

Artigo de Revisão/ Review Article

Alterações moleculares associadas à hemocromatose hereditária

Molecular changes associated with hereditary hemochromatosis

Paulo C. J. L. Santos¹

Rodolfo D. Cançado²

Cristiane T. Terada³

Elvira M. Guerra-Shinohara⁴

A hemocromatose hereditária (HH) é a mais comum doença autossômica em caucasianos e caracteriza-se pelo aumento da absorção intestinal de ferro, o qual resulta em acúmulo progressivo de ferro no organismo. A classificação da HH é realizada de acordo com a alteração genética encontrada, sendo os casos divididos em tipos 1, 2A, 2B, 3 e 4, quando a sobrecarga de ferro for associada aos genes HFE, HJV, HAMP, TFR2 e SLC40A1, respectivamente. Não existem estudos brasileiros que avaliaram a presença de mutações em genes relacionados à fisiopatologia da HH (genes HJV, HAMP, TFR2 e SLC40A1), além da pesquisa das três mutações no gene HFE (C282Y, H63D e S65C). Porém, está descrito, nos estudos realizados no Brasil, que alguns pacientes com sobrecarga de ferro primária não são portadores da HH tipo 1 (associada ao gene HFE). Portanto, é de suma importância a identificação das características genéticas dessa população, uma vez que outras mutações nos genes HJV, HAMP, TFR2 e SLC40A1 podem estar associadas à fisiopatologia da doença, podendo haver interações entre os genes alterados, de forma que possa auxiliar no entendimento da fisiopatologia da HH em pacientes brasileiros. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 2009;**31**(3):192-202.

Palavras-chave: Hemocromatose hereditária; sobrecarga de ferro; mutações; HFE; HAMP; TFR2.

Introdução

O ferro é um elemento químico indispensável aos seres humanos e praticamente encontrado em todos os seres vivos. Este íon faz parte de proteínas e enzimas importantes no transporte de oxigênio (hemoglobina e mioglobina), na síntese de DNA (ribonucleotídeo redutase), na produção de energia oxidativa (citocromo, catalase e peroxidase), na respiração mitocondrial (succinato desidrogenase) e na inativação de radicais livres (xantina oxidase). A concentração média de ferro no organismo de um indivíduo adulto é de 4 a 5 g, sendo

que 67% encontram-se na forma de hemoglobina.¹ A concentração de ferro em um indivíduo saudável é bem controlada por várias proteínas participantes de sua homeostasia. A deficiência deste elemento pode levar à anemia e o excesso à toxicidade.

Metabolismo do ferro

A funcionalidade das proteínas envolvidas no metabolismo de ferro é essencial para o equilíbrio deste mineral no organismo. As principais células relacionadas à home-

¹Farmacêutico-Bioquímico pela Universidade Federal de Alfenas. Aluno de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (USP) – São Paulo-SP.

²Professor da Disciplina de Hematologia e Oncologia da Faculdade de Medicina da Santa Casa de São Paulo – São Paulo-SP

³Aluna da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (USP) – São Paulo-SP.

⁴Professora de Hematologia Clínica do Depto. de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (USP) – São Paulo-SP.

Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (USP) – São Paulo-SP.

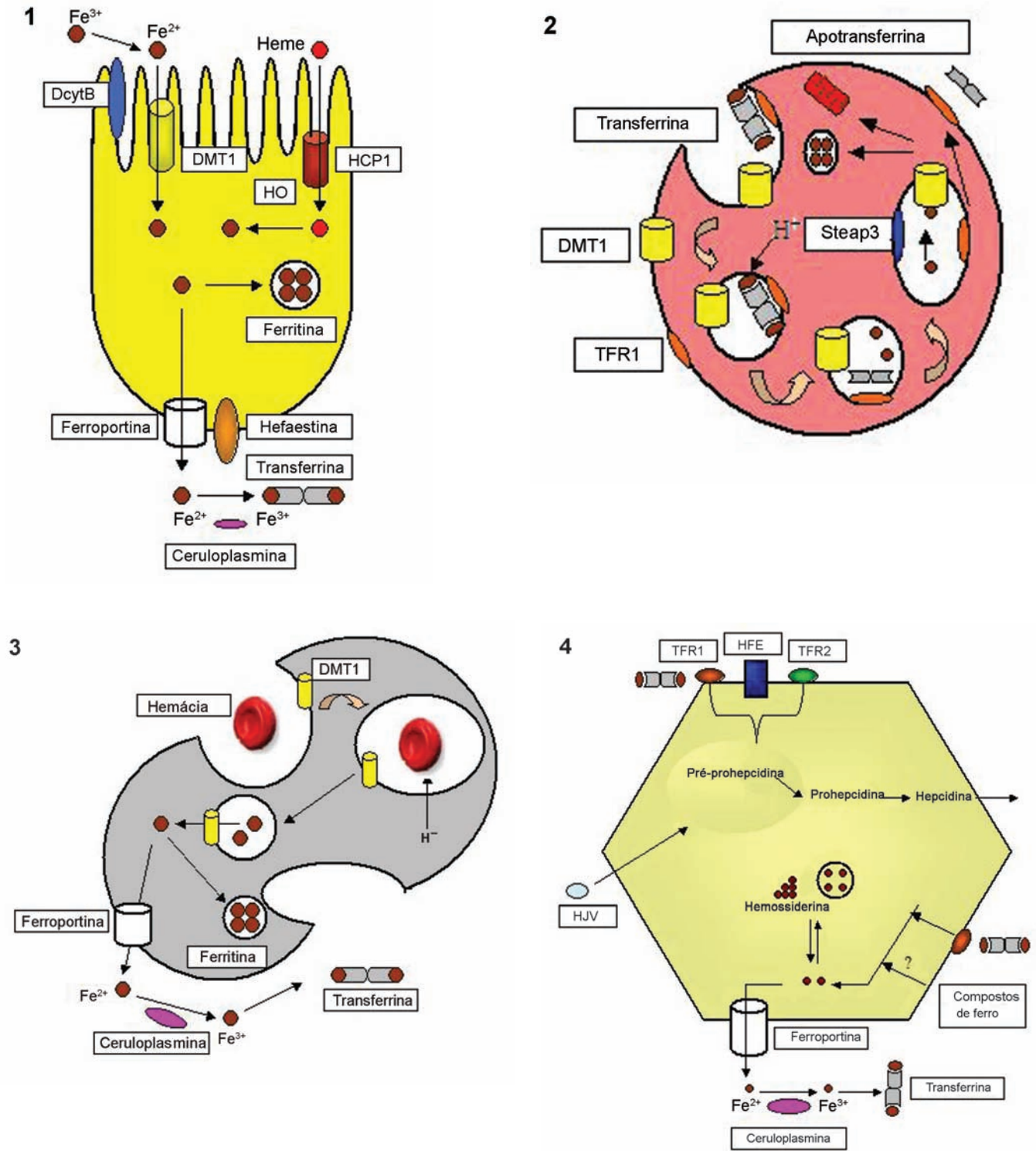
Correspondência: Elvira Maria Guerra-Shinohara

Av. Prof. Lineu Prestes, 580 Bloco 17 – Cidade Universitária
05508-900 – São Paulo-SP – Brasil

Tel.: (11) 3091-3635

E-mail: emguerra@usp.br

Doi: 10.1590/S1516-84842009005000051



HCP1: proteína de transporte do heme; DcytB: citocromo b duodenal; DMT1: transportador de metais divalente; HO: Heme oxigenase; TFR1: receptor de transferrina 1; Steap3: proteína redutora de ferro; TFR2: receptor de transferrina 2; HJV: hemojuvelina; HFE: proteína HFE; Compostos de ferro (ferritina, hemoglobina, heme e ferro não ligado à transferrina).

Figura 1. Papel das proteínas associadas ao metabolismo do ferro nos enterócitos (1), eritroblastos (2), macrófagos (3) e hepatócitos (4)

ostasia são: enterócitos, eritroblastos, macrófagos e hepatócitos (Figura 1).

