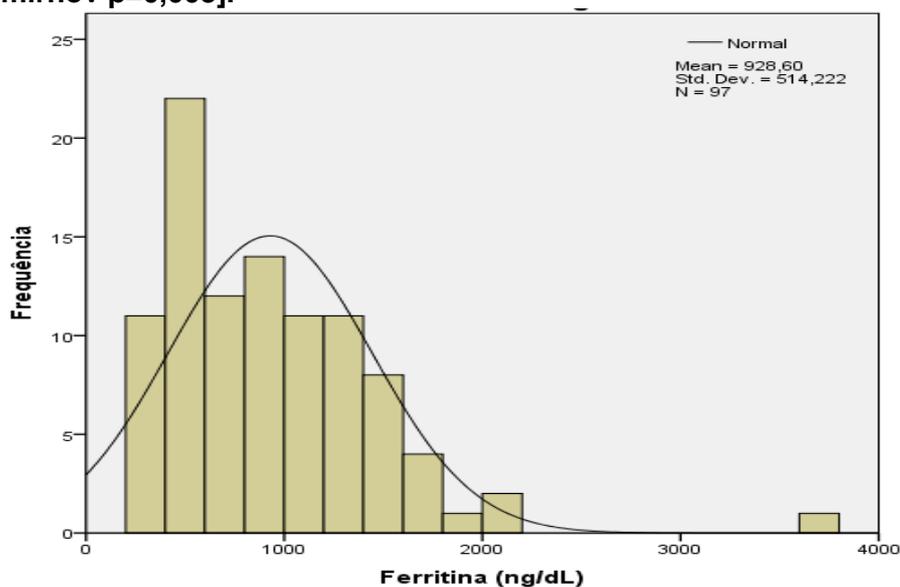
wt = wild-type

Fonte: Autora, 2013.

5.3 Avaliação dos dados laboratoriais e sintomas clínicos em relação aos genótipos de HH

Quanto às dosagens de ferritina dos participantes do estudo com suspeita de HH, a análise das amostras indicou que a distribuição não é normal, necessitando utilizar testes não-paramétricos (figura 6) nas determinações estatísticas. Os dados exibiram média, mediana e moda de 928,60; 849,10 e 500,00 respectivamente.

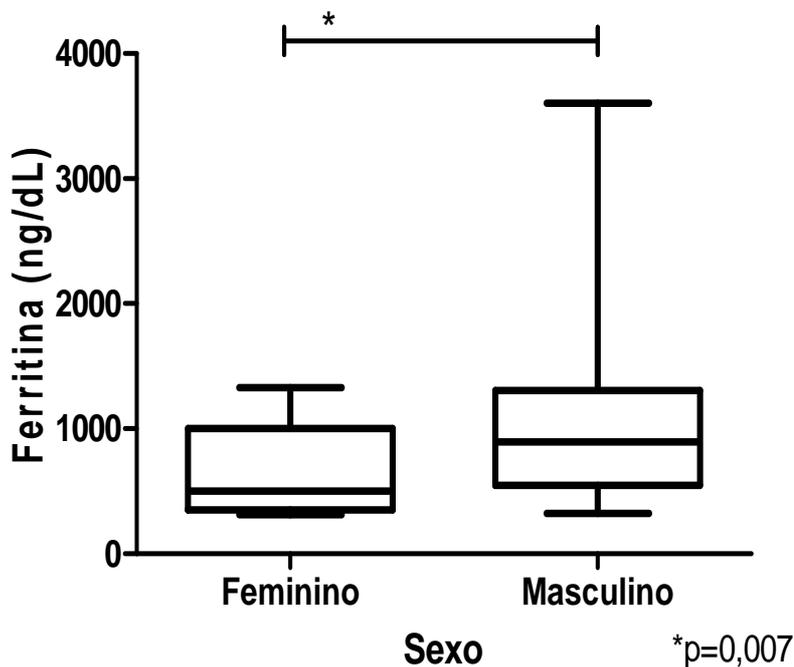
Figura 6 - Histograma e curva de distribuição dos dados em relação à ferritina. Distribuição não normal evidenciada. [Teste de Kolmogorov-Smirnov $p=0,003$].



Fonte: Autora, 2013.

Os valores médios de ferritina para as mulheres foi de 641,75 ng/dl (\pm DP 362,23) e de 972,99 ng/dl (\pm DP 521,52) para os homens . Os valores de ferritina de homens são significativamente mais altos que os valores de ferritina das mulheres ($p=0,007$) (Figura 7)

Figura 7 - Diferença entre os valores de ferritina para os homens e para as mulheres. Mediana, Box em percentil (25 e 75%), e whiskers representando valores mínimo e máximo de ferritina entre os gêneros. Teste de Mann-Whitney U.



Fonte: Autora,2013.

Os pacientes que possuem a mutação C282Y possuem valores de ferritina entre 300-1600 ng/dl, com valor médio de 618,63ng/dl para os heterozigotos e 1485,0 ng/dl para os homozigotos. Apesar de apenas dois indivíduos apresentarem genótipo homozigoto para C282Y, estes apresentam os maiores níveis de ferritina sérica, seguidos de heterozigotos para H63D (1110,33ng/dl) (Tabela 5). Pode-se observar, também, que os indivíduos do grupo com genótipo tipo selvagem (wt/wt) possuem valores mais altos de ferritina sérica que alguns grupos de indivíduos mutados. Não foi observada significância estatística entre os valores de ferritina e os genótipos da HH.

Tabela 5 - Média da dosagem de ferritina sérica em cada genótipo de pacientes suspeitos de HH.

GENÓTIPO	FREQUÊNCIA(N)	FERRITINA (ng/dL)
		Média ±DP
WT/WT	58	933,07 ± 532,47
WT/C282Y	10	618,63 ± 483,54
C282Y/C282Y	2	1485 ± 223,45
WT/H63D	20	1010,33 ± 463,17
H63D/H63D	2	764,50 ± 533,86
C282Y/H63D	5	693,86 ± 327,51
Total	97	912,15 ± 511,56

wt = wild-type

Fonte: Autora,2013.

Foi realizada, também, uma análise descritiva dos valores de ferritina por genótipo, dividindo os pacientes em três grupos, de acordo com os valores das dosagens de ferritina. O critério utilizado para a escolha dos três grupos foram os percentis, pois foi observado que 25% dos pacientes tinham ferritina de até 500,38ng/dl; 50% dos pacientes tinham ferritina de 500,39% à 849,10 e mais de 50% tinham ferritina acima de 849,10. Podemos observar que a maioria dos pacientes com as mutações da HH, possuem valores de ferritina acima de 849,10, principalmente entre os heterozigotos H63D (60%) e os homozigotos C282Y (100%). (Tabela 6)

Tabela 6 - Frequência dos níveis de ferritina. Os valores de ferritina divididos em três grupos de acordo com os percentis (25%, 50% e mais que 50%)

Genótipo	25% (até 500,38)		50% (500,39 a 849,10)		Acima de 50% (>849,10)	
	N	%	N	%	N	%
WT/WT	12	20.7%	19	32.8%	27	46.6%
WT/H63D	3	15.0%	5	25.0%	12	60.0%
H63D/H63D	1	50.0%	0	0.0%	1	50.0%
WT/C282Y	6	60.0%	0	0.0%	4	40.0%
C282Y/H63D	2	40.0%	1	20.0%	2	40.0%
C282Y/C282Y	0	0.0%	0	0.0%	2	100.0%

Fonte: Autora,2013.

Alguns pacientes apresentaram em seus prontuários algumas complicações conhecidas decorrentes da HH. As alterações mais comumente descritas foram a artralgia, fadiga e diabetes. A tabela 7 mostra a frequência com que essas doenças foram relatadas no estudo.

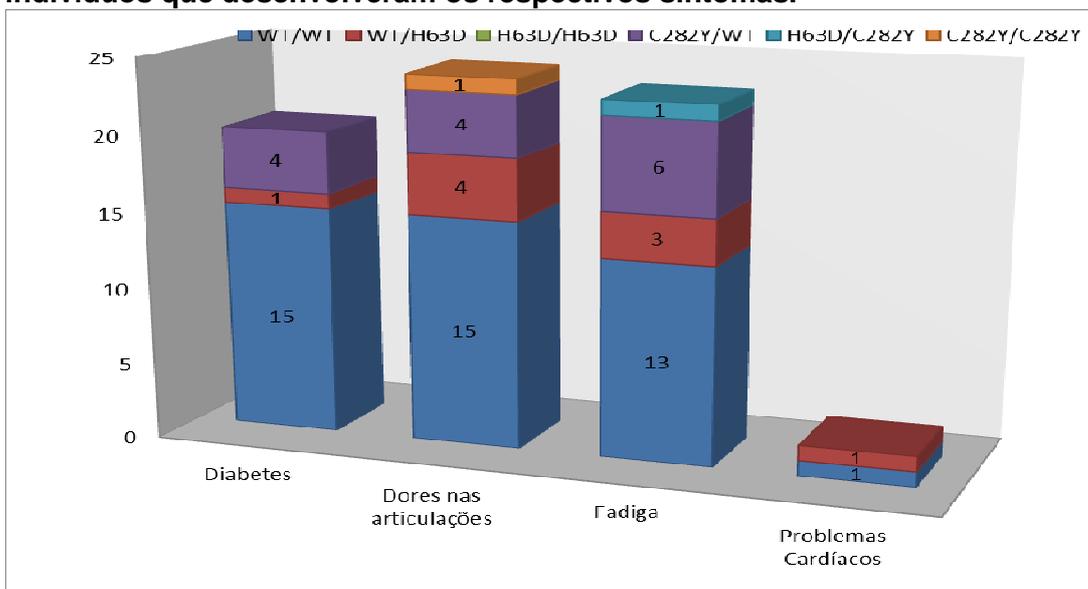
Tabela 7 - Frequência das complicações da HH encontradas entre os pacientes.

