

JANAÍNA RAQUEL DE SIMAS

**HEMOCROMATOSE HEREDITÁRIA: RASTREAMENTO DAS MUTAÇÕES
C282Y E H63D NO GENE HFE DE PACIENTES COM HIPERFERRITINEMIA
E SEUS DESCENDENTES**

Monografia apresentada à
Universidade Regional de Blumenau
como parte das exigências do Curso
de Ciências Biológicas para a
obtenção do grau de “Bacharel”.

Orientadora: Prof. Dra. Paula
Angélica Roratto

BLUMENAU
SANTA CATARINA – BRASIL
2017

JANAÍNA RAQUEL DE SIMAS

**HEMOCROMATOSE HEREDITÁRIA: RASTREAMENTO DAS MUTAÇÕES
C282Y E H63D NO GENE HFE DE PACIENTES COM HIPERFERRITINEMIA
E SEUS DESCENDENTES**

Monografia apresentada à
Universidade Regional de Blumenau
como parte das exigências do Curso
de Ciências Biológicas para a
obtenção do grau de “Bacharel”.

Prof. Dra. Paula Angélica Roratto (Orientadora)

Prof. Dra. Keila Zaniboni Siqueira Batista

Prof. Dr. André Paulo Nascimento

BLUMENAU
SANTA CATARINA – BRASIL
2017

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha orientadora, dra. Paula Angélica Roratto, pela paciência e pela coragem em me orientar sem antes ter sido minha professora,

À monitora do laboratório de genética da FURB, Laysa, pela atenção e pela ajuda em todos os processos práticos,

Ao HEMOSC de Blumenau, o dr. Rafael Kmiliauskis Santos Gomes e demais profissionais de lá que me ajudaram a conseguir as amostras que foram analisadas.

Em especial, aos pacientes que aceitaram fazer parte deste trabalho tão importante para mim.

Aos meus pais, Tânia e Pedro Paulo, pelo amor, paciência e interesse em escutar sobre este trabalho, mesmo quando não compreendiam alguns termos.

Às minhas irmãs, Jussara e Juliana, por sempre demonstrarem sentir orgulho de mim, por me darem força e carinho.

À Marjorie, minha pessoa especial, por ter paciência, acreditar em mim e me motivar a seguir em frente para ser a grande bióloga que desejo me tornar.

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT	8
REFERENCIAL TEÓRICO	9
CAPITULO 1.....	15
1 INTRODUÇÃO	17
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
3 RESULTADOS.....	21
4 DISCUSSÃO	24
5 CONCLUSÃO	27
AGRADECIMENTOS	28
REFERÊNCIAS	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação dos participantes do estudo.....	22
Tabela 2 – Genótipos identificados	23
Tabela 3 – Frequência dos genótipos	24

LISTA DE ANEXOS

ANEXO I – Material de divulgação (folder)	34
ANEXO II – Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)	35

RESUMO

A hemocromatose hereditária é uma doença genética, causada por mutações em genes relacionados à homeostase do ferro no organismo. Apesar de ser um mineral essencial ao organismo, o ferro excedente acumulado ao longo dos anos, de forma assintomática até a quarta década de vida, compromete o funcionamento correto de diversos órgãos, gerando complicações clínicas como cirrose, problemas cardíacos, hiperpigmentação da pele e disfunções sexuais. Uma das formas de controlar o avanço da doença e minimizar os danos é através da realização periódica de flebotomia. As mutações mais frequentes associadas à doença encontram-se no gene HFE, sendo denominadas C282Y e H63D. O objetivo deste trabalho foi rastrear estas mutações em pacientes que realizam sangrias no HEMOSC de Blumenau, e seus parentes de primeiro grau, filhos ou irmãos, viabilizando o acesso ao genótipo para que estes indivíduos, quando positivos, possam acompanhar o acúmulo de ferro durante suas vidas. As análises moleculares de ambas as mutações foram realizadas através do método de PCR e RFLP. Na amostra de 11 participantes, onde oito eram pacientes do HEMOSC afetados pela hemocromatose, e três eram descendentes de indivíduos afetados, apenas um descendente foi negativo para todas as mutações, três apresentaram genótipo heterozigoto composto, e os demais apresentaram pelo menos um alelo positivo para as mutações. Com estes resultados, demonstrou-se a importância em determinar o genótipo de pacientes com hemocromatose, a fim de determinar as causadas do acúmulo de ferro, e de seus parentes, tanto filhos quanto irmãos, para evitar os sintomas clínicos da doença.

Palavras chave: HFE, ferro, C282Y, H63D, mutações, flebotomia.

ABSTRACT

Hereditary hemochromatosis is a genetic disease, caused by mutations in genes related to iron homeostasis in the body. Although it is an essential mineral for the body, excess iron accumulated over the years, asymptomatic until the fourth decade of life, compromises the correct functioning of several organs, generating clinical complications such as cirrhosis, cardiac problems, hyperpigmentation of the skin and dysfunctions sexual relations. One way of controlling disease progression and minimizing damage is through periodic bleeding. The most frequent mutations associated with the disease are in the HFE gene, being called C282Y and H63D. The objective of this work was to track these mutations in patients who perform bleeding in the HEMOSC of Blumenau, and their first-degree relatives, children or siblings, allowing the access to the genotype so that these individuals, when positive, can accompany the accumulation of iron during their lives. Molecular analyzes of both mutations were performed using the PCR and RFLP method. In the population of 11 participants, where 8 were HEMOSC patients affected by hemochromatosis, and 3 were descendents of affected individuals, only 1 descendant was negative for all mutations, 3 had composite heterozygous genotype, and the others had at least one positive allele for the mutations. These results demonstrated the importance of determining the genotype of patients with hemochromatosis in order to determine those caused by the accumulation of iron and their relatives, both children and siblings, to avoid clinical symptoms of the disease.

Keywords: HFE, iron, C282Y, H63D, mutations, phlebotomy.

REFERENCIAL TEÓRICO

FERRO E SEU METABOLISMO

O ferro é um metal essencial ao organismo humano, atuando no metabolismo energético das células e transportando gases (CANÇADO & CHIATTONE., 2009). Quando mantém a sua normalidade, a quantidade de ferro dentro do organismo humano é baixa, cerca de 3g a 4g, sendo essa quantidade controlada por diversas proteínas que formam complexos de captação do metal, como a DMT-1 (proteína transportadora de metal divalente), relacionadas ao seu metabolismo. Apenas uma pequena porção é encontrada na forma livre na corrente sanguínea, o restante é armazenado sob a forma de ferritina ou hemossiderina (CUNHA, 2009; LEAL *et al.*, 2012).

Após ser ingerido, o ferro é captado pela proteína DMT-1 ao chegar no jejuno. Esta proteína forma um complexo com a β 2-microglobulina na superfície da célula, a fim de permitir a afinidade com o receptor da transferrina, o qual transporta para o interior das células apicais do intestino, onde é fixado à ferroportina, que o recebe e o transfere à ferritina (CUNHA, 2009; PARDINI, 2007). A quantidade de ferro desejada é armazenada e o restante é alterado à transferrina, que ficará na circulação sanguínea. A transferrina leva o ferro aos locais de depósito ou utilização (tecido hepático, baço, cérebro, coração, pâncreas e hipófise) (CUNHA, 2009).