Nos enterócitos, o ferro do alimento pode estar na forma inorgânica (Fe^{3+}) ou como hemoglobina ou mioglobina. O Fe^{3+} em complexo solúvel é reduzido a Fe^{2+} por uma proteína redutora chamada citocromo b duodenal (*duodenal cytochrome b* - DcytB) e transportado para os enterócitos duodenais através da DMT1 (transportador de metais divalentes). O heme é incorporado no enterócito após a digestão enzimática da hemoglobina e da mioglobina, presumivelmente através de uma proteína de transporte do heme chamada HCP1 (*heme carrier protein*). Dentro do enterócito, o heme é degradado pela heme oxigenase e o Fe^{2+} é liberado.^{2,3}

Em condições fisiológicas, o ferro no enterócito pode ser armazenado como ferritina, se a taxa de saturação de transferrina estiver normal ou aumentada no sangue periférico, ou pode ser transportado através da membrana basolateral a caminho da circulação, se os valores da saturação da transferrina estiverem baixos no sangue periférico. O transporte do ferro através da membrana basolateral é mediado pela ferroportina, que transporta Fe^{2+} ao plasma, sendo oxidado a Fe^{3+} pela hefaestina, facilitando a ligação do ferro à transferrina. A hepcidina regula a função da ferroportina, inibindo sua exportação de ferro; então, em caso de maiores concentrações de hepcidina no plasma, a maior parte do ferro absorvido será retida como ferritina no enterócito e esfoliada na luz intestinal com as fezes.^{2,3}

Os eritroblastos recebem o ferro através do ciclo da transferrina, que disponibiliza, seja via enterócitos ou macrófagos, o mineral essencial para a formação do eritrócito. A transferrina liga-se ao receptor de transferrina I (TFR1) na superfície da célula, formando o complexo que invagina-se para formar o endossomo, no qual ocorre a diminuição do pH, induzindo a liberação do ferro da transferrina. Neste momento o Fe^{3+} é convertido a Fe^{2+} , possivelmente por uma proteína redutora chamada STEAP3 (*six-transmembrane epithelial antigen of prostate 3*), permitindo o transporte do íon para fora dos endossomos através da DMT1. Subsequentemente, as apotransferrinas e os TFR1 retornam à superfície da célula para um ciclo posterior. O ferro é transportado principalmente para as mitocôndrias para síntese do grupo heme, a fim de formar a hemoglobina. O ferro adicional é armazenado como ferritina e hemossiderina.⁴

Nos macrófagos reticuloendoteliais é realizada a reciclagem do ferro. Estes fagocitam os eritrócitos com perda de flexibilidade ou com defeitos intrínsecos e os digerem em um compartimento fagolisossomal no qual a hemoglobina é degradada e o ferro é liberado do grupo heme, com a participação da enzima heme oxigenase. O ferro proveniente dos eritrócitos é armazenado como ferritina ou exportado pela ferroportina e oxidado a Fe^{3+} pela ceruloplasmina, a fim de facilitar a ligação ferro-transferrina. Também uma quantidade considerável de ferro é liberada do macrófago como

ferritina ou hemoglobina, mas este mecanismo não é bem elucidado.⁵

Já os hepatócitos realizam múltiplos mecanismos em relação ao metabolismo do ferro. As vias nas quais ocorrem os transportes dos compostos de ferro (hemoglobina, grupo heme, ferritina e ferro não-ligado à transferrina) nos hepatócitos não foram identificadas ainda. O ferro nos hepatócitos é armazenado como ferritina e hemossiderina ou exportado pela ferroportina. É conhecida a síntese da hepcidina nos hepatócitos, porém este mecanismo não está totalmente explicado. A hepcidina surgiu como a principal reguladora da exportação de ferro celular, sendo que sua forma circulante reduz a exportação de ferro para o plasma pela sua interação com a ferroportina na superfície de enterócitos e macrófagos. HFE, TFR2 e HJV podem modular a expressão de hepcidina.⁶

Sobrecarga de ferro

A sobrecarga de ferro pode ser classificada em primária ou secundária. Na primária estão incluídas as alterações em genes de proteínas relacionadas à homeostase do ferro no organismo. É o que se observa nos pacientes com hemocromatose hereditária (HH), os quais apresentam aumento inapropriado da absorção intestinal de ferro, na maioria das vezes, associado à mutação no gene HFE.⁷⁻⁹ Sobrecarga de ferro secundária é observada em doenças congênitas ou adquiridas que cursam com anemia hemolítica e/ou eritropoese ineficaz e requerem múltiplas transfusões de hemácias, como ocorre em pacientes com talassemia beta maior, anemia falciforme e síndrome mielodisplásica; em doenças hematológicas (anemia sideroblástica, anemia de Fanconi) e doenças hepáticas (hepatite C, esteatose hepática não-alcoólica, uso abusivo de bebidas alcoólicas).¹⁰

Nesta revisão são abordadas apenas as alterações genéticas relacionadas à sobrecarga de ferro, ou seja, a hemocromatose hereditária.

Hemocromatose hereditária

A HH é caracterizada pelo aumento na absorção de ferro e é frequente em caucasianos. O primeiro caso de HH foi relatado em 1865 por Trousseau, quando descreveu um paciente com cirrose hepática, *diabetes mellitus* e hiperpigmentação da pele. Todavia, o reconhecimento da doença como sendo consequência do aumento progressivo do estoque de ferro foi feito em 1889 por von Recklinghausen, sendo o primeiro a utilizar a expressão "hemocromatose".¹¹ Após a explicação sobre a natureza hereditária da doença por Sheldon, em 1935, avanços no entendimento da transmissão genética e das bases moleculares desta doença ocorreram nos anos 1970 e 1980 por Simon e colaboradores. Posteriormente, foi descrita a herança autossômica da HH e também a associação com a molécula HLA-A do complexo principal de

histocompatibilidade de classe I no cromossomo 6.¹²⁻¹⁴ Em 1996, Feder e colaboradores identificaram o gene HFE.¹⁵

O fígado é o principal sítio de armazenamento de ferro. Usualmente, o acúmulo nos hepatócitos resulta do excesso de absorção de ferro por via intestinal, enquanto o acúmulo no sistema mononuclear fagocitário decorre do aumento da atividade macrófágica com retenção de hemácias (autólogas, nos casos de hemólise crônica, ou heterólogas, nos casos de transfusão de hemácias). Na ausência de tratamento adequado, o ferro em excesso deposita-se gradativamente em vários órgãos ou tecidos, principalmente fígado, baço, miocárdio, glândulas endócrinas e medula óssea, ocasionando lesão celular e tecidual, fibrose e insuficiência funcional.^{7,16}

O principal mecanismo de toxicidade do ferro está relacionado com o ferro livre, ou seja, não ligado à transferrina (NTBI, *non-transferrin-bound iron*). A partir do momento no qual a quantidade de ferro absorvido ultrapassa a capacidade ferroquelante do organismo, ou seja, de armazená-lo e "neutralizá-lo", ocorre saída de ferro dos macrófagos para a circulação e, uma vez ultrapassada a capacidade de saturação da transferrina plasmática, o ferro livre em excesso deposita-se nos hepatócitos e em outras células parenquimatosas.^{17,18} A liberação do íon ferroso das moléculas de ferritina no citoplasma celular leva à conversão citossólica deste em íon férrico. O ferro livre atua como catalizador de reações oxidativas e consequente síntese de radicais superóxidos e radicais hidroxilas. A conversão do superóxido em H₂O₂ pela superóxido dismutase causa peroxidação de lípidos da membrana de diversas organelas citoplasmáticas, como mitocôndrias e microsossomos, com consequente dano celular, fibrose reativa e esclerose.¹⁷⁻¹⁹

Quanto às manifestações clínicas relacionadas à sobrecarga de ferro, os sintomas iniciais são geralmente inespecíficos, sendo os mais comumente referidos: fadiga, artralgia/artrite, dor abdominal, diminuição da libido ou impotência e perda de peso. Os sinais clínicos mais frequentes no diagnóstico são: hepatomegalia, esplenomegalia e artropatia. Com o decorrer do tempo, e sem a instituição de tratamento adequado, outros sintomas e sinais somam-se àqueles, tais como: fibrose portal, já observada após dois anos de transfusão; cirrose hepática e insuficiência hepática; adelgaçamento e hiperpigmentação da pele (decorrente do aumento da melanina nas camadas basais, aliado à atrofia da pele). Das manifestações endócrinas, destacam-se hipogonadismo hipogonadotrófico, *diabetes mellitus* (secundário ao acúmulo excessivo de ferro nas células betapancreáticas e ao desenvolvimento de resistência à insulina) e hipotireoidismo. As principais alterações relacionadas ao hipogonadismo hipogonadotrófico incluem: diminuição da libido, impotência, amenorréia, atrofia testicular, ginecomastia e queda de pelos corporais. Essas alterações resultam primariamente da diminuição da síntese de gonadotropinas pelo acúmulo excessivo de ferro na hipófise e no hipotálamo. O

comprometimento cardíaco é uma das principais complicações da sobrecarga de ferro, considerado como principal responsável pelo óbito nos pacientes portadores de talassemia beta maior (2/3 dos casos) e também de importância expressiva na morbimortalidade de pacientes com anemia falciforme e mielodisplasia.^{17,18,20}

O diagnóstico de HH baseia-se na detecção de sobrecarga de ferro associada à mutação do gene HFE ou de outros genes relacionados à homeostase do ferro.

