

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS:
ENDOCRINOLOGIA

**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**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

MÁIKEL LUÍS COLLI

Porto Alegre, maio de 2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS:
ENDOCRINOLOGIA

**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**

MÁIKEL LUÍS COLLI

Orientador: Prof. Dr. Luís Henrique Canani

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Endocrinologia.

Porto Alegre, maio de 2007

C699p Colli, Máikel Luís

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 / Máikel Luís Colli; orient. Luís Henrique Canani. – 2007.

87 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia. Porto Alegre, BR-RS, 2007.

1. Diabetes mellitus tipo II 2. Genética 3. Hemocromatose I. Canani, Luís Henrique II. Título.

NLM: WK 810

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, meus avós e meu irmão.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Luís Henrique Canani, por ter me incentivado e introduzido na pesquisa experimental desde o final da minha residência médica, e por não ter me deixado perder a motivação mesmo quando a distância era grande. A sua experiência em pesquisa serve como modelo para que eu continue me aperfeiçoando.

Aos professores do Serviço de Endocrinologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, especialmente ao Prof. Dr. Jorge Luiz Gross, pela minha excelente formação como endocrinologista e pelo exemplo de como se pode exercer o atendimento clínico e a pesquisa de forma conjunta e interligada.

Aos colegas de pós-graduação, alunos de iniciação científica e todas as demais pessoas envolvidas no atendimento dos pacientes com diabetes melito em nosso Serviço de Endocrinologia, em especial a Dra. Cristiane B. Leitão pelo encaminhamento de pacientes, a sua colaboração foi indispensável para a elaboração desta tese de mestrado.

À minha mãe, Rosicler, e a minha avó, Maria de Lurdes, que são as pessoas que me escutaram nos momentos mais difíceis e sempre me motivaram a fazer o que eu acreditava ser correto, vocês fazem parte das minhas conquistas.

Ao meu irmão, Maciel, em especial, por ter me recebido novamente em Porto Alegre onde pude retomar minhas atividades no mestrado, pelas conversas e troca de opiniões que foram fundamentais para me decidir em meus planos futuros, um forte abraço e obrigado.

SUMÁRIO

Agradecimentos.....	v
Lista de Tabelas e Figuras.....	ix
Lista de Abreviaturas	x

Capítulo 1

INTRODUÇÃO:

Alterações no Metabolismo do Ferro e o Risco de Diabetes Melito e suas Complicações Crônicas

Resumo	13
Abstract	14
Introdução	15
Metabolismo do Ferro.....	15
Homeostase Celular do Ferro.....	16
Homeostase Sistêmica do Ferro	19
Avaliação do Metabolismo do Ferro.....	20
 Hemoglobina, Índices Eritrocitários e Receptor Sérico da Transferrina	20
 Ferro Sérico, Capacidade Ferropéxica e Saturação da Transferrina	21
 Ferritina	21
Patologias Associadas à Sobrecarga de Ferro	22
 Hemocromatose Hereditária (Primária)	23
 Hemocromatose Hereditária Clássica	23
 Outros Tipos de Hemocromatose Hereditária.....	26
 Doença da Ferroportina.....	26
 Hemocromatose Secundária.....	26

Metabolismo do Ferro e Diabetes Melito	27
Bases Fisiopatológicas que Associam o Metabolismo do Ferro com o Desenvolvimento do Diabetes Melito Tipo 2	29
Ferro e as Células Beta	29
Ferro e a Resistência à Ação da Insulina	30
Estresse Oxidativo e o Metabolismo do Ferro e da Glicose.....	31
Metabolismo do Ferro e Complicações Crônicas do Diabetes Melito	31
Nefropatia Diabética	32
Retinopatia Diabética.....	33
Neuropatia Diabética	33
Complicações Macrovasculares	34
Implicações Terapêuticas da Depleção de Ferro	36
Indicações de Pesquisa do Metabolismo do Ferro em Pacientes com Síndrome Metabólica ou Diabetes Melito	38
Considerações Finais.....	38
Referências.....	40
Objetivos	69

Capítulo 2

Prevalence of Mutations in *HFE* Gene in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus and the Risk of Diabetic Chronic Complications

Abstract.....	71
Introduction	72
Research Design and Methods	73

Clinical Evaluation	73
General Evaluation	73
Evaluation of Diabetic Chronic Complications	74
Laboratory Evaluation	75
Molecular Analysis	75
Statistical Analysis	75
Results	76
Conclusions	77
References	82

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Capítulo 1

Tabela 1.	Classificação dos tipos de hemocromatose	60
Tabela 2.	Estudos realizados no Brasil avaliando a frequência alélica e genotípica das mutações no gene <i>HFE</i> em diversos grupos populacionais	61
Tabela 3.	Frequência dos sinais e sintomas em pacientes com diagnóstico de HH estabelecido previamente aos estudos de screening genético ou bioquímico	62
Tabela 4.	Descrição de alguns estudos epidemiológicos que suportam a hipótese do ferro na patogênese da doença cardiovascular	63
Tabela 5.	Descrição de alguns estudos epidemiológicos que não suportam a hipótese do ferro na patogênese da doença cardiovascular	64
Figura 1.	Metabolismo celular do ferro	65
Figura 2.	Sistema IRP/IRE e o controle da homeostase celular do ferro	66
Figura 3.	Representação dos mecanismos através dos quais o metabolismo do ferro correlaciona-se com a ação da insulina e o estresse oxidativo.....	68

Capítulo 2

Table 1.	Frequency of mutations H63D and C282Y in the <i>HFE</i> gene among patients with and without type 2 diabetes mellitus	86
Table 2.	Characteristics of patients with type 2 diabetes mellitus	87

LISTA DE ABREVIATURAS

AAC	Aterosclerose da artéria carótida
AAO	<i>American Academy of Ophthalmology</i>
ACE	<i>Angiotensin converting enzyme</i>
ADA	<i>American Diabetes Association</i>
ADC	Anemia da doença crônica
AFP	Anemia ferropriva
APE	Angina do peito estável
A1c	Teste A1c
ARIC	<i>Atherosclerosis Risk in Communities</i>
AVC	Acidente vascular cerebral
BMI	<i>Body mass index</i>
BP	<i>Blood pressure</i>
CD163	<i>Hemoglobin scavenger receptor</i>
CFP	Capacidade ferropéxica
CI	<i>Confidence interval</i>
Cp	Ceruloplasmina
DAC	Doença arterial coronariana
DCCT	<i>Diabetes Control and Complications Trial</i>
Dcytb	Ferroredutase citocromo b-like
DM	Diabetes melito ou <i>Diabetes mellitus</i>
DMT-1	Transportador dos metais divalentes 1 ou Divalent metal transporter 1
DN	<i>Diabetic nephropathy</i>
DR	<i>Diabetic retinopathy</i>
eALA-S	<i>Erythroid aminolevulinic acid synthase</i>
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ESRD	<i>End-stage renal disease</i>
eGFR	<i>Estimated glomerular filtration rate</i>
HCP1	Proteína carreadora do heme 1
HH	Hemocromatose hereditária ou <i>Hereditary hemochromatosis</i>
HHC	Hemocromatose hereditária clássica

HJV	Hemojuvelina
HS	Hemocromatose secundária
HOMA-IR	<i>Homeostasis model assessment of insulin resistance</i>
IM	Infarto do miocárdio
IRE	<i>Iron responsive elements</i>
IRP	<i>Iron regulatory proteins</i>
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
MHC	Complexo de histocompatibilidade principal
ND	Nefropatia diabética
NHANES	<i>National Health and Nutrition Examination Survey</i>
OMIN	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
OR	<i>Odds ratio</i>
PKC	Proteína kinase C
RC	Razão de chances
RD	Retinopatia diabética
RNA_m	RNA mensageiro
RNM	Ressonância nuclear magnética
RR	Risco relativo
SD	<i>Standard deviation</i>
ST	Saturação da transferrina
TfR	Receptor da transferrina
TfR1	Receptor da transferrina tipo 1
TfR2	Receptor da transferrina tipo 2
TNFα	Fator de necrose tumoral α
UAE	<i>Urinary albumin excretion</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

**Alterações no Metabolismo do Ferro e o Risco de Diabetes Melito
e suas Complicações Crônicas**

**Alterations in Iron Metabolism and the Risk of Diabetes Mellitus
and its Chronic Complications**

Título abreviado: Diabetes melito e ferro.

Short title: Diabetes mellitus and iron.

Máikel Luís Colli⁽¹⁾, Luís Henrique Canani⁽¹⁾.

1. Serviço de Endocrinologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre; Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS.

Endereço para correspondência:

Máikel Luís Colli

Serviço de Endocrinologia

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Av. Ramiro Barcelos 2350, Prédio 12 - 4º andar

900035-003 Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

Fone/Fax: (051) 2101-8127/2101-8777

E-mail: maikelcolli@yahoo.com.br

Unitermos: Diabetes melito, síndrome metabólica, ferro, sobrecarga de ferro.

Contagem de palavras: 7659

Tabelas: 5

Figuras: 3

Resumo

O diabetes melito (DM) é uma das manifestações clínicas do excesso de ferro corporal encontrado em pacientes com hemocromatose. A partir desse achado, tem-se procurado analisar o ferro como um dos possíveis fatores envolvidos na patogênese do DM e de suas complicações crônicas.

Inicialmente, estudos demonstram que o aumento das reservas corporais de ferro, avaliado pela ferritina, representa um fator de risco para DM. Além disso, pacientes com mutações no gene *HFE*, principal responsável pela hemocromatose hereditária, parecem ter um maior risco de DM. Finalmente, a redução do excesso de ferro mostrou-se protetora para o desenvolvimento de DM, além de levar a uma melhora no controle metabólico daqueles indivíduos já afetados.

Em relação às complicações crônicas do DM, os resultados são mais claros no que se refere ao risco de nefropatia diabética (ND) e doença cardiovascular. A ND está associada a um curso mais precoce e acelerado nos casos de hemocromatose secundária e é mais freqüente em indivíduos com mutações no gene *HFE*. Sobre a doença cardiovascular, apesar dos trabalhos serem em maior número, os resultados diferem conforme o grupo estudado, mas em determinados indivíduos (tabagistas e com DM) o excesso de ferro parece conferir um risco significativo. A correlação com as demais complicações crônicas foi menos pesquisada.

Em resumo, os estudos sugerem que as alterações no metabolismo do ferro estão envolvidas na patogênese do DM e de algumas das suas complicações crônicas como a ND e a doença cardiovascular. Estas alterações podem, futuramente, ser utilizadas como alvo terapêutico em determinados grupos.

Abstract

Diabetes mellitus (DM) is one of the clinical manifestations of iron excess in the body found in patients with hemochromatosis. Based on this finding, we attempted to analyze iron as one of the possible factors involved in the pathogenesis of DM and its chronic complications.

Initially, studies show that the increased body reserves of iron, evaluated by ferritin, are a risk factor for DM. Furthermore, patients with mutations in *HFE*, the main gene responsible for hereditary hemochromatosis, appear to be at higher risk for DM. Finally, the reduction of excess iron proved protective for the development of DM, besides improving the metabolic control of individuals who have already been affected.

As to chronic complications of DM, the results are clearer for the risk of diabetic nephropathy (DN) and cardiovascular disease. DN was associated with an earlier and faster course in the cases of secondary hemochromatosis, and occurred more frequently in individuals with mutations in gene *HFE*. As to cardiovascular disease, although there are more studies, the results differ according to the group studied, but in certain individuals (smokers and people with DM) the iron excess appears to confer a significant risk. The correlation with the other chronic complications was not researched to the same extent.

In brief, studies suggest that changes in iron metabolism are involved in the pathogenesis of DM and of some of its chronic complications such as DN and cardiovascular disease. In future these changes may be used as a therapeutic target in certain groups.

Introdução

A epidemia crescente de diabetes melito (DM) tipo 2 tem motivado a procura de fatores associados a sua patogênese, entre os quais destacam-se as alterações no metabolismo do ferro. Diversas publicações recentes têm correlacionado o excesso de ferro corporal, avaliado pela ferritina sérica, com a síndrome metabólica (1), o DM tipo 2 (2, 3) e as complicações crônicas associadas a estas patologias (4, 5). As doenças que ocasionam excesso de ferro corporal podem ser adquiridas ou herdadas. Destacam-se como causas adquiridas as talassemias e como causa herdada a hemocromatose hereditária (HH). A HH é uma doença genética que acomete essencialmente indivíduos brancos, na qual o principal gene envolvido é o *HFE*, identificado em 1996, e associado à maioria dos casos em descendentes de imigrantes do Norte da Europa (6). A função dos outros genes envolvidos no metabolismo do ferro ainda é pouco conhecida. A HH é um exemplo de situação extrema de excesso de ferro associado ao desenvolvimento de DM. No entanto, elevações menores da ferritina também parecem conferir maior risco de DM (2). Sendo assim, o objetivo do presente trabalho é descrever a interação entre o metabolismo do ferro e a patogênese do DM, bem como as perspectivas para a avaliação clínica e o tratamento destes pacientes.

Metabolismo do Ferro

O ferro é fundamental para a sobrevivência e a proliferação celular, atuando como um constituinte das hemoproteínas, das proteínas ferro-enxofre (Fe-S) e participando de reações de oxidação-redução (7). Essa última propriedade química também demonstra como o excesso de ferro reativo (livre) pode ser tóxico. No citoplasma, o ferro pode ser reduzido e participar de reações do tipo “Fenton”, onde a forma ferrosa (Fe^{2+}) reage com o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ou peróxidos lipídicos gerando a forma férrica (Fe^{3+}), OH^- ,

o radical hidroxila (OH \cdot), e os radicais lipídicos (LO \cdot e LOO \cdot) (8). Estes radicais livres danificam proteínas, membranas lipídicas e ácidos nucleicos.

Assim sendo, tanto a sobrecarga de ferro quanto a sua deficiência podem causar dano celular. Por este motivo, os níveis de ferro reativo são mantidos sob um controle rígido pelo organismo.

Homeostase Celular do Ferro

A homeostase celular do ferro envolve o controle da sua captação, transporte, armazenamento e exportação.

Absorção intestinal: as células absortivas duodenais captam o ferro inorgânico da dieta através da ação do transportador dos metais divalentes 1 (DMT-1) (9). O ferro não-heme dos alimentos encontra-se principalmente na forma Fe³⁺ a qual necessita ser reduzida a Fe²⁺ para cruzar a membrana apical intestinal. A enzima responsável por essa reação é a ferredutase citocromo b-like (Dcytb) (10).

Recentemente foi descrito o primeiro transportador para a captação celular do ferro ligado ao heme (mioglobina e hemoglobina) nas células duodenais, a proteína carreadora do heme 1 (HCP1) (11). O controle da absorção desta forma de ferro é pouco conhecido e parece ser menos rígido.

Transporte: o ferro circula no plasma ligado a transferrina, uma proteína com alta afinidade, e que o torna não reativo. Nos casos de hemólise intravascular (ie. anemia falciforme, talassemias) a hemoglobina liberada liga-se a proteína de fase aguda haptoglobina.

Captação pelas células: existem vários mecanismos de captação do complexo Fe-transferrina pela célula (Figura 1). O mais estudado dos receptores deste complexo é o receptor 1 da transferrina (TfR1) (12). O complexo transferrina/TfR1 é incorporado por

meio da endocitose e transportado para um endossoma ácido, onde ocorre a liberação do ferro. O TfR1 é expresso em diversos tecidos, contudo os precursores eritróides possuem o maior número de receptores. Outro receptor, o receptor 2 da transferrina (TfR2), que é expresso principalmente nos hepatócitos (13) tem uma menor afinidade pela transferrina (14). Apesar disso, parece ser importante devido à baixa expressão de TfR1 nos hepatócitos, onde o TfR2 funcionaria também como um regulador da expressão da uma importante proteína, a hepcidina, que será melhor descrita posteriormente (15).

O complexo hemoglobina-haptoglobina é captado pelo receptor CD163 (*hemoglobin scavenger receptor*) expresso em monócitos e macrófagos.

Em circunstâncias onde a capacidade de ligação da transferrina é excedida, o excesso de ferro sérico pode ser captado por mecanismos não dependentes do complexo transferrina/TfR (16). A forma como isso ocorre ainda não é plenamente compreendida. O fígado, o coração e os tecidos endócrinos são os que apresentam a maior capacidade para captação do ferro através deste mecanismo, sendo assim são os mais afetados pelos estados de sobrecarga de ferro (17).

Finalmente, a captação de ferro pelos macrófagos é realizada principalmente de forma indireta, através da fagocitose dos eritrócitos danificados e envelhecidos. Isto é quantitativamente muito importante, pois somente 1-2 mg de ferro são absorvidos diariamente, ao passo que 25 mg são necessários para a eritropoiese. Desta forma, a principal fonte de ferro é a reciclagem dos eritrócitos pelos macrófagos (7).

Armazenamento: uma vez que o ferro é captado pelas células ele pode ser utilizado pelas rotas metabólicas ou armazenado como ferritina (18). Esta consiste de uma apoproteína formada por 24 subunidades de cadeias leves e pesadas (19). A ferritina retira o ferro do *pool* intracelular e o apreende em uma forma quimicamente menos reativa, servindo assim para o armazenamento e detoxicação do ferro (20). A ferritina sofre

degradação conforme a demanda do organismo por ferro, através de vias lisossomais e proteossomais.

Exportação: até o momento, o único exportador celular do ferro conhecido é a ferroportina. (21). Nos enterócitos duodenais, ela é expressa na membrana basolateral, onde proporciona a liberação do ferro para a circulação sistêmica, em conjunto com a hefaestina, uma ferroredutase homóloga a ceruloplasmina (Cp) (22). As demais células não-intestinais exportam o ferro celular com o auxílio da Cp e da ferroportina (23). O modo como a hefaestina e a Cp agem ainda não é conhecido, contudo elas podem oxidar o ferro permitindo a sua ligação a proteínas carreadoras, como a transferrina (24).