A necessidade corporal é que define a trajetória do metal no organismo, se a demanda superar a quantidade existente na corrente sanguínea, o ferro sairá do enterócito duodenal para a corrente sanguínea onde se ligará à transferrina. Caso não exista necessidade, o ferro continuará ligado à ferritina no enterócito, sendo eliminado somente com a descamação do epitélio duodenal (LEAL *et al.*, 2012).

O organismo humano não é capaz de aumentar a excreção de ferro, mesmo quando a quantidade do metal está acima da desejada, o que causa seu acúmulo patológico, podendo gerar alterações e até lesões ao depositar-se em diversos tecidos, principalmente no tecido hepático. Porém, o organismo tem mecanismos que permitem a limitação de atuação do ferro em reações oxidativas que poderiam gerar danos, como mantê-lo ligado à proteínas de transporte ou armazenado na forma de ferritina, sendo o fígado o principal local de armazenamento do metal (LEAL *et al.*, 2012). A proteína HFE ("H" por ser hereditário, "Fe" que é o símbolo químico do ferro) é encontrada nos hepatócitos. Nos hepatócitos a HFE fica associada à β 2-globulina, ao receptor de transferrina-ferritina (TRF) e hemojuvelina, que apresenta função crítica de “sensor

férrico” para regular a secreção de hepcidina, hormônio essencial para a homeostase do ferro (BARDOU-JACQUET *et al.*, 2014; D’ALESSIO *et al.*, 2012).

Apesar do fígado ser seu principal destino, o excesso de ferro pode depositar-se em diversos tecidos, afetando também o miocárdio, a medula óssea e algumas glândulas, ocasionando lesões, fibrose e disfunções nos mesmos. O ferro tóxico ao organismo é o que está livre em excesso, que não está ligado a nenhuma proteína (LEAL *et al.*, 2012).

Os altos índices de ferro podem ser primários, resultantes da alteração do metabolismo do ferro, sendo essa a forma observada em pacientes com hemocromatose hereditária, bem como pacientes com esteatose hepática, estando também associada ao alcoolismo. A sobrecarga do metal pode ser secundária também, sendo esta forma adquirida por talassemia, anemia falciforme e hemolítica, ou por doença congênita (LEAL *et al.*, 2012).

HEMOCROMATOSE HEREDITÁRIA

A hemocromatose hereditária foi observada por Trousseau e Troisier no começo do século XIX, sendo descrita como uma síndrome clínica formulada por um conjunto de alterações como cirrose hepática, diabetes mellitus e hiperpigmentação da pele. Somente em 1889 a síndrome recebeu o nome de “hemocromatose” por Von Recklinghausen, que foi quem observou que a doença estava associada ao aumento dos níveis séricos de ferro, sem alterações clínicas aparentes até determinada idade. (CANÇADO *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2009).

Em indivíduos afetados pela hemocromatose hereditária, já no estágio sintomático, a quantidade de ferro absorvida pode ultrapassar o limite de necessidade, chegando até a 40g no organismo de um adulto, o que representa 10 vezes a quantidade necessária para homeostasia (SOUZA *et al.*, 2001).

O acúmulo exacerbado do metal nos células estimula processos fisiológicos que lesam o tecido e causam comprometimento progressivo, principalmente nos tecidos hepático e cardíaco, bem como em articulações, hipófise e pâncreas (BARBOSA *et al.*, 2013). Cançado *et al.* (2010) observaram que as chances de portadores da hemocromatose hereditária desenvolverem câncer hepático é até vinte vezes maior que em pacientes sem nenhuma alteração, que não tenham cirrose hepática.

Num trabalho realizado entre os anos de 1970 e 1980, os pesquisadores conseguiram compreender as bases moleculares e a forma de transmissão genética da

doença. Trata-se de uma alteração genética autossômica recessiva no gene da HFE, o qual codifica a proteína HFE, envolvida no metabolismo do ferro no organismo humano, resultando na deposição do metal progressivamente ao longo dos anos em tecidos e órgãos, tendo como principais afetados os tecidos hepático e cardíaco. A hemocromatose hereditária é uma doença de penetrância completa em homens e incompleta em mulheres, principalmente por fatores fisiológicos (BORECKI *et al.*, 1989; FEDER *et al.*, 1996; BARBOSA *et al.*, 2013).

Com uma prevalência de cerca de 1:200 a 1:500, a hemocromatose é mais comum entre os descendentes de europeus (PARDINI, 2007). As manifestações clínicas ocorrem tardiamente, sendo que elas podem ser divididas em três fases: (1) o tempo de latência, onde não há ainda acúmulo do ferro, de zero a vinte anos; (2) o período de vinte a quarenta anos, onde começam a aparecer os primeiros indícios da alteração devido ao aumento dos índices de ferro na corrente sanguínea, porém o acúmulo ainda não causa danos patológicos; e (3) entre quarenta e sessenta anos, quando as manifestações clínicas surgem, após todos os anos de acúmulo do ferro no organismo. As manifestações clínicas da hemocromatose são mais visíveis em homens que em mulheres, ocorrendo em mulheres com um retardo de cinco a dez anos quando em comparação com homens, devido a perda de ferro através da menstruação, lactação e gestacional (CUNHA, 2009; PARDINI, 2007).

MUTAÇÕES

De acordo com CANÇADO *et al.* (2009), a hemocromatose hereditária teve origem no norte da Europa, associada às mutações no gene HFE. O gene HFE está localizado no braço curto do cromossomo 6, próximo ao *locus* do HLA (antígenos de histocompatibilidade), sendo formado por 7 éxons (FEDER *et al.*, 1996). A proteína proveniente deste gene é formada por 348 aminoácidos, e diferentes mutações já foram observadas neste gene, associadas à doença, sendo as mais comuns denominadas C282Y e H63D, ou pela mutação S65C, com menor frequência (FEDER *et al.*, 1996. MURA *et al.*, 1999).

A mutação C282Y, no exon 4, consiste em uma transição de guanina (G) para adenina (A) no nucleotídeo 845, que determina a substituição de um aminoácido cisteína (C) por tirosina (Y) na posição 282 da proteína HFE. Apesar da função exata da proteína HFE não estar totalmente esclarecida, esta mutação acaba por não permitir a

interação entre HFE, β 2-microglobulina e a transferrina, o que de alguma forma compromete o metabolismo do ferro (FEDER *et al.*, 1996).

A mutação H63D refere-se à alteração de um aminoácido histidina (H) por ácido aspártico (D) na posição 63 da proteína HFE, esta alteração ocorre por conta da substituição de uma guanina (G) por uma citosina (C) no nucleotídeo 197 no éxon 2. Esta mutação altera o formato da proteína transportadora do ferro, diminuindo a sua afinidade com a transferrina, o que impede a fixação do ferro (FEDER *et al.*, 1996).

Há também uma terceira mutação, denominada S65C, que acontece quando há uma alteração de um aminoácido serina (S) por um aminoácido cisteína (C), na posição 65 da proteína HFE, por conta da troca de uma adenina (A) por uma timina (T) no nucleotídeo 193 do gene HFE, também no éxon 2 (BARTON *et al.*, 1999; MURA *et al.*, 1999).

MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS, DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO

Estudos indicam que quando em homozigose, a mutação C282Y do gene HFE é mais agressiva que as demais, acarretando no acúmulo de ferro depreciativo ao organismo. Quando o diagnóstico aponta este genótipo, os pacientes tendem a apresentar alterações no tecido hepático, sendo indicada a realização de exames complementares, tomografias e ultrassonografias, a fim de detectar possíveis fibroses ou cirrose no fígado. O diagnóstico de alterações hepáticas também pode ser realizado através de exames de imagem (CUNHA, 2009; CANÇADO *et al.*, 2007).

A mutação H63D, se não combinada à C282Y, indica um baixo risco para o desenvolvimento da doença clínica, porém quando combinada com a C282Y, o risco torna-se tão grande quanto um indivíduo homozigoto para a C282Y (SANTOS *et al.*, 2009). Bem como esta, a mutação S65C também é relacionada ao baixo índice de desenvolvimento da doença, porém já existem relatos de riscos para desenvolvimento da doença quando esta mutação se associa à C282Y (CUNHA, 2009).

Quando comparada às outras mutações, a C282Y é considerada a mais comum em determinadas localidades do mundo, porém no Brasil ela é considerada de três a oito vezes menor que em outras regiões, possivelmente pelas inúmeras etnias que compõem a população brasileira. Já a mutação H63D tem frequência alélica semelhante à de outras populações, sendo de duas a três vezes mais frequente que a C282Y (SANTOS *et al.*, 2009).

Apesar das alterações S65C e H63D serem consideradas mais brandas, elas podem aumentar os riscos de absorção inadequada do ferro quando associadas à outras doenças que estão relacionadas à homeostasia do ferro no organismo, como a talassemia, distúrbio hereditário que diminui a quantidade de hemoglobina e hemácias na corrente sanguínea; a esferocitose hereditária, doença que se estabelece pela presença de hemácias pequenas (microcitose) e altas concentrações de hemoglobinas (MELIS *et al.*, 2002; CANÇADO *et al.*, 2010).

CUNHA (2009) argumenta que, em geral o diagnóstico da hemocromatose hereditária ocorre quando há uma grande suspeita, com evidência de complicações secundárias que já acometem órgãos vitais do paciente. Porém com a realização de exames clínicos e dosagens bioquímicas, como a da ferritina, em indivíduos jovens assintomáticos, é possível observar algumas alterações precoces que sugerissem a incidência da doença.

Para pacientes que já possuam problemas de saúde, mesmo não relacionados à hemocromatose, como hepatite B ou C detectadas, ou na suspeita de cirrose ou fibrose hepática, recomenda-se que seja realizada a biópsia hepática, que por ser um procedimento invasivo, é mais indicado apenas para quantificar os problemas causados pela hemocromatose (CUNHA, 2009; CANÇADO *et al.*, 2007).

Alternativamente, as mutações do gene da HFE, podem ser detectadas antes de qualquer sintoma secundário, e de modo não invasivo, a partir da coleta de células da mucosa bucal. A detecção genética é realizada através da técnica de PCR – RFLP, ou seja, envolve uma reação em cadeia da polimerase (PCR) para o gene HFE, seguida da clivagem do produto da reação por enzimas de restrição (RFLP, do inglês: *Restriction Fragment length polymorphism*). Este método permite identificar a presença do alelo mutante e do normal, para qualquer uma das mutações C282Y, H63D e S65C, bem como identificar indivíduos heterozigotos (JOUANOLLE *et al.*, 1997; MURA *et al.*, 1997).

Considerando que diferentes genótipos para as mutações no gene HFE tornam indivíduos mais propensos a danos hepáticos, em especial devido à presença da mutação C282Y, o diagnóstico molecular precoce, associado à indícios de acúmulo de ferro no organismo, permitem uma conduta médica adequada a cada quadro clínico com o intuito de evitar ou minimizar o avanço da doença (CANÇADO *et al.*, 2007).

De acordo com SOUZA *et al.* (2001), a maioria dos autores indicam a flebotomia como principal forma de tratamento para pacientes com hemocromatose

hereditária detectada. Este procedimento, também conhecido como sangria, consiste na remoção de uma quantia de sangue semelhante ao procedimento de doação de sangue, porém com intuito diferenciado de diminuição da quantidade de ferro na corrente sanguínea. Entretanto, por se tratar de um procedimento bastante invasivo nem todos os pacientes possuem a mesma tolerância ao método. Uma dieta sem ferro a princípio não é indicada, porém é recomendado que o paciente, após a determinação do genótipo mutante, adquira hábitos alimentares com menores quantidades de alimentos ricos em ferro (carne vermelha, por exemplo), evite suplementação vitamínica de vitamina C ou suplementos férreos, evite o etilismo e faça o acompanhamento bioquímico dos indicadores do metabolismo correto do ferro, ferritina, saturação de transferrina e índice de capacidade total de ligação do ferro, quando necessário (CANÇADO *et al.*, 2010).

CAPITULO 1**HEMOCROMATOSE HEREDITÁRIA: RASTREAMENTO DAS MUTAÇÕES
C282Y E H63D NO GENE HFE DE PACIENTES COM HIPERFERRITINA E
SEUS DESCENDENTES**

HEMOCROMATOSE HEREDITÁRIA: RASTREAMENTO DAS MUTAÇÕES C282Y E H63D NO GENE HFE DE PACIENTES COM HIPERFERRITINA E SEUS DESCENDENTES

Janáína Raquel de Simas ¹⁾, Paula Angélica Roratto ²⁾

¹⁾ Acadêmica do Curso de Ciências Biológicas, Universidade Regional de Blumenau (FURB). Rua Antônio da Veiga, 140. 89012-900 Blumenau, SC

²⁾ Professor do Departamento de Ciências Exatas e Naturais. Universidade Regional de Blumenau (FURB). Rua Antônio da Veiga, 140. 89012-900 Blumenau, SC

Resumo: A hemocromatose hereditária é uma doença genética, causada por mutações em genes relacionados à homeostase do ferro no organismo que, quando presentes, geram acúmulo inadequado deste metal no organismo. As mutações mais frequentes, no gene HFE, em pacientes com a doença são a C282Y, H63D e, recentemente, a S65C. O objetivo deste trabalho foi rastrear as mutações C282Y e H63D em pacientes que realizam flebotomias no HEMOSC de Blumenau, e seus parentes de primeiro grau. As análises moleculares de ambas as mutações foram realizadas através do método de PCR e RFLP. Na amostra de 11 participantes, onde oito eram pacientes do HEMOSC afetados pela hemocromatose, e três eram descendentes de indivíduos afetados, apenas um descendente foi negativo para ambas as mutações, três apresentaram genótipo heterozigoto composto, e os demais apresentaram pelo menos um alelo positivo para as mutações. Com estes resultados, demonstrou-se a importância em determinar o genótipo de pacientes com hemocromatose, a fim de determinar as causadas do acúmulo de ferro, e de seus parentes, tanto filhos quanto irmãos, para evitar os sintomas clínicos da doença.

Palavras chaves: HFE, ferro, C282Y, H63D, mutações, flebotomia.