Até a década de 1990, o diagnóstico de HH baseava-se fundamentalmente na confirmação histológica de sobrecarga de ferro. Deste modo, preconizava-se a realização de biópsia hepática como parte integrante da investigação do paciente com suspeita de hemocromatose ou de flebotomia quantitativa, nos casos em que a biópsia hepática era contraindicada.

A biópsia hepática é considerada como o melhor método para o diagnóstico de sobrecarga de ferro, pois possibilita, além da demonstração histoquímica do aumento de ferro no tecido hepático e/ou dosagem da concentração de ferro no tecido hepático, a avaliação do grau de lesão hepática, quando presente. É importante salientar que a biópsia hepática é o único método confiável para estabelecer ou excluir a presença de cirrose hepática que está diretamente relacionada ao prognóstico e ao risco de desenvolvimento de carcinoma hepatocelular. Com a biópsia, é possível proceder à demonstração histoquímica da presença de ferro no tecido hepático mediante colorações específicas para aquele metal (coloração de Perls). Nos pacientes com HH, o comum é observar os graus III e IV, mas graduações menos intensas podem ser encontradas nos estágios iniciais da doença.²¹⁻²⁴

O índice hepático de ferro (IHF) é o resultado da divisão do valor do ferro hepático, expresso em µmol/g, pela idade do paciente em anos. Valores superiores a 1,9 são encontrados em 85% a 90% dos pacientes com HH. A constatação de sobrecarga tecidual de ferro pela biópsia hepática associada à presença de mutação no gene HFE, particularmente C282Y/C282Y, confirma o diagnóstico de HH.²¹⁻²⁴ Tem sido definida como sobrecarga de ferro a presença de pelo menos duas constatações de saturação da transferrina iguais ou superiores a 50% em mulheres e 60% em homens; e/ou concentrações séricas de ferritina >200 µg/L em mulheres e >300 µg/L em homens.²⁵⁻²⁷

No quadro 1 estão apresentados os critérios para diagnóstico da sobrecarga de ferro.²⁸

A pesquisa das mutações do gene HFE, sobretudo das mutações C282Y, H63D e S65C, é indicada para indivíduos com valores persistentemente elevados da saturação da transferrina e/ou da ferritina, para indivíduos com aumento do ferro tecidual e para parentes de primeiro grau de indivíduos com diagnóstico de HH.^{18,19}

A presença de mutação no gene HFE indica a existência de alteração genética relacionada à HH e maior predisposição ao desenvolvimento do fenótipo da doença,

Quadro 1. Critérios adotados para confirmar a condição de sobrecarga de ferro

- Critérios para o diagnóstico de sobrecarga de ferro (a+b.1 e/ou b.2 ou a+c)
- a) Saturação da transferrina > 50% ou 60% (sexos feminino e masculino, respectivamente) e/ou ferritina > 200 µg/L ou 300 µg/L (sexo feminino e masculino, respectivamente) em pelo menos duas ocasiões diferentes e na ausência de outras causas ou fatores secundários relacionados com sobrecarga de ferro
- b) Aumento do ferro hepático segundo itens b-1 e b-2 descritos abaixo:
- b.1) aumento do ferro hepático por coloração (graus III ou IV);
- b.2) aumento da concentração do ferro hepático (> 80 mmol/g ou 4500 µg de ferro/g de tecido hepático seco) e índice de ferro hepático > 1,9
- c) aumento do ferro mobilizável (remoção de pelo menos 4g de ferro por flebotomia sem que haja o desenvolvimento eritropoese deficiente de ferro)

mas não é suficiente para o diagnóstico de HH, pois a penetração do alelo mutante e a expressão fenotípica da doença são relativamente baixas, tornando bastante difícil prever quem desenvolverá ou não o quadro clínico da doença.^{25,29}

A maioria dos doentes com diagnóstico de HH é homocigoto para a mutação C282Y no gene HFE. Os doentes com os demais genótipos (C282Y/H63D, H63D/H63D, H63D/WT, C282Y/WT, S65C/S65C, S65C/WT) são considerados portadores de HH desde que seja constatada a presença de sobrecarga de ferro.^{16,18,25,28}

Em relação ao tratamento da HH, a flebotomia terapêutica é mais segura, eficaz e mais econômica.³⁰ Consiste da remoção inicial de sangue (350 - 450 mL), uma ou duas vezes por semana, dependendo do paciente. O objetivo é obter um estado de depleção de ferro, ou seja, para atingir concentrações séricas de ferritina <50 µg/L e saturação da transferrina <50%. Quando estas concentrações forem alcançadas, o paciente pode fazer a retirada sanguínea a cada dois ou três meses. É importante destacar que os pacientes que começam a flebotomia antes do início da fase irreversível de danos nos órgãos apresentam expectativa de vida normal.³¹ No entanto, o carcinoma hepatocelular é a causa de morte mais comum nos doentes em estado cirrótico.³² Quando a flebotomia não é viável (por exemplo, devido à presença de anemia ou outras doenças, tais como disfunções cardíacas, hepáticas avançadas ou cirrose), agentes quelantes de ferro podem ser utilizados.^{33,34}

A classificação da HH é realizada de acordo com a alteração genética encontrada, sendo os casos de HH divididos em tipos 1, 2A, 2B, 3 e 4 (Tabela 1).³⁵ No entanto, esta classificação não inclui alterações em outros genes além dos HFE, HJV, HAMP, TFR2 e SLC40A1.

Hemocromatose hereditária do tipo 1 (alterações no gene HFE)

A HH tipo 1, uma doença autossômica recessiva, é causada por mutações no gene HFE e caracterizada por aumento na absorção de ferro, acarretando sobrecarga. A proteína HFE é expressa nos enterócitos e hepatócitos e sua função fisiológica está associada ao controle de ferro no organismo,

Tabela 1. Alterações genéticas relacionadas à fisiopatologia da hemocromatose hereditária (HH)

Tipos de HH	Alterações moleculares	Referências
1	HFE	Feder et al., 1996 ¹⁵
2A	HJV	Papanikolaou et al., 2004 ³⁶
2B	HAMP	Park et al., 2001 ³⁷
3	TFR2	Kawabata et al., 1999 ³⁸
4	SLC40A1	Donovan et al., 2000 ³⁹

HFE: codifica a proteína HFE; HJV: codifica a proteína hemojovelina; HAMP: codifica o polipeptídeo hepcidina; TFR2: codifica a proteína TFR2; e SLC40A1: codifica a proteína ferroportina

porém seu mecanismo não está totalmente elucidado.⁴⁰ Uma hipótese de que a HFE poderia regular o metabolismo do ferro surgiu com a descoberta de sua associação ao receptor de transferrina 1 (TFR1). Este sensor de ferro no organismo funcionaria da seguinte maneira: a proteína HFE, associada à β2-microglobulina, se liga com receptor de transferrina 1, reduzindo a afinidade deste com a transferrina, controlando, assim, a entrada de ferro no organismo.^{41,42} Esta hipótese sugere que a interação anômala entre TFR1 e HFE na membrana basolateral dos enterócitos acarretaria aumento de absorção intestinal e, conseqüentemente, sobrecarga de ferro.¹⁶ A outra hipótese sugere que a proteína HFE esteja envolvida na regulação da expressão da hepcidina.^{43,44}