DOENÇA	FREQUÊNCIA % (n)
ARTRALGIA	28,91% (24)
FADIGA	27,71% (23)
DIABETES	19,28% (16)
PROBLEMAS CARDÍACOS	2,40% (2)
NÃO APRESENTARAM SINTOMAS	19,28% (16)

Fonte: Autora,2013.

Quanto à avaliação dos principais sintomas relatados entre os pacientes com HH, embora não tenha sido utilizado teste estatístico, encontramos com maior frequência a fadiga e a artralgia (dores nas articulações), principalmente entre os indivíduos com os genótipos heterozigotos para C282Y e H63D (figura 8).

Figura 8 - Sintomas relatados pelos pacientes com HH. As numerações indicam os valores absolutos dos dados. Representa o número de indivíduos que desenvolveram os respectivos sintomas.



Fonte: Autora, 2013.

5.4 Registro de Esteatose Hepática e Obesidade em pacientes com HH

Para determinar quantos indivíduos eram obesos foram calculados os Índices de Massa Corpórea (IMC) dos pacientes. 39,3% (33) foram considerados com sobrepeso; 27,4% (23) com obesidade grau 1; 9,5% (8) com obesidade grau 2 e 4,8% (4), com obesidade grau 3. Apenas 16 (19%) possuíam peso ideal.

Além disto, 18,07% (15) dos pacientes possuem relatos de esteatose hepática. Dentre estes, três (20%) possuem peso ideal e os demais estão com sobrepeso (13,3%) ou são obesos (66,7%).

Dos oitenta e cinco participantes que responderam aos dados necessários para o cálculo de IMC e determinação da obesidade, 35 apresentaram mutação para o gene HFE. Aqueles que possuem genótipo heterozigoto para H63D, possuem o maior número de obesos ou com sobrepeso dentre os grupos de genótipos mutados (Tabela 8). Devido a amostragem pequena por subgrupo genotípico, não foi possível a realização de testes estatísticos, havendo apenas uma análise descritiva dos dados.

Tabela 8 - Frequência de obesidade entre os genótipos da HH.

	PESO IDEAL %	SOBREPESO %	OBESIDADE GRAU (1,2,3) %
C282Y/C282Y	0%	5,71% (2)	0%
WT/C282Y	11,43% (4)	5,71% (2)	8,57% (3)
H63D/H63D	0%	2,86% (1)	0%
H63D/WT	5,71% (2)	11,43% (4)	34,29% (12)
C282Y/H63D	5,71 (2)	5,71% (2)	2,86% (1)
Total = 35			

Fonte: Autora,2013.

Dentre aqueles que possuem o alelo mutado da HH, oito (22,86%) apresentavam em seus prontuários terem desenvolvido esteatose hepática, sendo 4 (50%) heterozigotos C282Y, 3 (37,5%) heterozigoto H63D e 1 (12,5%) heterozigoto composto. Apenas um indivíduo, dentre os pacientes com HH que desenvolveram esteatose está com peso ideal. Os demais apresentam-se obesos ou com sobrepeso. A esteatose em obesos apresentou significância estatística com valor de $p=0,043$, através do teste Qui- quadrado exato de Fisher.

5.5 Avaliação nutricional de ingesta de ferro

82 participantes responderam ao questionário de Frequência de Consumo Alimentar. Vinte e seis (31,71%) participantes apresentaram valores ideais (14-18mg) de consumo de ferro e 56 (63,41%) apresentaram consumo excessivo (acima de 18mg).

Os homens apresentaram ingestão de ferro mais elevada que as mulheres, com 19,28mg (\pm DP 7,20) de ferro para os homens e 14,05mg (\pm DP 5,92) para as mulheres ($p=0,032$). (Teste t de Student)

A ingestão de ferro dos indivíduos foi classificada como: abaixo do valor mínimo de referência (<14mg/dia), normal (14 a 18mg/dia) e acima do valor máximo de referência (>18mg/dia). Quando comparados os grupos de consumo ideal de ferro e consumo excessivo com as respectivas médias de ferritina sérica dos dois grupos, não houve significância estatística entre eles ($p=0,922$) (tabela 9).

Tabela 9 - Relação entre a ingestão de ferro e o valor médio de ferritina.

Ingestão de Ferro	N	Média Ferritina (ng/dL)	\pmDP	Valor de P
Ideal	26	902.8742	399.90	$p=0,922$
Excessivo	56	1008.1561	577.70	

* Teste de amostras independentes Mann-Whitney U.

Fonte: Autora,2013.

Embora não tenha havido diferença estatística significativa entre a ingestão de ferro e os respectivos genótipos, podemos observar que os heterozigotos H63D possuem, dentre os outros genótipos, o maior número de indivíduos com ingestão de ferro acima do valor máximo de referência (12,9%), possuindo também, níveis mais altos de ferritina. Homozigotos H63D apresentaram poucos indivíduos com elevada ingestão de ferro (1,22%), bem como, os heterozigotos C282Y (4,88%). Nenhum homozigoto C282Y apresentou altas ingestões diárias de ferro, apesar de apresentarem valores de ferritina sérica mais altos que os demais genótipos. (Tabela 10) Também não foi possível comprovar a correlação entre a ingesta de ferro e os níveis de ferritina por não haver significância estatística nas amostras analisadas (valor de $p=0,793$)

Tabela 10 - Níveis de ingestão de ferro nos diferentes genótipos da HH

Genótipo	Ferritina (ng/dl) Média	Ingestão de Ferro %		
		Baixo (n)	Normal (n)	Alto (n)
WT/WT	933.07	20,73% (17)	12,19% (10)	24,39% (20)
WT/H63D	1010.33	2,44% (2)	7,32% (6)	12,19% (10)
H63D/H63D	764.50	0%	0%	1,22% (1)
C282Y/WT	618.63	6,10% (5)	0%	4,88% (4)
C282Y/H63D	693.86	1,22% (1)	1,22%(1)	3,66% (3)
C282Y/C282Y	1485.00	2,44% (2)	0%	0%

Teste de Qui-quadrado. Valor de $p > 0,05$.

Fonte: Autora, 2013.

Para avaliar se a ingestão de ferro atual dos pacientes estão interferindo nos valores de ferritina, foi necessário relacioná-los a ferritina dosada próximo à aplicação do questionário. Foram avaliados os pacientes que tiveram os valores de ferritina dosados em até 5 meses antes da aplicação do QFCA (46 pacientes). Podemos observar, através do teste de correlação de Spearman, que a ingestão de ferro após a dieta, alterou diretamente os níveis de ferritina, existindo uma associação moderada (p de Spearman=0,416) e estatisticamente significativa ($p=0,004$) entre os indivíduos.

Na tabela 11, observamos que os heterozigotos H63D, após a dieta, possuem altas ingestões de ferro e altos níveis de ferritina em relação aos demais genótipos. Os heterozigotos compostos também apresentam altas ingestões de ferro, porém, seus níveis de ferritina apresentam-se mais baixos que heterozigotos H63D. Entretanto, devido ao tamanho amostral pequeno, não foi possível a realização de testes estatísticos para avaliar os níveis de ferritina e ferro entre os genótipos.

Tabela 11 - Níveis de ferritina e ferro sérico de pacientes obtidas próximo a aplicação do QFCA.

Genótipos	N	Média de Ferritina	±DP	Ingestão de ferro	±DP
WT/WT	30	911.30	415.67	15.79	5.52
WT/H63D	9	1069.67	324.51	20.77	6,96
H63D/H63D	0	-	-	-	-
WT/C282Y	3	850.27	679.28	16.01	4.38
C282Y/H63D	2	603.50	226.98	21.27	3.48
C282Y/C282Y	2	467.50	20.51	10.22	4,53

Fonte: Autora, 2013.

5.6 Avaliação da Ingestão de Álcool

Quanto a ingestão de álcool, 82 pacientes responderam ao questionário, o qual é possível medir a quantidade, em gramas, ingerida de álcool por dia. Destes, 66 (79,52%) ingerem álcool. Dezesete (20,48%) relataram não ingerir bebida alcoólica.

Os homens ingerem mais álcool que as mulheres, apresentando um total de 64 (78,04%) participantes da pesquisa. Apenas 2 (2,44%) mulheres declararam ingestão de álcool.

A análise da ingestão de álcool daqueles que faziam uso do mesmo em nosso estudo apresentou uma correlação significativa (teste de correlação de Spearman) entre a ingestão de álcool e ferritina, havendo uma tendência entre os parâmetros analisados, apresentando $p=0,052$ e $\rho=0.240$.

A avaliação da ingestão de álcool e o aumento de ferritina entre os grupos genotípicos apresentou correlação significativa apenas para os indivíduos com genótipo C282Y/H63D (figura 9), apesar do seu pequeno número amostral ($n=4$; significância $p=0,001$; coeficiente de correlação de Spearman $p=1,000$), conforme pode ser observado na tabela 12. O grupo de heterozigotos para H63D que possuem uma alta ingesta de álcool, também apresenta valores de ferritina aumentados em relação aos demais genótipos, entretanto, sem significância

estatística. A presença de apenas um homozigoto para C282Y e para H63D inviabiliza a análise estatística destes grupos.

Tabela 12 - Relação entre os genótipos com a ingestão de álcool e ferritina.