1 INTRODUÇÃO

Após ser ingerido através da alimentação, o ferro que provém da dieta pode ser utilizado nos processos metabólicos onde é necessário, ou pode ser armazenado como ferritina. O organismo humano não possui nenhum mecanismo efetivo de excreção do ferro, o qual depende de fatores fisiológicos para que a concentração do mesmo torne-se equilibrada dentro do organismo. Há reciclagem e reutilização do metal no organismo através da sua utilização para renovação de células, e perda através do período menstrual em mulheres ou sangramentos eventuais (LEÃO, 2013).

O ferro é armazenado no organismo de duas formas, como ferritina, sendo esta a forma mobilizável do metal, e hemossiderina, sendo esta a forma estável de reserva do mesmo. A mucosa intestinal é que regula o processo de absorção do ferro. Alterações na homeostase deste metal acarretam na elevação da ferritina, sendo as principais causas: hemocromatose, hemofagocitose, doença de Still, síndromes inflamatórias, entre outras patologias (CARVALHO *et al.*, 2008; LEÃO, 2013).

A hemocromatose hereditária é uma doença genética, de herança autossômica recessiva, que leva ao acúmulo progressivo do ferro no organismo. Sua ocorrência está associada à mutações no gene HFE, o qual codifica a proteína associada à hemocromatose (HFE) (LEÃO, 2013; CUNHA, 2009; SANTOS *et al.*, 2009).

A proteína HFE é uma das principais reguladoras atuantes no metabolismo normal do ferro, de modo que, qualquer alteração na sua conformação, implica em desordem na homeostase deste metal, o que o torna tóxico ao organismo. Ela tem papel essencial no metabolismo do ferro, sendo expressa nos enterócitos e hepatócitos, nas criptas duodenais, em associação com a $\beta 2$ microglobulina, ligada ao receptor da transferrina, o que reduz a afinidade do metal pela transferrina, auxiliando no controle da entrada do metal. Admite-se que a HFE, em conjunto com as demais proteínas, forme um complexo que atua como um sensor férreo, que determina a necessidade de ferro no organismo (LEÃO, 2013). Os SNPs (do inglês: *single nucleotide polymorphism*, ou polimorfismo de um único nucleotídeo) associados à hemocromatose hereditária mais conhecidos são C282Y, H63D e S65C (FEDER *et al.*, 1996; MURA *et al.*, 1999; SCHINCARIOL *et al.*, 2011).

Indivíduos homocigotos para estas mutações acumulam ferro no organismo a partir da segunda década de vida de modo assintomático. Os efeitos clínicos das mutações são observados somente em um estágio já avançado da doença, entre a quarta

e a quinta década de vida dos pacientes, quando por mais de vinte anos já ocorreu a deposição do ferro em altos níveis em órgãos e tecidos, o que por vezes impossibilita um bom prognóstico. A determinação sérica dos níveis de ferritina é frequentemente utilizada para estabelecimento dos níveis de sobrecarga do metal nos tecidos dos pacientes, e isto auxilia na definição de ponto inicial de tratamento da hemocromatose hereditária. Valores acima de 1000 µg/mL de dosagem de ferritina sérica indica grau de hiperferritinemia, o qual é indicativo para o início do tratamento por flebotomias (LEÃO, 2013; CUNHA, 2009; SOUZA *et al.*, 2001).

Antes considerada uma doença não muito comum, que acometia principalmente homens, a hemocromatose era diagnosticada muitas vezes somente após o óbito do paciente. Com os avanços das técnicas de biologia molecular, a hemocromatose hereditária pode ser diagnosticada precocemente. O conhecimento adquirido sobre o metabolismo do ferro, proteínas e processos reguladores da sua homeostasia também foram extremamente importantes na compreensão da doença e na busca por métodos de diagnóstico precoce (CANÇADO *et al.*, 2007).

Desse modo, o diagnóstico precoce da hemocromatose é uma realidade possível atualmente, através do acompanhamento de rotina em exames realizados em laboratórios de análises clínicas, com a quantificação do ferro sérico, ou pela investigação genética da presença das mutações causadoras da doença.

Apesar da disponibilidade destes exames, a hemocromatose hereditária é um distúrbio dificilmente detectado antes dos sintomas se tornarem graves, o que deixa claro a importância do rastreamento genético em parentes de indivíduos portadores da doença. Fatores não genéticos, como os ambientais e clínicos, estão relacionados às diferentes formas de desenvolvimento clínico da doença, o que determina que sua expressão fenotípica é variável. Isto demonstra a possibilidade de que indivíduos heterozigotos possuem chances de desenvolverem os sintomas tanto quanto pacientes homozigotos (CANÇADO *et al.*, 2007; LEÃO, 2013).

No presente trabalho objetivou-se pesquisar as mutações C282Y e H63D em pacientes que realizam sangrias no Hemocentro de Blumenau e seus parentes de primeiro grau.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

O projeto realizou-se na Universidade Regional de Blumenau/SC (FURB), contando com amostras biológicas de pacientes que realizam o procedimento de flebotomia programada no Hemocentro Regional de Blumenau/HEMOSC e seus parentes de primeiro grau.

ABORDAGEM DOS PARTICIPANTES

Este projeto foi executado após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da FURB, em conjunto com o CEP do HEMOSC de Florianópolis – SC, sob parecer número 1.941.012. A abordagem dos pacientes ocorreu no Hemocentro Regional de Blumenau, de março a maio do ano de 2017.

Os pacientes que se deslocaram ao HEMOSC para realizarem flebotomias programadas neste período foram abordados, informados sobre a pesquisa através de material de divulgação impresso (ANEXO I) e diálogo. Os parentes de alguns destes pacientes, após tomarem conhecimento do trabalho, que demonstraram interesse na análise, também participaram. Mediante consentimento e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido TCLE (ANEXO II), tiveram amostras de mucosa bucal coletadas através de *swab*.

CUIDADOS ÉTICOS

As práticas de coleta adotadas para obtenção da amostra de DNA não envolveram riscos físicos ao paciente, conforme destacado no TCLE deste trabalho.

As informações obtidas neste trabalho, sobre a saúde dos pacientes e seus familiares, foram tratadas de forma confidencial, sendo repassadas somente aos próprios pacientes e seu médico.

RASTREAMENTO DAS MUTAÇÕES C282Y E H63D POR PCR-RFLP

Após a coleta, foi realizada a extração de DNA a partir das células presentes no *swab*, de acordo com o protocolo à base de NaCl descrito por ABRÃO *et al.* (2005), e foi posteriormente verificada através de eletroforese em gel de agarose.

A PCR foi realizada com 25 µL de volume contendo: 1U de Taq DNA, 1x tampão da enzima, 1,5mM de MgCl₂, 10mM de dNTPs, e 1 µM de cada primer (*forward* e *reverse*) e 2 µL de amostra de DNA.

As condições para amplificação para ambos os SNPs foram a mesmas, exceto pela temperatura de anelamento específica de cada par de primer: 1 ciclo de 94°C durante 5 minutos, 30 ciclos de 94°C durante 1 minuto, 55,3°C (para C282Y) e 53,9°C (para H63D) durante 1 minuto, 72°C durante 1 minuto e, para finalizar, 1 ciclo de 7 minutos a 72°C. Posteriormente, o produto de PCR foi aplicado em gel de agarose 1% para confirmação da amplificação.