Regulação celular: as proteínas envolvidas na regulação da homeostase celular do ferro funcionam de uma forma coordenada. A regulação pós-transcrição é o mecanismo melhor descrito. Por este mecanismo, as proteínas reguladoras do ferro (*Iron regulatory proteins*, IRPs) interagem com os elementos responsivos ao ferro (*Iron responsive elements*, IREs) localizados em regiões não traduzidas do RNAm codificador das proteínas envolvidas no metabolismo do ferro. A formação dos complexos IRE/IRP na região 5' causa a inibição dos passos iniciais da tradução RNAm codificador da ferritina, das enzimas da biossíntese do heme, da aconitase mitocondrial, e da ferroportina (25). IREs múltiplos na região 3' do RNAm do TfR1 são estabilizados após a ligação com os IRPs (26).

Existem duas IRPs (IRP1 e IRP2). Estudos em animais sugerem que a IRP2 seja a principal reguladora do metabolismo do ferro (27). A figura 2 descreve mais detalhadamente a interação IRPs/IREs.

Os genes relacionados ao metabolismo do ferro também são regulados ao nível da transcrição. Citocinas (interleucina 1 e 6, interferon- γ e TNF- α) estimulam a expressão da ferritina e reduzem do TfR1 (18). O interferon- γ e o lipopolissacarídeo também induzem o

aumento na expressão do DMT-1 e inibem da ferroportina em monócitos ativados (28). As alterações citadas acima favorecem a retenção de ferro (aumento da ferritina) observada em estados de inflamação, e na defesa contra micro-organismos.

Homeostase Sistêmica do Ferro

Como previamente comentado, o ferro é fundamental para uma série de reações, mas seus níveis devem ser controlados devido à toxicidade do ferro “livre”. Não dispomos de uma forma eficiente de eliminação do ferro. Perdas sangüíneas e a descamação das células das mucosas são as únicas formas de depuração do ferro sistêmico. A absorção do ferro da dieta tem por fim compensar estas perdas. Para manter a homeostase sistêmica do ferro, a comunicação entre as células que consomem (principalmente eritrócitos), armazenam (hepatócitos e macrófagos teciduais) e absorvem o ferro da dieta (enterócitos) deve ser estreitamente regulada. Dentre as situações que alteram a absorção intestinal de ferro e a distribuição tecidual podemos citar: disponibilidade anormal de ferro (excesso ou deficiência), aumento na eritropoiese, hipóxia e inflamação.

A absorção do ferro e a mobilização das reservas reduzem-se pela sobrecarga de ferro e pela inflamação e são elevadas pela deficiência de ferro, aumento da eritropoiese e hipóxia. As respostas a esses estímulos são coordenadas.

A descoberta da hepcidina trouxe inúmeras informações novas sobre o metabolismo do ferro, sendo inclusive chamada de o “hormônio do ferro” devido aos seus efeitos sistêmicos. A hepcidina é uma molécula com 25 aminoácidos, produzida no fígado, liberada na circulação sistêmica e excretada pelos rins (29). Níveis elevados são produzidos em situações de sobrecarga de ferro não-genética (30) e inflamação (31). Inversamente, eles se reduzem na deficiência de ferro, aumento da eritropoiese e hipóxia (32). A expressão

constitutiva forçada da hepcidina em animais transgênicos resultou na deficiência de ferro e anemia (33), enquanto que a sua perda resultou na hemocromatose (34).

A hepcidina é um regulador negativo da absorção intestinal e da liberação de ferro pelos macrófagos teciduais. Contudo, a forma como é regulada a expressão da hepcidina é pouco conhecida. O ferro ligado a transferrina [avaliado pela saturação da transferrina (ST)] (32) e a interleucina 6 (35) podem ser alguns dos controladores da expressão da hepcidina. Entretanto, estudos *in vitro* não associaram nem a forma férrica nem a ligada a transferrina com a expressão da hepcidina em cultura de hepatócitos humanos e linhagens de células hepatócitos-like (35, 36), sugerindo que outras células hepáticas possam funcionar como sensores do ferro e assim regularem a hepcidina (37).

A ferroportina é o provável receptor da hepcidina. A hepcidina liga-se a ferroportina, aumentando a sua internalização e degradação (38).

Além dos possíveis mecanismos já descritos, o *HFE*, a hemojuvelina (HJV) e o TfR2 desenvolvem claramente um papel importante na regulação da hepcidina. A expressão hepática da hepcidina é reduzida nos modelos animais de *knockout* do *HFE*, do TfR2 e da HJV (30, 39, 40). A deposição hepática de ferro nos modelos animais de hemocromatose pode ser prevenida pela supra-expressão da hepcidina (41).

Avaliação do Metabolismo do Ferro

Os métodos mais comumente utilizados para avaliar o metabolismo do ferro são: hemoglobina + índices eritrocitários, receptor sérico da transferrina, ferro sérico/capacidade ferropéxica, ferritina, biópsia hepática e ressonância nuclear magnética (RNM).

Hemoglobina, Índices Eritrocitários e Receptor Sérico da Transferrina

A hemoglobina é mais elevada em homens do que em mulheres e tem utilidade apenas nos casos de anemia. Os índices eritrocitários ajudam, principalmente, a separar a

anemia por deficiência de ferro da deficiência de B12 e folato. Os níveis séricos do receptor da transferrina (TfRs) relacionam-se diretamente com a atividade eritropoiética na medula óssea, e inversamente com a disponibilidade do ferro tecidual (42). Tem alguma utilidade na diferenciação da anemia da doença crônica (ADC) da anemia ferropriva (AFP), em situações onde a ferritina está falsamente elevada como doenças hepáticas e infecção aguda, pois seus níveis permanecem estáveis se não houver deficiência de ferro (43). Contudo, um índice obtido pela razão do RTfs (mg/L) pela ferritina ($\mu\text{g/L}$) ou pela razão do RTfs (mg/L) pelo \log_{10} da concentração de ferritina é mais adequado para a diferenciação de ADC (índice <1) da AFP (índice >2) (44). Estes testes não possuem papel significativo na avaliação dos estados de sobrecarga de ferro.

Ferro Sérico, Capacidade Ferropéxica e Saturação da Transferrina

Dosagens isoladas do ferro sérico apresentam pouca utilidade clínica devido a sua grande variação diurna. Diminuição dos seus níveis ocorre na ADC e AFP, enquanto há aumento nos estados de sobrecarga de ferro, doença hepática e eritropoiese inefetiva (43). A capacidade ferropéxica (CFP) é uma medida estimada da concentração de transferrina e a ST é um índice calculado a partir do ferro sérico e da CFP ($\text{Fe sérico}/\text{CFP} \times 100$). Estados de deficiência de ferro aumentam a concentração da transferrina e por consequência a CFP, além de diminuir a ST, o contrário ocorre na HH onde a elevação da ST é a manifestação laboratorial mais precoce. Existem algumas limitações da ST para o diagnóstico de sobrecarga de ferro como a elevação da transferrina que ocorre na gestação e com o uso de anticoncepcionais a qual falsamente reduz a ST. Além disso, as variações fisiológicas do ferro sérico podem diminuir o seu valor preditivo (45). Entretanto, pela sua fácil realização, baixo custo e alta sensibilidade, é o exame de primeira linha, juntamente com a ferritina, na suspeita clínica de HH ou outro estado de sobrecarga de ferro hereditária.

Ferritina

A ferritina é um ótimo indicador das reservas corporais de ferro em indivíduos saudáveis e é menos invasiva do que a quantificação do ferro tecidual. Crianças possuem valores menores que adultos e mulheres durante a menacne apresentam valores inferiores aos homens. Níveis baixos são vistos quase exclusivamente em estados de deficiência de ferro, ocorrendo o contrário nos estados de sobrecarga de ferro. Contudo, algumas outras situações que alteram os níveis da ferritina precisam ser consideradas antes de se continuar a avaliação de suposta HH (46). Dentre essas podemos citar: os estados inflamatórios, as neoplasias, as doenças hepáticas, o consumo excessivo de álcool, o hipertireoidismo, a síndrome metabólica, a hemólise e a suplementação de ferro. Uma forma de corrigir a alteração, pelo menos nos estados inflamatórios, seria dividir o seu valor por três (47). Se essas causas de alteração da ferritina forem afastadas, a suspeita de hemocromatose deve ser levantada e a ST deve ser analisada em conjunto. Quando ambas forem elevadas deve-se solicitar a pesquisa das mutações no gene *HFE*, ou se esta for negativa a avaliação de outros genes relacionados à HH (caso disponível). Se apenas a ferritina for elevada e a ST for normal ou pouco alterada é conveniente avaliar a presença da sobrecarga de ferro hepática, com biópsia hepática ou através da ressonância nuclear magnética, um método cada vez mais utilizado por ser menos invasivo (15). A ausência de sobrecarga de ferro em crianças e adultos jovens levanta a hipótese de doença da ferroportina ou Síndrome de hiperferritinemia-catarata, enquanto que a sua presença, principalmente em idosos, pode sugerir doença da ferroportina, pois a sobrecarga de ferro hepático nesta síndrome ocorre mais tardiamente. A sobrecarga de ferro hepático em crianças sem aumento da ST sugere aceruloplasminemia (48).

Patologias Associadas à Sobrecarga de Ferro

A hemocromatose é uma doença na qual a sobrecarga de ferro leva a alterações patológicas. As primeiras descrições clínicas ocorreram no século 19 (49). Nesta época a associação de DM, pigmentação dourada da pele e cirrose foi denominada hemocromatose (50). Em 1935 Sheldon revisou 311 casos publicados e sugeriu pela primeira vez que a doença resultaria do comprometimento de múltiplos sistemas devido a um erro inato do metabolismo do ferro hereditário (51).

A hemocromatose pode ser dividida em hemocromatose primária (ou hereditária) e hemocromatose secundária (Tabela 1) (52). Alguns autores preferem reservar o termo hemocromatose para as formas hereditárias (hemocromatose primária) denominando as demais como estados de sobrecarga de ferro (53).

Hemocromatose Hereditária (Primária)

Em 1996 o primeiro gene associado à HH, o *HFE*, foi identificado e descrito (6). Pesquisas adicionais sobre o metabolismo do ferro demonstraram que outros genes, além do *HFE*, estão envolvidos. Atualmente, o banco de dados *Online Mendelian Inheritance in Man* (OMIM) classifica a HH em quatro tipos dependendo do gene mutado (54).

Hemocromatose Hereditária Clássica

A HH clássica (HHC, OMIM tipo 1), relacionada ao *HFE*, é o tipo mais prevalente em populações descendentes de europeus, e apresenta alguns aspectos em comum com outras formas de HH do banco de dados OMIM (tipos 2A, 2B e 3).

Genética: a HHC é uma doença autossômica recessiva, associada à mutação no gene *HFE*, localizado no cromossomo 6 (6p21.3) (6). A grande maioria dos pacientes possui uma substituição do aminoácido cisteína por tirosina na posição 282 do produto protético não processado (C282Y). A prevalência de homocigotos para C282Y em descendentes de europeus do norte é 1/200 (55). Essa prevalência é muito influenciada pela localização geográfica e a origem étnica da população estudada, sendo extremamente rara em afro-

americanos (56). Os estudos que avaliaram a prevalência destas mutações no Brasil demonstram a mesma variabilidade conforme a origem étnica da população estudada, mas com uma prevalência um pouco inferior a população européia de indivíduos brancos (Tabela 2).

Os homozigotos para C282Y são predispostos a alterações no metabolismo do ferro e as suas manifestações clínicas, contudo é impossível prever a evolução de uma forma individual (57). A penetrância descrita em muitos estudos é baixa (58). Inúmeros fatores contribuem para essa variabilidade fenotípica podendo-se citar: sexo, perdas fisiológicas de sangue, uso de álcool, dieta, e outros determinantes genéticos do metabolismo do ferro, uma vez que se demonstrou maior concordância nas manifestações clínicas e nos marcadores da sobrecarga de ferro dentro da mesma família do que entre as famílias afetadas (59, 60). Apesar da predisposição genética, uma pequena proporção de homozigotos não apresenta alterações laboratoriais no metabolismo do ferro (15).

Além da mutação C282Y, a troca do aminoácido histidina por ácido aspártico na posição 63 da proteína HFE (H63D) também possui repercussões clínicas. Aproximadamente 1-2% dos heterozigotos compostos (C282Y/H63D) expressam a doença (55). Os heterozigotos isolados do H63D (HD), assim como homozigotos (DD) usualmente apresentam apenas alterações laboratoriais. O significado clínico das outras variantes alélicas, como a troca serina por cisteína na posição 65 (S65C) (61), permanece a ser esclarecido.

Fisiopatologia: o gene *HFE* codifica uma proteína da classe I do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) (62). Esta heterodimeriza-se com a beta₂-microglobulina, um evento necessário para a sua expressão na superfície celular e em membranas endossomais, onde interage com o TfR1 (63). A mutação C282Y resulta no rompimento de uma ponte dissulfeto no HFE (64), a qual é crítica para a sua interação com

a beta₂-microglobulina. A proteína HFE mutante, conseqüentemente é retida no retículo endoplasmático e complexo de Golgi onde sofre degradação.

Pesquisas *in vitro* sugerem que a proteína HFE normalmente facilita a captação celular de ferro ligado a transferrina (65). Além disso, a proteína HFE parece funcionar, principalmente, como um regulador da expressão da hepcidina, desta forma controlando o ferro corporal (7).

Baseado nas ações da proteína HFE citadas anteriormente, dois modelos para explicar o desenvolvimento da sobrecarga de ferro no HHC foram desenvolvidos: o modelo da cripta programada e o da hepcidina. No primeiro, que é o mais antigo, o gene *HFE* teria como função “programar” a capacidade absorptiva futura dos enterócitos duodenais imaturos (57). A perda desta “programação” resultaria na absorção excessiva de ferro. Pelo modelo da hepcidina, a taxa de influxo do ferro para o plasma depende primariamente da atividade da hepcidina, o “hormônio regulador do ferro” (36). Segundo este o modelo, que é o mais aceito atualmente, o gene *HFE*, normalmente, funcionaria como um modulador da expressão da hepcidina. As suas mutações, conseqüentemente, resultariam na diminuição patológica dos níveis de hepcidina e no desenvolvimento da HHC e suas manifestações clínicas (57).

Alterações clínico-laboratoriais: elevação da ST (acima de 45%) é a alteração laboratorial mais precoce na HHC. As alterações nos níveis séricos da ferritina só ocorrem mais tardiamente (52). O acúmulo de ferro dá-se principalmente no fígado, coração, hipófise, pele e pâncreas, poupando relativamente o sistema reticuloendotelial (15).

A doença sintomática geralmente manifesta-se a partir da quarta ou quinta década de vida na maioria das vezes com sintomas inespecíficos como fraqueza e dores articulares. O comprometimento hepático (desde alterações nas transaminases, até cirrose e carcinoma hepatocelular), geralmente predomina, além de distúrbios endocrinológicos (DM,

hipogonadismo hipogonadotrófico e hipotireoidismo primário), cardíacos (arritmias e insuficiência cardíaca) e articulares (artrite destrutiva) (Tabela 3).

Heterozigotos para C282Y e H63D são usualmente assintomáticos, apesar dos níveis de ST, ferro sérico e ferritina serem significativamente superiores aos de sujeitos normais (58, 66).

Outros Tipos de Hemocromatose Hereditária

A HH não relacionada ao *HFE* envolve mutações em outros três genes, todas com um padrão de herança autossômica recessiva, com uma prevalência muito inferior a da HHC e não restritas a descendentes de europeus do norte.

Hemojuvelina e Hepsidina: pacientes homozigotos para mutações nos genes hemojuvelina (*HFE2*, *HJV*) e *HAMP* (hepcidina), desenvolvem um quadro precoce (juvenil) e grave de hemocromatose (OMIN tipos 2A e 2B) (34, 67).

Receptor 2 da Transferrina: as mutações no Tfr2 (OMIN tipo 3) geram quadros de hemocromatose que se manifestam na vida adulta muito semelhantes à HHC (68).

Doença da Ferroportina

Apesar de classificada no grupo das HH pelo OMIN (tipo 4), trata-se de uma forma distinta de sobrecarga de ferro (15), com um padrão de herança autossômico dominante, causada pela mutação no gene da ferroportina (69). Essas mutações não são restritas aos descendentes de europeus do norte e aparentemente afetam vários grupos étnicos. A sobrecarga de ferro ocorre principalmente nos macrófagos e os níveis séricos da ferritina são elevados com ST normal ou levemente aumentada. Além disso, em contraste à HHC, esses pacientes não toleram bem as flebotomias. O dano aos órgãos é pequeno.

Hemocromatose Secundária

A hemocromatose secundária (HS) pode surgir em muitos distúrbios, herdados ou adquiridos. Estes têm em comum o fato de o paciente ser anêmico. As transfusões de

eritrócitos fornecem conjuntamente ferro (1 ml de hemácias contém 1 mg de ferro). Quando a anemia está associada à eritropoiese inefetiva, a absorção intestinal de ferro é inapropriadamente ativada, agravando a sobrecarga de ferro. Portanto, estes são os pacientes mais propensos a sobrecargas significativas de ferro (52). Entre as formas hereditárias, as mais comuns são as talassemias, e entre as formas adquiridas predominam as anemias sideroblásticas adquiridas.

Outras doenças raras associadas com a sobrecarga de ferro são: a aceruplasminemia, a atransferrinemia e a hemocromatose neonatal.