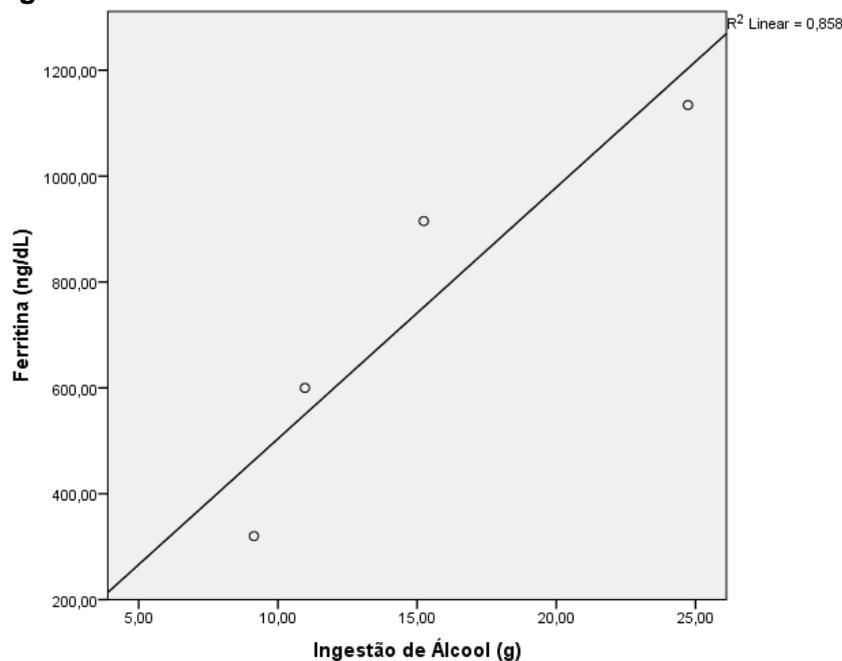
Genótipo	N	Álcool	Ferritina	Valor de p	C.C.* (p)
		Média ±DP	Média±DP		
WT/WT	39	26,81 ±23,0	933,07±532,4	0,117	0,255
WT/H63D	15	32,40 ±32,6	1010,33±463,1	0,443	0,214
H63D/H63D	1	1,02	764,50	-	-
WT/C282Y	6	17,87 ±14,8	778,14±584,4	0,872	-0,086
C282Y/H63D	4	15,02 ±6,9	693,86±327,5	0,001	1,000
C282Y/C282Y	1	14,63	1485,00	-	-

Teste de correlação de Spearman

* Coeficiente de correlação de Spearman

Fonte: Autora, 2013.

Figura 9 - Diagrama de dispersão de dados do genótipo C282Y/H63D quanto à ingestão de álcool e os níveis de ferritina



Fonte: Autora, 2013.

5.7 Avaliação da Ingestão de Vitamina C

Quando avaliados os níveis de vitamina C ingeridos pelos participantes da pesquisa, observamos que todos os grupos ultrapassaram os valores máximos recomendados de ingestão diária (75mg/dia) (Tabela 13).

Tabela 13 - Média da ingestão de vitamina C em cada grupo genotípico

Genótipos	N	Média	±DP
WT/WT	47	632.93	347.45
WT/H63D	18	715.28	396.37
H63D/H63D	1	1028.34	-
WT/C282Y	9	456.77	186.67
C282Y/H63D	5	649.34	316.07
C282Y/C282Y	2	465.72	631.64

Fonte: Autora, 2013.

Comparando esses grupos entre si, não foi observada diferença significativa entre os genótipos, quanto aos níveis de vitamina C ingerida. Diante destes resultados, nós realizamos uma análise descritiva, dividindo os pacientes em três grupos, de acordo com os valores de ingestão de vitamina C. O primeiro grupo era formado por aqueles que tinham valores de vitamina C até o valor máximo de referência (75mg/dia), o segundo grupo aqueles que obtiveram valores de 75 a 290,6mg/dia (que tiveram em 25% dos pacientes) e aqueles que apresentaram valores acima de 290,6mg/dia, que foi encontrado em mais de 50% dos pacientes com HH. A frequência de cada grupo pode ser analisada relacionando com cada genótipo da HH, conforme a tabela 14. Podemos observar que, apesar de não haver significância estatística entre os grupos, a frequência para todos os genótipos foi mais alta entre aqueles que possuem ingestão de vitamina C acima de 290mg/dia.

Tabela 14 - Níveis de ingestão de vitamina C nos genótipos da HH.

Genótipo	Valor de Referência (até 75mg)		25% (75 a 290,6)		Acima de 290,6	
	N	%	N	%	N	%
WT/WT	1	2.1%	11	23.4%	35	74.5%
WT/H63D	2	11.1%	1	5.6%	15	83.3%
H63D/H63D	0	0.0%	0	0.0%	1	100.0%
WT/C282Y	0	0.0%	3	33.3%	6	66.7%
C282Y/H63D	0	0.0%	1	20.0%	4	80.0%
C282Y/C282Y	1	50.0%	0	0.0%	1	50.0%

WT -wild type

Fonte: Autora, 2013.

6 DISCUSSÃO

A hemocromatose hereditária é considerada uma das doenças genéticas mais comuns em todo o mundo. É frequentemente encontrada entre a população caucasiana (branca) originada do norte Europeu. As mutações mais frequentemente relacionadas à Hemocromatose Hereditária (HH) correspondem às do gene HFE (C282Y e H63D) (ROSSI, et.al, 2001).

Sintomas graves aparecem quando a doença não é tratada. O primeiro fenótipo a ser expresso é a elevação dos níveis de ferro sérico que implica no aumento dos estoques do mineral sob a forma de ferritina. Esse depósito de ferro ocorre principalmente em órgãos como fígado, pâncreas, coração, que ao longo dos anos acabam causando graves danos aos mesmos (CUKJATI et.al, 2007). Esse armazenamento de ferro causa sérias complicações como diabetes, artralgia, doenças cardíacas, cirrose e câncer hepático.

Muitos estudos relatam que dentre as mutações causadoras da HH, aquela em que o indivíduo apresenta os sintomas mais severos são os homozigotos C282Y e os heterozigotos compostos. Por isso, torna-se importante diagnosticar a doença com antecedência, a fim de evitar que as complicações tonem-se ainda mais graves e que o tratamento adequado seja seguido (BITTENCOURT et.al, 2009).

Alguns fatores são considerados acentuadores destes fenótipos. Dentre eles podemos destacar a dieta rica em ferro, ingestão de álcool, obesidade, ingestão de vitamina C. E outros atuam como coadjuvantes no tratamento da doença, como é o caso da menstruação, distúrbios hormonais, gravidez. É importante que estes fatores sejam evitados em pessoas que possuem a mutação para HH, evitando-se assim que a doença se desenvolva ou se agrave.

Esta doença tem sido estudada com bastante frequência no mundo e tem apresentado frequências alélicas bastante variadas nas diferentes regiões. No Brasil, os poucos estudos relatados, demonstram uma divergência nos resultados encontrados para a frequência das mutações, talvez devido à população multiétnica aqui encontrada.

O presente estudo buscou identificar a frequência das mutações causadoras da HH na população geral e suspeita da doença, determinando os principais sintomas clínicos e laboratoriais desenvolvidos pelos pacientes e a possível contribuição dos principais moduladores de gravidade conhecidos da doença.

São considerados suspeitos de hemocromatose hereditária aqueles que apresentaram sintomas clínicos e laboratoriais compatíveis com a doença. O principal marcador de indicação da doença é o aumento dos níveis de ferro e do ferro armazenado (ferritina) no organismo (LYON e FRANK, 2001), que foi utilizado como principal critério de inclusão do nosso trabalho.

A hemocromatose hereditária pode se desenvolver em todas as idades, porém é mais comum que apareçam os primeiros sintomas depois dos 40 anos, pois o ferro depositado nos órgãos demora de 20-40 anos para causar danos, desenvolver os primeiros sintomas e as primeiras patologias associadas à doença (TAVILL, 2001). Os participantes do nosso estudo, com suspeita de HH, apresentaram idade entre 20-60 anos, com idade média de 47,56 anos (\pm DP 11,077). Pessoas com idade inferiores à 40 anos que nunca apresentaram sintomas, mas que possuem as mutações do gene HFE para HH, principalmente aqueles homocigotos C282Y, devem evitar alguns hábitos de vida, como alimentação rica em ferro, ingestão de álcool, suplementação férrica, entre outros, pois possuem grande predisposição ao desenvolvimento da HH futuramente, principalmente, após os 40 anos de idade (FERREIRA et al, 2008; TAVILL, 2001).

Entre os pacientes com suspeita de HH do nosso estudo, apenas 13,41% são mulheres e 86,59% são homens. Nossos dados refletem uma tendência relatada na literatura, onde apesar de acometer homens e mulheres igualmente (BEATON e ADAMS (2007), há uma expressão do fenótipo mais acentuada em homens, decorrendo de fatores que interferem no desenvolvimento da doença em mulheres, como é o caso da perda sanguínea mensal (menstruação) que impede que os níveis de ferro no organismo aumentem. A gravidez, lactação, fatores associados a menopausa, a baixa ingestão de álcool e uma dieta mais balanceada, também são fatores importantes para a diferença entre os sexos quanto a HH (CANÇADO e CHIATTONE, 2010). Portanto, as mulheres podem apresentar esse diagnóstico mais tardiamente, pois apresentam fatores, já mencionados, que retardam o desenvolvimento da HH (MACLAREN et.al, 2008).

6.1 Investigação das Mutações C282Y e H63D nas Amostras da População Geral e com Suspeita de HH

Estudos em diversas populações do continente Europeu, demonstram que 1:200 indivíduos da população geral apresentam a mutação C282Y em homozigose, com frequência alélica de 6%. Já a mutação H63D é encontrada em aproximadamente 1-3% em homozigose e 14% da população em heterozigose, podendo variar em cada região (FERREIRA et.al, 2008; JACKOWISKY, REBELLO e FAUCZ, 2004).

Na população geral estudada neste trabalho, com 164 indivíduos, o genótipo com maior frequência foi heterozigoto para H63D, apresentando frequência de 24,4%. Resultados similares são encontrados em muitas regiões do mundo, principalmente na Europa e América do Norte, apresentando frequências que variam de 12 a 30% de WT/H63D. (HANSON et.al,2001) Os heterozigotos para C282Y e os homozigotos H63D apresentaram frequência de 3% cada um.

Em discordância com este estudo, algumas regiões da África (Nigéria e Sul da África), Índia, Ásia e Austrália apresentam frequências alélicas tão baixas, que existem alguns trabalhos publicados nestes continentes com frequência inexistente (0%) para as mutações. (MERRYWEATHER-CLARKE et.al, 1997)

Homozigotos para a mutação C282Y, quando pesquisados em uma população geral possui frequência muito baixa ou quase nula em todas as regiões do mundo (HANSON et.al,2001). Os resultados encontrados em nosso estudo para a população geral de Alagoas estão de acordo com estes achados, não apresentando nenhum indivíduo homozigoto para C282Y.