Os produtos de PCR foram submetidos à digestão enzimática e posterior eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% para identificação do genótipo dos participantes.

O produto da PCR de 136pb amplificado para C282Y foi submetido à digestão pela enzima de restrição *AfaI*, a qual cliva os produtos da PCR gerando fragmentos de 62 e 74pb. Na presença da mutação, a enzima reconhece um sítio adicional de clivagem, produzindo fragmentos de 29, 45 e 62pb. A presença de duas bandas (62 e 74pb) representou um indivíduo homocigoto para o alelo normal. A presença de três bandas (29, 45 e 62pb) representou um indivíduo homocigoto para a mutação C282Y. A presença de quatro bandas (29, 45, 62 e 74 pb) indicou um indivíduo heterocigoto.

O material amplificado para H63D, com 100pb, foi submetido à digestão pela enzima de restrição *BclI*, a qual clivou os produtos de PCR do alelo normal em dois fragmentos menores de 36 e 64 pb. Considerando que a mutação modifica a sequência reconhecida pela enzima *BclI*, o alelo mutante foi identificado pela presença da banda de 100pb do produto de PCR não clivado. A presença de três bandas (36, 64 e 100pb) caracterizou o genótipo heterocigoto.

Considerando que todas as amostras foram investigadas tanto para a mutação C282Y quanto para H63D, foi possível identificar indivíduos portadores de ambas as mutações. A terceira mutação descrita para este gene, a S65C, não foi investigada neste trabalho.

3 RESULTADOS

Foram abordados os pacientes durante seu tempo de espera para o procedimento de sangria HEMOSC. Destes, foram recrutados onze participantes para fazerem parte do estudo, sendo que os mesmos são referidos ao longo do texto pelo respectivo número apresentado na Tabela 1. Dentre eles, oito são pacientes do HEMOSC, os demais são parentes, sendo: o participante 2 filho do paciente 1, e os participantes 7 e 8 filhos de um indivíduo afetado que é paciente do HEMOSC, porém não foi genotipado pois o mesmo já possui confirmação molecular de mutação pra hemocromatose. Todos os participantes da pesquisa são do sexo masculino, exceto a paciente 7, filha de um indivíduo afetado que não fez parte deste trabalho.

Indivíduos	Paciente	Parente	Masculino	Feminino	Idade
1	x		X		64
2		x	X		36
3	x		X		65
4	x		X		56
5	x		X		64
6	x		X		69
7		x		x	6
8		x	X		1
9	x		X		42
10	x		X		56
11	x		X		39

Tabela 1. Relação de indivíduos amostrados no trabalho, classificados por linha de abordagem (afetado pela doença ou parente de afetado), sexo e idade.

Paciente	H63D		C282	
	Genótipo	Bandas	Genótipo	Bandas (pb)
1	+/+	100	-/+	74, 62, 45, 29
2	+/+	100	-/-	74,62
3	-/+	100, 62, 38	-/-	74,62
4	-/+	100, 62, 38	-/-	74,62
5	-/-	62, 38	-/+	74, 62, 45, 29
6	-/-	62, 38	-/+	74, 62, 45, 29
7	-/-	62, 38	-/-	74, 62
8	-/-	62, 38	?/?	
9	-/-	62, 38	-/+	74, 62, 45, 29
10	-/+	100, 62, 38	-/+	74, 62, 45, 29
11	-/-	62, 38	-/+	74, 62, 45, 29

Tabela 2. Genótipos obtidos dos participantes amostrados. O símbolo “+” representa presença do alelo mutante para ambos SNPs C282Y e H63D, enquanto o símbolo “-” representa genótipo não definido, e o “?” refere-se ao genótipo que não pode ser determinado. Os números representam os tamanhos (em pares de base) das bandas observadas na eletroforese pela técnica de PCR-RFLP.

Conforme a tabela 2, dentre os participantes amostrados, apenas o 7 não apresentou nenhum alelo positivo para mutações, sendo homozigoto para o alelo normal em ambos os SNPs. Os demais participantes apresentaram pelo menos um dos alelos mutantes em uma das mutações. No caso do participante número 8, não foi possível determinar seu genótipo para a mutação C282Y devido à pouca coloração das bandas. O participante número 10 é um paciente com genótipo heterozigoto composto, sendo que este possui um dos alelos normais e um dos alelos mutantes para a H63D, e um dos alelos normais e um dos alelos mutantes para a C282Y. O paciente representado pelo número 1 é um paciente heterozigoto composto, sendo homozigoto para a mutação em H63D e heterozigoto pra C282Y.

Genótipo	Frequência (%)
Normal	9,1
C282Y/C282Y	0
C282Y/-	36,36
C282Y/H63D	18,18
H63D/H63D	18,18
H63D/-	18,18
Total	100

Tabela 3. Frequência dos genótipos encontrados nos participantes do universo amostral do estudo. O símbolo “-“ representa o genótipo não definido.

DISCUSSÃO

As informações genéticas de pacientes afetados com a hiperferritinemia, bem como de seus parentes, fornecem importantes parâmetros devido à abordagem que pode ser adotada diante dos genótipos encontrados nestes indivíduos, em especial quando ainda assintomáticos.

Com o passar dos anos, o acúmulo de ferro no organismo pode tornar-se um grande problema, visto que sua forma livre em demasia no organismo demonstra uma potencial chance de formação excessiva de radicais livres no organismo, o que causa estragos não mensuráveis nas células (LEÃO, 2013).

A hemocromatose hereditária é uma doença genética, portanto não há cura para ela, apenas tratamentos que, quando aliados a técnicas específicas, como alteração na alimentação, visando a diminuição da absorção de ferro, e/ou flebotomias regulares, podem aumentar o bem estar do paciente, sua qualidade e expectativa de vida. Quando a mutação é rastreada em descendentes de pacientes afetados, ainda que não apresentem sintomas clínicos, estas mudanças de hábitos podem determinar o curso clínico que a mutação pode gerar (BONINI-DOMINGOS, 2007; CARVALHO *et al.*, 2008).

A penetrância da mutação em HFE é completa em indivíduos do sexo masculino. No entanto, é importante destacar a heterogeneidade gênica descrita para a hemocromatose, considerando todas as proteínas envolvidas no metabolismo do ferro. Há registros na literatura de indivíduos portadores da doença heterozigoto para as mutações em HFE, porém portando mutações também em outros genes, como o HAMP, produtos de um hormônio peptídeo associado à regulação do ferro no organismo (BORECKI *et al.*, 1989; MERRYWEATHER-CLARKE *et al.*, 2003).

Com isso, a triagem genética entre familiares de primeiro grau de pacientes afetados têm cada vez mostrado mais a sua relevância, e vem sendo sugerida em alguns países. Em contrapartida, esta conduta ainda é negligenciada em alguns locais do mundo, onde a relação entre a genética e o desenvolvimento clínico da doença não é tratada de forma conjunta e, por vezes, os médicos focam apenas em condutas de tratamento e não de prevenção aos sintomas clínicos (BECKER *et al.*, 2011).

Os SNPs pesquisados neste trabalho estão dentro do grupo de mutações consideradas primárias, porém há ainda outras diversas mutações, dentro deste mesmo grupo, que podem gerar o mesmo fenótipo de sobrecarga de ferro, sendo elas: outras

mutações no gene HFE, gene HAMP (hepcidina), gene Tfr2 (receptor de transferrina), gene HJV (hemojuvelina) e SLC40A1 (ferroportina) (AGUIAR et al., 2014).

