

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS  
MÉDICAS

**DO LABORATÓRIO AO MANEJO CLÍNICO: A HEMOCROMATOSE  
HEREDITÁRIA SOB AS ÓTICAS EPIDEMIOLÓGICA E EXPERIMENTAL.**

Nathalia Kersting dos Santos

**Porto Alegre**

**2022**

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

**DO LABORATÓRIO AO MANEJO CLÍNICO: A HEMOCROMATOSE  
HEREDITÁRIA SOB AS ÓTICAS EPIDEMIOLÓGICA E EXPERIMENTAL.**

Nathalia Kersting dos Santos

Orientação: Profa. Dra. Sandra Leistner Segal

Co-orientação: Prof. Dr. Tor Gunnar Hugo Onsten

Tese apresentada como requisito parcial  
para obtenção do título de Doutor em  
Medicina: Ciências Médicas, da  
Universidade Federal do Rio Grande do  
Sul, Programa de Pós-Graduação em  
Medicina: Ciências Médicas.

Porto Alegre

2022

### CIP - Catalogação na Publicação

dos Santos, Nathalia Kersting  
DO LABORATÓRIO AO MANEJO CLÍNICO: A HEMOCROMATOSE  
HEREDITÁRIA SOB AS ÓTICAS EPIDEMIOLÓGICA E  
EXPERIMENTAL. / Nathalia Kersting dos Santos. --  
2022.

88 f.

Orientadora: Sandra Leistner Segal.

Coorientador: Tor Gunnar Hugo Onsten.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de  
Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto  
Alegre, BR-RS, 2022.

1. Hyperferritinemia. 2. Hemochromatosis. 3.  
Diagnosis. 4. Molecular Biology. 5. Circulating  
MicroRNA. I. Segal, Sandra Leistner, orient. II.  
Onsten, Tor Gunnar Hugo, coorient. III. Título.

## AGRADECIMENTOS

Após mais de 10 anos trabalhando com pesquisa, sendo os últimos quatro dedicados ao doutorado, aquilo que ficou mais claro foi que não caminhamos sozinhos. Esta tese é fruto de muito trabalho em equipe. Aqui ficam os meus sinceros agradecimentos.

À minha orientadora Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Sandra Leistner Segal por todos os ensinamentos, por acompanhar o meu crescimento e me guiar sempre quando foi preciso.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Tor Gunnar Hugo Onsten, indispensável na concepção da ideia do projeto.

Ao Prof. Dr. Leo Sekine pela sua disponibilidade de tempo e ânimo, para fazer e refazer nossas análises quando necessário. Obrigada pela paciência e parceria.

À equipe de enfermagem do ambulatório transfusional do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pela ajuda tão essencial no contato com os pacientes.

À equipe do serviço de hemoterapia do Hospital São Vicente de Paula de Passo Fundo- PF, em especial, Cristiane, Bruna e Fernanda, pela disponibilidade e alegria em abraçar o projeto.

A todas integrantes do laboratório de Genética Molecular incluindo alunos de graduação, pós-graduação e contratados, em especial, Vitória, Juliana Cristine, Fabiane e Anita, em época alunas de Biologia e Biomedicina, fundamentais para o desenvolvimento do projeto.

Aos membros da banca examinadora pela receptividade ao convite para a análise desta tese.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas por compartilharem seu conhecimento, contribuindo para a minha formação técnica e acadêmica.

Às fontes de financiamento de pesquisa que possibilitam que nossos projetos saiam do papel e virem realidade, meu sincero agradecimento.

E, principalmente, aos que estavam nos bastidores de todo esse processo, esse título é compartilhado com vocês, minha família, vocês são minha base e meu porto seguro. Absolutamente nada teria acontecido sem vocês. Às amigas de sempre e para sempre Daniela, Juliana, Laís, Laura, Thayssa, Vanessa, Gabriela, Mariana e Fernanda não tenho palavras para descrever a importância de vocês nesta caminhada.

Hoje, sou só gratidão.