O gene HFE é constituído de 7 éxons e está localizado no cromossomo 6p21.3.¹⁵ O produto deste gene é a proteína com 348 aminoácidos. Várias mutações foram descritas no gene HFE (V53M, V59M, H63H, Q127H, Q283P, P168X, E168Q, E168X e W169X), porém as três mutações mais pesquisadas são: C282Y, H63D e S65C.⁴⁵

A mutação HFE C282Y acarreta a troca da tirosina por cisteína na posição 282 da proteína HFE. Em 1996, Feder e colaboradores mostraram que 83% dos pacientes com HH apresentavam genótipo homocigoto mutado 282YY. Por outro lado, esta mutação é rara na população africana e asiática.⁴⁶

No Brasil, Agostinho e colaboradores avaliaram as frequências das mutações C282Y no gene HFE em 227 indivi-

duos: 71 caucasianos, 91 mestiços, 85 descendentes de africanos e 75 índios parakanãs. A frequência alélica da mutação C282Y foi de 1,4% na população caucasiana, de 1,1% nos descendentes africanos, de 1,1% nos mestiços e de 0% nos índios parakanãs, confirmando que a frequência do alelo Y é baixa em negros e índios.⁴⁷ Outros dois estudos confirmaram a baixa frequência do alelo 282Y em doadores de sangue na cidade de São Paulo quando comparada à frequência deste alelo na população caucasiana do norte da Europa, mostrando frequências do alelo 282Y de 1,4% e 2,1%.^{48,49}

O genótipo 282YY é encontrado em mais de 90% dos doentes com HH no norte europeu e em mais de 80% dos doentes norte-americanos.⁵⁰ A ocorrência desta mutação, em pacientes portadores de HH, diminui do norte para o sul da Europa, apresentando as seguintes frequências: 96% na Grã-Bretanha, 64% na Itália e 39% na Grécia.⁵¹⁻⁵³

A mutação H63D consiste na troca de histidina por ácido aspártico na posição 63 da proteína HFE.¹⁵ O alelo D tem distribuição mundial, com frequência de 20% na Europa.⁵⁴ Nos dois estudos realizados com doadores de sangue brasileiros foram encontradas frequências do alelo 63D de 10,8% e 13,6%.^{48,49} A presença do alelo 63D quando da ausência de mutação *HFE* C282Y foi associada ao menor risco de HH. Porém, quando a mutação *HFE* H63D é herdada em heterozigose com a mutação C282Y (heterozigose composta), o indivíduo apresenta risco elevado de desenvolver HH, sendo muitas vezes comparado ao risco de um indivíduo portador de 282YY.^{52,55}

Outra mutação no gene *HFE* é a S65C, que consiste na troca de serina por cisteína na posição 65 da proteína HFE.⁵⁶ A mutação S65C foi encontrada em pacientes com sobrecarga de ferro, porém, não houve diferença significativa entre as frequências desta mutação em pacientes e na população em geral.⁵⁷ Os doadores de sangue brasileiros estudados apresentaram frequências do alelo 65C de 0,6% e 1,0%.^{48,49}

O mecanismo pelo qual a mutação *HFE* C282Y está associada à sobrecarga de ferro poderia ser explicado através de duas hipóteses. Uma delas considera que a proteína HFE forma um complexo com o TFR1 e diminui a afinidade do receptor pela transferrina.^{41,58} Desse modo, quando há a mutação C282Y, ocorre a troca de único aminoácido que interfere na ligação da ponte dissulfeto entre a proteína HFE e a β 2-microglobulina. Como consequência dessa alteração, a transferrina permanece livre para ligar-se ao seu receptor, acarretando sobrecarga de ferro.⁵⁹ Esta hipótese tem sido questionada em estudos mais recentes, pois sugere que a associação de HFE com TFR1 não é essencial para a sua função.⁶⁰

Outra hipótese sugere que a mutação *HFE* C282Y isoladamente ou em heterozigose com a mutação *HFE* H63D estaria associada com a diminuição da expressão hepática do gene da hepcidina e aumento da ferroportina em pacientes com HH, porém não foi possível demonstrar, no estudo, o mesmo efeito em camundongos nocaute para o gene *HFE*.⁴³

Outros estudos mostraram que os pacientes com HH e portadores de genótipo *HFE* 282YY apresentam menores concentrações urinárias de hepcidina quando comparadas com as concentrações urinárias deste polipeptídeo em indivíduos italianos saudáveis.⁶¹ Consequentemente, com menores concentrações e expressões de hepcidina, a absorção de ferro via ferroportina apresenta-se aumentada, acarretando sobrecarga de ferro.²

Hemocromatose hereditária do tipo 2A (alterações no gene hemojuvelina)

A proteína hemojuvelina (HJV) é expressa no fígado, coração e músculos esqueléticos e sua função ainda é desconhecida.^{36,62} O gene *HFE2* (usualmente chamado de HJV), constituído de 4 éxons, codifica uma proteína de 426 aminoácidos e foi identificado no cromossomo 1q21.³⁶

Um estudo mostrou que pacientes portadores de mutações no gene da HJV apresentaram menores concentrações de hepcidina, podendo ser este o mecanismo da sobrecarga.⁶³ A presença de sobrecarga de ferro e de mutação no gene da HJV caracteriza o subtipo 2A da HH, que é uma doença autossômica recessiva, com frequência rara dentre os demais tipos de HH e caracterizada pela gravidade da sobrecarga de ferro em indivíduos com menos de 30 anos.⁴⁵ Várias mutações foram descritas no gene HJV, tais como: G320V, R326X, I222N, I281T, C80R, L101P e a deleção de 4pb do nucleotídeo 980.^{36,64-67}

Hemocromatose hereditária do tipo 2B (alterações no gene HAMP)

A hepcidina é a principal reguladora da homeostase do ferro, tendo sido demonstrado que este polipeptídeo regula a ferroportina (FPN), inibindo a exportação de ferro proveniente dos enterócitos e dos macrófagos.⁶⁸ Em estudos com cultura de células foi demonstrado que a hepcidina se liga à FPN e, em seguida, acarreta degradação da proteína exportadora de ferro.²

O conhecimento nos processos celulares que regulam a produção de hepcidina e a secreção nos hepatócitos ainda é limitado.^{69,70} Alguns estudos sugerem que a proteína HFE interage com TFR1 e TFR2, controlando a síntese da hepcidina, e que esta interação estaria associada às alterações na cinética do ferro nos hepatócitos.⁷¹ Baixas concentrações urinárias de hepcidina foram encontradas em pacientes portadores de HH, associadas a mutações nos genes *HFE*, *TFR2* e *HJV*.^{43,61,72,73} Também na presença de anemia e de hipóxia são encontradas concentrações diminuídas de hepcidina.⁶⁶ Outro estudo correlacionou o aumento da síntese de hepcidina com as citocinas liberadas em processos infecciosos e inflamatórios.⁷⁴

Estudos realizados com camundongos submetidos à

dieta pobre em ferro mostraram que esses animais apresentaram menores concentrações de hepcidina, enquanto animais submetidos à dieta rica em ferro apresentaram maiores concentrações desse polipeptídeo. Outro estudo descreveu que camundongos nocautes para o gene HFE apresentaram baixas concentrações de hepcidina quando comparados com animais controles.⁷²

O gene HAMP é constituído de 3 éxons, codifica um polipeptídeo de 84 aminoácidos e está localizado no cromossomo 19q13. O gene é expresso no coração, cérebro e, em alta concentração, no fígado.³⁷

A HH subtipo 2B, doença autossômica recessiva e muito rara, caracteriza-se pela particular sobrecarga de ferro grave, mais que no subtipo 2A, e é causada por mutações no gene HAMP, que codifica hepcidina. O portador de HH subtipo 2B geralmente apresenta, precocemente, sintomas cardíacos que podem dominar o curso da doença não tratada. Assim, para os casos mais avançados, a única opção terapêutica é o transplante de coração.⁷⁵

A causa da sobrecarga de ferro nos indivíduos portadores dos dois subtipos de HH tipo 2 pode ser explicada pela diminuição das concentrações urinárias de hepcidina em relação aos indivíduos controles.^{69,76,77}