Nos poucos estudos realizados no Brasil, os resultados não são diferentes. Em trabalhos realizados na população geral do sudeste brasileiro, mais especificamente em São Paulo, foram encontrados frequências de 22,9% e 26,75% de heterozigotos para H63D (PERÍCOLE et.al, 2005). Na região norte e nordeste, os resultados também são os mesmos, com inexistência de homozigotos C282Y (TORRES et. Al, 2008; JACKOWISKY et.al, 2004).

A presença das mutações no gene HFE, em suspeitos de HH foi encontrada em 40,20% dos pacientes deste estudo. É possível que os demais indivíduos que não apresentaram mutação no gene estudado tenham desenvolvido hemocromatose

decorrente de fatores não genéticos ou possuam outras mutações em outros genes que também são responsáveis pela sobrecarga de ferro. Esses genes podem ser HJV, HAMP, Trf2 e FPN. As mutações nestes genes possuem uma frequência baixa na população, fenótipo parecido com as mutações no gene HFE, porém possuem mecanismo de absorção de ferro diferenciado (PIETRANGELO, 2010).

A mutação mais frequentemente encontrada entre os indivíduos com clínica indicativa de HH em nosso trabalho foi a H63D. Esses resultados divergem dos encontrados em estudos na Europa, principalmente na região norte que apresentam 80-90% de pacientes com sintomas clínicos e laboratoriais da doença com genótipo de homozigotos para C282Y (HANSON et.al, 2001). Apenas 2,06% foram homozigotos para C282Y neste estudo.

20,62% são heterozigotos para H63D e apresentaram a maior frequência alélica entre os suspeitos de HH com genótipo mutado. Um estudo realizado no Brasil com indivíduos de todo o país (N=1955), apresentou resultados equivalentes aos encontrados em nosso estudo. A frequência para C282Y foi de 2,9% para homozigotos, enquanto que para a mutação H63D 30,06% eram heterozigotos (FERREIRA et.al, 2008). No entanto, outros estudos publicados em nosso país concordam com os resultados publicados na Europa e América do norte, onde a frequência é maior para os C282Y/C282Y, ficando em segundo lugar os heterozigotos para H63D (BITTENCOURT et.al, 2009).

Em um estudo publicado sobre frequência das mutações no gene HFE na América Central, mais de 80% dos pacientes com HH são heterozigotos para H63D, enquanto 12% eram homozigotos C282Y (NIEVES-SANTIAGO, et.al, 2011).

É possível que essa variação na prevalência das mutações do gene HFE no Brasil seja devido à diferenças étnicas na composição das populações das diversas regiões do país (CANÇADO et.al, 2010; BITTENCOURT, 2009).

Embora H63D tenha frequência maior nos indivíduos com HH, há uma diferença significativa nas proporções de heterozigotos C282Y entre população geral e pacientes ($p=0,0008$), o que indica uma maior contribuição funcional desta mutação para o desenvolvimento da hemocromatose. A mutação C282Y, principalmente os homozigotos para esta mutação, são responsáveis pelos sintomas e complicações mais severos da HH, por isso é uma mutação tão frequente entre os pacientes que desenvolvem a doença (ALLEN et.al, 2008; CANÇADO et.al, 2010).

Com relação ao grupo étnico em que ocorre maior frequência das mutações associadas à HH, existem muitas divergências entre os resultados encontrados no Brasil e no mundo. Por se tratar de uma população miscigenada, nem sempre encontramos as mutações somente na população branca.

Neste estudo, na população geral, os mulatos apresentaram-se em maior frequência que os brancos, e com o genótipo heterozigoto H63D mais frequente. Os negros apresentaram frequência de genótipos mutados baixa em todos os grupos genotípicos, bem como a mutação C282Y, que não houve nenhum homozigoto.

Em um estudo realizado em São Paulo, Pereira et. al (2001) descreve que para a mutação C282Y, as frequências são baixas em euro-brasileiros, mestiços e afro-brasileiros, em concordância com o nosso trabalho. Similarmente, a mutação H63D apresenta-se mais frequentemente em euro-brasileiros, seguidos de mestiços e por último, afro-brasileiros.

Nos Estados Unidos, Acton et.al (2006) demonstram em seu trabalho que tanto H63D quanto C282Y possuem maiores frequências em brancos; C282Y possuem baixas frequências em asiáticos e H63D possuem baixas frequências em negros.

Na população suspeita de HH, com relação à etnia, poucos são os relatos no Brasil e no mundo. Vários estudos demonstram que a hemocromatose ocorre principalmente em indivíduos caucasianos (brancos). O que se sabe, até então, é que a população negra possui baixa frequência genotípica para mutações no gene HFE e que a população caucasiana em diversas regiões do mundo apresentam frequência elevada do genótipo homozigoto para C282Y (ARANDA et.al, 2010). Adams e colaboradores (2005) descreveram em um estudo realizado no Canadá, com uma população estratificada de vários grupos étnicos, que a frequência de brancos com HH foi maior que nativos americanos (índios) e que hispânicos. Negros e asiáticos apresentaram uma frequência muito baixa, em relação aos demais grupos étnicos.

O nosso estudo demonstrou que a frequência de mulatos entre os indivíduos com HH foi maior que de brancos, discordando dos resultados encontrados em São Paulo e publicados por Cançado et.al (2007) que demonstram que mais de 50% dos portadores da doença são indivíduos brancos.

Em Alagoas, tanto na população geral quanto na população suspeita de HH, a mutação mais frequente encontrada em mulatos foi H63D. Porém, aqueles que apresentaram o alelo C282Y são, em sua maioria, brancos, conforme relatos descritos por Pietrangelo (2010).

A diversidade étnica e as dimensões geográficas do Brasil podem resultar em diferentes associações entre HFE e etnias (ARANDA et.al, 2010; BITTENCOURT et.al, 2002). Isto pode explicar porque os resultados nas populações de nosso estudo divergem das diversas regiões do mundo, já que o grupo étnico mais prevalente foi o mulato e a mutação heterozigoto H63D.

6.3 Avaliação dos dados laboratoriais e sintomas clínicos em relação ao genótipo de HH

Em média, os valores de ferritina dos homens foram maiores que o das mulheres em nossa pesquisa. Provavelmente, esse resultado é decorrente de fatores que modulam o aumento da ferritina, como dieta, álcool, ingestão de vitamina C e alimentos que aumentam a absorção de ferro, menstruação, esteatose e obesidade que são diferentes entre os sexos (ARANDA, et al, 2010).

Homozigotos C282Y tendem a desenvolver sintomas mais severos, apresentando altos níveis de ferritina sérica. Os genótipos heterozigotos para C282Y e para H63D são considerados de graus mais leves, porém os heterozigotos compostos têm fenótipos semelhantes aos homozigotos (ALLEN et.al, 2008; WOJCIK et.al, 2002). Cançado e colaboradores (2010) relatam que heterozigotos para H63D não desenvolvem fenótipos da HH.

Podemos observar que em nossa pesquisa os homozigotos C282Y apresentaram valores de ferritina mais elevados que os demais genótipos, porém, não apresentando significância estatística entre estes e os heterozigotos H63D, possivelmente decorrente do pequeno tamanho amostral. Este dado está de acordo com vários trabalhos publicados, que descrevem que indivíduos com este genótipo expressam um fenótipo mais acentuado da HH. (PIETRANGELO, 2010) No entanto, os heterozigotos para H63D também apresentaram altos valores de ferritina, quando comparados aos demais genótipos.

Mesmo apresentando valores altos de ferritina, alguns dos participantes do nosso estudo não possuíam nenhuma mutação. A partir deste resultado, é

necessário identificar quais os fatores encontrados em nossa população que poderiam estar alterando os níveis de ferro. É possível que estas alterações possam estar associadas a outras mutações ou aos moduladores de gravidade que acentuam os estoques de ferro no organismo, podendo ser consideradas, também, a presença de outras doenças hepáticas associadas.

Foram relatados pelos indivíduos alguns sintomas e complicações decorrentes da HH. As alterações mais comumente descritas foram a diabetes, artralgia, fadiga e problemas cardíacos. A artralgia e a fadiga foram relatadas com maior frequência entre os indivíduos com hiperferritinemia. De acordo com Lyon e Frank (2001), o sintomas da HH são causados pelo acúmulo de ferro nos órgãos, ocorrendo lesão dos seus tecidos. Estes autores relatam que o sintoma clínico mais comum é a fadiga, havendo outros sintomas como a artralgia, problemas cardíacos, diabetes mellitus, cirrose hepática, hiperpigmentação, conforme demonstrado em nosso estudo, onde fadiga e a artralgia foram relatados com maior frequência entre os participantes.

Porém, essas manifestações foram desenvolvidas em sua maioria por indivíduos com genótipo heterozigoto para H63D ou C282Y.

Alguns estudos estimam que aproximadamente 50% dos pacientes homozigotos C282Y desenvolva sintomatologia da HH (PIETRANGELO, 2010). Aqueles que são assintomáticos para este genótipo são mulheres em fase pré-menopausa (LYON e FRANK,2001).

Quatro indivíduos heterozigotos C282Y desenvolveram diabetes em nosso estudo. A diabetes é uma consequência da HH bem frequente. Os altos níveis de ferro no organismo fazem com que o indivíduo desenvolva uma intolerância a glicose forte, causando o surgimento da patologia. Além disso, o depósito de ferro no pâncreas impede que a insulina cumpra seu papel de forma adequada (HUANG et.al, 2011).

O fato de não haver em nossa amostra indivíduos com sintomas mais graves como cirrose e carcinoma hepatocelular pode estar associado à baixa frequência do genótipo homozigoto C282Y, que seria o principal responsável pelo fenótipo mais acentuado da HH. Entretanto, como o desenvolvimento da doença é gradativo, há a necessidade de acompanhamento constante destes pacientes a fim de evitar o desenvolvimento destas complicações mais graves (CHEN e CHLOUPKOVÁ, 2009).