## RESUMO

A Hemocromatose Hereditária (HH) é classificada como um distúrbio autossômico recessivo caracterizado pelo aumento da absorção do ferro intestinal, podendo levar a estoques excessivos nos parênquimas hepático, cardíaco, pancreático, tireoidiano, gônadas e articulações. Com a saturação, tanto no sistema de armazenamento, bem como de transporte, o excesso do metal livre fica sujeito a reações físico-químicas, principalmente as de *Fenton* e *Haber-Weiss*, o que desencadeia uma série de cascatas inflamatórias, dano ao material genético e morte celular, resultando em insuficiências teciduais ou mesmo a tumorigênese. As variantes genéticas mais descritas são relacionadas ao gene *HFE* (C282Y, H63D e S65C). Outros subtipos já descritos envolvem os genes *HFE2* (*HJV*), *HAMP*, *SLC40A1*, *TRFC1* e *TRFC2*. O tratamento mais eficaz se dá pelo procedimento de flebotomias. O monitoramento dessa terapêutica é feito pelos exames ferritina sérica e saturação de transferrina, principalmente. Entretanto, ao se considerar o caráter multifatorial da HH, limitações quanto às ferramentas disponíveis para controle da doença são claras, não existindo nenhum biomarcador que possa ajudar na mensuração mais precoce de eventuais comorbidades secundárias à sobrecarga de ferro. Outro fator que impacta a busca por evidências nesse sentido é a escassez de dados que caracterizem esta população, sendo inexistente qualquer artigo que foque na descrição dessa no estado do Rio Grande do Sul (RS). Neste ínterim, a literatura nos apresenta algumas evidências interessantes a respeito do miR-122. Estudos pré-clínicos vinculam sua atividade a modulação de genes como o *HFE*, *HJV* e *HAMP*, além dos artigos em grau clínico que o associam como bom biomarcador precoce de patologias com desfecho encontrados na HH, caso da cirrose hepática e da diabetes tipo 2.

A partir deste cenário, duas questões de pesquisa foram elaboradas: Qual o perfil dos pacientes acometidos por essa condição clínica no RS? O miR-122 pode ser um bom biomarcador na HH? No intuito de achar as respectivas respostas, um projeto, dividido em duas etapas, foi estruturado.

A descrição clínica e laboratorial se deu a partir de uma amostragem de pacientes com diagnóstico de hiperferritinemia e em regime de sangrias terapêuticas. Além disso, o estudo contou com a análise em dois centros referência no tratamento destes casos, o Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e o Hospital São Vicente de Paulo de Passo Fundo (HSVP-PF). Foi estabelecido o período de janeiro de 2019 a março de 2020 para recrutamento, no qual foram solicitados dados ao diagnóstico, sendo estes, ferritina, saturação de transferrina (ST),

Transaminase Glutâmico Oxalacética (TGO), Transaminase Glutâmica Pirúvica (TGP), índice de massa corpórea (IMC), comorbidades e histórico familiar. Os procedimentos de sangrias terapêuticas também foram contabilizados. O exame molecular para investigação das variantes no gene *HFE* foi disponibilizado àqueles que não o apresentavam no recrutamento, não sendo critério de exclusão a negativa para a coleta. Foram incluídos no estudo 177 pacientes do HCPA e 57 do HSVP. Os dados foram descritos em médias, medianas e percentuais. A partir desta amostragem, um grupo de quarenta pacientes procedeu à análise do miRNA. O critério para seleção destes levou em consideração o diagnóstico clínico e molecular de HH. Acrescido aos dados no momento do diagnóstico, idade, ferritina sérica, percentual de saturação de transferrina ao recrutamento foram solicitados. A análise da expressão gênica do miR-122 foi feita a partir do isolamento do RNA, em sangue total, com kit mirVana™ PARIS™ e técnica de RT-qPCR com uso de sondas previamente testadas pelo fabricante (Thermo Scientific®). Para análise tanto do perfil ao diagnóstico, quanto ao recrutamento, além das comparações quanto ao miR-122, os participantes foram estratificados em 3 grupos considerando os níveis de ferritina ao momento da coleta. Participantes com níveis séricos normais (abaixo de 300 ng/uL) foram alocados no grupo manutenção, e os demais em outros dois, chamados de indução 1 e 2 (indução 1 níveis entre 300 e 999 ng/uL; indução 2 níveis igual ou acima de 1000 ng/uL).

A análise epidemiológica desta população gerou dados descritivos que seguiram os seguintes valores ao diagnóstico: Ferritina sérica 1029,5 ng/mL, ST 52,0%; histórico familiar em 35,0% e mediana de sangrias até o recrutamento de 7. A comorbidade em maior destaque foi a Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS). Duzentos e quatorze participantes procederam à análise molecular e 66,4% desses apresentaram ao menos uma variante. Os genótipos de maior frequência foram os seguintes: H63D em heterozigose (21.5%), C282Y/C282Y (14.0%) e C282Y/H63D (11.8%). Quanto às variantes, uma discreta diferença na frequência alélica foi observada, sendo maior para C282Y. Na estratificação por centro, diferenças foram observadas nas variáveis clínicas, as quais podem apontar diferenças no manejo dos pacientes. A variante H63D aparece em maior número no centro HSVP-PF. Correlações entre grupos de genótipos e as variáveis clínicas também foram testadas. A estratificação feita considerou que os genótipos em homozigose e heterozigose composta para a variante C282Y tendem a apresentar maior prejuízo à função da hepcidina. Os resultados vão ao encontro da descrição na literatura, com diferenças observadas na ST e número de sangrias ( $p < 0,001$ ). Quando as variantes são observadas de maneira mais detalhada, C282Y em homozigose apresenta maior ST. A mesma mutação em heterozigose composta com H63D, ou S65C, é a configuração característica dos

pacientes que mais relataram histórico familiar positivo.