A heterogeneidade clínica presente nos pacientes afetados pela hemocromatose pode ser explicada devido a esta heterogeneidade genética, tanto alélica quanto gênica, apresentada pela doença. Tanto o paciente homozigoto para determinada mutação, ou até heterozigoto composto, onde há combinação de mutações, encontrada em 18,18% dos pacientes neste trabalho, podem apresentar alterações bioquímicas nas dosagens de ferritina sérica. Com o passar do tempo, acabam desenvolvendo graves sintomas da doença, sendo a severidade dos sintomas dependente das combinações entre as mutações. Independentemente de o genótipo ser mais propício ou não à severidade, a identificação precoce da mutação é, sem sombra de dúvidas, a melhor forma de, primeiramente, verificar a eminência da manifestação de uma doença silenciosa, e monitorar os níveis séricos de ferro ao longo da vida para evitar os danos consequentes (COLLI, 2007).

No presente estudo, os participantes que eram pacientes do HEMOSC já apresentavam hiperferritinemia em suas dosagens bioquímicas, o que gerou a necessidade da realização de sangrias. Nota-se que, neste mesmo grupo, a maioria dos pacientes encontram-se além da quarta década de vida, onde os sintomas clínicos já podem ser críticos, devido ao tempo de acumulação de ferro descontrolada e desacompanhada. Esse acúmulo é pior em indivíduos do sexo masculino (todos os pacientes que participaram são homens), pois estes não sofrem com as perdas fisiológicas de ferro da mesma forma que indivíduos do sexo feminino (CUNHA, 2009).

Dos descendentes que participaram do estudo, apenas um apresentou resultado positivo para mutações (Participante 2), sendo este homozigoto para a mutação H63D. Com esta descoberta aos 36 anos, onde provavelmente já ocorreu o acúmulo de ferro no organismo, de forma assintomática, por pelo menos três décadas, faz-se cumprir o objetivo do rastreamento genético para a hemocromatose hereditária, com a indicação de acompanhamento dos níveis de ferritina por exames bioquímicos, além de exames de imagem e outras formas de avaliar danos primários aos órgãos, como o fígado, com intuito de minimizar o avanço da doença.

Os demais descendentes, crianças de 1 e 6 anos, exibiram resultados negativos para mutação H63D, e a participante 7 apresentou resultado negativo também para a mutação C282Y, o que gera tranquilidade quanto às suas chances de desenvolver a

doença ao longo de sua vida. Para o participante 8, ainda há necessidade de confirmação para presença ou ausência da mutação C282Y, pois ambos são filhos de um paciente afetado pela doença (homozigoto para mutação C282Y e heterozigoto para H63D), portanto este pode ser portador de um alelo mutante também, e a idade em que se encontra, período de latência da doença, é a que oferece maiores chances de evitar as sequelas clínicas proporcionadas pela deposição inadequada do ferro no organismo (LEÃO, 2013).

O rastreamento das mutações no gene HFE através de técnicas moleculares têm demonstrado um ótimo custo-benefício, no sentido de gerar economia para o país com gastos em saúde. Ao descobrir a presença do genótipo mutante, o paciente é acompanhado durante sua vida de forma profilática, diminuindo o uso e os custos de tratamento e medicamentos para pacientes afetados. Há também benefício para o paciente que descobre a possibilidade de desenvolver tais problemas e, ao longo de sua vida, pode evita-los (JACKOWSKI *et al.*, 2004).

O HEMOSC de Blumenau/SC possui um banco de dados com 94 pacientes, que realizam procedimento de flebotomia, já genotipados (Dr. Rafael Kmiliauskis Santos Gomes, comunicação pessoal). Dentre estes pacientes, cerca de 17% são heterozigotos compostos (incluindo mutantes para a terceira mutação descrita para o gene HFE, a S65C), enquanto neste trabalho, observou-se que a frequência genotípica de heterozigotos compostos é de 18,18%. Enquanto 36,36% dos pacientes deste trabalho apresentaram genótipo heterozigoto pra mutação C282Y, o banco de dados apresenta 13,83% de indivíduos com este genótipo; já para a mutação H63D, o banco de dados apresenta 47,87% dos pacientes heterozigotos, enquanto o presente estudo identificou 18,18%, conforme apresentado na tabela 3.

Valadão *et al.* (2014) citam que, dos brasileiros afetados pela hemocromatose hereditária, 2/3 possuem as mutações C282Y ou H63D. Porém acredita-se que outras mutações possam estar envolvidas com o desenvolvimento clínico da doença, mas não estudos de rastreamento para outros genes que comprovem esta relação de heterogeneidade. O presente estudo mostra um grande número de heterozigotos afetados (9 de 11), indicando que pode haver sim outras mutações associadas à hemocromatose no grupo amostrado. Estas mutações podem ser tanto o outro SNP encontrado no gene HFE, a S65C, demonstrando a heterogeneidade alélica descrita para a doença, como outras mutações em outros genes que causam o mesmo fenótipo, representando sua heterogeneidade gênica.

4 CONCLUSÃO

- Há indícios de outras mutações associadas à hemocromatose hereditária na população amostrada, dada a presença dos heterozigotos encontrados para os SNPs investigados.

- O rastreamento é extremamente útil quando aplicado na confirmação do genótipo em descendentes de indivíduos afetados.

- Quando confirmado o genótipo mutante, o indivíduo pode acompanhar os índices de ferritina durante sua vida, dando atenção aos fatores que influenciam no desenvolvimento clínico da doença.

- O resultado negativo para as mutações ajuda a minimizar a preocupação para os parentes de indivíduos acompanhados.

- É necessário dar continuidade à pesquisa, a fim de rastrear as mutações em mais parentes dos indivíduos acompanhados no HEMOSC.

AGRADECIMENTOS

Ao Hemocentro Regional de Blumenau/SC, por oferecer suporte à pesquisa, proporcionando uma ponte entre os pesquisadores e os pacientes, num trabalho de união de forças. Agradecemos também ao Laboratório de Genética da Universidade Regional de Blumenau (FURB), onde pude realizar as práticas necessárias para obtenção dos resultados desse trabalho. E, claro, um agradecimento especial aos voluntários que aceitaram fazer parte deste trabalho.

REFERÊNCIAS

ABRÃO, Milena Garcia et al. **Padronização da Técnica de Extração de DNA de células de mucosa oral com NaCL: Aplicação no estudo do Gene PROP1.** *Arq Bras Endocrinol Metab*, São Paulo, v. 49, n. 6, p.978-982, dez. 2005.

AGUIAR, Karina Marini et al. Mutações genéticas, métodos diagnósticos e terapêuticas relacionadas à hemocromatose hereditária. *Biotemas*, [s.l.], v. 27, n. 1, p.133-142, 2 dez Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). 2013.

BARBOSA, Fabíola B. et al. **Hemocromatose simulando artrite reumatoide: relato de caso.** São Paulo, SP: Revista Brasileira de Reumatologia, 2013.