6.4 Avaliação da Esteatose Hepática e Obesidade em HH

A obesidade é um forte fator para o aumento de ferritina no sangue. Pessoas obesas tendem a alimentar-se de forma inadequada e com maior intensidade, ingerindo alimentos que possam ser ricos em ferro e que aumentam a absorção do mineral (ROSSI, et.al, 2001; GOOT et.al, 2012). 81% dos indivíduos com hiperferritinemia, neste estudo, são obesos ou com sobrepeso.

Em uma pesquisa realizada na França, a obesidade aumentou os níveis de ferritina apenas em pacientes homocigotos C282Y (DEUGINIER et.al, 2008). Rossi e colaboradores (2001) demonstram que a obesidade aumenta significativamente os níveis de ferro no sangue, e conseqüentemente a ferritina, em pacientes com qualquer genótipo da HH.

O grau de obesidade observado em nosso estudo foi bem acentuado, principalmente entre os heterocigotos para H63D, onde encontramos valores mais altos de ferritina.

Outro fator importante, decorrente da obesidade e que pode aumentar os níveis de ferritina é a esteatose (TRAN e GUAL, 2013). A gordura no fígado pode causar danos aos hepatócitos. Esse acúmulo de gordura, oxida os hepatócitos, causando degeneração nos mesmos, liberando a ferritina e aumentando o ferro na corrente sanguínea (TRAN e GUAL, 2013 ; FARIA e ZANELLA, 2000) .

Dantas e colaboradores (2002) em estudo com pacientes com esteatose hepática, demonstram que 42% dos pacientes apresentaram aumento nos níveis de ferritina sérica. A esteatose apresentou-se em 22,86% dos pacientes com HH, com genótipo heterocigotos H63D.

6.5 Avaliação nutricional de ingestão de ferro

A absorção de ferro é maior em pacientes com HH, induzindo diretamente o aumento nos níveis de ferritina do sangue. Estudos demonstram que a ingestão de ferro não heme não altera os níveis de ferritina, porém se for ingerida com alimentos que aumentam a sua absorção intestinal, ele apresenta relação direta com o aumento da mesma. Já o ferro heme pode ser absorvido duas vezes mais em pacientes com HH. (HEATH e FAIRWEATHER-TAIT, 2003)

Em nosso estudo, homens apresentaram ingestão de ferro mais elevada que as mulheres. Esse fato pode ser explicado devido a dieta dos homens ser mais rica em ferro e com valores de ingestão de ferro acima 18mg/dia, que as mulheres, principalmente quanto a ingestão de carne vermelha. (ROSSI et.al, 2001)

Muitos trabalhos demonstram que a ingestão de ferro acima do valor máximo (18mg/dia) está relacionada ao aumento de ferritina (LEGGET et.al, 1990; GREENWOOD et. al, 2005; BURKE et.al, 2001; BEATON e ADAMS, 2007). Em nosso trabalho, a ingestão de ferro calculada a partir do QFCA em pacientes que obtiveram resultados de dosagens de ferritina próximas à data de coleta do questionário, apresentou significância ($p=0,004$), demonstrando que a alimentação rica em ferro altera diretamente os níveis de ferritina independente do genótipo. Porém, quando comparados os valores de ingestão de ferro e os níveis de ferritina em cada grupo genotípico, não houve nenhuma significância estatística. Uma possível explicação para esta falta de correlação pode residir no pequeno tamanho amostral deste estudo, particularmente em relação aos subgrupos genotípicos.

É descrito em muitos trabalhos que apenas os homozigotos C282Y apresentam uma relação significativa com o aumento de ferritina a partir de uma ingestão aumentada de ferro (HEATH e FAIRWEATHER-TAIT, 2003; BEATON e ADAMS, 2007; BURKE et. al, 2001).

Na Holanda, estudo demonstra que altas doses de ingestão de ferro diárias aumentam significativamente os níveis de ferritina em homozigotos C282Y e heterozigotos compostos, não havendo significância nos outros genótipos. (ADAMS e BEATON, 2012).

Na Austrália, que é considerada uma das populações mais consumidoras de carne, uma pesquisa comprovou, entretanto, que, independente da presença da mutação, altas ingestões de carne vermelha aumentam a ferritina sérica. E na presença da mutação, esses indivíduos se tornam ainda mais susceptíveis a essa hiperferritinemia (LEGGETT et.al, 1990).

Entre os indivíduos do nosso estudo, aqueles que ingerem ferro em quantidades maiores que 18mg/dia, são, em maior frequência, do grupo dos heterozigotos H63D, com níveis mais altos de ferritina quando relacionados aos demais genótipos. Porém, estes resultados discordam de vários trabalhos publicados, onde apenas os pacientes com a mutação C282Y diante de altas ingestões de ferro podem desenvolver altos níveis de ferritina, sendo as pessoas

que possuem os genótipos com a mutação H63D, incapazes de apresentar valores de ferritina tão acentuados (SWINKELS et.al, 2006; BEUTLER, 2003).

Nenhum dos homozigotos para C282Y, em nosso estudo, teve ingestão de ferro acima dos valores de referência durante um dia, no entanto, seus valores de ferritina continuaram aumentados. Segundo Deugnier e Mosser (2008), a ingestão de ferro é um dos principais fatores que propiciam o aumento da ferritina nesse grupo genotípico, mesmo que as dosagens de ingestão de ferro estejam dentro dos valores de referência. Por isso a necessidade de evitar os alimentos ricos em ferro. Porém, podemos observar, mesmo sem significância estatística, que quando comparamos os valores de ingestão de ferro aos valores de ferritina coletados próximo à aplicação do QFCA, provavelmente após iniciarem dieta alimentar, os homozigotos C282Y demonstraram valores de ferritina mais baixos dentre os outros genótipos. O tamanho amostral pequeno para os homozigotos C282Y impediram a realização de um estudo mais aprofundado entre eles.

Portanto, é importante, que haja um controle da dieta, diminuindo a ingestão dos principais alimentos ricos em ferro, suplementos férricos e alimentos que aumentam a absorção deste mineral por parte daqueles que possuem a HH. Esta dieta também é usada como método profilático para aqueles que possuem a mutação, porém não desenvolveram sintomas da doença, como forma de evitar o desenvolvimento da HH (BURKE et. al, 2001).

6.6 Avaliação da Ingestão de Álcool

Tanto para homens quanto para mulheres, o consumo de álcool interfere diretamente nos níveis de ferritina. Esse resultado foi encontrado em nosso estudo e em vários artigos publicados que fazem essa relação, onde quase 80% dos pacientes que fazem ingestão de álcool apresentaram aumento significativo de ferritina (MILMA e KIRCHHOFF, 1996; ROSSI et.al, 2001; PEDERSEN e MILMAN, 2009).

Já relatados em várias pesquisas, há uma maior prevalência de ingestão de álcool e alcoolismo entre os homens do que entre as mulheres (ALMEIDA, et.al, 2004; GALDURÓZ e CAETANO, 2004). Os resultados de nosso estudo estão em concordância com esta afirmação, onde os homens bebem mais que as mulheres.

Deugnier e colaboradores (2008) relatam que o álcool acelera significativamente o aumento do ferro do organismo e que pessoas com as mutações da HH não devem ingerir álcool para evitar que a doença seja agravada. O álcool é um importante fator para o desenvolvimento de doenças do fígado, acentuando os danos causados pela HH, podendo evoluir para cirrose hepática, fibrose e carcinoma hepatocelular, pois altera a homeostase do ferro (FLETCHER et.al, 2003; WOOD et.al., 2008).

É estimado pela OMS (Organização Mundial de Saúde) que 76,3 milhões de pessoas no mundo que ingerem bebida alcoólica possuem alguma doença relacionada ao uso do álcool. Levando em consideração que o Brasil é o maior produtor de cana de açúcar e álcool, principalmente a cachaça, a ingestão no país é bem acentuada, principalmente na região nordeste. Este pode ser um fator importante para agravar a HH em nossa região, pois trata-se de uma questão fortemente cultural (FILIZOLA et. al, 2008).

Apesar de o álcool alterar os níveis de ferritina independente da presença da mutação para HFE (ROSSI, et.al, 2001), em nosso trabalho os indivíduos com maior consumo de álcool e altos valores de ferritina possuíam genótipos heterozigotos para H63D. É possível, então que o álcool esteja influenciando a expressão dos sintomas da HH nestes pacientes. No entanto, apenas os heterozigotos compostos apresentaram significância estatística quanto a correlação entre ingestão de álcool e os níveis de ferritina ($p=0,001$) em nosso trabalho. Há relatos na literatura que mostram que esse genótipo, quando sofre influências dos moduladores de gravidade, como é o caso da ingestão de álcool, expressa fenótipos comparados àqueles homozigotos C282Y, ou seja, desenvolve sintomas mais severos da HH (ARANDA et.al, 2010).

6.7 Avaliação da Ingestão de Vitamina C

Segundo Milward e colaboradores (2008), alimentos ricos em vitamina C devem ser evitados por pacientes com HH, principalmente quando associados a alguma refeição, pois aumentam a absorção intestinal do ferro. No entanto, em nosso estudo, todos os indivíduos, independentemente de genótipo, apresentaram elevada ingestão de vitamina C. Apesar de os heterozigotos para H63D apresentarem valores mais altos de ferritina, o que poderia estar relacionado à maior

ingesta de vitamina C deste grupo, não houve significância estatística entre os genótipos e a ingestão da vitamina.

Estudos anteriores ao nosso, com um tamanho amostral ampliado demonstraram que altas ingestões de vitamina C em pacientes com HH, aumentam o nível de ferro no organismo e seu consequente depósito hepático (BURKE, et.al, 2001; HURRELL e EGLI, 2010). É provável que a vitamina C seja um fator que acentua o desenvolvimento da HH em heterozigotos H63D, porém não há estudos que relatem a influencia da vitamina C nos diferentes genótipos causadores da HH. O que se sabe é que a vitamina C quando ingerida juntamente com alimentos ricos em ferro heme, aumenta significativamente a absorção intestinal de ferro (HEATH e FAIRWEATHER-TAIT, 2003).