Metabolismo do Ferro e Diabetes Melito

DM desenvolve-se em 10-50% dos pacientes com HH (70, 71), dependendo principalmente de como a hemocromatose é pesquisada (clínica, bioquímica ou geneticamente). Os primeiros estudos demonstraram prevalências maiores devido ao atraso no diagnóstico dos pacientes e, portanto a uma maior sobrecarga de ferro. Estudos mais recentes têm evidenciado alterações no metabolismo da glicose mesmo sem uma sobrecarga importante de ferro. Entre adultos norte-americanos com diagnóstico recente de DM tipo 2, existe uma razão de chances (RC) de valores elevados de ferritina de 4,94 (IC 95%: 3,05-8,01) e 3,61 (IC 95%: 2,01-6,48), respectivamente em homens e mulheres (2). Além disso, as reservas corporais de ferro têm sido associadas à síndrome metabólica (1), à área da gordura visceral e subcutânea (72), ao diagnóstico de DM gestacional (73), à tolerância diminuída à glicose e ao DM tipo 2 (2, 74, 75).

Qi *et al* avaliaram as mutações no gene *HFE*, reservas corporais de ferro, ingestão de ferro e o desenvolvimento de DM tipo 2 em mulheres norte-americanas em um estudo de casos e de controles aninhado à coorte do *Nurses Health Study* (76). A RC de desenvolvimento de DM tipo 2 foi maior nos quartis superiores de ingestão de ferro heme

apenas nos pacientes com mutações no gene *HFE*, sugerindo um efeito sinérgico entre a dieta e a alteração genética (76). Como comentado previamente, a absorção do ferro não-heme é regulada estreitamente. Indivíduos com mutações no gene *HFE* (HHC) perdem esse controle. A absorção do ferro heme é menos controlada e, depende principalmente da oferta. Desta forma, pessoas com mutações *HFE* e com alta ingestão de ferro heme são teoricamente mais predispostas a alterações no metabolismo do ferro e às suas complicações.

Como o DM é uma das manifestações clínicas da HH (77) poderia se esperar uma maior prevalência de mutações no gene *HFE* entre pacientes com DM tipo 2. As observações são controversas neste ponto. Alguns autores relatam maior prevalência de mutações no *HFE* entre pacientes com DM tipo 2 (78-80) enquanto outros não foram capazes de demonstrar essa associação (81-83).

Outra evidencia para um papel do metabolismo do ferro na homeostase glicêmica vem do fato de que doações sanguíneas frequentes e dietas específicas, que resultam em diminuição nas reservas de ferro, melhoram a sensibilidade à insulina (84, 85) e protegem do desenvolvimento do DM (86).

Deve-se comentar que a maioria dos estudos avaliou as reservas corporais através da ferritina sérica. A ferritina é uma proteína da fase aguda, cujos níveis séricos são alterados pela inflamação e inúmeros outros processos. Portanto, a elevação da ferritina observada em pacientes com DM tipo 2 pode ser um processo secundário e não primário (87). A utilização dos níveis séricos da ferritina como marcador da quantidade de ferro tecidual deve, portanto, ser utilizada com cautela, pois não existem valores de referência bem estabelecidos, e biópsias com determinação do ferro tecidual não foram realizadas na maioria dos estudos (3). Os níveis séricos da ferritina se correlacionam com a glicemia, com o grau de resistência a ação da insulina (2, 88), com o número de componentes da

síndrome metabólica (1), com a ocorrência de tolerância diminuída à glicose e com a presença de DM. Estas correlações são independentes dos níveis séricos da proteína C reativa (2, 89), ratificando a idéia de que em pacientes com DM tipo 2 a ferritina elevada reflete um aumento nas reservas corporais de ferro e pode estar associada à patogênese do DM.

Bases Fisiopatológicas que Associam o Metabolismo do Ferro com o Desenvolvimento do Diabetes Melito Tipo 2

Apesar de não se conhecer os mecanismos fisiopatológicos precisos que correlacionam o metabolismo do ferro e dos glicídios, alguns mecanismos que provavelmente estão envolvidos serão descritos a seguir (Figura 3).

Ferro e as Células Beta

As células beta são mais susceptíveis aos efeitos tóxicos do ferro devido ao seu elevado número de DMT-1, necessários para a obtenção de zinco utilizado no processamento da insulina nos grânulos secretores (90). Além disso, as células beta são particularmente lesadas pelo estresse oxidativo devido ao seu padrão quase exclusivo de metabolismo mitocondrial da glicose para a secreção de insulina glicose-dependente (91).

Em modelos animais de HHC, a sobrecarga de ferro está associada à redução na capacidade secretória de insulina devido a apoptose celular e conseqüente diminuição no volume das ilhotas pancreáticas (91). Essa diminuição do volume é devido à perda das células beta, com preservação das células alfa. Contudo, usualmente os animais não desenvolvem DM, demonstrando que provavelmente um segundo insulto é necessário (hepático, ou de outro componente da síndrome metabólica).

Em seres humanos com HHC confirmou-se a redução da capacidade secretória de insulina nos indivíduos com DM e com tolerância diminuída à glicose. Os indivíduos que

desenvolvem DM apresentam maior prevalência de obesidade e de resistência à ação da insulina, que são provavelmente os insultos adicionais necessários para a expressão clínica do DM em pacientes com sobrecarga de ferro (71).

Ferro e a Resistência à Ação da Insulina

Dmochowski *et al.* (92) avaliaram pacientes normoglicêmicos com HS, e a principal alteração encontrada foi resistência à ação da insulina. Este achado foi inversamente relacionado aos níveis da ferritina sérica. No acompanhamento destes indivíduos houve uma redução progressiva na insulina sérica. Isto demonstra uma provável seqüência de eventos, semelhantes aos do DM tipo 2 clássico, onde a resistência insulínica e a hiperinsulinemia desenvolvem-se precocemente e o DM surge apenas quando há incapacidade das células beta em compensar essa resistência insulínica.

Fargion *et al* (93) demonstraram em cultura de hepatócitos que a adição de ferro ao meio de cultura diminui a ligação da insulina marcada aos seus receptores, os níveis de RNAm da glucoquinase e o número de receptores para insulina. A depleção de ferro com a deferoxamina corrigiu estas alterações. Sendo assim, o ferro aparentemente modifica a sensibilidade dos hepatócitos à insulina através da alteração nos seus receptores e na sinalização intracelular.

Algumas evidências sugerem que a sobrecarga de ferro também afeta o músculo esquelético (94), um dos principais efetores da ação insulínica.

Os ácidos graxos livres também possuem um papel importante na síndrome de resistência à ação da insulina (95). A adição de soro a cultura de adipócitos aumenta a taxa de lipólise (96) e aproximadamente 50% do efeito lipolítico deve-se a presença da transferrina ou do ferro ligada a mesma (97). O ferro livre também aumenta a atividade lipolítica (97). Além disso, a transferrina tem um efeito antagonista à ação da insulina (98)

e existe uma correlação positiva entre ferritina e transferrina e o desenvolvimento de DM (99).

Por outro lado, a insulina também exerce efeitos sobre o metabolismo do ferro. A insulina estimula a captação de ferro pelos adipócitos através da redistribuição dos receptores de transferrina das membranas intracelulares para a superfície celular (100). Além disso, também aumenta a síntese de ferritina em cultura de células (101).

Estresse Oxidativo e o Metabolismo do Ferro e da Glicose

O ferro reativo (livre) está diretamente envolvido com o estresse oxidativo através das reações de “Fenton”. Para neutralizar sua toxicidade o ferro é armazenado na forma de ferritina e durante a circulação encontra-se ligado a transferrina.

O armazenamento do ferro na forma ferrosa, pela ferritina, ocorre em condições aeróbicas. Em circunstâncias onde há diminuição dos anti-oxidantes, o potencial redutor e a anaerobiose aumentam progressivamente facilitando a liberação do ferro pela ferritina. Este ferro livre amplifica a geração de radicais livres levando ao dano de estruturas celulares (3).

Desta forma, a ferritina através da seqüestração do ferro livre pode agir como um anti-oxidante (protetora). Contudo, mudanças nas condições locais podem fazer com que a ferritina libere parte do ferro armazenado, agindo assim como um pró-oxidante (tóxica).

Metabolismo do Ferro e Complicações Crônicas do Diabetes Melito

Estudos clínicos e modelos em animais têm definitivamente correlacionado as complicações microvasculares diabéticas com a hiperglicemia (102). O DCCT elegantemente demonstrou que o tratamento intensivo, objetivando um maior controle da glicemia, reduz a incidência destas complicações (103). As complicações macrovasculares em pacientes com DM também se correlacionam com a hiperglicemia (104), mas na

maioria das vezes em conjunto com a dislipidemia, a hipertensão arterial sistêmica e a resistência à ação da insulina (105).

Atualmente existem quatro hipóteses principais para explicar como a hiperglicemia levaria às complicações crônicas do DM: formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), aumento da atividade da aldose redutase, ativação de isoformas da proteína kinase C (PKC) e aumento dos produtos finais da glicação avançada.

Contudo, descobertas recentes tem apontado para o possível elo unindo todas essas hipóteses que seria a geração de EROs induzidas pela hiperglicemia, especificamente a produção excessiva de superóxido pela cadeia de transporte de elétrons mitocondrial (106).

Desta forma, as alterações no metabolismo do ferro, que aumentem os níveis séricos do ferro livre (reativo) ou induzam sobrecarga tecidual, podem, através das reações de “Fenton”, formar EROs levando a uma maior incidência de complicações crônicas do DM e/ou a uma evolução mais grave das mesmas.

Nefropatia Diabética

Loebstein *et al* avaliaram o curso clínico da nefropatia diabética (ND) em pacientes com HS (β -talassemia) e DM demonstrando início mais precoce e evolução mais acelerada da mesma (5). Outros dois estudos sugerem um papel das alterações no metabolismo do ferro na patogênese da ND (4, 107). Nestes avaliou-se a prevalência da ND em pacientes com mutações no gene relacionado à HHC (*HFE*), e foi encontrada uma maior prevalência de ND naqueles com a mutação H63D (4) e C282Y (107). Sabendo-se que os portadores destas mutações possuem níveis séricos dos marcadores do metabolismo do ferro estatisticamente superiores em relação àqueles sem a mutação, reforça-se a teoria de que o ferro modifica a história natural da ND.

As alterações glomerulares iniciais da ND resultam no desenvolvimento de microalbuminúria e transferrinúria, podendo em alguns casos esta última alteração preceder

a microalbuminúria (108). Recentemente, diversos autores têm reavaliado a importância do dano tubulointersticial na progressão da ND (109, 110). A transferrina tem sido proposta como um mediador da toxicidade tubular devido ao fato que a sua reabsorção e o pH urinário <6,5 liberariam o ferro reativo junto às células tubulares, promovendo a formação de radicais livres e o dano tubulointersticial mesmo em estágios iniciais da ND (microalbuminúria) (111). Nankivell *et al* observaram um aumento na concentração de ferro lisossomal no epitélio tubular proximal em pacientes com ND (112).

Retinopatia Diabética

Os resultados dos trabalhos que correlacionaram alterações no metabolismo do ferro com retinopatia diabética (RD) são menos conclusivos. Peterlin *et al* pesquisaram as mutações associadas com a HHC em pacientes com DM tipo 2 encontrando uma RC de 6,1 (IC 95%: 1,2-30,5) para o desenvolvimento de RD proliferativa em portadores da mutação C282Y (113). Por outro lado, Oliva *et al* não encontraram relação entre as mutações da HHC e a presença de RD (107) e Elis *et al* não demonstraram diferenças nos níveis séricos da ferritina, do ferro e da ST em pacientes com DM tipo 2 com ou sem RD (114).

Neuropatia Diabética

Evidências sugerem que parte das alterações na função dos nervos periféricos presentes na neuropatia diabética originam-se da diminuição no fluxo sanguíneo endoneural (115). Essa redução poderia ser devido à diminuição na vasodilatação dependente do endotélio. O ferro, através da geração de EROs, exacerbaria os mecanismos deletérios associados à hiperglicemia (PKC, aldose redutase e produtos finais da glicação avançada), além de formar “glicoquelados” (proteínas glicadas ligadas a metais) que se acumulam na vasculatura e cataliticamente inativam o fator relaxante derivado do endotélio, um substância que acredita-se ser o óxido nítrico ou uma mistura de tióis (116). Estudos experimentais demonstraram que a administração de queladores de metais transicionais

(ferro e cobre, especialmente) a ratos diabéticos corrige essa redução no relaxamento vascular dependente do fator endotelial e restaura o fluxo sanguíneo e a velocidade de condução neuronal (117, 118). Estes achados não foram confirmados em seres humanos até o momento.

Complicações Macrovasculares

Vários autores têm sugerido uma associação entre alterações nas reservas de ferro e o desenvolvimento da aterosclerose (119-122). Essa associação tem sido denominada “hipótese do ferro” (119, 120). Através da geração de EROs, o ferro reativo (livre) pode causar a oxidação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL), um promotor do desenvolvimento da aterosclerose (123). A LDL oxidada ativa a produção de várias moléculas de adesão, de fatores quimiotáticos e de crescimento celular que promovem a migração e a adesão de monócitos e linfócitos à parede arterial. Em pacientes com DM a glicação não-enzimática da LDL a torna ainda mais susceptível a oxidação (124). Além disso, a glicação das proteínas da lâmina elástica interna (elastina e colágeno) aumenta a sua capacidade de ligação ao ferro (formando “glicoquelados”). Essas proteínas possuem meia-vida prolongada (décadas) e podem agir como fonte local de estresse oxidativo vascular (125). Como já comentado anteriormente, pacientes com DM também podem apresentar isquemia tecidual devido a um comprometimento da vasodilatação dependente do fator relaxante derivado do endotélio, através da sua maior inativação pelos “glicoquelados” e EROs (116).

Kahn *et al* demonstraram que as células epiteliais expressam transportadores do ferro (DMT-1 e ferroportina) e que o aumento da glicemia no meio de cultura eleva a expressão destes (126). No seu modelo experimental, a expressão do DMT-1 foi superior a da ferroportina, resultando em acúmulo celular de ferro e em aumento do estresse oxidativo.

Além disso, a avaliação da função endotelial *in vivo* (127) e *in vitro* (128) tem demonstrado que níveis elevados de ferro estão associados a alterações da reatividade vascular. A redução dos níveis do ferro restaura a função endotelial (129).

Estudos em animais: a maioria dos resultados de estudos em animais dão suporte à “hipótese do ferro”. A susceptibilidade do coração de ratos a lesão de reperfusão foi aumentada pela sobrecarga de ferro (130). Araújo *et al* demonstraram que a sobrecarga de ferro induz a formação de lesões ateroscleróticas em coelhos com hipercolesterolemia (131). Lee *et al* encontraram resultados semelhantes em ratos com deficiência de apo-E e demonstraram que a dieta pobre em ferro reduz essas lesões (132). Além disso, o uso de queladores do ferro, deferiprona e deferoxamina, está associado com proteção contra o dano oxidativo e o desenvolvimento da aterosclerose (133, 134). Contudo, Kirk *et al* demonstraram redução da aterosclerose com a sobrecarga de ferro (135).

Estudos epidemiológicos: na última década, muitos estudos epidemiológicos foram realizados para testar a “hipótese do ferro” (Tabelas 4 e 5). O indicador do metabolismo do ferro mais utilizado nos trabalhos foi a ferritina. Salonen *et al* foram os primeiros a relatar uma associação significativa entre os níveis de ferritina e o risco de infarto do miocárdio (IM) em uma amostra de 1931 homens acompanhados por um período médio de 3 anos (120). Homens com ferritina ≥ 200 $\mu\text{g/L}$ possuíam risco 2,2 vezes maior de IM que homens com ferritina abaixo deste limite. Em um estudo de casos-controles aninhado ao estudo Rotterdam, Klipstein-Grobusch *et al* mostraram que homens nos tercís superiores de ferritina apresentavam aumento no risco de IM na presença de fatores de risco como tabagismo (RC: 1,68; IC 95%: 1,17-2,47; P = 0,008) e DM (RC: 2,41; IC 95%: 1,12-7,67; P = 0,027) (136). Além disso, um estudo transversal encontrou um aumento na RC para doença aterosclerótica carotídea de 1,54 para cada acréscimo de 100 $\mu\text{g/L}$ na ferritina sérica (137). No seguimento de cinco anos após a avaliação inicial, foi observada manutenção da

relação entre a ferritina e a doença aterosclerótica carotídea (138). Estes dados foram confirmados em outros estudos (122, 139, 140). Pesquisas que avaliaram as mutações no gene *HFE* também demonstraram maior risco de morte cardiovascular e IM em portadores da mutação C282Y (78, 141).

Contrariamente, diversos estudos epidemiológicos têm falhado em confirmar a associação entre ferro e doença cardiovascular. Sempos *et al* não encontraram evidência de associação entre ST e o desenvolvimento de doença arterial coronariana (DAC) no *National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES I)* durante um acompanhamento médio de 14 anos (142). Contudo, os níveis séricos de ferritina não foram avaliados neste estudo. Magnusson *et al* relataram que a ferritina sérica não estava associada com um aumento no número de IM e mortes cardíacas súbitas (143). Moore *et al* não encontraram associação entre ferritina sérica e o espessamento da íntima da artéria carótida em um estudo de caso-controle pareado do *Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC)* (144). Por fim, Ascherio *et al* não demonstraram associação entre a ingestão de ferro e a incidência de DAC em 44.933 homens do *Health Professional's Follow-up Study* (145). A tabela 5 descreve outros trabalhos contra a “hipótese do ferro”.

A inconsistência dos achados nos estudos pode ser decorrente dos diferentes parâmetros que foram utilizados para medir as reservas corporais de ferro, da ausência de limites claros para descrever sobrecarga de ferro nos parâmetros disponíveis ou da diferença nas características das amostras. Estudos futuros devem dirigir sua atenção para distinguir se a ferritina elevada é um fator causal para a DAC ou simplesmente um marcador do processo da doença ou das comorbidades associadas.