Apenas estados homozigóticos estão associados à sobrecarga de ferro, enquanto indivíduos heterozigóticos para mutações na hepcidina ou hemojuvelina são assintomáticos e podem apresentar concentrações normais dos parâmetros de ferro.^{75,78}

A deleção da guanina na posição 93 do gene HAMP (93delG) foi encontrada em duas irmãs afetadas com o tipo 2B da HH, apresentando genótipos homozigotos. Em homozigose, esta deleção resulta na formação do peptídeo pro-hepcidina, que tem função anormal.⁷⁹ Também foram descritas em pacientes portadores do subtipo 2B as mutações HAMP R56X e HAMP G71D.^{79,80}

Hemocromatose hereditária do tipo 3 (alterações no gene do receptor de transferrina 2)

A proteína TFR2 tem elevada homologia com a TFR1, sendo expressa predominantemente no fígado. Comparada com a TFR1, a proteína TFR2 liga-se com transferrina com menor afinidade, aproximadamente 30 vezes.^{81,82} Evidências indicam que sua função fisiológica está relacionada com a absorção de ferro pelos hepatócitos através de um mecanismo de endocitose e que funciona como um sensor da saturação da transferrina no plasma, sinalizando para controlar a síntese de hepcidina.⁸³⁻⁸⁵

O indivíduo com sobrecarga de ferro causada por mutações no gene TFR2 apresenta a HH tipo 3, mas o mecanismo pelo qual ocorre a sobrecarga de ferro não foi totalmente elucidado.⁸⁶ No entanto, foi sugerido que a proteína TFR2, expressa seletivamente no fígado, estaria relacionada com a absorção de ferro nos hepatócitos através de um mecanismo

de endocitose mediado por receptor, podendo, assim, regular a síntese de hepcidina.^{71,83} Estudos mostraram que pacientes com HH associada ao gene TFR2 apresentam menores concentrações urinárias de hepcidina em relação aos indivíduos controles.^{87,88}

O gene TFR2 é constituído de 18 éxons, codifica uma proteína de 355 aminoácidos e está localizado no cromossomo 7q22.⁸³ Várias mutações foram descritas no gene TFR2, tais como: Y250X, E60X, M172K, R455Q e Q690P.⁸⁹⁻⁹²

A mutação Y250X foi identificada em duas famílias da Sicília e consiste em uma mutação do tipo nonsense, que acarreta a síntese de uma proteína de menor tamanho, comprometendo a função desta.⁸⁹ Outra mutação, Q690P, que é do tipo missense, foi descrita em homozigose em paciente masculino de origem portuguesa que apresentava quadro severo de sobrecarga de ferro (ferritina 34.000 µg/L), sendo que esta mutação foi detectada também em homozigose em duas irmãs desse paciente. Nesta família, tanto o homem (35 anos) como uma das irmãs (25 anos) apresentavam genótipos homozigotos para TFR2 Q690P e heterozigotos para HFE H63D. No entanto, a outra irmã, de 30 anos, apresentava genótipo homozigoto mutado para TFR2 Q690P e não apresentava o alelo mutado para a H63D. Todos os três irmãos apresentavam valores elevados da saturação de transferrina, porém apenas o homem apresentava concentração sérica de ferritina superior a 1.000 µg/L.⁹² A herança em heterozigose para as mutações Y250X e Q690P no gene TFR2 não foi associada com o aparecimento de sintomas clínicos e à sobrecarga de ferro.⁶³

Hemocromatose hereditária do tipo 4 (alterações no gene da ferroportina)

A ferroportina (FPN) é expressa na porção basolateral dos enterócitos, em macrófagos e em células de Kupffer. Esta localização é consistente com sua função fisiológica de exportar o ferro das células.³⁹

A HH tipo 4 é uma doença autossômica dominante, sendo causada por mutações no gene SLC40A1, ou seja, é caracterizada por alterações funcionais na ferroportina que acarretam sobrecarga de ferro.

O gene SLC40A1 é constituído de 8 éxons, codifica uma proteína de 571 aminoácidos e está localizado no cromossomo 2q32.³⁹ Várias mutações foram descritas nesse gene, tais como: N144H, A77D, V162X, D157G, Q182H, G323V, D181V, G80V e G267D.⁹³⁻⁹⁷

Os efeitos destas mutações foram associados à perda de função da proteína com a diminuição da exportação de ferro, principalmente macrófagos do sistema reticuloendotelial. A consequência é o acúmulo do mineral nos tecidos, além da diminuição da disponibilidade de ferro circulante para a transferrina, o que acarretaria, num primeiro momento, uma forma leve de anemia. No entanto, posteriormente, podem ocorrer sobrecarga de ferro nos tecidos, devido à liberação

de ferro a partir de macrófagos, e aumento compensatório na absorção de ferro, devido à anemia. Este estágio mais avançado da HH tipo 4 geralmente ocorre entre a terceira e a quarta décadas de vida.⁹⁸

Estudos realizados no Brasil

Alguns estudos avaliaram as frequências das mutações em pacientes portadores de hepatite C crônica,⁹⁹ de cardiomiopatias,¹⁰⁰ de talassemias,¹⁰¹ com hemoglobina S¹⁰² e em portadores de malária.¹⁰³ Outros estudos foram realizados em pacientes portadores de sobrecarga de ferro.^{27,48,99,104}

Martinelli e colaboradores avaliaram a prevalência das mutações C282Y e H63D no gene HFE em 135 homens portadores de hepatite C crônica. Destes pacientes, 6 (4,4%) apresentaram a mutação C282Y e 32 (23,7%) apresentaram H63D. No entanto, estas frequências foram semelhantes às observadas em controles saudáveis.⁹⁹

Maior prevalência de heterozigose para a mutação C282Y em pacientes com cardiomiopatia isquêmica em relação aos pacientes com cardiomiopatia de etiologias não-isquêmicas foi observada em São Paulo.¹⁰⁰

O efeito das mutações no gene HFE em pacientes portadores de alterações qualitativa (HbS) e quantitativa (talassemias) das globinas, bem como em pacientes portadores de malária, foi estudado em indivíduos brasileiros.¹⁰³ Elevada frequência da mutação C282Y no gene HFE foi observada em portadores de beta talassemia, sugerindo que esta interação pode estar associada com o pior quadro clínico nestes pacientes.¹⁰¹ A frequência do alelo Y da mutação C282Y foi alta em portadores de HbS (8,3%) quando comparada às frequências descritas em doadores de sangue no Brasil.¹⁰²

O alelo Y da mutação C282Y no gene HFE apresenta distribuição heterogênea no Brasil. É raro na região norte do país, tendo sido encontrado apenas cinco portadores de genótipos heterozigotos para a mutação C282Y no gene HFE em 400 portadores de malária e 400 doadores de sangue,¹⁰³ enquanto na região sudeste foram descritas frequências deste alelo entre 1,1% e 2,1% em doadores de sangue.⁴⁷⁻⁴⁹ Por sua vez, a mutação H63D no gene HFE é relativamente frequente, não sendo observada diferença significativa entre as frequências na forma heterozigótica em portadores de malária e doadores de sangue daquela região, assim como o alelo D não foi associado aos sinais clínicos da doença.¹⁰³

Bueno e colaboradores estudaram as mutações C282Y, H63D e S65C no gene HFE de oito pacientes com HH, mostrando que três pacientes eram homozigotos para a mutação C282Y, um era heterozigoto composto (C282Y/H63D), o outro era heterozigoto para a C282Y e três não apresentaram as mutações pesquisadas.⁴⁸

Cançado e colaboradores descreveram que 38 de 50 pacientes portadores de sobrecarga de ferro apresentaram mutações no gene HFE (C282Y, H63D e S65C), com concen-

trações de ferritina sérica e saturação da transferrina significativamente maiores em pacientes com genótipo homozigoto (282YY) para a mutação HFE C282Y. Também a coexistência de hepatite C, o consumo excessivo de bebida alcoólica e a presença de anemia hemolítica hereditária foram associados ao aumento dos estoques de ferro e relacionados como fator de risco adicional em pacientes com mutação no gene HFE.²⁷

Em um estudo realizado por nossa equipe na cidade de São Paulo, com 542 doadores de sangue, foram encontrados os seguintes haplótipos para as mutações C282Y/H63D/S65C, por ordem de frequência: CC/HH/SS (70,1%), CC/HD/SS (22,7%), CY/HH/SS (3,5%), CC/DD/SS (1,9%), CC/HH/SC (1,1%) e CY/HD/SS (0,7%). A presença dos alelos HFE 282Y e HFE 63D foi associada ao maior aporte de ferro nos doadores de sangue masculinos.⁴⁹

No diagnóstico da hemocromatose hereditária devem-se excluir as causas secundárias; além disso, a expressão fenotípica de sobrecarga de ferro e as repercussões desta no organismo devem prevalecer à expressão genotípica.^{25,28} No entanto, a pesquisa de mutações nos genes HJV, HAMP, TFR2 e SLC40A1, além das mutações C282Y, H63D e S65C no gene HFE, pode colaborar no entendimento da fisiopatologia desta doença, especialmente em estudos que avaliem o efeito da interação entre diversas mutações. Como até o momento não há estudos no Brasil que avaliaram a presença de mutações nos genes HJV, HAMP, TFR2 e SLC40A1, conclui-se que estas pesquisas sejam necessárias, principalmente em pacientes com sobrecarga de ferro primária não associada ao gene HFE.