BARDOU-JACQUET, Edouard et al. **Liver transplantation normalizes serum hepcidin level and cures iron metabolism alterations in hfe hemochromatosis.** Rennes, França: *Hepatology*, 2014.

BARTON, James C. et al. **Two Novel Missense Mutations of the HFE Gene (I105T and G93R) and Identification of the S65C Mutation in Alabama Hemochromatosis Probands.** Alabama, EUA: *Blood Cells, Molecules, And Diseases*, 1999.

BECKER, Frauke et al. Genetic testing and common disorders in a public health framework: how to assess relevance and possibilities. *European Journal Of Human Genetics*, [s.l.], v. 19, n. 1, p.6-44, Springer Nature, abr. 2011.

BONINI-DOMINGOS, Claudia R.. Aumento de ferro, hemocromatose hereditária e defeitos no gene HFE. O que conhecemos na população brasileira? *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.*, São José do Rio Preto, v. 4, n. 29, p.339-343, dez. 2007.

BORECKI, I. B. et al. Segregation of Genetic Hemochromatosis Indexed by Latent Capacity of Transferrin. *Hum. Genet.*, Am., v. 1, n. 45, p.465-470, dez. 1989.

CANÇADO, Rodolfo Delfini; CHIATTONE, Carlos Sérgio. Visão atual da hemocromatose hereditária. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São Paulo, SP: p.469-475, 8 dez. 2009.

CANÇADO, Rodolfo D.; CHIATTONE, Carlos S.. **Visão atual da hemocromatose hereditária**. São Paulo, SP: Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, 2010.

CUNHA, Pâmella R.. **Hemocromatose hereditária**. Barra Mansa, RJ: Academia de Ciência e Tecnologia - Instituto Naoum, 2009.

CARVALHO, Rosali Braga Brandão et al. Hemocromatose: um enfoque nutricional. **Pleiade**, Foz do Iguaçu, v. 2, n. 2, p.101-107, dez. 2008.

COLLI, Maikel Luis. **Prevalência das mutações C282Y e H63D no gene da hemocromatose hereditária (HFE) em pacientes com diabetes melito tipo 2 e a sua relação com as complicações crônicas**. 2007. 87 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Endocrinologia, Ufrgs, Porto Alegre, 2007.

CUNHA, Pâmella R.. **Hemocromatose hereditária**. Barra Mansa, RJ: Academia de Ciência e Tecnologia - Instituto Naoum, 2009.

D'ALESSIO F., et al. **The hemochromatosis proteins HFE, Tfr2, and HJV form a membrane-associated protein complex for hepcidin regulation**. *Journal Hepatology*, p.1052–1060, 2012.

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

JACKOWSKI, Danielle et al. ANÁLISE DA FREQUÊNCIA DA MUTAÇÃO C282Y NA POPULAÇÃO PARANAENSE. **Revista Estudos de Biologia**, Curitiba, v. 26, n. 55, p.11-18, jun. 2004.

JOUANOLLE, Anne M. et al. **A candidate gene for hemochromatosis: frequency of the C282Y and H63D mutations**. Rennes, França: Hum Genet, 1997.

LEAL, Francismar P. et al. **Hemocromatose: uma atualização de conceitos**. Maringá, PR: Brazilian Journal Of Surgery And Clinical Research, 2012.

LEÃO, Gioconda D. Rodrigues. **Análise das mutações C282Y, S65C e H63D e frequência alélica do gene do HFE em pacientes com hiperferritinemia, em uma cidade do Nordeste, Brasil**. 96 f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Programa de pós-graduação em ciências da saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Rio Grande do Norte. 2013.

MELIS, Maria A. et al. **H63D mutation in the HFE gene increases iron overload in β -thalassemia carriers**. Cagliari, Itália: Haematologica, 2002.

MERRYWEATHER-CLARKE, A. T.. **Digenic inheritance of mutations in HAMP and HFE results in different types of haemochromatosis**. Oxford University Press (OUP). Human Molecular Genetics, [s.l.], v. 12, n. 17, p.2241-2247, 8 jul. 2003.

MURA, Catherine et al. **Phenotype-genotype correlation in haemochromatosis subjects**. Brest, França: Hum Genet, 1997.

MURA, Catherine et al. HFE Mutations Analysis in 711 Hemochromatosis Proband: Evidence for S65C Implication in Mild Form of Hemochromatosis. **Blood**, v. 93, n. 8, p.2502-2505, abr. 1999.

PARDINI, Hermes. **Hemocromatose hereditária: estudo das mutações C282Y, H63D e S65C no gene HFE**. 2007. Disponível em: <http://www.hermespardini.com.br/atual_manual/pdf_genetica_novos_exames/HEMO_CROMATOSE_HEREDITARIA1.pdf>. Acesso em: 25 abr. 2016.

SANTOS, Paulo C. J. I. et al. **Alterações moleculares associadas à hemocromatose hereditária**. São Paulo, SP: Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, 2009.

SCHINCARIOL, Luciana Pasqualini et al. Detecção de polimorfismo de única base (SNPS) pelas técnicas de PCR RFLP e ARMS-PCR no café. **VII Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil**, Araxá, p.1-6, ago. 2011.

SOUZA, Aécio F. M. de et al.. **Hemocromatose hereditária: Relato de caso e revisão da literatura**. Juiz de Fora, MG: Serviço de Gastroenterologia, Hospital Universitário, UFJF, 2001.

VALADÃO, Analina Furtado et al. Diagnóstico molecular para hemocromatose: um estudo de casos. **Brazilian Journal Of Surgery And Clinical Research**, Minas Gerais, v. 6, n. 3, p.23-29, maio 2014.

ANEXOS

ANEXO I: Folder apresentado aos pacientes do HEMOSC .

Você conhece a causa e os sintomas da hemocromatose hereditária?



A hemocromatose é um distúrbio do metabolismo do ferro, que faz com que os níveis deste metal fiquem altos no organismo a partir dos 20 anos, gerando problemas mais graves de saúde entre 40 ou 50 anos, tais como cirrose, hiperpigmentação cutânea (pele avermelhada), artrite, impotência sexual, entre outros.

Não seria bom descobrir cedo?

O diagnóstico precoce ajuda o paciente a tomar as precauções necessárias para evitar as complicações da doença. Basta diagnosticar a presença da mutação, e o paciente passa a ficar atento aos níveis de ferro no sangue.



E se você pudesse ajudar outras pessoas?



Sim, você pode!
Fazendo a investigação genética entre seus parentes (filhos, irmãos), você pode ajudá-los a descobrir a mutação antes dos sintomas aparecerem!

Faça parte da pesquisa:
“Rastreamento de mutações no gene HFE em parentes de afetados pela hemocromatose hereditária”

Nos procure na sua próxima visita ao HEMOSC, ou entre em contato!