Implicações Terapêuticas da Depleção de Ferro

Estudos da década de 50 já descreviam melhora no controle metabólico em 35 a 45% dos pacientes com DM e hemocromatose após a depleção de ferro (146). Dymock *et al* demonstraram uma redução na dose diária total de insulina após a flebotomia (147). Além disso, drogas utilizadas para quelar o ferro parecem prevenir o desenvolvimento de DM em indivíduos com sobrecarga de ferro transfusional (148).

Nos anos 90, foram publicadas série de casos pequenas (n total 23 pacientes) e não controladas com utilização de deferoxamina em pacientes com DM e níveis séricos elevados de ferritina (149-151), com melhora dos parâmetros glicêmicos.

A utilização de flebotomia para induzir um estado de quase deficiência de ferro (ferritina ≤ 30 $\mu\text{g/L}$, ST $\leq 15\%$ e volume corpuscular médio ≤ 82 fL) na ausência de anemia, foi associada com redução significativa da A1c e da resistência a ação da insulina (HOMA-IR, *Homeostasis model assessment of insulin resistance*), principalmente em pacientes com esteatose hepática não alcoólica (152). Fernández-Real *et al* encontraram resultados semelhantes quanto à sensibilidade à ação da insulina em indivíduos com (153) ou sem DM (85). Em pacientes com DM, a depleção de ferro também melhorou a função endotelial (154). Facchini e Saylor também relataram que uma dieta pobre em ferro, rica em polifenóis e restrita em carboidratos reduz a progressão da ND e a mortalidade total (155).

Recentemente, um ensaio clínico randomizado avaliou o efeito da depleção de ferro, através de doações de sangue repetidas, em indivíduos com doença vascular periférica (156). Não houve redução da mortalidade por todas as causas ou por doença cardiovascular. Contudo, análise estratificada demonstrou que alguns subgrupos beneficiaram-se da redução das reservas corporais de ferro, como indivíduos mais jovens (<60 anos) e tabagistas. Este estudo demonstra a heterogeneidade de fatores que interferem no metabolismo do ferro e modificam a resposta as intervenções.

Indicações de Pesquisa do Metabolismo do Ferro em Pacientes com Síndrome Metabólica ou Diabetes Melito

O nível atual de conhecimento poderia justificar a inclusão da avaliação do metabolismo do ferro como um dos componentes da síndrome metabólica, adicionando a ferritina e a ST aos exames laboratoriais.

A respeito dos pacientes com DM, a avaliação do metabolismo do ferro, incluindo a pesquisa das mutações no gene *HFE*, estaria justificada, segundo a *American Association for Study of Liver Diseases*, quando existirem outras comorbidades como: hepatomegalia, alteração das transaminases hepáticas, doença cardíaca atípica, hipogonadismo ou artropatia destrutiva (157).

Os dados disponíveis não justificam o uso clínico dos parâmetros do metabolismo para o diagnóstico, acompanhamento ou tratamento das complicações crônicas do DM, mas podem em um futuro próximo ter utilidade para alguns destes fins.

A indicação da pesquisa genética das mutações mais prevalentes na HH (gene *HFE*) em pacientes com DM necessita de mais estudos, incluindo análises de custo-efetividade de tal intervenção.

Considerações Finais

O DM tipo 2 é uma doença com origem multifatorial. As alterações no metabolismo do ferro corporal, especificamente o seu excesso, através das reações de “Fenton” e da geração de radicais livres, parecem estar envolvidas na sua patogênese.

A hemocromatose, uma forma extrema de excesso de ferro, está claramente associada ao desenvolvimento de DM. Contudo, formas mais brandas de elevação do ferro corporal, caracterizadas apenas por aumento da ferritina, já parecem conferir um maior risco de síndrome metabólica e de DM.

Além disso, o ferro, aparentemente, desenvolve um papel no surgimento e na progressão de algumas das complicações crônicas do DM, em especial, a ND e a doença cardiovascular. Os estudos clínicos e experimentais demonstram que intervenções que reduzem os níveis séricos de ferro poderão ser utilizadas para o tratamento de algumas destas complicações crônicas.

Em relação às alterações nos padrões alimentares, os estudos sugerem que o ferro na forma heme, especialmente associado a mutações no gene *HFE*, está relacionado com o aumento no risco de DM. Deve-se, futuramente, dar maior atenção para as modificações na quantidade deste tipo de ferro como forma de evitar o desenvolvimento de DM.

Quanto aos determinantes genéticos do metabolismo do ferro, as pesquisas (gene *HFE*) revelam resultados menos conclusivos em se tratando do risco de DM ou das suas complicações crônicas. O capítulo a seguir busca esclarecer questões concernentes a algumas destas incertezas sobre DM e às mutações no gene *HFE*.

Referências

1. Bozzini C, Girelli D, Olivieri O, Martinelli N, Bassi A, De Matteis G, et al. Prevalence of body iron excess in the metabolic syndrome. **Diabetes Care** **2005**;28:2061-3.
2. Ford ES, Cogswell ME. Diabetes and serum ferritin concentration among U.S. adults. **Diabetes Care** **1999**;22:1978-83.
3. Fernandez-Real JM, Lopez-Bermejo A, Ricart W. Cross-talk between iron metabolism and diabetes. **Diabetes** **2002**;51:2348-54.
4. Moczulski DK, Grzeszczak W, Gawlik B. Role of hemochromatosis C282Y and H63D mutations in *HFE* gene in development of type 2 diabetes and diabetic nephropathy. **Diabetes Care** **2001**;24:1187-91.
5. Loebstein R, Lehotay DC, Luo X, Bartfay W, Tyler B, Sher GD. Diabetic nephropathy in hypertransfused patients with beta-thalassemia. The role of oxidative stress. **Diabetes Care** **1998**;21:1306-9.
6. 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**;13:399-408.
7. Hentze MW, Muckenthaler MU, Andrews NC. Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. **Cell** **2004**;117:285-97.
8. Halliwell B, Gutteridge JM. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods Enzymol** **1990**;186:1-85.
9. Gunshin H, Mackenzie B, Berger UV, Gunshin Y, Romero MF, Boron WF, et al. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. **Nature** **1997**;388:482-8.

10. McKie AT, Barrow D, Latunde-Dada GO, Rolfs A, Sager G, Mudaly E, et al. An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron. **Science** **2001**;291:1755-9.
11. Shayeghi M, Latunde-Dada GO, Oakhill JS, Laftah AH, Takeuchi K, Halliday N, et al. Identification of an intestinal heme transporter. **Cell** **2005**;122:789-801.
12. Cheng Y, Zak O, Aisen P, Harrison SC, Walz T. Structure of the human transferrin receptor-transferrin complex. **Cell** **2004**;116:565-76.
13. 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**;274:20826-32.
14. West AP, Jr., Bennett MJ, Sellers VM, Andrews NC, Enns CA, Bjorkman PJ. Comparison of the interactions of transferrin receptor and transferrin receptor 2 with transferrin and the hereditary hemochromatosis protein *HFE*. **J Biol Chem** **2000**;275:38135-8.
15. Pietrangelo A. Hereditary hemochromatosis. **Annu Rev Nutr** **2006**;26:251-70.
16. Randell EW, Parkes JG, Olivieri NF, Templeton DM. Uptake of non-transferrin-bound iron by both reductive and nonreductive processes is modulated by intracellular iron. **J Biol Chem** **1994**;269:16046-53.
17. Andrews NC, Schmidt PJ. Iron homeostasis. **Annu Rev Physiol** **2007**;69:69-85.
18. Torti FM, Torti SV. Regulation of ferritin genes and protein. **Blood** **2002**;99:3505-16.
19. Harrison PM, Arosio P. The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. **Biochim Biophys Acta** **1996**;1275:161-203.
20. Harrison PM. Ferritin: an iron-storage molecule. **Semin Hematol** **1977**;14:55-70.

21. McKie AT, Marciani P, Rolfs A, Brennan K, Wehr K, Barrow D, et al. A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation. **Mol Cell** **2000**;5:299-309.
22. Vulpe CD, Kuo YM, Murphy TL, Cowley L, Askwith C, Libina N, et al. Hephaestin, a ceruloplasmin homologue implicated in intestinal iron transport, is defective in the sla mouse. **Nat Genet** **1999**;21:195-9.
23. Harris ZL, Durley AP, Man TK, Gitlin JD. Targeted gene disruption reveals an essential role for ceruloplasmin in cellular iron efflux. **Proc Natl Acad Sci U S A** **1999**;96:10812-7.
24. Andrews NC. Molecular control of iron metabolism. **Best Pract Res Clin Haematol** **2005**;18:159-69.
25. Muckenthaler M, Gray NK, Hentze MW. IRP-1 binding to ferritin mRNA prevents the recruitment of the small ribosomal subunit by the cap-binding complex eIF4F. **Mol Cell** **1998**;2:383-8.
26. Hentze MW, Kuhn LC. Molecular control of vertebrate iron metabolism: mRNA-based regulatory circuits operated by iron, nitric oxide, and oxidative stress. **Proc Natl Acad Sci U S A** **1996**;93:8175-82.
27. Meyron-Holtz EG, Ghosh MC, Iwai K, LaVaute T, Brazzolotto X, Berger UV, et al. Genetic ablations of iron regulatory proteins 1 and 2 reveal why iron regulatory protein 2 dominates iron homeostasis. **Embo J** **2004**;23:386-95.
28. Yang J, Goetz D, Li JY, Wang W, Mori K, Setlik D, et al. An iron delivery pathway mediated by a lipocalin. **Mol Cell** **2002**;10:1045-56.
29. Krause A, Neitz S, Magert HJ, Schulz A, Forssmann WG, Schulz-Knappe P, et al. LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. **FEBS Lett** **2000**;480:147-50.

30. Muckenthaler M, Roy CN, Custodio AO, Minana B, deGraaf J, Montross LK, et al. Regulatory defects in liver and intestine implicate abnormal hepcidin and Cybrd1 expression in mouse hemochromatosis. **Nat Genet** 2003;34:102-7.
31. Nicolas G, Chauvet C, Viatte L, Danan JL, Bigard X, Devaux I, et al. The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. **J Clin Invest** 2002;110:1037-44.
32. Weinstein DA, Roy CN, Fleming MD, Loda MF, Wolfsdorf JI, Andrews NC. Inappropriate expression of hepcidin is associated with iron refractory anemia: implications for the anemia of chronic disease. **Blood** 2002;100:3776-81.
33. Nicolas G, Bennoun M, Porteu A, Mativet S, Beaumont C, Grandchamp B, et al. Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver hepcidin. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2002;99:4596-601.
34. 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;33:21-2.
35. Nemeth E, Valore EV, Territo M, Schiller G, Lichtenstein A, Ganz T. Hepcidin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute-phase protein. **Blood** 2003;101:2461-3.
36. Pigeon C, Ilyin G, Courselaud B, Leroyer P, Turlin B, Brissot 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;276:7811-9.
37. Nemeth E, Rivera S, Gabayan V, Keller C, Taudorf S, Pedersen BK, et al. IL-6 mediates hypoferrremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. **J Clin Invest** 2004;113:1271-6.

38. 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**;306:2090-3.
39. Huang FW, Pinkus JL, Pinkus GS, Fleming MD, Andrews NC. A mouse model of juvenile hemochromatosis. **J Clin Invest** **2005**;115:2187-91.
40. 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**;105:376-81.
41. 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**;34:97-101.
42. Lok CN, Loh TT. Regulation of transferrin function and expression: review and update. **Biol Signals Recept** **1998**;7:157-78.
43. Worwood M. The laboratory assessment of iron status--an update. **Clin Chim Acta** **1997**;259:3-23.
44. Brugnara C. Iron deficiency and erythropoiesis: new diagnostic approaches. **Clin Chem** **2003**;49:1573-8.
45. Bridges KR, Seligman PA, Disorders of iron metabolism in **Blood: Principles & Practice of Hematology**, R.I. Handin, S.E. Lux, and T.P. Stossel, Editors. 1995.
46. Cazzola M. Role of ferritin and ferroportin genes in unexplained hyperferritinaemia. **Best Pract Res Clin Haematol** **2005**;18:251-63.
47. Cook JD. Clinical evaluation of iron deficiency. **Semin Hematol** **1982**;19:6-18.
48. Aguilar-Martinez P, Schved JF, Brissot P. The evaluation of hyperferritinemia: an updated strategy based on advances in detecting genetic abnormalities. **Am J Gastroenterol** **2005**;100:1185-94.

49. Trousseau A, Glycosurie: diabete sucre, in **Clinique medicale de l'Hotel-Dieu de Paris**. 1865, J.-B. Bailliere: Paris. p. 663-98.
50. Recklinghausen Fv. Uber Haemochromatose. **Tageblatt Versammlung Dtsche Naturforscher Arzte Heidelberg 1889**;62:324-5.
51. Sheldon JH, **Haemochromatosis**. 1935, London: Oxford University Press.
52. Beutler E, Hoffbrand AV, Cook JD. Iron deficiency and overload. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2003**:40-61.
53. Adams P, Brissot P, Powell LW. EASL International Consensus Conference on Haemochromatosis. **J Hepatol 2000**;33:485-504.
54. Hemochromatosis. *Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM*. Hemochromatosis 2000 [cited 2004 11/11/2004]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>.
55. Rochette J, Pointon JJ, Fisher CA, Perera G, Arambepola M, Arichchi DS, et al. Multicentric origin of hemochromatosis gene (*HFE*) mutations. **Am J Hum Genet 1999**;64:1056-62.
56. Adams PC, Reboussin DM, Barton JC, McLaren CE, Eckfeldt JH, McLaren GD, et al. Hemochromatosis and iron-overload screening in a racially diverse population. **N Engl J Med 2005**;352:1769-78.
57. Pietrangelo A. Hereditary hemochromatosis--a new look at an old disease. **N Engl J Med 2004**;350:2383-97.
58. Beutler E, Felitti VJ, Koziol JA, Ho NJ, Gelbart T. Penetrance of 845G--> A (C282Y) *HFE* hereditary haemochromatosis mutation in the USA. **Lancet 2002**;359:211-8.

59. Crawford DH, Halliday JW, Summers KM, Bourke MJ, Powell LW. Concordance of iron storage in siblings with genetic hemochromatosis: evidence for a predominantly genetic effect on iron storage. **Hepatology** **1993**;17:833-7.
60. Muir WA, McLaren GD, Braun W, Askari A. Evidence for heterogeneity in hereditary hemochromatosis. Evaluation of 174 persons in nine families. **Am J Med** **1984**;76:806-14.
61. Mura C, Raguenes O, Ferec C. *HFE* mutations analysis in 711 hemochromatosis probands: evidence for S65C implication in mild form of hemochromatosis. **Blood** **1999**;93:2502-5.
62. Lebron 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**;93:111-23.
63. Gross CN, Irrinki A, Feder JN, Enns CA. Co-trafficking of *HFE*, a nonclassical major histocompatibility complex class I protein, with the transferrin receptor implies a role in intracellular iron regulation. **J Biol Chem** **1998**;273:22068-74.
64. Parkkila S, Waheed A, Britton RS, Feder JN, Tsuchihashi Z, Schatzman RC, et al. Immunohistochemistry of HLA-H, the protein defective in patients with hereditary hemochromatosis, reveals unique pattern of expression in gastrointestinal tract. **Proc Natl Acad Sci U S A** **1997**;94:2534-9.
65. Waheed A, Grubb JH, Zhou XY, Tomatsu S, Fleming RE, Costaldi ME, et al. Regulation of transferrin-mediated iron uptake by HFE, the protein defective in hereditary hemochromatosis. **Proc Natl Acad Sci U S A** **2002**;99:3117-22.
66. Bulaj ZJ, Griffen LM, Jorde LB, Edwards CQ, Kushner JP. Clinical and biochemical abnormalities in people heterozygous for hemochromatosis. **N Engl J Med** **1996**;335:1799-805.

67. Papanikolaou G, Samuels ME, Ludwig EH, MacDonald ML, Franchini PL, Dube MP, et al. Mutations in *HFE2* cause iron overload in chromosome 1q-linked juvenile hemochromatosis. **Nat Genet** 2004;36:77-82.
68. 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;25:14-5.
69. 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;108:619-23.
70. Niederau C, Fischer R, Purschel A, Stremmel W, Haussinger D, Strohmeyer G. Long-term survival in patients with hereditary hemochromatosis. **Gastroenterology** 1996;110:1107-19.
71. McClain DA, Abraham D, Rogers J, Brady R, Gault P, Ajioka R, et al. High prevalence of abnormal glucose homeostasis secondary to decreased insulin secretion in individuals with hereditary haemochromatosis. **Diabetologia** 2006;49:1661-9.
72. Iwasaki T, Nakajima A, Yoneda M, Yamada Y, Mukasa K, Fujita K, et al. Serum ferritin is associated with visceral fat area and subcutaneous fat area. **Diabetes Care** 2005;28:2486-91.
73. Lao TT, Tam KF. Maternal serum ferritin and gestational impaired glucose tolerance. **Diabetes Care** 1997;20:1368-9.
74. Salonen JT, Tuomainen TP, Nyyssonen K, Lakka HM, Punnonen K. Relation between iron stores and non-insulin dependent diabetes in men: case-control study. **BMJ** 1998;317:727.