Quanto ao miR-122, o grupo indução 2 apresentara maior expressão, comparada aos grupos manutenção e indução 1 ( $p < 0,05$ ). Entre esses resultados, a diferença estatística entre os grupos indução chama atenção, uma vez que a variável ferritina sérica ao diagnóstico não mostra diferença estatística entre eles, assim como é visto em relação ao número de sessões de flebotomias, indicando uma provável resistência ao tratamento do grupo indução 2. Além disso, nesse grupo nota-se a presença de dois pacientes, cujas expressões relativas do miR-122 se distaciam dos demais, tendo valores que chegam a ser 20 vezes maiores. O resultado é acompanhado de uma piora dos níveis séricos de ferritina entre diagnóstico e recrutamento.

Conforme já mencionado este foi o primeiro trabalho a descrever uma população do RS, assim como é pioneiro na análise do miR-122 em amostras de HH. Dentre os dados epidemiológicos, chama atenção, também, os genótipos em heterozigose simples com uma incidência considerável. Esse dado, permite levantar a hipótese da existência de variantes menos frequentes, potencialmente relacionadas aos desfechos. Em relação ao dados experimentais, a hipótese de que o miR-122 seja um bom indicador de prognóstico é reiterada, ainda que de forma incipiente, visto que o número amostral foi pequeno. Quanto a avaliação de quão precoce pode ser a sinalização de um dano tecidual a partir da análise do miR-122, estudo prospectivos devem ser delineados, comparando a expressão da referida molécula aos painéis de exames laboratoriais de ampla utilização na prática clínica.

## ABSTRACT

Hereditary Hemochromatosis (HH) is an autosomal recessive disorder characterized by increased intestinal iron absorption, which can lead to excessive storage in the liver, cardiac, pancreatic, thyroid, gonads and joints parenchyma. With saturation, both in the storage and transport systems, the excess of free metal is subjected to physicochemical reactions, mainly those of Fenton and Haber-Weiss, which triggers a series of inflammatory cascades, damage to the genetic material and even cell death, resulting in tissue failure or even tumorigenesis. The most described genetic variants are related to the *HFE* gene (C282Y, H63D and S65C). Other subtypes already described involve the *HFE2*, *HAMP*, *SLC40A1*, *TRFC1* and *TRFC2* genes. The most effective treatment is phlebotomy. Monitoring of this therapy is mainly performed by means of serum ferritin and transferrin saturation. However, when considering the multifactorial character of HH, limitations regarding the tools available to control the disease are clear, and there is no biomarker that can help in the earlier measurement of possible comorbidities secondary to iron overload. Another factor impacting the search for evidence is the scarcity of data that characterize the population of the state of Rio Grande do Sul (RS). In the meantime, the literature presents us with some interesting evidence regarding miR-122. Preclinical studies link its activity to the modulation of genes such as *HFE*, *HJV* and *HAMP*, in addition to clinical-grade scientific papers that associate it as a good early biomarker of pathogenesis with an outcome found in HH, such as liver cirrhosis and type 2 diabetes.

Based on these data, two research questions were raised: What is the profile of patients affected by this clinical condition in RS? Can miR-122 be a good biomarker in HH? In order to find the respective answers, a project, divided into two stages, was structured.

The clinical and laboratory description was based on a sample of patients diagnosed with hyperferritinemia and undergoing therapeutic bleeding. In addition, the study included the analysis of two reference centers in the treatment of these cases, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) and Hospital São Vicente de Paulo de Passo Fundo (HSVP-PF). The period from January 2019 to March 2020 was established for recruitment, in which diagnostic data were requested, namely, ferritin, transferrin saturation (TS), aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), body mass index (BMI), comorbidities and familial history. Therapeutic bleeding procedures were also accounted. The molecular testing for the investigation of variants in the *HFE* gene was made available to those who did not present it at recruitment. 177 patients from HCPA and 57 from HSVP were included in the study. Data were described as means, medians and percentages.