Abstract

Hereditary Hemochromatosis (HH) is the most common autosomal disease in Caucasians. It is characterized by an increase in intestinal absorption of iron, which results in a progressive accumulation of iron in the body. The classification of HH is carried out according to the genetic alteration found; thus cases of HH are divided into Types 1, 2A, 2B, 3 and 4, when the iron overload is associated to the HFE, HJV, HAMP, TFR2 and SLC40A1 genes, respectively. There is research on the three HFE gene mutations (C282Y, H63D and S65C) in the Brazilian population however there are no Brazilian studies that evaluate the presence of mutations in other genes related to the pathophysiology of HH (HJV, HAMP, TFR2 and SLC40A1 genes). Nevertheless, studies conducted in Brazil have described that some patients with primary iron overload are not carriers of the Type 1 HH (associated with the HFE gene). Hence, it is very important to identify the genetic characteristics of this population, as mutations of the HJV, HAMP, TFR2 and SLC40A1 genes may be associated with the pathophysiology of the disease, and there may be interactions between mutations. These findings will help in understanding the pathophysiology of patients with HH in Brazil. Rev. Bras. Hematol. Hemoter. 2009;31(3):192-202.

Key words: Hereditary hemochromatosis; iron overload; mutations; HFE; HAMP; TFR2.

Referências Bibliográficas

1. Beutler E. Disorders of iron metabolism. In: Lichtman MA, Beutler E, Seligsohn U, Kaushansky K, Kipps TJ, Prchal JT, eds. *Williams Hematology*. 7th ed. New York: MacGraw-Hill, 2006. cap.40.
2. Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, Vaughn MB, Donovan A, Ward DM, *et al.* Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science*. 2004;306(5704):2090-3.
3. Shayeghi M, Latunde-Dada GO, Oakhill JS, Laftah AH, Takeuchi K, Halliday N, *et al.* Identification of an intestinal heme transporter. *Cell*. 2005;122(5):789-801.
4. Ohgami RS, Campagna DR, Greer EL, Antiochos B, McDonald A, Chen J, *et al.* Identification of a ferrireductase required for efficient transferrin-dependent iron uptake in erythroid cells. *Nat Genet*. 2005;37(11):1264-9.
5. Moura E, Noordermeer MA, Verhoeven N, Verheul AF, Marx JJ. Iron release from human monocytes after erythrophagocytosis in vitro: an investigation in normal subjects and hereditary hemochromatosis patients. *Blood*. 1998;92(7):2511-9.
6. Anderson GJ, Darshan D, Wilkins SJ, Frazer DM. Regulation of systemic iron homeostasis: how the body responds to changes in iron demand. *Biometals*. 2007;20(3-4):665-74.
7. Piperno A. Classification and diagnosis of iron overload. *Haematologica*. 1998;83(5):447-55.
8. Andrews NC. A genetic view of iron homeostasis. *Semin Hematol*. 2002;39(4):227-34.
9. Camaschella C. Understanding iron homeostasis through genetic analysis of hemochromatosis and related disorders. *Blood*. 2005;106(12):3710-7.
10. Kushner JP, Porter JP, Olivieri NF. Secondary iron overload. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2001:47-61.
11. Pietrangelo A. Haemochromatosis. *Gut*. 2003;52 Suppl 2:ii23-30.
12. Simon M, Pawlotsky Y, Bourel M, Fauchet R, Genetet B. Idiopathic hemochromatosis associated with HL-A 3 tissular antigen. *Nouv Presse Med* 1975;4:1432.
13. Simon M, Bourel M, Genetet B, Fauchet R. Idiopathic hemochromatosis. Demonstration of recessive transmission and early detection by family HLA typing. *N Engl J Med*. 1977;297(19):1017-21.
14. Simon M, Le Mignon L, Fauchet R, Yaouanq J, David V, Edan G, *et al.* A study of 609 HLA haplotypes marking for the hemochromatosis gene: (1) mapping of the gene near the HLA-A locus and characters required to define a heterozygous population and (2) hypothesis concerning the underlying cause of hemochromatosis-HLA association. *Am J Hum Genet*. 1987;41(2):89-105.
15. Feder JN, Gnirke A, Thomas W, Tsuchihashi Z, Ruddy DA, Basava A, *et al.* A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nat Genet*. 1996;13(4):399-408.
16. Andrews NC. Disorders of iron metabolism. *N Engl J Med*. 1999;341(26):1986-95.
17. Ajioka RS, Kushner JP. Hereditary hemochromatosis. *Semin Hematol*. 2002;39(4):235-41.
18. Pietrangelo A. Hereditary hemochromatosis – a new look at an old disease. *N Engl J Med*. 2004;350(23):2383-97.
19. Powell LW, George DK, McDonnell SM, Kowdley KV. Diagnosis of hemochromatosis. *Ann Intern Med*. 1998;129(11):925-31.
20. Powell LW. Hereditary hemochromatosis and iron overload diseases. *J Gastroenterol Hepatol*. 2002;17 Suppl:S191-5.
21. Angelucci E, Brittenham GM, McLaren CE, Ripalti M, Baronciani D, Giardini C, *et al.* Hepatic iron concentration and total body iron stores in thalassemia major. *N Engl J Med*. 2000;343(5):327-31.
22. Brittenham GM, Badman DG; National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (NIDDK) Workshop. Noninvasive measurement of iron: report of an NIDDK workshop. *Blood*. 2003;101(1):15-9.
23. Anderson LJ, Holden S, Davis B, Prescott E, Charrier CC, Bunce NH, *et al.* Cardiovascular T2-star (T2*) magnetic resonance for the early diagnosis of myocardial iron overload. *Eur Heart J*. 2001;22(23):2171-9.
24. Cançado RD. Sobrecarga e quebração de ferro na anemia falciforme. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter*. 2007;29(3):316-26.
25. Bacon BR, Powell LW, Adams PC, Kresina TF, Hoofnagle JH. Molecular medicine and hemochromatosis: at the crossroads. *Gastroenterology*. 1999;116(1):193-207.
26. McCullen MA, Crawford DH, Hickman PE. Screening for hemochromatosis. *Clin Chim Acta*. 2002;315(1-2):169-86.
27. Cançado RD, Guglielmi ACO, Vergueiro CSV, *et al.* Estudo das mutações C282Y, H63D e S65C do gene HFE em doentes brasileiros com sobrecarga de ferro. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter* 2007;29(4):351-60.
28. Witte DL, Crosby WH, Edwards CQ, Fairbanks VF, Mitros FA. Practice guideline development task force of the College of American Pathologists. Hereditary hemochromatosis. *Clin Chim Acta*. 1996;245(2):139-200.
29. Beutler E. The HFE Cys282Tyr mutation as a necessary but not sufficient cause of clinical hereditary hemochromatosis. *Blood*. 2003;101(9):3347-50.
30. McDonnell SM, Preston BL, Jewell SA, Barton JC, Edwards CQ, Adams PC, *et al.* A survey of 2,851 patients with hemochromatosis: symptoms and response to treatment. *Am J Med*. 1999;106(6):619-24.
31. Camaschella C, De Gobbi M, Roetto A. Hereditary hemochromatosis: progress and perspectives. *Rev Clin Exp Hematol* 2000;4: 302-321.
32. Njajou OT, Alizadeh BZ, van Duijn CM. Is genetic screening for hemochromatosis worthwhile? *Eur J Epidemiol*. 2004;19(2):101-8.
33. Franchini M, Gandini G, Aprili G. Advances in iron chelating therapy. *Haematologica*. 2000;85(11):1122-5.
34. Franchini M, Veneri D. Iron-chelation therapy: an update. *Hematol J*. 2004;5(4):287-92.
35. OMIM. Online Mendelian Inheritance in Man. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/OMIM> (accessed 02 April 2008).
36. Papanikolaou G, Samuels ME, Ludwig EH, MacDonald ML, Franchini PL, Dubé MP, *et al.* Mutations in HFE2 cause iron overload in chromosome 1q-linked juvenile hemochromatosis. *Nat Genet*. 2004;36(1):77-82.
37. Park CH, Valore EV, Waring AJ, Ganz T, *et al.* Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J Biol Chem*. 2001;276(11):7806-10.
38. Kawabata H, Yang R, Hiramata T, Vuong PT, Kawano S, Gombart AF, *et al.* Molecular cloning of transferrin receptor 2. A new member of the transferrin receptor-like family. *J Biol Chem*. 1999;274(30):20826-32.
39. Donovan A, Brownlie A, Zhou Y, Shepard J, Pratt SJ, Moynihan J, *et al.* Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. *Nature*. 2000;403(6771):776-81.
40. Pietrangelo A. Molecular insights into the pathogenesis of hereditary haemochromatosis. *Gut*. 2006;55(4):564-8.
41. Feder JN, Penny DM, Irrinki A, Lee VK, Lebrón JA, Watson N, *et al.* The hemochromatosis gene product complexes with the transferrin receptor and lowers its affinity for ligand binding. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(4):1472-7.