75. Barbieri M, Ragno E, Benvenuti E, Zito GA, Corsi A, Ferrucci L, et al. New aspects of the insulin resistance syndrome: impact on haematological parameters. **Diabetologia** 2001;44:1232-7.
76. Qi L, Meigs J, Manson JE, Ma J, Hunter D, Rifai N, et al. *HFE* Genetic Variability, Body Iron Stores, and the Risk of Type 2 Diabetes in U.S. Women. **Diabetes** 2005;54:3567-72.
77. Yaouanq JM. Diabetes and haemochromatosis: current concepts, management and prevention. **Diabete Metab** 1995;21:319-29.
78. Tuomainen TP, Kontula K, Nyysönen K, Lakka TA, Helio T, Salonen JT. Increased risk of acute myocardial infarction in carriers of the hemochromatosis gene Cys282Tyr mutation : a prospective cohort study in men in eastern Finland. **Circulation** 1999;100:1274-9.
79. Conte D, Manachino D, Colli A, Guala A, Aimo G, Andreoletti M, et al. Prevalence of genetic hemochromatosis in a cohort of Italian patients with diabetes mellitus. **Ann Intern Med** 1998;128:370-3.
80. Kwan T, Leber B, Ahuja S, Carter R, Gerstein HC. Patients with type 2 diabetes have a high frequency of the C282Y mutation of the hemochromatosis gene. **Clin Invest Med** 1998;21:251-7.
81. Frayling T, Ellard S, Grove J, Walker M, Hattersley AT. C282Y mutation in *HFE* (haemochromatosis) gene and type 2 diabetes. **Lancet** 1998;351:1933-4.
82. Kankova K, Jansen EH, Marova I, Stejskalova A, Pacal L, Muzik J, et al. Relations among serum ferritin, C282Y and H63D mutations in the *HFE* gene and type 2 diabetes mellitus in the Czech population. **Exp Clin Endocrinol Diabetes** 2002;110:223-9.

83. Halsall DJ, McFarlane I, Luan J, Cox TM, Wareham NJ. Typical type 2 diabetes mellitus and *HFE* gene mutations: a population-based case - control study. **Hum Mol Genet** **2003**;12:1361-5.
84. Hua NW, Stoohs RA, Facchini FS. Low iron status and enhanced insulin sensitivity in lacto-ovo vegetarians. **Br J Nutr** **2001**;86:515-9.
85. Fernandez-Real JM, Lopez-Bermejo A, Ricart W. Iron stores, blood donation, and insulin sensitivity and secretion. **Clin Chem** **2005**;51:1201-5.
86. Ascherio A, Rimm EB, Giovannucci E, Willett WC, Stampfer MJ. Blood donations and risk of coronary heart disease in men. **Circulation** **2001**;103:52-7.
87. Wilson JG, Lindquist JH, Grambow SC, Crook ED, Maher JF. Potential role of increased iron stores in diabetes. **Am J Med Sci** **2003**;325:332-9.
88. Tuomainen TP, Nyyssonen K, Salonen R, Tervahauta A, Korpela H, Lakka T, et al. Body iron stores are associated with serum insulin and blood glucose concentrations. Population study in 1,013 eastern Finnish men. **Diabetes Care** **1997**;20:426-8.
89. Jiang R, Manson JE, Meigs JB, Ma J, Rifai N, Hu FB. Body iron stores in relation to risk of type 2 diabetes in apparently healthy women. **JAMA** **2004**;291:711-7.
90. Andrews NC. The iron transporter DMT1. **Int J Biochem Cell Biol** **1999**;31:991-4.
91. Cooksey RC, Jouihan HA, Ajioka RS, Hazel MW, Jones DL, Kushner JP, et al. Oxidative stress, beta-cell apoptosis, and decreased insulin secretory capacity in mouse models of hemochromatosis. **Endocrinology** **2004**;145:5305-12.
92. Dmochowski K, Finegood DT, Francombe W, Tyler B, Zinman B. Factors determining glucose tolerance in patients with thalassemia major. **J Clin Endocrinol Metab** **1993**;77:478-83.

93. Fargion S, Dongiovanni P, Guzzo A, Colombo S, Valenti L, Fracanzani AL. Iron and insulin resistance. **Aliment Pharmacol Ther** 2005;22 Suppl 2:61-3.
94. Schafer AI, Cheron RG, Dluhy R, Cooper B, Gleason RE, Soeldner JS, et al. Clinical consequences of acquired transfusional iron overload in adults. **N Engl J Med** 1981;304:319-24.
95. Bergman RN, Van Citters GW, Mittelman SD, Dea MK, Hamilton-Wessler M, Kim SP, et al. Central role of the adipocyte in the metabolic syndrome. **J Investig Med** 2001;49:119-26.
96. Curtis-Prior PB. Lipolytic activity of serum and of products of serum ultrafiltration. **Horm Metab Res** 1973;5:305.
97. Rumberger JM, Peters T, Jr., Burrington C, Green A. Transferrin and iron contribute to the lipolytic effect of serum in isolated adipocytes. **Diabetes** 2004;53:2535-41.
98. Vargas L, Kawada ME, Bazaes S, Karplus PA, Faerman CH. Insulin antagonism: a novel role for human serum transferrin. **Horm Metab Res** 1998;30:113-7.
99. Fumeron F, Pean F, Driss F, Balkau B, Tichet J, Marre M, et al. Ferritin and transferrin are both predictive of the onset of hyperglycemia in men and women over 3 years: the data from an epidemiological study on the Insulin Resistance Syndrome (DESIR) study. **Diabetes Care** 2006;29:2090-4.
100. Davis RJ, Corvera S, Czech MP. Insulin stimulates cellular iron uptake and causes the redistribution of intracellular transferrin receptors to the plasma membrane. **J Biol Chem** 1986;261:8708-11.
101. Yokomori N, Iwasa Y, Aida K, Inoue M, Tawata M, Onaya T. Transcriptional regulation of ferritin messenger ribonucleic acid levels by insulin in cultured rat glioma cells. **Endocrinology** 1991;128:1474-80.

102. Williams RH, Wilson JD, Foster DW, **Williams Textbook of endocrinology**. 10th ed. 2003, Philadelphia: Saunders. xv, 1927 p.
103. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. **N Engl J Med** **1993**;329:977-86.
104. Gerstein HC. Is glucose a continuous risk factor for cardiovascular mortality? **Diabetes Care** **1999**;22:659-60.
105. Stamler J, Vaccaro O, Neaton JD, Wentworth D. Diabetes, other risk factors, and 12-yr cardiovascular mortality for men screened in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. **Diabetes Care** **1993**;16:434-44.
106. Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, et al. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. **Nature** **2000**;404:787-90.
107. Oliva R, Novials A, Sanchez M, Villa M, Ingelmo M, Recasens M, et al. The *HFE* gene is associated to an earlier age of onset and to the presence of diabetic nephropathy in diabetes mellitus type 2. **Endocrine** **2004**;24:111-4.
108. Kazumi T, Hozumi T, Ishida Y, Ikeda Y, Kishi K, Hayakawa M, et al. Increased urinary transferrin excretion predicts microalbuminuria in patients with type 2 diabetes. **Diabetes Care** **1999**;22:1176-80.
109. Gilbert RE, Cooper ME. The tubulointerstitium in progressive diabetic kidney disease: more than an aftermath of glomerular injury? **Kidney Int** **1999**;56:1627-37.
110. Ueno M, Kawashima S, Nishi S, Shimada H, Karasawa R, Suzuki Y, et al. Tubulointerstitial lesions in non-insulin dependent diabetes mellitus. **Kidney Int Suppl** **1997**;63:S191-4.

111. Kanauchi M, Akai Y, Hashimoto T. Transferrinuria in type 2 diabetic patients with early nephropathy and tubulointerstitial injury. **Eur J Intern Med** 2002;13:190-193.
112. Nankivell BJ, Tay YC, Boadle RA, Harris DC. Lysosomal iron accumulation in diabetic nephropathy. **Ren Fail** 1994;16:367-81.
113. Peterlin B, Globocnik Petrovic M, Makuc J, Hawlina M, Petrovic D. A hemochromatosis-causing mutation C282Y is a risk factor for proliferative diabetic retinopathy in Caucasians with type 2 diabetes. **J Hum Genet** 2003;48:646-9.
114. Elis A, Ferencz JR, Gilady G, Livne A, Assia EI, Lishner M. Is serum ferritin high in patients with diabetic retinopathy? A controlled study. **Endocr Res** 2004;30:141-7.
115. Kilo S, Berghoff M, Hilz M, Freeman R. Neural and endothelial control of the microcirculation in diabetic peripheral neuropathy. **Neurology** 2000;54:1246-52.
116. Eaton JW, Qian M. Interactions of copper with glycated proteins: possible involvement in the etiology of diabetic neuropathy. **Mol Cell Biochem** 2002;234-235:135-42.
117. Cameron NE, Cotter MA. Neurovascular dysfunction in diabetic rats. Potential contribution of autoxidation and free radicals examined using transition metal chelating agents. **J Clin Invest** 1995;96:1159-63.
118. Cameron NE, Cotter MA. Effects of an extracellular metal chelator on neurovascular function in diabetic rats. **Diabetologia** 2001;44:621-8.
119. Sullivan JL. Iron and the sex difference in heart disease risk. **Lancet** 1981;1:1293-4.
120. Salonen JT, Nyyssonen K, Korpela H, Tuomilehto J, Seppanen R, Salonen R. High stored iron levels are associated with excess risk of myocardial infarction in eastern Finnish men. **Circulation** 1992;86:803-11.

121. Salonen JT, Tuomainen TP, Kontula K, *Role of C282Y mutation in haemochromatosis gene in development of type 2 diabetes in healthy men: prospective cohort study*, in **BMJ** **2000**. p. 1706-7.
122. Tuomainen TP, Punnonen K, Nyysönen K, Salonen JT. Association between body iron stores and the risk of acute myocardial infarction in men. **Circulation** **1998**;97:1461-6.
123. Witztum JL. The oxidation hypothesis of atherosclerosis. **Lancet** **1994**;344:793-5.
124. Bowie A, Owens D, Collins P, Johnson A, Tomkin GH. Glycosylated low density lipoprotein is more sensitive to oxidation: implications for the diabetic patient? **Atherosclerosis** **1993**;102:63-7.
125. Qian M, Liu M, Eaton JW. Transition metals bind to glycated proteins forming redox active "glycochelates": implications for the pathogenesis of certain diabetic complications. **Biochem Biophys Res Commun** **1998**;250:385-9.
126. Khan ZA, Farhangkhome H, Barbin YP, Adams PC, Chakrabarti S. Glucose-induced regulation of novel iron transporters in vascular endothelial cell dysfunction. **Free Radic Res** **2005**;39:1203-10.
127. Gaenger H, Marschang P, Sturm W, Neumayr G, Vogel W, Patsch J, et al. Association between increased iron stores and impaired endothelial function in patients with hereditary hemochromatosis. **J Am Coll Cardiol** **2002**;40:2189-94.
128. Sasaki K, Hashida K, Michigami Y, Bannai S, Makino N. Restored vulnerability of cultured endothelial cells to high glucose by iron replenishment. **Biochem Biophys Res Commun** **2001**;289:664-9.
129. Zheng H, Cable R, Spencer B, Votto N, Katz SD. Iron stores and vascular function in voluntary blood donors. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** **2005**;25:1577-83.

130. van der Kraaij AM, Mostert LJ, van Eijk HG, Koster JF. Iron-load increases the susceptibility of rat hearts to oxygen reperfusion damage. Protection by the antioxidant (+)-cyanidanol-3 and deferoxamine. **Circulation** **1988**;78:442-9.
131. Araujo JA, Romano EL, Brito BE, Parthe V, Romano M, Bracho M, et al. Iron overload augments the development of atherosclerotic lesions in rabbits. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** **1995**;15:1172-80.
132. Lee TS, Shiao MS, Pan CC, Chau LY. Iron-deficient diet reduces atherosclerotic lesions in apoE-deficient mice. **Circulation** **1999**;99:1222-9.
133. Matthews AJ, Vercellotti GM, Menchaca HJ, Bloch PH, Michalek VN, Marker PH, et al. Iron and atherosclerosis: inhibition by the iron chelator deferiprone (L1). **J Surg Res** **1997**;73:35-40.
134. Williams RE, Zweier JL, Flaherty JT. Treatment with deferoxamine during ischemia improves functional and metabolic recovery and reduces reperfusion-induced oxygen radical generation in rabbit hearts. **Circulation** **1991**;83:1006-14.
135. Kirk EA, Heinecke JW, LeBoeuf RC. Iron overload diminishes atherosclerosis in apoE-deficient mice. **J Clin Invest** **2001**;107:1545-53.
136. Klipstein-Grobusch K, Koster JF, Grobbee DE, Lindemans J, Boeing H, Hofman A, et al. Serum ferritin and risk of myocardial infarction in the elderly: the Rotterdam Study. **Am J Clin Nutr** **1999**;69:1231-6.
137. Kiechl S, Aichner F, Gerstenbrand F, Egger G, Mair A, Rungger G, et al. Body iron stores and presence of carotid atherosclerosis. Results from the Bruneck Study. **Arterioscler Thromb** **1994**;14:1625-30.
138. Kiechl S, Willeit J, Egger G, Poewe W, Oberhollenzer F. Body iron stores and the risk of carotid atherosclerosis: prospective results from the Bruneck study. **Circulation** **1997**;96:3300-7.

139. Morrison HI, Semenciw RM, Mao Y, Wigle DT. Serum iron and risk of fatal acute myocardial infarction. **Epidemiology** 1994;5:243-6.
140. Wolff B, Volzke H, Ludemann J, Robinson D, Vogelgesang D, Staudt A, et al. Association between high serum ferritin levels and carotid atherosclerosis in the study of health in Pomerania (SHIP). **Stroke** 2004;35:453-7.
141. Roest M, van der Schouw YT, de Valk B, Marx JJ, Tempelman MJ, de Groot PG, et al. Heterozygosity for a hereditary hemochromatosis gene is associated with cardiovascular death in women. **Circulation** 1999;100:1268-73.
142. Sempos CT, Looker AC, Gillum RF, Makuc DM. Body iron stores and the risk of coronary heart disease. **N Engl J Med** 1994;330:1119-24.
143. Magnusson MK, Sigfusson N, Sigvaldason H, Johannesson GM, Magnusson S, Thorgeirsson G. Low iron-binding capacity as a risk factor for myocardial infarction. **Circulation** 1994;89:102-8.
144. Moore M, Folsom AR, Barnes RW, Eckfeldt JH. No association between serum ferritin and asymptomatic carotid atherosclerosis. The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. **Am J Epidemiol** 1995;141:719-23.
145. Ascherio A, Willett WC, Rimm EB, Giovannucci EL, Stampfer MJ. Dietary iron intake and risk of coronary disease among men. **Circulation** 1994;89:969-74.
146. Davis WD, Jr., Arrowsmith WR. The treatment of hemochromatosis by massive venesection. **Ann Intern Med** 1953;39:723-34.
147. Dymock IW, Cassar J, Pyke DA, Oakley WG, Williams R. Observations on the pathogenesis, complications and treatment of diabetes in 115 cases of haemochromatosis. **Am J Med** 1972;52:203-10.
148. Olivieri NF, Brittenham GM. Iron-chelating therapy and the treatment of thalassemia. **Blood** 1997;89:739-61.

149. Cutler P. Deferoxamine therapy in high-ferritin diabetes. **Diabetes** **1989**;38:1207-10.
150. Kaye TB, Guay AT, Simonson DC. Non-insulin-dependent diabetes mellitus and elevated serum ferritin level. **J Diabetes Complications** **1993**;7:246-9.
151. Redmon JB, Pyzdrowski KL, Robertson RP. No effect of deferoxamine therapy on glucose homeostasis and insulin secretion in individuals with NIDDM and elevated serum ferritin. **Diabetes** **1993**;42:544-9.
152. Facchini FS, Hua NW, Stoohs RA. Effect of iron depletion in carbohydrate-intolerant patients with clinical evidence of nonalcoholic fatty liver disease. **Gastroenterology** **2002**;122:931-9.
153. Fernandez-Real JM, Penarroja G, Castro A, Garcia-Bragado F, Hernandez-Aguado I, Ricart W. Blood letting in high-ferritin type 2 diabetes: effects on insulin sensitivity and beta-cell function. **Diabetes** **2002**;51:1000-4.
154. Fernandez-Real JM, Penarroja G, Castro A, Garcia-Bragado F, Lopez-Bermejo A, Ricart W. Blood letting in high-ferritin type 2 diabetes: effects on vascular reactivity. **Diabetes Care** **2002**;25:2249-55.
155. Facchini FS, Saylor KL. A low-iron-available, polyphenol-enriched, carbohydrate-restricted diet to slow progression of diabetic nephropathy. **Diabetes** **2003**;52:1204-9.
156. Zacharski LR, Chow BK, Howes PS, Shamayeva G, Baron JA, Dalman RL, et al. Reduction of iron stores and cardiovascular outcomes in patients with peripheral arterial disease: a randomized controlled trial. **JAMA** **2007**;297:603-10.
157. Tavill AS. Diagnosis and management of hemochromatosis. **Hepatology** **2001**;33:1321-8.

158. 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**;25:324-7.
159. Pereira AC, Mota GF, Krieger JE. Hemochromatosis gene variants in three different ethnic populations: effects of admixture for screening programs. **Hum Biol** **2001**;73:145-51.
160. Pericole FV, Alves MA, Saad ST, Costa FF. Hemochromatosis (*HFE*) gene mutations in Brazilian chronic hemodialysis patients. **Braz J Med Biol Res** **2005**;38:1321-4.
161. 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**;102:152-6.
162. Martinelli AL, Zago MA, Roselino AM, Filho AB, Villanova MG, Secaf M, et al. Porphyria cutanea tarda in Brazilian patients: association with hemochromatosis C282Y mutation and hepatitis C virus infection. **Am J Gastroenterol** **2000**;95:3516-21.
163. Bittencourt PL, Palacios SA, Couto CA, Cancado EL, Carrilho FJ, Laudanna AA, et al. Analysis of HLA-A antigens and C282Y and H63D mutations of the *HFE* gene in Brazilian patients with hemochromatosis. **Braz J Med Biol Res** **2002**;35:329-35.
164. Cancado RD, Guglielmi AC, Vergueiro CS, Rolim EG, Figueiredo MS, Chiattono CS. Analysis of *HFE* gene mutations and HLA-A alleles in Brazilian patients with iron overload. **Sao Paulo Med J** **2006**;124:55-60.
165. Yen AW, Fancher TL, Bowlus CL. Revisiting hereditary hemochromatosis: current concepts and progress. **Am J Med** **2006**;119:391-9.