7 CONCLUSÕES

O genótipo mais frequente encontrado na população geral de Alagoas é o hete rozigoto para H63D, sendo compatível com os resultados encontrados em outras regiões do Brasil e no Mundo.

Os genótipos mais frequentes encontrados entre os pacientes com suspeita de Hemocromatose em nossa pesquisa foram os heterozigotos H63D, discordando de vários relatos que mostram uma maior frequência de C282Y entre pacientes com HH. Entretanto, concorda com alguns estudos realizados no Brasil, podendo estar relacionado a população multiétnica aqui encontrada.

A mutação C282Y é mais frequente no grupo de pacientes comparativamente à população geral, o que indica uma maior contribuição funcional desta mutação para o desenvolvimento da HH.

Os pacientes que possuem mutação desenvolveram os sintomas com idade média de 44,57 anos, relatada no prontuário com frequência maior em homens que em mulheres. Os sintomas clínicos e laboratoriais mais severos foram apresentados pelos homens.

Os mulatos apresentam-se em maior prevalência dentre os indivíduos que apresentaram mutações, tanto na população geral quanto na população com suspeita de HH, diferentemente dos relatos que afirmam que a frequência é maior em brancos. Essa divergência se dá, provavelmente devido à mistura étnica encontrada no Brasil.

O sintoma mais comum apresentado pelos pacientes foi a fadiga e a artralgia e a complicação mais frequente foi a diabetes. A obesidade foi frequente entre os pacientes com HH, bem como a esteatose, que podem estar associadas ao aumento de ferritina nesses pacientes, sendo considerados possíveis moduladores de gravidade da HH em pessoas com a mutação.

Os valores de ingesta de álcool relatados pelos pacientes estão diretamente correlacionados com os níveis de ferritina sérica. A maioria dos participantes que ingerem álcool em maior quantidade são homens, possuindo os maiores níveis de ferritina.

Quanto a ingestão de ferro, o grupo de pacientes (com ou sem mutação) possui um padrão de dieta rico em ferro e vitamina C, que são considerados importantes fatores para o aumento de ferritina e o agravamento da HH.

REFERÊNCIAS

ACTON R. et al. Geographic and racial/ethnic differences in HFE mutation frequencies in the Hemochromatosis and Iron Overload Screening (HEIRS) Study. **Ethnic Disease**, USA , v. 16, n.4 p.:815-21, Out. 2006

ADAMS, P. C.; BARTON, J. C. How I treat hemochromatosis **Blood**, London, v. 116, p. 317-325, Mar. 2010

ADAMS P.C. et.al. Hemochromatosis and Iron Overload Screening (HEIRS) Study Research Investigators. **The new england journal of medicine**, California, v.17, n. 52 p: 1769-78, Fev. 2005

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Regulamento técnico sobre ingestão diária recomendada (idr) para proteína, Vitaminas e minerais**. Consulta Pública nº 80, 2004. Disponível em: <<http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP%5B8989-1-0%5PDF>> Acesso em: 06 ago. 2012

AGUILAR - MARTINEZ, P. et al. Iron overload in HFE C282Y heterozygotes at first genetic testing: a strategy for identifying rare HFE variants, **Haematologica**, France, v. 96, n.4 p.507–514, Jan. 2011

AGUILAR-MARTINEZ, P. et al. Variable phenotypic presentation of iron overload in H63D homozygotes: are genetic modifiers the cause? **GUT Journal**, France, n. 48 p.836–842, Jun. 2001

ALLEN, K. J. et al. Iron-overload-related disease in hfe hereditary hemochromatosis. **New England Journal Medicine**. San Francisco, v.358 p:221-230, Maio 2008

ALMEIDA-FILHO, N.; LESSA, I.; MAGALHÃES, L. Determinantes sociais e padrões de consumo de álcool na Bahia – Brasil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 38, n.1 p. 45-54, Fev. 2004

AGOSTINHO M.F. et al. Mutation analysis of the HFE gene in Brazilian populations. **Blood Cells Molecular Disease**, São Paulo, v. 25, n.5-6 p.324-327, Out-Dez.1999

ARANDA,N.; VITERI, F.E.; MONTSERRAT,C.; ARIJA, V. Effects of C282Y, H63D, and S65C HFE gene mutations, diet, and life-style factors on iron status in a general

Mediterranean population from Tarragona, Spain. **Annals of Hematologica**, Tarragona, v.89, n.8 p. 767-773, Ago. 2010

BACON, B. R. et al. Diagnosis and Management of hemochromatosis: 2011 Practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, **HEPATOLOGY**, USA, v.54, n. 1, Jul. 2011

BATTS, K.P. Iron overload syndromes and the liver **Modern Pathology**, USA, n.20, p.S31–S39, Fev. 2007

BEATON, M.D.; ADAMS, P.C. The myths and realities of hemochromatosis. **Can Journal Gastroenterology**, London, v.21, n.2 p.101-104, Fev. 2007

BEATON, M.D.; ADAMS, P.C. Treatment of hyperferritinemia. **Annals of Hepatology**, London, v.11, n.3 p: 294-300, Maio-Jun.2012

BEUTLER.E. The HFE Cys282Tyr mutation as a necessary but not sufficient cause of clinical hereditary hemochromatosis **BLOOD**, Washington, v.101, p. 3347-3350, Maio. 2003

BITTENCOURT, P.L. et al. Analysis of HFE And Non-HFE Gene Mutations in Brazilian Patients with Hemochromatosis. **Journal CLINICS**, São Paulo, v. 64, n.9 p. 837–841, Jun. 2009

BITTENCOURT, P.L. et al. Analysis of HLA-A antigens and C282Y and H63D mutations of the HFE gene in Brazilian Patients with hemochromatosis **Brazilian Journal Medicine Biology Research**, Salvador, v. 35, n.3 p. 329-335, Mar. 2002

BRANDÃO, A.H.F.; CABRAL, M.A.; CABRAL, A.C.V. A suplementação de ferro na gravidez: orientações atuais. **FEMINA**, Belo Horizonte, v. 39, n. 5, Maio 2011

BRISSOT, P.; MOIRAND, R.; JOUANOLLE, A.M. A Genotypic study of 217 unrelated probands diagnosed as "genetic hemochromatosis" on "classical" phenotypic criteria. **Journal of Hepatology**, France, v.30, p: 588-593, Abr. 1999

BUENO, S.; DUCH, C.R.; FIGUEIREDO, M.S. Mutações no gene HFE (C282Y, H63D, S65C) em uma população brasileira. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São Paulo, v.28, n.4 p. 293-295, Dez. 2006

BURKE, W. ; IMPERATORE, G.; REYES, M. Iron deficiency and iron overload: effects of diet and genes. **Proceedings of the Nutrition Society**, USA, v.60, P. 73–80, 2001

BURT, M.J.; GEORGE, P.M.; UPTON, J.D.; The significance of haemochromatosis gene mutations in general population: implications for screening. **GUT Journal**, New Zealand, v.43, p: 830-836, Dez. 1998

BURTIS C. A., ASHWOOD E.R., BRUNS D.E. **Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics**. 4. ed. St. Louis: Elsevier, 2006

BURTIS, C.A.; ASHWOOD, E.R. **Fundamentos de química clínica**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998

CALADO, R.T. et al. HFE gene mutations in coronary Atherothrombotic disease **Brazilian Journal of Medicine Biology**, São Paulo, v.33 n.3, Mar, 2000

CANÇADO, R.D. Deficiência de ferro: causas, efeitos e tratamento. **Revista Brasileira de Medicina**, São Paulo, v. 202, p 17 – 26, 2010

CANÇADO, R.D; CHIATTONE, C. S. Visão atual da hemocromatose hereditária **Revista brasileira de hematologia e hemoterapia**, São Paulo, v.32, n.6 p.469-47, 2010

CANÇADO, R.D. Aspectos Atuais do Metabolismo do Ferro. **Revista Brasileira de Medicina**, São Paulo, v.46, p. 10-16, 2001

CANÇADO, R. D. et al. Estudo das mutações C282Y, H63D e S65C do gene HFE em doentes brasileiros com sobrecarga de ferro. **Revista brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São José do Rio Preto, n. 29, v.4 p:351-360, Out-Dez, 2007

CANÇADO, R. D. et al. Avaliação laboratorial da deficiência de ferro em doadoras de sangue. **Revista brasileira de Hematologia e hemoterapia**, São Paulo, v.29, n.2 p:153-159, 2007

CAUZA E. et al. Mutations of the HFE Gene in Patients With Hepatocellular Carcinoma. **Annals Journal Gastroenterology**, Austria, v. 98, n. 2 p:442-447, Fev. 2003

CHEN, J.; CHLOUPKOVÁ, M. Abnormal iron uptake and liver cancer. **Cancer Biology & Therapy**, USA, v.8; n.18 p. 1699-1708, Set. 2009

CONNOR, J.R. et al. Is hemochromatosis a risk factor for Alzheimer's disease? **Journal Alzheimers Disease**, USA, v. 3, n. 5 p. 471-477, Out. 2001

CONTE V.P. Hemocromatose hereditária. **Revista Brasileira de Medicina**, São Paulo, v.57, p.553-564, 2000

CUKJATI, M. et al. Prevalence of H63D, S65C and C282Y hereditary hemochromatosis gene mutations in Slovenian population by an improved high-throughput genotyping assay **BMC Medical Genetics**, Slovenian, v. 8 p.69, Nov. 2007

D'ALESSIO F.; HENTZE M.W.; MUCKENTHALER M.U. The hemochromatosis proteins HFE, TfR2, and HJV form a membrane-associated protein complex for hepcidin regulation. **Journal of Hepatology**, Germany, v.57 n.5 p.1052-1060, November, 2012