✉ (janainabru@hotmail.com)
 📞 (47-99999-3993)

Esta pesquisa é desenvolvida em parceria com a FURB e o HEMOSC, tendo sido aprovada pelo Comitê de Ética da FURB (Nº 1.941.012)





ANEXO II: Termo de consentimento livre e esclarecido apresentado aos participantes.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

1. Identificação do Projeto de Pesquisa	
Título do Projeto: Rastreamento de mutações no gene HFE em parentes de indivíduos afetados por hemocromatose hereditária	
Área do Conhecimento: Genética Humana Molecular	
Curso: Ciências Biológicas	
Número de sujeitos no centro: 50	Número total de sujeitos: 50
Patrocinador da pesquisa: Não há	
Instituição onde será realizado: Fundação Universidade Regional de Blumenau - FURB	
Nome dos pesquisadores e colaboradores: Janaina Raquel de Simas e Paula Angélica Roratto	

Você está sendo convidado (a) a participar do projeto de pesquisa acima identificado. O documento abaixo contém todas as informações necessárias sobre a pesquisa que estamos fazendo. Sua colaboração neste estudo será de muita importância para nós, mas se desistir, a qualquer momento, isso não causará nenhum prejuízo a você.

2. Identificação do Sujeito da Pesquisa	
Nome:	
Data de Nascimento:	Nacionalidade:
Estado Civil:	Profissão:
CPF/MF:	RG ou RNE:
Endereço:	
Telefone:	E-mail:

3. Identificação do Pesquisador Responsável	
Nome: Paula Angélica Roratto	
Profissão: Bióloga	N. do Registro no Conselho: 53105-03D
Endereço: Rua Antônio da Veiga, 140 Sala T-122 Blumenau - SC	
Telefone: (47) 3321-0573	E-mail: p.angelica21@gmail.com

Eu, sujeito da pesquisa, abaixo assinado (a), concordo de livre e espontânea vontade em participar como voluntário (a) do projeto de pesquisa acima identificado. Discuti com o pesquisador responsável sobre a minha decisão em participar e estou ciente que:

1. O objetivo desta pesquisa é avaliar se parentes de indivíduos afetados pela hemocromatose hereditária possuem alguma das mutações genéticas no gene HFE que causam a doença.
2. Após ser selecionado(a) para o rastreamento da mutação, minha amostra será coletada no HEMOSC (pacientes que realizam flebotomias programadas), em Blumenau/SC, ou no local de minha preferência (parentes dos pacientes), sem implicações em gastos por deslocamento de minha parte. O procedimento para coleta de dados será uma coleta de swab (raspado) bucal, de onde será extraído o meu material genético (DNA). Após este procedimento, minha participação será liberada e será dada continuidade ao estudo. A minha amostra então será submetida a uma técnica de amplificação e clivagem do DNA (PCR e RFLP) com a finalidade de reconhecer alterações específicas no gene HFE, envolvido na regulação do metabolismo do ferro.
3. Terei como benefício, informações sobre a minha condição, ou seja, se após análise do meu DNA, identificar que eu possuo as mutações relacionadas à hemocromatose, poderei procurar ajuda com hematologistas, endocrinologistas ou profissional da área mais indicada para acompanhar a manifestação (ou não) dos sintomas e minimizar os efeitos da doença.
4. A minha participação nesta pesquisa contribuirá para o estudo da minha condição, trazendo uma melhor compreensão das bases genéticas que acarretam nas alterações das dosagens bioquímicas encontradas em meus exames de sangue de rotina.

Todas as páginas deverão ser rubricadas pelo Pesquisador Responsável pela obtenção do TCLE e pelo Participante da Pesquisa. Testemunhas serão exigidas caso o participante da pesquisa não possa, por algum motivo, assinar o termo.

ANEXO II: Termo de consentimento livre e esclarecido apresentado aos participantes.

5. A minha participação é isenta de despesas, entretanto tenho ciência de que não serei remunerado pela participação na pesquisa.
6. O procedimento de coleta com *swab* da mucosa bucal é considerado não invasivo, porém podem ocorrer incômodos, como desconforto ou sangramento (que pode ocorrer devido ao esforço em uma coleta incorreta). No caso de sangramento, será realizada a contenção com gaze estéril no local, pressionando o local por alguns minutos.
7. Apesar do diagnóstico precoce da mutação viabilizar condutas que melhoram a qualidade de vida do paciente, a confirmação de sua condição de portador da mutação pode causar algum dano psicológico em saber que possui predisposição genética para desenvolver a doença. Nesses casos, o paciente receberá orientação para procura de auxílio psicológico.
8. Tenho direito à indenização por eventuais danos que sejam me causados (por exemplo, perda acidental de sigilo).
9. Tenho a liberdade de desistir ou de interromper a colaboração nesta pesquisa a qualquer momento/ no momento em que desejar, sem necessidade de qualquer explicação.
10. A minha desistência não causará nenhum prejuízo à minha saúde ou bem estar físico, social, psicológico, emocional, espiritual e/ou cultural. Minha desistência não interferirá no andamento da pesquisa.
11. Meus dados pessoais serão mantidos em sigilo, mas concordo que sejam divulgados os resultados da pesquisa em publicações científicas, desde que meus dados pessoais não sejam mencionados;
12. Para garantir a proteção dos meus dados individuais, resultados de exames e testes, minha amostra será identificada com um número aleatório ligado ao meu nome, no qual, somente será acessível aos pesquisadores envolvidos e não será permitido o acesso a terceiros (seguradoras, empregadores, supervisores hierárquicos etc.).
13. A minha amostra de material será armazenada no Laboratório de Genética da FURB, no entanto, tenho ciência que a amostra me pertence e que tenho direito de retirá-la a qualquer momento. Há possibilidade de que a minha amostra seja usada em um novo projeto de pesquisa. Neste caso, serei contatado para conceder ou não autorização para uso do material, e caso não seja possível me contatar, o fato será justificado ao Comitê de Ética em Pesquisas. Ainda assim, o material somente será utilizado mediante aprovação do novo projeto pelo CEP, pela CONEP e pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos do Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina, rua Barão de Batovi, nº630, Anexo Administrativo Hemosc – Centro – Florianópolis /SC – CEP: 88015-340 E-mail: cep.fns@hemosc.org.br, Telefone:(48) - 3251-9826.
14. Poderei consultar o pesquisador responsável (acima identificado), endereço e telefone, sempre que entender necessário obter informações ou esclarecimentos sobre o projeto de pesquisa e minha participação no mesmo.
15. Tenho a garantia de tomar conhecimento, pessoalmente, do(s) resultado(s) parcial (is) e final (is) desta pesquisa.
16. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da FURB sob parecer de número 64516817.6.1001.5370.

Declaro que obtive todas as informações necessárias e esclarecimento quanto às dúvidas por mim apresentadas e, por estar de acordo, assino o presente documento em duas vias de igual teor (conteúdo) e forma, ficando uma em minha posse.

Todas as páginas deverão ser rubricadas pelo Pesquisador Responsável pela obtenção do TCLE e pelo Participante da Pesquisa. Testemunhas serão exigidas caso o participante da pesquisa não possa, por algum motivo, assinar o termo.

ANEXO II: Termo de consentimento livre e esclarecido apresentado aos participantes.

_____ (), _____ de _____ de _____.

Pesquisador Responsável pela obtenção
do consentimento

Sujeito da pesquisa e/ou responsável

Testemunhas:

Nome:
RG ou RNE:
CPF/MF:
Telefone:

Nome:
RG ou RNE:
CPF/MF:
Telefone:

Todas as páginas deverão ser rubricadas pelo Pesquisador Responsável pela obtenção do TCLE e pelo Participante da Pesquisa.
Testemunhas serão exigidas caso o participante da pesquisa não possa, por algum motivo, assinar o termo.