42. Waheed A, Parkkila S, Saarnio J, Fleming RE, Zhou XY, Tomatsu S, *et al*. Association of HFE protein with transferrin receptor in crypt enterocytes of human duodenum. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;96(4):1579-84.
43. Bridle KR, Frazer DM, Wilkins SJ, Dixon JL, Purdie DM, Crawford DH, *et al*. Disrupted hepcidin regulation in HFE-associated haemochromatosis and the liver as a regulator of body iron homeostasis. *Lancet*. 2003;361(9358):669-73.
44. Nicolas G, Viatte L, Lou DQ, Bennoun M, Beaumont C, Kahn A, *et al*. Constitutive hepcidin expression prevents iron overload in a mouse model of hemochromatosis. *Nat Genet*. 2003;34(1):97-101.
45. Camaschella C, Roetto A, De Gobbi M. Juvenile hemochromatosis. *Semin Hematol*. 2002;39(4):242-8.
46. Merryweather-Clarke AT, Pointon JJ, Shearman JD, Robson KJ. Global prevalence of putative haemochromatosis mutations. *J Med Genet*. 1997;34(4):275-8.
47. Agostinho MF, Arruda VR, Basseres DS, Bordin S, Soares MC, Menezes RC, *et al*. Mutation analysis of the HFE gene in Brazilian populations. *Blood Cells Mol Dis*. 1999;25(5-6):324-7.
48. Bueno S, Duch CR, Figueiredo MS. Mutations in the HFE gene (C282Y, H63D, S65C) in a Brazilian population. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter*. 2006;28(4):293-5.
49. Santos PCJL, Cañado RD, Terada CT, *et al*. Relação entre mutações no gene HFE e TFR2 e alterações nos parâmetros de ferro segundo a frequência de doação em doadores de sangue. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2008;30(4):21.
50. Cazzola M. Novel genes, proteins, and inherited disorders of iron overload: iron metabolism is less boring than thought. *Haematologica*. 2002;87(2):115-6.
51. Brisson P, Moirand R, Jouanolle AM, Guyader D, Le Gall JY, Deugnier Y, *et al*. A genotypic study of 217 unrelated probands diagnosed as "genetic hemochromatosis" on "classical" phenotypic criteria. *J Hepatol*. 1999;30(4):588-93.
52. Carella M, D'Ambrosio L, Totaro A, Grifa A, Valentino MA, Piperno A, *et al*. Mutation analysis of the HLA-H gene in Italian hemochromatosis patients. *Am J Hum Genet*. 1997;60(4):828-32.
53. Politou M, Kalotychoy V, Pissia M, Rombos Y, Sakellaropoulos N, Papanikolaou G, *et al*. The impact of the mutations of the HFE gene and of the SLC11A3 gene on iron overload in Greek thalassemia intermedia and beta(s)/beta(thal) anemia patients. *Haematologica*. 2004;89(4):490-2.
54. Merryweather-Clarke AT, Pointon JJ, Jouanolle AM, Rochette J, Robson KJ. Geography of HFE C282Y and H63D mutations. *Genet Test*. 2000;4(2):183-98.
55. Beutler E. The significance of the 187G (H63D) mutation in hemochromatosis. *Am J Hum Genet*. 1997;61(3):762-4.
56. Mura C, Ragueneo O, Férec C. HFE mutations analysis in 711 hemochromatosis probands: evidence for S65C implication in mild form of hemochromatosis. *Blood*. 1999;93(8):2502-5.
57. Barton JC, Sawada-Hirai R, Rothenberg BE, Acton RT, *et al*. Two novel missense mutations of the HFE gene (I105T and G93R) and identification of the S65C mutation in Alabama hemochromatosis probands. *Blood Cells Mol Dis*. 1999;25(3-4):147-55.
58. Lebrón JA, Bennett MJ, Vaughn DE, Chirino AJ, Snow PM, Mintier GA, *et al*. Crystal structure of the hemochromatosis protein HFE and characterization of its interaction with transferrin receptor. *Cell*. 1998;93(1):111-23.
59. Feder JN, Tsuchihashi Z, Irrinki A, Lee VK, Mapa FA, Morikang E, *et al*. The hemochromatosis founder mutation in HLA-H disrupts beta2-microglobulin interaction and cell surface expression. *J Biol Chem*. 1997;272(22):14025-8.
60. Zhang AS, Davies PS, Carlson HL, Enns CA. Mechanisms of HFE-induced regulation of iron homeostasis: Insights from the W81A HFE mutation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100(16):9500-5.
61. Bozzini C, Campostrini N, Trombini P, Nemeth E, Castagna A, Tenuti I, *et al*. Measurement of urinary hepcidin levels by SELDI-TOF-MS in HFE-hemochromatosis. *Blood Cells Mol Dis*. 2008;40(3):347-52.
62. Andrews NC. Molecular control of iron metabolism. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2005;18(2):159-69.
63. Roetto A, Camaschella C. New insights into iron homeostasis through the study of non-HFE hereditary haemochromatosis. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2005;18(2):235-50.
64. Huang FW, Rubio-Aliaga I, Kushner JP, Andrews NC, Fleming MD. Identification of a novel mutation (C321X) in HJV. *Blood*. 2004;104(7):2176-7.
65. Barton JC, Rao SV, Pereira NM, Gelbart T, Beutler E, Rivers CA, *et al*. Juvenile hemochromatosis in the southeastern United States: a report of seven cases in two kinships. *Blood Cells Mol Dis*. 2002;29(1):104-15.
66. Lee PL, Beutler E, Rao SV, Barton JC. Genetic abnormalities and juvenile hemochromatosis: mutations of the HJV gene encoding hemojuvelin. *Blood*. 2004;103(12):4669-71.
67. Gehrke SG, Pietrangelo A, Kascák M, Braner A, Eisold M, Kulaksiz H, *et al*. HJV gene mutations in European patients with juvenile hemochromatosis. *Clin Genet*. 2005;67(5):425-8.
68. Rivera S, Nemeth E, Gabayan V, Lopez MA, Farshidi D, Ganz T. Synthetic hepcidin causes rapid dose-dependent hypoferrremia and is concentrated in ferroportin-containing organs. *Blood*. 2005;106(6):2196-9.
69. Lin L, Goldberg YP, Ganz T. Competitive regulation of hepcidin mRNA by soluble and cell-associated hemojuvelin. *Blood*. 2005;106(8):2884-9.
70. Zhang AS, West AP Jr, Wyman AE, Bjorkman PJ, Enns CA. Interaction of hemojuvelin with neogenin results in iron accumulation in human embryonic kidney 293 cells. *J Biol Chem*. 2005;280(40):33885-94.
71. Frazer DM, Anderson GJ. Iron imports. I. Intestinal iron absorption and its regulation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2005;289(4):G631-5.
72. Leong WI, Lönnnerdal B. Hepcidin, the recently identified peptide that appears to regulate iron absorption. *J Nutr*. 2004;134(1):1-4.
73. Papanikolaou G, Tzilianos M, Christakis JI, Bogdanos D, Tsimirika K, MacFarlane J, *et al*. Hepcidin in iron overload disorders. *Blood*. 2005;105(10):4103-5.
74. Pigeon C, Ilyin G, Courselaud B, Leroyer P, Turlin B, Brisson P, *et al*. A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. *J Biol Chem*. 2001;276(11):7811-9.
75. De Gobbi M, Roetto A, Piperno A, Mariani R, Alberti F, Papanikolaou G, *et al*. Natural history of juvenile haemochromatosis. *Br J Haematol*. 2002;117(4):973-9.
76. Cazzola M. Genetic disorders of iron overload and the novel "ferroportin disease". *Haematologica*. 2003;88(7):721-4.
77. Swinkels DW, Janssen MC, Bergmans J, Marx JJ. Hereditary hemochromatosis: genetic complexity and new diagnostic approaches. *Clin Chem*. 2006;52(6):950-68.
78. Lanzara C, Roetto A, Daraio F, Rivard S, Ficarella R, Simard H, *et al*. Spectrum of hemojuvelin gene mutations in 1q-linked juvenile hemochromatosis. *Blood*. 2004;103(11):4317-21.
79. Roetto A, Papanikolaou G, Politou M, Alberti F, Girelli D, Christakis J, *et al*. Mutant antimicrobial peptide hepcidin is associated with severe juvenile hemochromatosis. *Nat Genet*. 2003;33(1):21-2.