DANTAS, T. L. et al. Esteato-hepatite não alcoólica e sobrecarga de ferro: avaliação clínico-histológica **Gastroenterology Endoscopy Digestive**. n.21, v.5, p:207-212, Set - Out. 2002

DEUGNIER, Y; BRISSOT, P.; LOREAL, O. Iron and the liver: Update 2008 **Journal of Hepatology**, France, v.48, n. 1 , p.113-123, Fev. 2008

DEUGNIER Y, MOSSER J. Modifying factors of the HFE hemochromatosis phenotype. **Revista Gastroenterology and Hepatology**, France, v.2 n.4 p.531-40, Ago. 2008

DEVER, J. B. et al. Phenotypic Characteristics and Diagnoses of Patient referred to an iron overload clinic. **Digestive Disease Scienses**, USA, v.55, n.3 p. 803–807, Dez. 2010

DOMINGOS, C.R.B. Aumento de ferro, hemocromatose hereditária e defeitos no gene HFE. O que conhecemos na população brasileira? **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São José do Rio Preto, v.29,n 4, Out-Dez. 2007

FARIA, A.N.; ZANELLA, M. T. Obesidade: condição prejudicial à saúde **Revista Brasileira de Nutrição Clínica** v.15, n.1, p: 276-281, Jan – Mar, 2000

FEDER, J.N. et al. A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary hemochromatosis. **National Genetic.**; USA, v.13, p.399-408, Ago. 1996

FERREIRA, A.C.S. et al. Prevalência das mutações C282Y e H63D no gene HFE em indivíduos brasileiros com suspeita clínica de hemocromatose hereditária. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São Paulo, v.30, n.5, p. 379-383, Set - Out. 2008

FILIZOLA, P. R. B. et al. Alcoolismo no Nordeste do Brasil – prevalência e perfil sociodemográfico dos afetados **Jornal Brasileiro de Psiquiatria**, Rio de Janeiro, v.57 n.4 p.227-232, 2008

Fix OK, Kowdley KV. Hereditary hemochromatosis. **Minerva Medicine**, USA, v. 99, n.6 p:605-617, Dez. 2008

FLETCHER, L. M.. ; POWELL L. W. Hemochromatosis and alcoholic liver disease **Alcohol**, Australia, v. 30, n. 2 , p: 131-136, Jun. 2003

GAC, G.L.; FÉREC, C. The molecular genetics of haemochromatosis. **European Journal of Human Genetics**, France, v. 13; p: 1172-1185, Nov. 2005

GÁLDUROZ, J.C.F; CAETANO, R. Epidemiologia do uso de álcool no Brasil. **Revista Brasileira de Psiquiatria**. São Paulo, v.26 n.1, Maio, 2004

GARCIA, I. A. C. Hemocromatosis tipo I. Patogenia y diagnóstico **Revista Electrónica de las Ciencias Médicas en Cienfuegos**, Cuba, v.10, n.2, 2012

GOOT, K. et al. Darrell. Elevated serum ferritin. What should GPs know? **Australian Family Physician**, Austrália, v. 41, n. 12, p: 945 – 949, Dez. 2012

GREENWOOD, D C. et al. HFE Genotype Modifies the Influence of Heme Iron Intake on Iron **Epidemiology**, UK, v. 16, n. 6 p: 802-805, Nov. 2005

GRIFFITHS, W. J. H. Review article: the genetic basis of haemochromatosis **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, Cambridge, v. 26; n.3; p. 331-342, Ago. 2007

GROTTO, H.Z.W. Metabolismo do ferro: uma revisão sobre os principais mecanismos envolvidos em sua homeostase. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São Paulo, v.30, n.05, Set – Out. 2008

GROTTO, H.Z.W Fisiologia e metabolismo do ferro. **Revista Brasileira. Hematologia e Hemoterapia**, São Paulo, v.32, n. 2, p:8-17, Maio, 2010

HANSON, E.H.; IMPERATORE, G.; BURKE, W. HFE gene and hereditary hemochromatosis: A huge review. **American Journal of Epidemiology**, USA, v.154, n.3, p. 193-206, Ago. 2001

HEATH, A.L.M.; FAIRWEATHER, S.J.T. Health Implications of Iron Overload: The Role of Diet and Genotype **Nutrition Reviews** , New Zealand, v. 61, n. 2 p:45-62, Fev. 2003

HERRUZO, J.A.S; MUÑOZ, P.S. HFE gene mutations and risk of Hepatocellular carcinoma. **Revista Espanhola de Enfermagem Digestiva**, Madri, v. 99, n. 7 p: 369-375, Jul. 2007

HOFFBRAND, A.V; MOSS, P. A. H. **Fundamentos em Hematologia**. 6^a Edição. Porto Alegre: Artmed, 2011

HUANG, J. et al. Iron Overload and Diabetes Risk: A Shift From Glucose to Fatty Acid Oxidation and Increased Hepatic Glucose Production in a Mouse Model of Hereditary Hemochromatosis. **Diabetes**, USA, v.60, n.1, p: 80–87, Jan. 2011

HURREL, R.; EGLI, I. Iron bioavailability and dietary reference values. **American Journal Clinic Nutrition**, Zurique, v. 91, n. 5, p.1461-1467, Maio 2010

JACKOWSKI, D. ; REBELLO, E.S.; FAUCZ, F.R. Análise da frequência da mutação C282Y na população paranaense **Revista Estudos de Biologia**, Paraná, v. 26, n.55, p. 11-18, Mar. 2004.

LEE M, KOWDLEY KV. Alcohol's effect on other chronic liver diseases. **Clinic Liver Disease**, USA, v .16, n.4, p.827-837, Nov. 2012

LEGGETT, B. A. et al. Factors Affecting the Concentrations of Ferritin in Serum in a Healthy Australian Population. **Clinical Chemistry**, Austrália, v. 36, n. 7, p. 1350-1355, Jul. 1990

LORENZII, T.F. **Manual de Hematologia Propedêutica e Clínica**. 3. edição. Rio de Janeiro: Medsi, 2003

LYON, E.; FRANK, E.L. Hereditary hemochromatosis since Discovery of the gene. **Clinical Chemistry**, USA, v.47, n.7, p. 1147-1156, Jul. 2001

MACLAREN, G.D. et al. Clinical manifestations of hemochromatosis in HFE C282Y homozygotes identified by screening. **Can Journal Gastroenterology**, USA, v. 22, n. 11, p. 923-929, Nov. 2008

MARTINELLI, A. L.C. et al. Hereditary hemochromatosis in a Brazilian university hospital in São Paulo State. **Genetic Molecular Research**, São Paulo, v. 4, n. 1, p: 31-38, Mar. 2005

MCCLUNG, J.P.; KARL, J.P. Iron deficiency and obesity: the contribution of inflammation and diminished iron absorption. **Nutrition Reviews**, USA, v.67, n.2, p.100–104, Fev. 2009

MENEZES, J.F. et al. Estudo das mutações C282Y e H63D do gene da hemocromatose hereditária em pacientes com anemia falciforme do nordeste do Brasil **Gazeta Médica da Bahia**, Salvador, v.80, n.3, p.69-73, Ago-Set. 2010

MERRYWEATHER-CLARKE, A.T.; POINTON, J.J.; SHEARMAN, J.D. Global prevalence of putative haemochromatosis mutation. **Journal Medicine Genetic**, UK v.34, p: 275-278, Abr. 1997

MILMA N.; KIRCHHOFF M. Relationship between serum ferritin, alcohol intake, and social status in 2235 Danish men and women. **Annals of Hematologica**, Dinamarca, n.72, v.3, p:145-51, Mar. 1996

MILWARD, E.A. et al. Noncitrus fruits as novel dietary environmental modifiers of iron stores in people with or without HFE gene mutations. **Mayo Clinic**, Austrália, v.83, n.5, p.543–549, Maio 2008

MURA C.; RAGUENES, O. HFE mutations analysis in 711 hemochromatosis probands: evidence for S65C implication in mild form of hemochromatosis. **Blood**, França, v.93, p: 2502-2505, Abr. 1999

NASCIMENTO, L.B. et al. Iron and Neurodegeneration: From Cellular Homeostasis to Disease. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, Portugal, v.2012, Fev. 2012

NEMETH,E.; GANZ,T. The Role of Hepcidin in Iron Metabolism. **Acta Haematologica**, USA, v.122, n. 2-3, p. 78–86, Nov. 2009

NIEVES-SANTIAGO, P. et al. Presence of hemochromatosis-associated mutations in Hispanic patients with iron overload. **Puerto Rico Health Science Journal**, Porto Rico, n. 30, v. 3, p.135-8, Set. 2011

OLYNYK, J.K. et al. Hereditary hemochromatosis in te post HFE era. **Hepatology**, Austrália, v.48, n.3, p. 991-1001, Set. 2008

PEDERSEN P, MILMAN N. Extrinsic factors modifying expressivity of the HFE variant C282Y, H63D, S65C phenotypes in 1,294 Danish men. **Annals of Hematology**, Dinamarca, v. 88, n.10, p:957-65, Out. 2009

PEREIRA AC, MOTA GF, KRIEGER JE. Hemochromatosis gene variants in three different ethnic populations: effects of admixture for screening programs. **Human Biology**, São Paulo, n.73, v.1, p:145-51, Fev. 2001

PERÍCOLE , F.V. et al. Hemochromatosis (HFE) gene mutations in Brazilian chronic hemodialysis patients **Brazilian Journal Medicine Biology Research**, Ribeirão Preto, v. 38, n. 9, p. 1321-1324, Set. 2005

PIENTRANGELO, A. Non HFE Hemochromatosis. **Seminars in Liver Disease**, Itália, v. 25, n.4, p.450-60, Nov. 2005

PIETRANGELO, A. Hereditary Hemochromatosis: Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment. **Gastroenterology**, Itália, v. 139. p. 393-408, Ago. 2010.

ROSSI,E. et al. Effect of Hemochromatosis Genotype and Lifestyle Factors on Iron and Red Cell Indices in a Community Population. **Clinical Chemistry**, Austrália, V.47, p.202-208, Fev. 2001.