166. Tuomainen TP, Diczfalusy U, Kaikkonen J, Nyysönen K, Salonen JT. Serum ferritin concentration is associated with plasma levels of cholesterol oxidation products in man. **Free Radic Biol Med** 2003;35:922-8.
167. Silvia WD, Biswas S, Uthappa S, Shetty P. Ferritin, a potent threat for acute myocardial infarction? **J Assoc Physicians India** 2003;51:947-50.
168. Aronow WS. Serum ferritin is not a risk factor for coronary artery disease in men and women aged \geq 62 years. **Am J Cardiol** 1993;72:347-8.
169. Frey GH, Krider DW. Serum ferritin and myocardial infarct. **W V Med J** 1994;90:13-5.
170. Solymoss BC, Marcil M, Gilfix BM, Gelinac F, Poitras AM, Campeau L. The place of ferritin among risk factors associated with coronary artery disease. **Coron Artery Dis** 1994;5:231-5.
171. Rauramaa R, Vaisanen S, Mercuri M, Rankinen T, Penttila I, Bond MG. Association of risk factors and body iron status to carotid atherosclerosis in middle-aged eastern Finnish men. **Eur Heart J** 1994;15:1020-7.
172. Duthie GG, Beattie JA, Arthur JR, Franklin M, Morrice PC, James WP. Blood antioxidants and indices of lipid peroxidation in subjects with angina pectoris. **Nutrition** 1994;10:313-6.
173. Liao Y, Cooper RS, McGee DL. Iron status and coronary heart disease: negative findings from the NHANES I epidemiologic follow-up study. **Am J Epidemiol** 1994;139:704-12.
174. Baer DM, Tekawa IS, Hurley LB. Iron stores are not associated with acute myocardial infarction. **Circulation** 1994;89:2915-8.

175. Reunanen A, Takkunen H, Knekt P, Seppanen R, Aromaa A. Body iron stores, dietary iron intake and coronary heart disease mortality. **J Intern Med** **1995**;238:223-30.
176. Aronow WS, Ahn C. Three-year follow-up shows no association of serum ferritin levels with incidence of new coronary events in 577 persons aged \geq 62 years. **Am J Cardiol** **1996**;78:678-9.
177. Manfro WC, Zago AJ, Caramori PR, Cruz R, Oliveira J, Kirschnick LS, et al. Does serum ferritin correlate with coronary angiography findings? **Int J Cardiol** **1999**;69:149-53.
178. Pilote L, Joseph L, Belisle P, Robinson K, Van Lente F, Tager IB. Iron stores and coronary artery disease: a clinical application of a method to incorporate measurement error of the exposure in a logistic regression model. **J Clin Epidemiol** **2000**;53:809-16.
179. Bozzini C, Girelli D, Tinazzi E, Olivieri O, Stranieri C, Bassi A, et al. Biochemical and genetic markers of iron status and the risk of coronary artery disease: an angiography-based study. **Clin Chem** **2002**;48:622-8.
180. Knuiman MW, Divitini ML, Olynyk JK, Cullen DJ, Bartholomew HC. Serum ferritin and cardiovascular disease: a 17-year follow-up study in Busselton, Western Australia. **Am J Epidemiol** **2003**;158:144-9.

Tabela 1. Classificação dos tipos de hemocromatose (adaptado de Beutler *et al* (52)).

Hemocromatose Hereditária

Hemocromatose Hereditária Clássica; *HFE* relacionada (Tipo 1)

Hemocromatose Juvenil (Tipo 2)

- a. Mutação no gene da hemojuvelina
- b. Mutação no gene da hepcidina

Deficiência do Receptor 2 da Transferrina (Tipo 3)

Deficiência de Ferroportina (Tipo 4)

Sobrecarga de ferro africana

Hemocromatose Secundária

Hereditárias

1. Talassemias
2. Deficiência de piruvato kinase
3. Anemia diseritropoiética congênita
4. Deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase
5. Esferocitose hereditária
6. Anemia sideroblástica (Deficiência de eALA-S)

Adquiridas

1. Anemia sideroblástica e outras anemias diseritropoiéticas
2. Qualquer anemia, exceto por deficiência de ferro, na qual sejam necessárias múltiplas transfusões

eALA-S: *erythroid aminolevulinic acid synthase*

Tabela 2. Estudos realizados no Brasil avaliando a frequência alélica e genotípica das mutações no gene *HFE* em diversos grupos populacionais.

Autor	N	Casos	C282Y	H63D
			Frequência alélica	
Agostinho <i>et al</i> , 1999 (158)	71 caucasianos	Membros de Hospital Universitário de Campinas	0.014	0.163
	85 afro-americanos	Indivíduos da Bahia	0.011	0.075
	91 mulatos (“mistos”)	Recém nascidos de Campinas	0.011	0.098
	75 índios Parakanã	Índios do Pará	0.000	0.000
Pereira <i>et al</i> , 2001 (159)	148 caucasianos	Doadores de sangue atendidos no banco de sangue da USP.	0.037	0.203
	101 afro-americanos		0.005	0.064
	146 mulatos (“mistos”)		0.007	0.130
Pericole <i>et al</i> , 2005 (160)	201 pacientes em Diálise	Diálise no Hospital Universitário de Campinas	0.017	0.124
	91 doadores de sangue	*não especifica etnia.	0.011	0.098
			Frequência genotípica	
Martinelli <i>et al</i> , 1999 (161)	278 doadores de sangue	Doadores + membros do Hospital Universitário de Ribeirão Preto *não especifica etnia.	CY/YY – 4%	HD/DD – 31.1%
	135 homens portadores de HCV		CY/YY – 4.4%	HD/DD – 23.7%
Martinelli <i>et al</i> , 2000 (162)	278 doadores de sangue	Doadores + membros do Hospital Universitário de Ribeirão Preto (mesmos dados estudo anterior)	CY/YY – 4%	HD/DD – 31.1%
	23 pacientes c/ porfiria cutânea		CY/YY – 17.4%	HD/DD – 30.4%
Bittencourt <i>et al</i> , 2002 (163)	15 pacientes com HH	Homens com HH	YY – 53%	HD – 7%
		*não especifica etnia.	CY – 7%	CY/HD – 0%
Cançado <i>et al</i> , 2006 (164)	35 pacientes com sobrecarga de ferro	*não especifica etnia.	YY – 14%	DD – 3%
			CY – 17%	HD – 29%
			CY/HD – 11%	CY/HD – 11%

Tabela 3. Freqüência dos sinais e sintomas em pacientes com diagnóstico de HH estabelecido previamente aos estudos de screening genético ou bioquímico. (adaptado de Yen *et al* (165))

Sinal ou Sintoma	Freqüência
Prévio ao diagnóstico	
Fadiga	46%
Artralgia	44%
Perda da libido	26%
Pele bronzeada	26%
No momento do diagnóstico clínico	
Alterações da função hepática	75%
Fraqueza e letargia	74%
Hiperpigmentação da pele	70%
Diabetes melito	48%
Impotência	45%
Artralgias	44%
Alterações no ECG	31%

Tabela 4. Descrição de alguns estudos epidemiológicos que suportam a hipótese do ferro na patogênese da doença cardiovascular.

Autores (referência)	Marcador do ferro corporal	Eventos cardíacos		Tamanho da amostra
		Tipo	Número	
Salonen <i>et al.</i> (120)	Ferritina	IM	51	1.931 H
Tuomainen <i>et al.</i> (122)	TfR/ferritina	IM	83	197 H
Tuomainen <i>et al.</i> (166)	Ferritina		99	669 H
Morrison <i>et al.</i> (139)	Ferro sérico	IM	164	9.920
Kiechl <i>et al.</i> (137)	Ferritina	AAC	?	847
Kiechl <i>et al.</i> (138)	Ferritina	DAC	375	414 H
				412 M
Klipstein-Grobusch <i>et al.</i> (136)	Ferritina	IM	60	172
Silvia <i>et al.</i> (167)	Ferritina	IM		145 H
Wolff <i>et al.</i> (140)	Ferritina	AAC	100	1.243 H
				1.200 M

Abreviações: H: homens, M: mulheres, TfR: receptor da transferrina, IM: infarto do miocárdio, DAC: doença arterial coronariana, AAC: aterosclerose da artéria carótida, ?: dado não disponível.

Tabela 5. Descrição de alguns estudos epidemiológicos que não suportam a hipótese do ferro na patogênese da doença cardiovascular.

Autores (referência)	Marcador do ferro corporal	Eventos cardíacos		Tamanho da amostra
		Tipo	Número	
Aronow (168)	Ferritina	DAC	74	171 H 406 M
Ascherio <i>et al.</i> (145)	Ingestão de ferro	DAC	844	44.933 H
Magnusson <i>et al.</i> (143)	Ferritina	IM	81	990 H
	CFP			1.046 M
Sempos <i>et al.</i> (142)	ST	IM	305, 712	1.345 H
				1.750 M
Frey e Krider (169)	Ferritina	DAC	32	298 H
Solymoss <i>et al.</i> (170)	Ferritina	DAC	195 H	225 H
			48 M	74 M
Rauramaa <i>et al.</i> (171)	Ferritina	DAC	82	206 H
Duthie <i>et al.</i> (172)	Ferritina	APE	25	225
Liao <i>et al.</i> (173)	ST	IM,	489,	1.827 H
		DAC	1151	2.410 M
Baer <i>et al.</i> (174)	ST	IM	1840	15.167 H
				31.765 M
Moore <i>et al.</i> (144)	Ferritina	AAC	365	730
Reunanen <i>et al.</i> (175)	ST	DAC	984	6.086 H
				6.102 M
Aronow and Ahn (176)	Ferritina	IM	235	171 H
				406 M
Manfroi <i>et al.</i> (177)	Ferritina	DAC	196	187 H
				120 M
Pilote <i>et al.</i> (178)	Ferritina	DAC	244	201 H
				183 M
Bozzini <i>et al.</i> (179)	Ferritina	DAC	546	849
Knuiman <i>et al.</i> (180)	Ferritina	DAC,	217,	1.612
		AVC	118	

Abreviações: H: homens, M: mulheres, CFP: capacidade ferropéxica, ST: saturação da transferrina, IM: infarto do miocárdio, DAC: doença arterial coronariana, APE: angina do peito estável, AAC: aterosclerose da artéria carótida, AVC: acidente vascular cerebral.

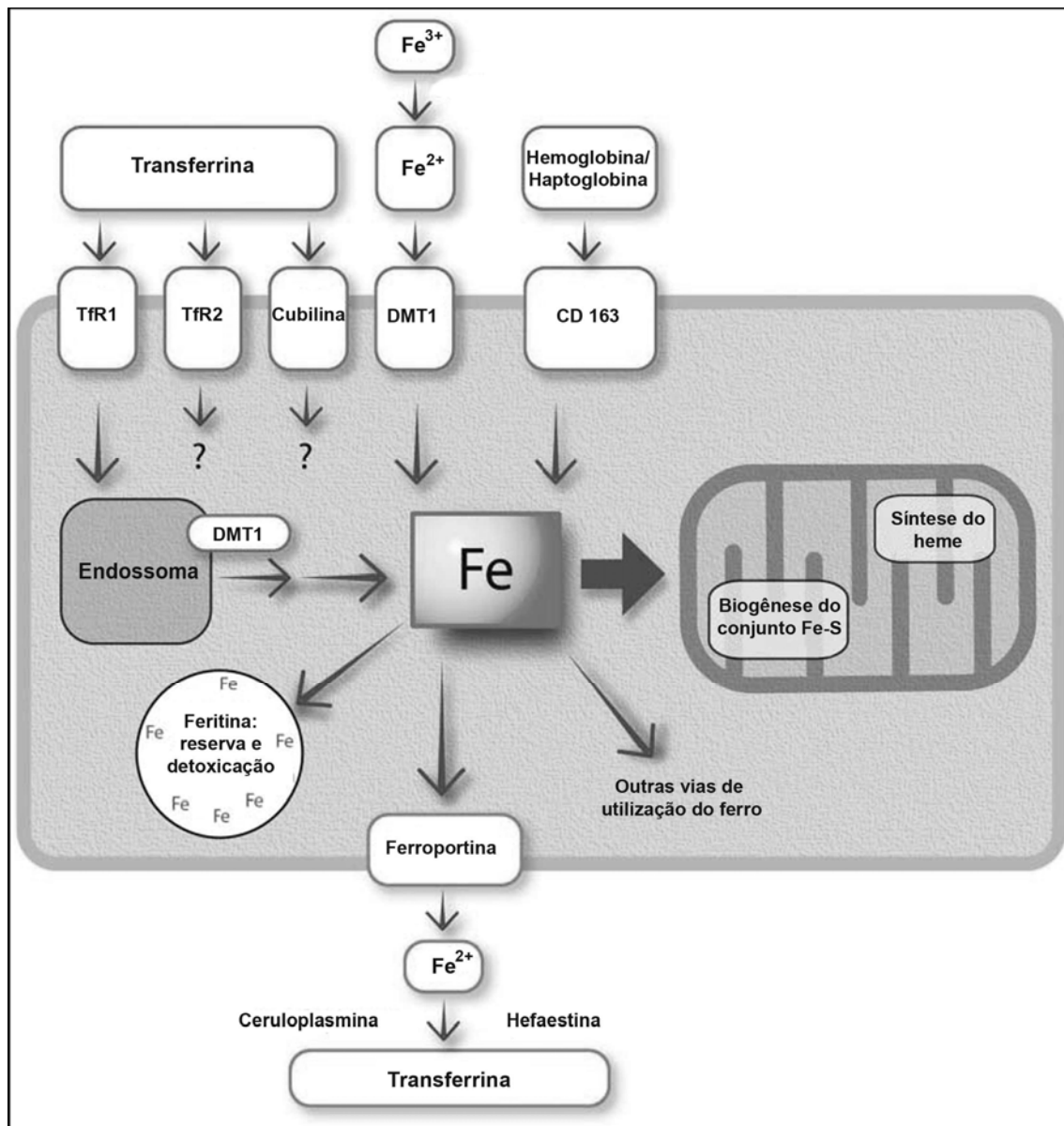


Figura 1. Metabolismo celular do ferro. O ferro pode ser captado na forma ligada a transferrina ou hemoglobina, ou ainda livre. No interior da célula é armazenado como ferritina ou participa de processos como a síntese do heme. A sua saída ocorre através da ferroportina associada a hefaestina ou ceruloplasmina. (adaptado de Hentze *et al.* (7)).

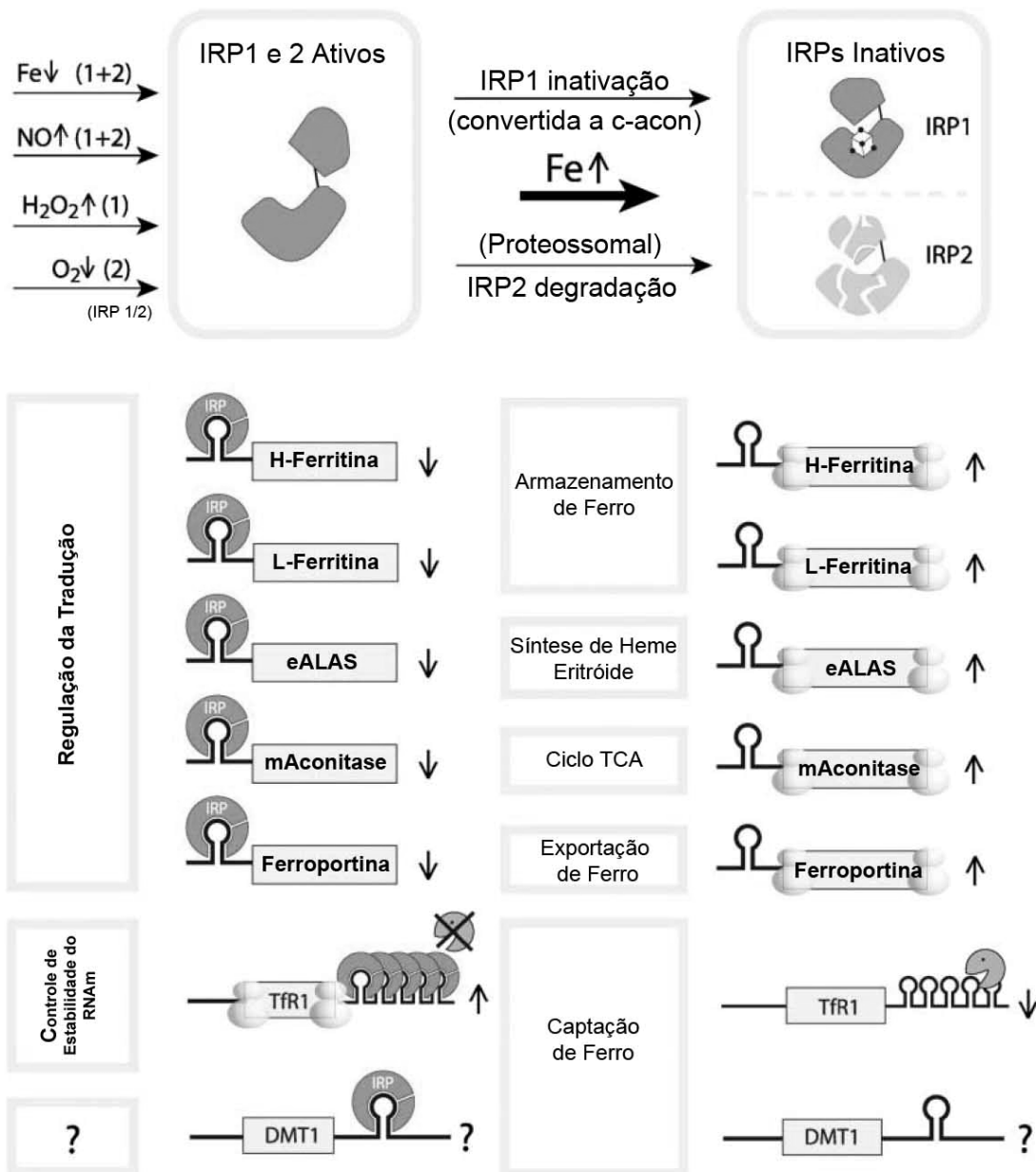


Figura 2. Sistema IRP/IRE e o controle da homeostase celular do ferro. O *pool* de ferro celular regula a ligação dos IRP1 e IRP2 aos IREs. **Baixos níveis de ferro** favorecem a ligação das IRPs nas regiões 5' do RNAm (ferritina, ferroportina e enzimas da biossíntese do heme) suprimindo a sua tradução e conseqüentemente o armazenamento de ferro (↓ ferritina), síntese do heme pelos eritrócitos (↓ enzimas da biossíntese do heme) e exportação do ferro (↓ ferroportina). Na região 3' do RNAm do Tfr1 a ligação dos IRPs aumenta a sua meia-vida e portanto a síntese dos Tfr1. Isso leva a uma maior captação de

ferro ligado a transferrina e um aumento no *pool* de ferro celular. Em condições de **excesso de ferro**, a IRP1 is convertida a uma aconitase citosólica (c-acon) inibindo a sua ligação aos IREs, enquanto a IRP2 sofre degradação proteossomal, isso libera os IREs nas regiões 5' do RNAm favorecendo a tradução do RNAm da ferritina, da ferroportina e das enzimas da biossíntese do heme. Além disso, as IREs na região 3' do RNAm do TfR1 não encontram-se ligadas as IRPs e sofrem rápida degradação, isto diminui a captação de ferro ligado a transferrina (adaptado de Hentze *et al.* (7)).