80. Merryweather-Clarke AT, Cadet E, Bomford A, Capron D, Viprakasit V, Miller A, *et al.* Digenic inheritance of mutations in HAMP and HFE results in different types of haemochromatosis. *Hum. Molec. Hum Mol Genet.* 2003;12(17):2241-7.
81. Kawabata H, Germain RS, Ikezoe T, Tong X, Green EM, Gombart AF, *et al.* Regulation of expression of murine transferrin receptor 2. *Blood.* 2001;98(6):1949-54.
82. Kawabata H, Nakamaki T, Ikonomi P, Smith RD, Germain RS, Koeffler HP. Expression of transferrin receptor 2 in normal and neoplastic hematopoietic cells. *Blood.* 2001;98(9):2714-9.
83. Kawabata H, Yang R, Hiramata T, Vuong PT, Kawano S, Gombart AF, *et al.* Molecular cloning of transferrin receptor 2. A new member of the transferrin receptor-like family. *J Biol Chem.* 1999; 274(30):20826-32.
84. Frazer DM, Anderson GJ. The orchestration of body iron intake: how and where do enterocytes receive their cues? *Blood Cells Mol Dis.* 2003;30(3):288-97.
85. Wallace DF, Summerville L, Lusby PE, Subramaniam VN. First phenotypic description of transferrin receptor 2 knockout mouse, and the role of hepcidin. *Gut.* 2005;54(7):980-6.
86. Ganz T. Hepcidin in iron metabolism. *Curr Opin Hematol.* 2004;11(4):251-4.
87. Nemeth E, Roetto A, Garozzo G, Ganz T, Camaschella C. Hepcidin is decreased in TFR2 hemochromatosis. *Blood.* 2005; 105 (4):1803-6.
88. Kawabata H, Fleming RE, Gui D, Moon SY, Saitoh T, O'Kelly J, *et al.* Expression of hepcidin is down-regulated in TFR2 mutant mice manifesting a phenotype of hereditary hemochromatosis. *Blood.* 2005;105(1):376-81.
89. Camaschella C, Roetto A, Cali A, De Gobbi M, Garozzo G, Carella M, *et al.* The gene TFR2 is mutated in a new type of haemochromatosis mapping to 7q22. *Nat Genet.* 2000;25(1):14-5.
90. Roetto A, Totaro A, Piperno A, Piga A, Longo F, Garozzo G, *et al.* New mutations inactivating transferrin receptor 2 in hemochromatosis type 3. *Blood.* 2001;97(9):2555-60.
91. Hofmann WK, Tong XJ, Ajioka RS, Kushner JP, Koeffler HP. Mutation analysis of transferrin-receptor 2 in patients with atypical hemochromatosis. *Blood.* 2002;100(3):1099-100.
92. Mattman A, Huntsman D, Lockitch G, Langlois S, Buskard N, Ralston D, *et al.* Transferrin receptor 2 (TfR2) and HFE mutational analysis in non-C282Y iron overload: identification of a novel TfR2 mutation. *Blood.* 2002;100(3):1075-7.
93. Njajou OT, Vaessen N, Joosse M, Berghuis B, van Dongen JW, Breuning MH, *et al.* A mutation in SLC11A3 is associated with autosomal dominant hemochromatosis. *Nat Genet.* 2001;28(3): 213-4.
94. Montosi G, Donovan A, Totaro A, Garuti C, Pignatti E, Cassanelli S, *et al.* Autosomal-dominant hemochromatosis is associated with a mutation in the ferroportin (SLC11A3) gene. *J Clin Invest.* 2001;108(4):619-23.
95. Wallace DF, Pedersen P, Dixon JL, Stephenson P, Searle JW, Powell LW, *et al.* Novel mutation in ferroportin1 is associated with autosomal dominant hemochromatosis. *Blood.* 2002;100 (2):692-4.
96. Hetet G, Devaux I, Soufir N, Grandchamp B, Beaumont C. Molecular analyses of patients with hyperferritinemia and normal serum iron values reveal both L ferritin IRE and 3 new ferroportin (slc11A3) mutations. *Blood.* 2003;102(5):1904-10.
97. Cremonesi L, Forni GL, Soriani N, Lamagna M, Fermo I, Daraio F, *et al.* Genetic and clinical heterogeneity of ferroportin disease. *Br J Haematol.* 2005;131(5):663-70.
98. Pietrangelo A. The ferroportin disease. *Blood Cells Mol Dis.* 2004; 32(1):131-8.
99. Martinelli AL, Franco RF, Villanova MG, Figueiredo JF, Secaf M, Tavella MH, *et al.* Are haemochromatosis mutations related to the severity of liver disease in hepatitis C virus infection? *Acta Haematol.* 2000;102(3):152-6.
100. Pereira AC, Cuoco MA, Mota GF, da Silva FF, Freitas HF, Bocchi EA, *et al.* Hemochromatosis gene variants in patients with cardiomyopathy. *Am J Cardiol.* 2001;88(4):388-91.
101. Oliveira TM, Souza FP, Jardim AC, Cordeiro JA, Pinho JR, Sitnik R, *et al.* HFE gene mutations in Brazilian thalassemic patients. *Braz J Med Biol Res.* 2006;39(12):1575-80.
102. Bonini-Domingos CR, Zamaro PJA. Frequency of hereditary hemochromatosis gene mutations (C282Y and H63D) in hemoglobin S carrier from Brazil. *Vita et Sanitas, Trindade/GO* 2007;1(1).
103. Torres FR, Souza-Neiras WC, D'Almeida Couto AA, D'Almeida Couto VS, Cavasini CE, Rossit AR, *et al.* Frequency of the HFE C282Y and H63D polymorphisms in Brazilian malaria patients and blood donors from the Amazon region. *Genet Mol Res.* 2008;7(1):60-4.
104. Cançado RD, Guglielmi AC, Vergueiro CS, Rolim EG, Figueiredo MS, Chiattonne CS. Analysis of HFE gene mutations and HLA-A alleles in Brazilian patients with iron overload. *Sao Paulo Med J.* 2006;124(2):55-60.

Avaliação: Editor e dois revisores externos
 Conflito de interesse: sem conflito de interesse

Recebido: 29/05/2008
 Aceito após modificações: 19/12/2008