SANTOS, P.C.J.L. et al. Alterações moleculares associadas a hemocromatose hereditária **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São Paulo, v.31, n.3, p. 192-202, Jul. 2009

SCOTET, V. et al. Hereditary Hemochromatosis: Effect of Excessive Alcohol Consumption on Disease Expression in Patients Homozygous for the C282Y Mutation. **American Journal of Epidemiology**, França, v. 158, n. 2, Jul. 2003

SEBASTIANI G.; WALKER A.P. HFE gene in primary and secondary hepatic iron overload. **World Journal Gastroenterology**, Itália, v.13, n.35, p. 4673-4689, Set. 2007

SIAH, C.W. et al. Normal Iron Metabolism and the Pathophysiology of Iron Overload Disorders **Clinic Biochemistry Research**, Austrália, n.27; v.1; p. 5–16, Fev. 2006

SIDDIQUE, A.; KOWDLEY, K.V. Review article: the iron overload syndromes **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, USA, v.35, n.8, p: 876 - 893, Abr. 2012

SOUZA, A. F. M.; CARVALHO-FILHO, R. J.; CHEBLI, J. F
HEMOCROMATOSE HEREDITÁRIA Relato de caso e revisão da literatura
Gastroenterology, Juiz de Fora, v.38, n.3, Set. 2001

SWINKELS, D.W. et al.. Hereditary Hemochromatosis: Genetic Complexity and New Diagnostic Approaches **Clinical Chemistry**, Nimegue, v. 52, n. 6, p.950-968, Jun. 2006

SWINKELS , D. W.; FLEMING, R. E. Novel observations in hereditary hemochromatosis: potential implications for clinical strategies **Haematologica**, USA, v.96, n.4, p. 485–488, Abr. 2011

TAVILL, A. Diagnosis and management of hemochromatosis. **Hepatology**, Filadélfia, v.33, n.5, p. 1321-1327, Mar. 2001

TAVILL, A.S. Clinical implications of the hemochromatosis gene **The New England Journal of Medicine**, Inglaterra, v. 34, p. 755-757, Set. 1999

TOMATSU, S. et al. Contribution of the H63D mutation in HFE to murine hereditary hemochromatosis **Proceedings of the National Academic Science** , USA, v. 100, n. 26, p. 15788–15793, Dez. 2003.

TORRES, F.R. et al. Frequency of the HFE C282Y and H63D polymorphisms in Brazilian malaria patients and blood donors from the Amazon region
Genetic Molecular Research, São Paulo, v. 7 n. 1, p. 60-64, Jan. 2008

TRAN A. ; GUAL P. Non-alcoholic steatohepatitis in morbidly obese patients. **Clinic Research Hepatology Gastroenterology**, França, v.37, n. 1, p. 17-29, Jan. 2013

WANG, W. et al. Serum ferritin: Past, present and future. **Biochemistry Biophys Acta**, USA, v.1800, n.8, p:760-769, Mar. 2010

WANG, J.; PANTOPOULOS, K. Regulation of cellular iron metabolism. **Biochemistry Journal**, USA, v. 434, p.365-381, Mar. 2011

WOJCIK, J.P. et al. Natural History C282Y Homozygotes for Hemochromatosis. **Can Journal Gastroenterology**, London, v.16, n.05, p. 297-302, Maio 2002

WOOD, M.J; POWELL, L.W.; RAMM, G.A. Environmental and genetic modifiers of the progression to fibrosis and cirrhosis in hemochromatosis **Blood**, Australia, v. 111, n. 9, p. 4456-4462, Mar. 2008

ZHANG, A.S.; ENNS, C.A. Molecular mechanisms of normal iron homeostasis **ASH Education Book**, USA, v. 2009, n. 1 p.207-214, 2009

APÊNDICE A – Questionário de Frequência de Consumo Alimentar - QFCA

Paciente:

Idade:

Peso:

Altura:

Produto	Quantidade	Frequência							
		Mais de 3X/dia	2 a 3 X/dia	1 X/dia	5 a 6 X/semana	2 a 4 X/semana	1 X/semana	1 a 3 X/mês	Nunca/quase nunca
Arroz	Colher sopa cheia ()								
Feijão	Concha média ()								
Macarrão	Escumadeira cheia ou pegador ()								
Farinha de Mandioca	Colher sopa ()								
Pão	1 Francês/2 fatias pão forma ()								

Modelo proposto por Schieri (1998) e validado para a população Brasileira maior que 12 anos.

ANEXO A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (T.C.L.E.)

“O respeito devido à dignidade humana exige que toda pesquisa se processe após consentimento livre e esclarecido dos sujeitos, indivíduos ou grupos que por si e/ou por seus representantes legais manifestem a sua anuência à participação na pesquisa.” (Resolução. nº 196/96-IV, do Conselho Nacional de Saúde)

Eu,, tendo sido convidad(o,a) a participar como voluntári(o,a) do estudo **“ESTUDO DAS MUTAÇÕES C282Y E H63D NO GENE HFE EM PACIENTES COM SUSPEITA DE HEMOCROMATOSE HEREDITÁRIA EM ALAGOAS.”**, recebi do Sr. Prof. Dr. Tiago Gomes de Andrade, do Campus Arapiraca da Universidade Federal de Alagoas - UFAL, responsável por sua execução, as seguintes informações que me fizeram entender sem dificuldades e sem dúvidas os seguintes aspectos:

- Que o estudo se destina a determinar a prevalência das mutações C282Y e H63D do gene HFE em pacientes com suspeita de Hemocromatose hereditária no estado de Alagoas.
- Que a importância deste estudo é a de contribuir para um tratamento adequado, para a prevenção de doenças secundárias a HH, determinar a relação entre os genótipos e a manifestação clínica dos pacientes estudados, e contribuir para a identificação de potenciais moduladores de gravidade da doença.
- Que os resultados que se desejam alcançar são os seguintes: determinar a prevalência dos pacientes portadores da Hemocromatose Hereditária, compreender melhor a doença no estado e seus principais agravantes, melhorar o tratamento e prevenir complicações futuras.
- Que esse estudo começará em 06/2011 e terminará em 12/2012
- Que o estudo será feito da seguinte maneira: Os pacientes irão responder um questionário sobre os fatores ambientais que podem influenciar o desenvolvimento da doença. Os convidados a participar da pesquisa deverão ser submetidos a uma avaliação nutricional diária através do método recordatório de 24 horas durante três dias consecutivos, incluindo um final de semana ou feriado. Será realizada uma coleta de 5 ml de sangue por punção venosa em tubo com anticoagulante EDTA, realizada com material descartável pelo profissional devidamente treinado, para extração de DNA e análise da mutação.
- Que eu participarei das seguintes etapas: Participarei do preenchimento dos questionários, da avaliação nutricional pelo método recordatório de 24 horas e da doação de material biológico (sangue). Com isto, encerra-se a minha participação neste estudo.
- Que os outros meios conhecidos para se obter os mesmos resultados são as seguintes: não existem outros meios para se obter os mesmos resultados
- Que os incômodos que poderei sentir com a minha participação são os seguintes: O desconforto da coleta de sangue é dor leve e passageira e/ ou possível aparecimento de mancha roxa no local.

- Que os possíveis riscos à minha saúde física e mental são: A participação neste estudo não trará nenhum risco à minha saúde física e mental.
- Que deverei contar com a seguinte assistência: Que serei acompanhado por profissionais pesquisadores qualificados durante toda a minha participação no projeto e não terei nenhum tipo de gasto financeiro.
- Que os benefícios que deverei esperar com a minha participação, mesmo que não diretamente são: encaminhamento ao profissional apto a melhorar o tratamento do paciente.
- Que a minha participação será acompanhada do seguinte modo: serei acompanhado pelo pesquisador responsável durante o preenchimento dos questionários e da coleta de material.
- Que, sempre que desejar, serão fornecidos esclarecimentos sobre cada uma das etapas do estudo.
- Que, a qualquer momento, eu poderei recusar a continuar participando do estudo e, também, que eu poderei retirar este meu consentimento, sem que isso me traga qualquer penalidade ou prejuízo.
- Que as informações conseguidas através da minha participação não permitirão a identificação da minha pessoa, exceto aos responsáveis pelo estudo, e que a divulgação das mencionadas informações só será feita entre os profissionais estudiosos do assunto.

Finalmente, tendo eu compreendido perfeitamente tudo o que me foi informado sobre a minha participação no mencionado estudo e estando consciente dos meus direitos, das minhas responsabilidades, dos riscos e dos benefícios que a minha participação implicam, concordo em dele participar e para isso eu DOU O MEU CONSENTIMENTO SEM QUE PARA ISSO EU TENHA SIDO FORÇADO OU OBRIGADO.

Endereço d(o,a) participante-voluntári(o,a)

Domicílio: (rua, praça, conjunto):

Bloco: /Nº: /Complemento:

Bairro: /CEP/Cidade: /Telefone:

Ponto de referência:

Contato de urgência: Sr(a).

Domicílio: (rua, praça, conjunto):

Bloco: /Nº: /Complemento:

Bairro: /CEP/Cidade: /Telefone:

Ponto de referência:

Endereço d(os,as) responsável(is) pela pesquisa:

Instituição: Universidade Federal de Alagoas-UFAL Campus Arapiraca

Endereço: Av. Manoel Severino Barbosa, s/n, Bom Sucesso

CEP: 57309-005. Arapiraca-AL

Telefones p/contato: 82-99822080

ATENÇÃO: Para informar ocorrências irregulares ou danosas durante a sua participação no estudo, dirija-se ao:
Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Alagoas:
Prédio da Reitoria, sala do C.O.C. , Campus A. C. Simões, Cidade Universitária
Telefone: 3214-1041

Arapiraca,

<p>(Assinatura ou impressão datiloscópica d(o,a) voluntári(o,a) ou resposável legal - Rubricar as demais folhas)</p>	<p>Nome e Assinatura do responsável pelo estudo (Rubricar as demais páginas)</p>
--	--