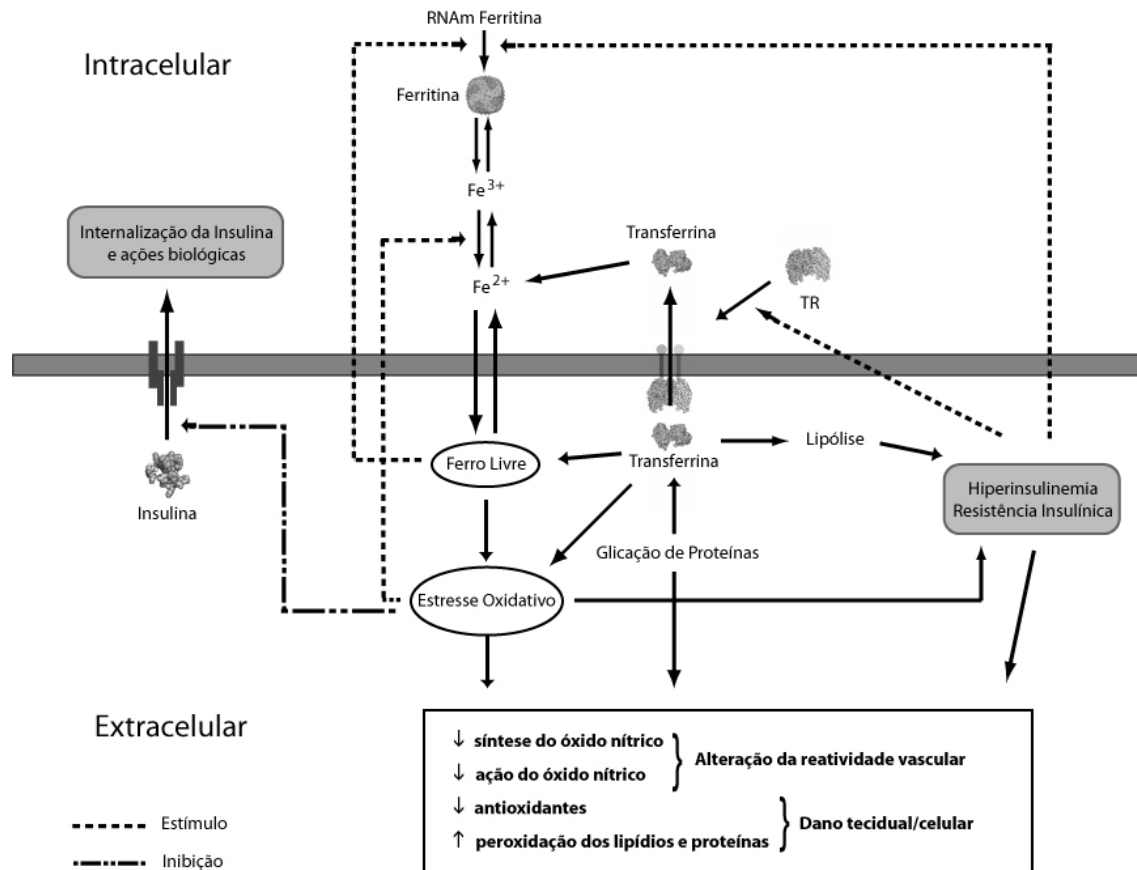


Figura 3. Representação dos mecanismos através dos quais o metabolismo do ferro correlaciona-se com a ação da insulina e o estresse oxidativo: (1) A insulina estimula a síntese de ferritina e facilita a captação de ferro pela célula através da translocação do TfR para a superfície celular. (2) O ferro é um potente pró-oxidante, causando inibição das ações da insulina e hiperinsulinemia, da mesma forma a transferrina através do aumento da lipólise reduz a ação da insulina. (3) Além disso, o aumento do estresse oxidativo também leva a liberação do ferro armazenado pela ferritina, causa dano celular e altera a reatividade vascular. (4) Finalmente, a glicação protéica do DM amplifica a liberação do ferro ligado a transferrina, aumenta o estresse oxidativo e diretamente causa dano tecidual (modificado de Fernandez-Real *et al* (3))

Objetivo Geral

Avaliar a prevalência de mutações no gene *HFE* em uma amostra de pacientes com DM tipo 2 e a sua relação com a presença das complicações crônicas do DM.

Objetivos Específicos

1. Comparar a prevalência de mutações (C282Y e H63D) no gene *HFE* entre pacientes com e sem DM tipo 2.
2. Avaliar a associação entre as mutações (C282Y e H63D) no gene *HFE* e a presença de ND.
3. Avaliar a associação entre as mutações (C282Y e H63D) no gene *HFE* e a presença de RD.
4. Avaliar a associação entre as mutações (C282Y e H63D) no gene *HFE* e a presença de doença cardiovascular.

**PREVALENCE OF MUTATIONS IN *HFE* GENE IN PATIENTS WITH TYPE 2
DIABETES MELLITUS AND THE RISK OF DIABETIC CHRONIC
COMPLICATIONS**

Abbreviated title: Mutations in *HFE* gene and type 2 diabetes.

Máikel L. Colli, MD¹

Jorge L. Gross MD, PhD¹

Luís H. Canani MD, PhD¹

¹Endocrine Division, Hospital de Clinicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

Corresponding Address:

Luís H. Canani, Serviço de Endocrinologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Av. Ramiro Barcelos 2350, Prédio 12 - 4º andar, 900035-003 Porto Alegre, RS, Brazil.

Phone: +55 51 2101-8127. Fax: + 55 51 2101 8777

E-mail: luiscanani@yahoo.com

Words count: 3090

Tables: 2

Key words: diabetes mellitus, genetic predisposition, hemochromatosis, *HFE* gene.

ABSTRACT

OBJECTIVE: To evaluate the frequency of mutations in the *HFE* gene (C282Y and H63D) in type 2 diabetes mellitus (DM) patients and their relationship with diabetic chronic complications.

RESEARCH DESIGN AND METHODS: A case-control study with 723 subjects was performed. All diabetic subjects (n = 519) were submitted to a clinical and laboratorial evaluation. Diabetic retinopathy (DR) was evaluated by an ophthalmologist. Diabetic nephropathy (DN) was categorized according to urinary albumin excretion in normoalbuminuria (n = 247), microalbuminuria (n = 68), macroalbuminuria (n = 70), or the presence of end-stage renal disease (ESRD; n = 134). Ischemic heart disease was evaluated in 381 patients. Data available for blood donors (n = 204) were limited to age, sex, absence of previous diagnosis of diabetes and/or normal fasting plasma glucose. The mutations C282Y and H63D in *HFE* gene were genotyped based on PCR protocols and digested with the restriction enzymes *SnaBI* (C282Y) and *MboI* (H63D).

RESULTS: The genotypes HD/DD had an odds ratio (OR) of 1.7 (CI 95%: 1.2-2.6) for diagnosis of type 2 DM. No difference in relation to mutation C282Y was found (OR = 0.7 [CI 95%: 0.4-1.4]). In respect to the chronic complications, there was no difference in the prevalence of DR, DN or ischemic heart disease among the different genotypes.

CONCLUSIONS: Our data suggest that mutation H63D in *HFE* gene is associated with a higher risk of type 2 DM, but both mutations studied (C282Y and H63D) appear not to confer risk of diabetic chronic complications.

INTRODUCTION

Hereditary hemochromatosis (HH) is an autosomal recessive iron metabolism disorder in which there is excessive absorption of this element compared with the amount needed by the body. Accumulation is progressive and, consequently, it compromises several organs (liver, pancreas, pituitary gland, heart and joints). Mutations in the *HFE* gene are responsible for most cases of HH in European descendants. (1). The precise mechanism by which *HFE* gene regulates the iron metabolism has not yet been fully explained. There are evidence from experimental studies that protein HFE binds to β 2-microglobulin favoring cell uptake of transferrin-bound iron, and it also modulates the expression of hepcidin, the “iron-regulating hormone” (2). The “hormone” hepcidin regulates iron absorption and macrophage iron release (2). Two mutations in *HFE* gene are mainly responsible for HH: C282Y (substitution of tyrosine by cysteine in position 282) and H63D (substitution of histidine by aspartic acid in position 63) (1). Most patients with HH are homozygotes for mutation C282Y and only 1-2 % are compound heterozygotes (C282Y/H63D) (3).

Diabetes mellitus (DM) develops in 10-40 % of patients with HH. This depends mainly on how the diagnosis is made (genotypic, phenotypic or laboratory) (4). Therefore a higher prevalence of mutations in *HFE* gene could be expected among patients with type 2 DM. However, this issue is still controversial. Some authors report a higher prevalence of mutations in *HFE* among patients with type 2 DM (5), and others do not show this association (6). Moreover, studies published recently have correlated changes in iron metabolism with the development of type 2 DM (7) and its complications (8). Mutations in the HH gene have been described as associated with diabetic nephropathy (DN) and proliferative diabetic retinopathy (DR) in Caucasian patients with type 2 DM (9, 10).

The aim of this study was to evaluate the prevalence of HH mutations (C282Y and H63D) in white patients with type 2 DM from Southern Brazil and to determine whether these mutations were associated with diabetic complications.

RESEARCH DESIGN AND METHODS

A case-control study was performed based on 723 white subjects. Patients with type 2 DM (n = 519) were identified from a multicentric study that started recruiting patients in 2002 in the Brazilian state of Rio Grande do Sul which has an estimated area of 281,748 square kilometers (11). That project aims at studying risk factors for chronic complications of DM in a state's representative sample of patients with type 2 DM. It includes five centers located at general hospitals, namely Grupo Hospitalar Nossa Senhora da Conceição, Hospital São Vicente de Paulo, Hospital Universitário de Rio Grande, Fundação Universitária de Rio Grande and Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Type 2 DM was defined by diagnosis of diabetes after the age of 35 years with no use of insulin during the first five years after diagnosis. DNAs from non-diabetic white blood donors were identified from a central blood bank and were used as controls (n = 204). This blood bank concentrates donations from the entire state. The ethnicity was self defined by the subject. The white individuals in Rio Grande do Sul are descended mainly from Portuguese, Spanish, Italian and German immigrants (12).

Clinical evaluation

General evaluation

The clinical evaluation of patients with type 2 DM included measuring weight and height on an anthropometric scale (without shoes and in light clothes); body mass index (BMI) was calculated (weight in kilograms divided by height in meters square), and mean of two measurements of systemic arterial blood pressure (BP), after a 5-minute interval, in

a seated position, with a mercury column sphygmomanometer (phase I and V of the Korotkoff sounds). Hypertension was defined as BP \geq 140/90 mmHg, and/or use of antihypertensive medication.

Evaluation of diabetic chronic complications

DR was evaluated by an ophthalmologist who performed direct funduscopy, and was classified as absent, non-proliferative (microaneurysms, hard exudates, retinal hemorrhages, and intraretinal microvascular abnormalities), or proliferative (newly formed blood vessels and/or growth of fibrous tissue into the vitreous cavity) according to the criteria of the American Academy of Ophthalmology (AAO) (13). Patients with panphotocoagulation were classified as presenting proliferative DR.

DN was categorized according to urinary albumin excretion (UAE; three samples, 6 months apart, without ACE inhibitors or angiotensin type I receptor blockers for at least 1 week) as normoalbuminuria (n = 247), microalbuminuria (n = 68), macroalbuminuria (n = 70), or the presence of end-stage renal disease (ESRD; n = 134). Two different types of urine collections were used to define DN: 24 h timed urine collections or random spot urine samples (11). The cutoff values used to define the stages of renal involvement followed American Diabetes Association (ADA) recommendations for timed urine collections ($\mu\text{g}/\text{min}$). For spot samples, urine concentration (mg/l) cutoffs were used as previously validated in our Division (14) as normoalbuminuria (UAE $<20 \mu\text{g}/\text{min}$ or $<17\text{mg}/\text{l}$), microalbuminuria (UAE 20–199 $\mu\text{g}/\text{min}$ or 17–174 mg/l), and macroalbuminuria (UAE $>200 \mu\text{g}/\text{min}$ or $>174 \text{mg}/\text{l}$).

Ischemic heart disease was evaluated as previously described (15) in 381 patients. Briefly, ischemic heart disease was established in the presence of angina or possible infarct according to the World Health Organization (WHO) Cardiovascular Questionnaire, and/or the presence of resting ECG abnormalities (Minnesota Code: Q and QS patterns (1.1-2,

1.3); S-T junction (J) and segment depression (4.1-4); T wave items (5.1-3) and complete left bundle block (7.1)), and/or the presence of perfusion abnormalities (fixed or variable) upon myocardial scintigraphy at rest and after dipyridamole administration.

Data available on the blood donors were limited to age, sex and absence of previous diagnosis of diabetes and/or fasting plasma glucose <100 mg/dl.

Laboratory evaluation

The laboratory evaluation included measuring UAE by immunoturbidimetry (Sera-Pak immunomicroalbuminuria; Bayer, Tarrytown, NY; intra- and interassay coefficients of variation: 4.5 and 11.0%, respectively); A1c test by an ion-exchange high-performance liquid chromatography procedure (Merck-Hitachi L-9100 glycosylated hemoglobin analyzer, reference range 2.7–4.3%; Merck, Darmstadt, Germany); glucose using the glucose oxidase method; total cholesterol, HDL and triglycerides by enzymatic methods; creatinine by the Jaffé reaction, and the estimated glomerular filtration rate (eGFR) was calculated by the abbreviated Modification of Diet in Renal Disease Study formula (16).

Molecular analysis

Total DNA was extracted from peripheral blood leucocytes. All participants were genotyped by polymerase chain reaction (PCR) with specific primers and conditions for mutation C282Y (17) and H63D (1). The material of this PCR was then digested with the restriction enzymes *SnaBI* (C282Y) and *MboI* (H63D). The products resulting from cleavage with the restriction enzymes were separated into agarose gels at 2.5%, stained with ethidium bromide, according to the size of each fragment to be studied.

Statistical analysis

The χ^2 test with Yates's correction was used to compare the frequency of alleles and genotypes among the groups. The continuous data were compared using the Student t test and categorical data with the χ^2 test. Variables without normal distribution (UAE, creatinine

and triglycerides) were log-transformed for analysis. Continuous data were presented as mean \pm standard deviation (SD) or median (range). The Hardy–Weinberg equilibrium was examined using the χ^2 test. Due to the small prevalence of the H63D and C282Y polymorphisms the major genotypes were compared to the other two grouped (HH vs. HD/DD and CC vs. CY/YY). The population attributable risk was calculated using the following equation: $100 \times [\text{prevalence (OR - 1)}/\text{prevalence (OR - 1) + 1}]$. The magnitude of effect was assessed through the odds ratio (OR). (18). A two-sided P value < 0.05 was considered statistically significant. All statistical analyses were performed using the SPSS version 13.0 (SPSS, Chicago, IL, USA).

RESULTS

The proportion of female patients in the type 2 DM group (50.3%) was not different than the blood donors group (48.5%, $P = 0.69$). Type 2 DM patients were older (60.3 ± 9.9 years) than the blood donors subjects (52.6 ± 8.8 years, $P < 0.001$). The genotype frequency did not deviate from the Hardy-Weinberg equilibrium in the control group for both mutations. However, in the type 2 DM group, the frequency of homozygotes for mutation C282Y (2 patients) was higher than expected (CC/CY/YY – 472/27/02, $P = 0.023$), while the mutation H63D remained at the Hardy-Weinberg equilibrium (HH/HD/DD – 355/151/13, $P = 0.51$). The distribution of *HFE* genotypes did not differ statistically among sexes in both groups.

The HD/DD genotypes (H63D) were more prevalent in the group of patients with type 2 DM (OR = 1.7 [95% CI: 1.2-2.6]) (Table 1). The frequency of D allele was 0.17 in patients with type 2 DM compared to 0.10 in the control group ($P = 0.003$). Considering a 21.1% frequency of risk genotypes combined (HD/DD) in the blood donors that was

suppose to represent the general population, the attribute risk for this mutation to predispose to DM in the white Brazilian population is 12.9%. Regarding the C282Y polymorphism and compound heterozygotes (4 patients in both groups) no differences were found between diabetic and nondiabetic subjects.

Table 2 describes the clinical and laboratory characteristics of the group of patients with type 2 DM according to the H63D mutation, since in the present study this mutation was associated with DM. Patients with D allele (HD/DD) had higher fasting plasma glucose (9.2 ± 3.7) than patient without it (HH) (10.1 ± 4.4 , $P = 0.04$), however there was no difference between groups in the A1c test (6.9 ± 2.1 vs 7.0 ± 2.2 , respectively, $P = 0.59$). Males with D allele (HD/DD) have lower waist circumference (99.7 ± 10.3) as compared to males without this allele (HH) (95.8 ± 10.8 , $P = 0.05$). Regarding the other variables the two groups were not different.

The prevalence of DN, DR and ischemic heart disease was not different between those carrying the D allele and those without it (Table 2). Likewise, there were no differences concerning the frequency of diabetic chronic complications and the C282Y mutation (data not shown). Due to different clinical manifestation of HH among men and women, a stratified analysis was performed by gender. There were no differences in the frequency of chronic complications regarding genotypes (data not shown).

CONCLUSIONS

This is the first study to address the role of HH genes in DM in the Brazilian population. In the present study, the H63D polymorphism was associated with type 2 DM in the Brazilian population of European descent. However, these two mutations, H63D and

C282Y, in HH genes are not associated with micro- and macrovascular complications of DM.

The H63D mutation was associated with an OR of 1.7 of presenting type 2 DM. On the other hand no increase risk was observed for the C282Y mutation. These results are in accordance with those found in a recent meta-analysis of 17 studies (4245 patients with type 2 DM and 5982 controls) that did not find an association between mutation C282Y and the risk of type 2 DM (OR = 1.0 [95% CI: 0.9 –1.2]) but showed a moderately increased risk in the carriers of mutation H63D (OR = 1.1 [95% CI: 1.0 –1.2]) (19). This meta-analysis included white subjects basically from the Europe. In Brazil, there is great genetic heterogeneity across the country (20). However, there is less ethnic miscegenation in the south compared to other regions (20). The Brazilian white individuals represent 83.6% of the population from this region and they are of European descent, mainly from Germany, Portugal, Italy and Spain (21). The C282Y polymorphism has a great ethnic influence, being higher among North European descendents and lower among Asian and African descendents. The frequency of C282Y polymorphism in the present study was similar to the studies with white Europeans descendents (19), supporting the idea that the self-definition of ethnic group used in the present study was appropriate. The H63D polymorphism has a less significant geographic variation, and our data are again similar to those of the European populations.

Previous studies reported an association between the *HFE* mutation and the microvascular complications of DM such as DN (9) and DR (10). Moczulski et al found a higher prevalence of DN among those with the H63D mutation (OR = 1.8 [95% CI: 1.2–2.8]) (9). Peterlin *et al* reported an association of proliferative DR and the C282Y mutation (OR = 3.0 [95% CI: 1.2–8.0]) (10). In the present study no association was found with either of complications. One explanation for these discrepancies could be due to

characteristics of patients included. For instance, the prevalence of arterial hypertension and metabolic control were distinct in the Moczulski et al. study and ours and this could lead to different results. Regarding DR, the subjects included in Peterlin et al. study had a longer duration of DM compared to those included in the present study (18.2 vs. 14.3 years, $P < 0.001$). DM duration is a well known risk factor for developing DR. An alternative explanation could be due to other genetic environmental interactions. Qi *et al* showed that the risk for developing DM associated with *HFE* gene mutations is modulated by the amount of heme iron in the diet (19). Those who ingested higher amounts of heme iron were at greater risk. Therefore, local nutritional habits could explain some of the discordant results.

The relationship between *HFE* mutations and cardiovascular disease is a controversial issue. Some prospective studies suggested a greater risk of cardiovascular events among people heterozygote for C282Y mutation (22). However, others (23) failed to show the same relationship. A recent meta-analysis did not confirm the association of either mutations, C282Y or H63D, and cardiovascular disease (24). Most of the studies had a small number of subjects with type 2 DM. The present study suggests that these mutations do not have a major effect on cardiovascular disease in patients with type 2 DM.

The mechanism by which the iron metabolism could be associated with higher DM susceptibility has not yet been fully explained. None of the subjects in the present study have clinically overt HH. The predisposition to DM might be due to the high number of DMT1 (divalent metal transporter 1) in the beta cells. Iron flux through this pathway and particular susceptibility of beta cells to oxidative damage leads to apoptosis with a consequent reduction of the secretory capacity of insulin (4). Furthermore, the iron overload also reduces the liver sensitivity to insulin (25). Some authors suggest that the presence of mutations in *HFE* gene favor the development of type 2 DM with less degree of

body weight excess. Dubois-Laforgue *et al* described a lower prevalence of obesity in subjects with type 2 DM and H63D mutation (26). Likewise, in the present study the H63D mutation was associated with a lower waist circumference in males. The D allele was also associated with higher fasting plasma glucose but not with higher A1c test values.

The surplus number of homozygotes for mutation C282Y found in the present study which caused a disturb in the Hardy-Weinberg equilibrium was also shown in other populations (27, 28). One possible explanation could be the higher tendency of individuals living in the same demographic area to be related. This is not likely to have occurred in the present study, because of its multicentric design. Genotyping errors are unlikely, since the samples with the mutations were confirmed in duplicate. Most probably, this is a statistical finding since the significance comes from the excess of only one subject.

Case-control studies are more likely to have sampling biases, and to minimize them, we choose to include cases from several centers all over the state of Rio Grande do Sul. In the same way the controls were selected from a blood bank that received donations from the entire state. In this way a representative and similar sample of cases and controls was obtained.

In conclusion, there is an association between the H63D mutation of *HFE* gene and type 2 DM. However, this mutation did not increase the risk of diabetic chronic complications. Future studies should evaluate if interventions on the amount of heme iron in subjects with mutations in the *HFE* gene could change the risk of type 2 DM development. This could indicate a role of diet manipulation in these patients. Moreover, other genetic and environment factors that modify iron metabolism need to be analyzed in subjects with type 2 DM.

Acknowledgments: this study was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundo de Incentivo à Pesquisa (FIPE) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. LHC is recipient of a Grant from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

References

1. Feder JN, Gnirke A, Thomas W, Tsuchihashi Z, Ruddy DA, Basava A, Dormishian F, Domingo R, Jr., Ellis MC, Fullan A, Hinton LM, Jones NL, Kimmel BE, Kronmal GS, Lauer P, Lee VK, Loeb DB, Mapa FA, McClelland E, Meyer NC, Mintier GA, Moeller N, Moore T, Morikang E, Prass CE, Quintana L, Starnes SM, Schatzman RC, Brunke KJ, Drayna DT, Risch NJ, Bacon BR and Wolff RK: A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nat Genet* 13:399-408, 1996
2. Pietrangelo A: Hereditary hemochromatosis. *Annu Rev Nutr* 26:251-270, 2006
3. Rochette J, Pointon JJ, Fisher CA, Perera G, Arambepola M, Arichchi DS, De Silva S, Vandwalle JL, Monti JP, Old JM, Merryweather-Clarke AT, Weatherall DJ and Robson KJ: Multicentric origin of hemochromatosis gene (*HFE*) mutations. *Am J Hum Genet* 64:1056-1062, 1999
4. McClain DA, Abraham D, Rogers J, Brady R, Gault P, Ajioka R and Kushner JP: High prevalence of abnormal glucose homeostasis secondary to decreased insulin secretion in individuals with hereditary haemochromatosis. *Diabetologia* 49:1661-1669, 2006
5. Conte D, Manachino D, Colli A, Guala A, Aimo G, Andreoletti M, Corsetti M and Fraquelli M: Prevalence of genetic hemochromatosis in a cohort of Italian patients with diabetes mellitus. *Ann Intern Med* 128:370-373, 1998
6. Halsall DJ, McFarlane I, Luan J, Cox TM and Wareham NJ: Typical type 2 diabetes mellitus and *HFE* gene mutations: a population-based case - control study. *Hum Mol Genet* 12:1361-1365, 2003
7. Ford ES and Cogswell ME: Diabetes and serum ferritin concentration among U.S. adults. *Diabetes Care* 22:1978-1983, 1999
8. Loebstein R, Lehotay DC, Luo X, Bartfay W, Tyler B and Sher GD: Diabetic nephropathy in hypertransfused patients with beta-thalassemia. The role of oxidative stress. *Diabetes Care* 21:1306-1309, 1998

9. Moczulski DK, Grzeszczak W and Gawlik B: Role of hemochromatosis C282Y and H63D mutations in *HFE* gene in development of type 2 diabetes and diabetic nephropathy. *Diabetes Care* 24:1187-1191, 2001
10. Peterlin B, Globocnik Petrovic M, Makuc J, Hawlina M and Petrovic D: A hemochromatosis-causing mutation C282Y is a risk factor for proliferative diabetic retinopathy in Caucasians with type 2 diabetes. *J Hum Genet* 48:646-649, 2003
11. Canani LH, Capp C, Ng DP, Choo SG, Maia AL, Nabinger GB, Santos K, Crispim D, Roisenberg I, Krolewski AS and Gross JL: The fatty acid-binding protein-2 A54T polymorphism is associated with renal disease in patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 54:3326-3330, 2005
12. Crispim D, Canani LH, Gross JL, Carlessi RM, Tschiedel B, Souto KE and Roisenberg I: The G1888A variant in the mitochondrial 16S rRNA gene may be associated with Type 2 diabetes in Caucasian-Brazilian patients from southern Brazil. *Diabet Med* 22:1683-1689, 2005
13. Wilkinson CP, Ferris FL, 3rd, Klein RE, Lee PP, Agardh CD, Davis M, Dills D, Kampik A, Pararajasegaram R and Verdaguer JT: Proposed international clinical diabetic retinopathy and diabetic macular edema disease severity scales. *Ophthalmology* 110:1677-1682, 2003
14. Zelmanovitz T, Gross JL, Oliveira JR, Paggi A, Tatsch M and Azevedo MJ: The receiver operating characteristics curve in the evaluation of a random urine specimen as a screening test for diabetic nephropathy. *Diabetes Care* 20:516-519, 1997
15. Costa LA, Canani LH, Lisboa HR, Tres GS and Gross JL: Aggregation of features of the metabolic syndrome is associated with increased prevalence of chronic complications in Type 2 diabetes. *Diabet Med* 21:252-255, 2004

16. Levey AS, Bosch JP, Lewis JB, Greene T, Rogers N and Roth D: A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. *Ann Intern Med* 130:461-470, 1999
17. Jeffrey GP, Chakrabarti S, Hegele RA and Adams PC: Polymorphism in intron 4 of *HFE* may cause overestimation of C282Y homozygote prevalence in haemochromatosis. *Nat Genet* 22:325-326, 1999
18. Rockhill B, Newman B and Weinberg C: Use and misuse of population attributable fractions. *Am J Public Health* 88:15-19, 1998
19. Qi L, Meigs J, Manson JE, Ma J, Hunter D, Rifai N and Hu FB: *HFE* Genetic Variability, Body Iron Stores, and the Risk of Type 2 Diabetes in U.S. Women. *Diabetes* 54:3567-3572, 2005
20. Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM and Pena SD: Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:177-182, 2003
21. IBGE: *Tendências demográficas no período de 1940 a 2000*. Rio de Janeiro, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE, 2007
22. Tuomainen TP, Kontula K, Nyysönen K, Lakka TA, Helio T and Salonen JT: Increased risk of acute myocardial infarction in carriers of the hemochromatosis gene Cys282Tyr mutation : a prospective cohort study in men in eastern Finland. *Circulation* 100:1274-1279, 1999
23. Campbell S, George DK, Robb SD, Spooner R, McDonagh TA, Dargie HJ and Mills PR: The prevalence of haemochromatosis gene mutations in the West of Scotland and their relation to ischaemic heart disease. *Heart* 89:1023-1026, 2003

24. van der AD, Peeters PH, Grobbee DE, Roest M, Marx JJ, Voorbij HM and van der Schouw YT: *HFE* mutations and risk of coronary heart disease in middle-aged women. *Eur J Clin Invest* 36:682-690, 2006
25. Dmochowski K, Finegood DT, Francombe W, Tyler B and Zinman B: Factors determining glucose tolerance in patients with thalassemia major. *J Clin Endocrinol Metab* 77:478-483, 1993
26. Dubois-Laforgue D, Caillat-Zucman S, Boitard C and Timsit J: Clinical characteristics of type 2 diabetes in patients with mutations of *HFE*. *Diabetes Metab* 26:65-68, 2000
27. Ellervik C, Mandrup-Poulsen T, Nordestgaard BG, Larsen LE, Appleyard M, Frandsen M, Petersen P, Schlichting P, Saermark T, Tybjaerg-Hansen A and Birgens H: Prevalence of hereditary haemochromatosis in late-onset type 1 diabetes mellitus: a retrospective study. *Lancet* 358:1405-1409, 2001
28. Beutler E, Felitti VJ, Koziol JA, Ho NJ and Gelbart T: Penetrance of 845G--> A (C282Y) *HFE* hereditary haemochromatosis mutation in the USA. *Lancet* 359:211-218, 2002

Table 1. Frequency of mutations H63D and C282Y in the *HFE* gene among patients with and without type 2 diabetes mellitus.

<i>HFE</i> mutation	Blood Donors n (%)	Type 2 DM n (%)	OR (95% CI)	P
H63D				
Genotype				
HH	161 (78.9)	355 (68.4)	1	
HD/DD	43 (21.1)	164 (31.6)	1.7 (1.2-2.6)	0.006
Alleles				
H	365	861		
D	43	177		0.003
C282Y				
Genotype				
CC	185 (92.0)	472 (94.2)	1	
CY/YY	16 (8.0)	29 (5.8)	0.7 (0.4-1.4)	0.373
Alleles				
C	386	971		
Y	16	31		0.503

DM = diabetes mellitus, OR = odds ratio

Table 2. Characteristics of patients with type 2 diabetes mellitus.

	All (n=519)	Mutation H63D		P*
		HH (n=355)	HD/HD (n=164)	
Age (years)	60.3 ± 9.9	60.5 ± 10.1	60.1 ± 9.6	0.73
Male Sex - n (%)	258 (49.7)	175 (49.3)	83 (50.6)	0.85
Diabetes duration (years)	14.3 ± 8.1	14.4 ± 8.3	14.0 ± 7.8	0.61
Age at diagnosis (years)	46.4 ± 10.2	46.3 ± 10.3	46.6 ± 10.0	0.82
Waist (cm)				
Male	98.6 ± 10.6	99.7 ± 10.3	95.8 ± 10.8	0.05
Female	97.4 ± 12.0	97.9 ± 12.2	96.3 ± 11.6	0.47
BMI (kg/m ²)	28.5 ± 4.8	28.6 ± 4.8	28.1 ± 4.8	0.29
Systolic blood pressure (mmHg)	144.9 ± 24.2	145.1 ± 24.2	144.5 ± 24.3	0.80
Diastolic blood pressure (mmHg)	86.1 ± 13.1	86.0 ± 12.6	86.5 ± 14.3	0.69
Hypertension n (%)	376 (72.4)	257 (72.4)	119 (72.6)	0.93
Glucose (mmol/L)	9.5 ± 4.0	9.2 ± 3.7	10.1 ± 4.4	0.04
A1 _c test (%)	7.0 ± 2.1	6.9 ± 2.1	7.0 ± 2.2	0.59
Total Cholesterol (mmol/L)	5.4 ± 1.2	5.3 ± 1.2	5.5 ± 1.1	0.21
LDL-C (mmol/L)	3.3 ± 1.2	3.4 ± 1.2	3.2 ± 1.1	0.20
HDL-C (mmol/L)	1.1 ± 0.3	1.1 ± 0.3	1.1 ± 0.3	0.57
Triglycerides (mmol/L) †	1.7 (0.2-16.4)	1.7 (0.5-14.3)	1.8 (0.5-10.1)	0.20
UAE (µg/min) †	11.3 (0.1-10,100)	7.4 (0.1-10,100)	10.1 (1.0-7,680)	0.23
Creatinine (µmol/L) †	76.3 (38.1-1,060)	76.3 (38.1-1,060)	76.3 (45.8-793.1)	0.99
eGFR (ml/min/1.73m ²)	67.2 ± 31.1	67.1 ± 31.1	67.4 ± 31.3	0.94
Diabetic nephropathy n=519				
Microalbuminuric n (%)	68 (13.1)	41 (11.5)	27 (16.5)	0.18
Macroalbuminuric/ESRD n (%)	204 (39.3)	137 (38.6)	67 (40.8)	
Diabetic retinopathy n=519				
Non-proliferative n (%)	165 (31.8)	118 (33.2)	47 (28.7)	0.57
Proliferative n (%)	128 (24.7)	85 (23.9)	43 (26.2)	
Ischemic heart disease n=381 (%)	42.5	40.8	46.5	0.31

* P for HH vs HD/DD. † median (range). BMI = body mass index; UAE = urinary albumin

excretion; eGFR = estimated glomerular filtration rate