Based on this sample, a group of forty patients underwent miRNA analysis. The criteria for their selection took into account the clinical and molecular diagnosis of HH. In addition to data at diagnosis, age, serum ferritin, percent transferrin saturation at recruitment were requested. The analysis of miR-122 gene expression was performed in RNA, isolated with a mirVana™ PARIS™ kit and RT-qPCR technique using probes previously tested by the manufacturer (Thermo Scientific®). For analysis of both the profile at diagnosis and recruitment, in addition to comparisons regarding miR-122, participants were stratified into 3 groups considering ferritin levels at the time of collection. Participants with normal serum levels (below 300 ng/uL) were allocated to the maintenance group, and the others to two others, called induction 1 and 2 (induction 1 levels between 300 and 999 ng/uL; induction 2 levels equal to or above of 1000 ng/uL).

The epidemiological analysis of this population generated the following data at diagnosis: Serum ferritin 1029.5 ng/mL, ST 52.0%; family history in 35.0% and median of bloodletting until recruitment of 7. The most prominent comorbidity was Systemic Arterial Hypertension (SAH). Two hundred and fourteen participants performed the molecular analysis and 66.4% of them presented at least one variant. The genotypes with the highest frequencies were: H63D in heterozygosity (21.5%), C282Y/C282Y (14.0%) and C282Y/H63D (11.8%). Regarding the variants, a slight difference in allele frequency was observed, being greater for C282Y. In the stratification by center, differences were observed in the clinical variables, which may point to differences in the management of patients. The H63D variant appears in greater numbers at the HSVP-PF center. Correlations between genotype groups and clinical variables were also tested. The stratification performed considered that the genotypes in homozygosity and compound heterozygosity for the C282Y variant tend to present greater damage to the function of hepcidin. The results are in line with the description in the literature, with differences observed in ST and number of bleeds ( $p < 0.001$ ). When the variants are observed in more detail, C282Y in homozygosity has higher ST. The same mutation, in compound heterozygosity with H63D or S65C, is the characteristic configuration of patients who most reported a positive family history.

As for miR-122, the induction 2 group showed greater expression, compared to the maintenance and induction 1 groups ( $p < 0.05$ ). Among these results, the statistical difference between the induction groups draws attention, since the serum ferritin variable at diagnosis does not show a statistical difference between them, as observed regarding the number of phlebotomies sessions, indicating a probable resistance to the treatment of induction group 2. In addition, in this group we can see the presence of two patients, whose relative expressions of miR-122 are distant from the others, with values that are up to 20 times higher. The result is

accompanied by a worsening of serum ferritin levels between diagnosis and recruitment.

As already explained, this was the first work to describe this population in RS, as well as being a pioneer in the analysis of miR-122 in HH samples. Among the epidemiological data, the genotypes in simple heterozygosity appear to be considerable frequent. This data allows us to hypothesize the existence of rarer variants, potentially related to the outcomes. Regarding the experimental data, the hypothesis that miR-122 is a good prognostic indicator is reiterated, albeit incipiently, since the sample number was small. Regarding the evaluation of how early the signaling of tissue damage can be observed from the analysis of miR-122, prospective studies should be designed, comparing the expression of that molecule to panels of laboratory tests widely used in clinical practice.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ALT: Alanine Aminotransferase* ( Transaminase Glutâmica Pirúvica, TGP)
- AST: Aspartate Aminotransferase* ( Transaminase Glutâmico Oxalacética, TGO)
- DMT-1: Divalent Metal Transporter 1* ( Proteína Transportadora de Metal Divalente 1)
- FLT: Ferritin Light Chain*
- FPN: Ferroportina
- HAMP: Hepcidin Antimicrobial Peptide* (Peptídeo Antimicrobiano Hepcidina)
- Hb: Hemoglobina
- HCP-1: Heme Carrier Protein 1* (Proteína Transportadora do Heme-1)
- HCPA: Hospital de Clínicas de Porto Alegre
- HFE: Homeostatic Iron Regulator* (Regulador de Ferro Homeostático)
- HH: Hemocromatose Hereditária
- HJV (HFE2): Hemojuvelin BMP Co-Receptor* (Co-receptor de Hemojuvelina BMP)
- HPN: Hepcidina
- HSVP-PF: Hospital São Vicente de Paulo- Passo Fundo
- SLC40A1: Solute Carrier Family 40 Member 1* (Família de Carreadores de Solutos 40 Membro 1)
- ST: Saturação de Transferrina
- TF: Transferrina
- TGP: Transaminase Glutâmica Pirúvica
- TRFC1: Transferrin Receptor type 1* ( Receptor de Transferrina tipo 1)
- TRFC2: Transferrin Receptor type 2* ( Receptor de Transferrina tipo 2)

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISÃO DA LITERATURA .....	18
2.1 Estratégia de Busca na Literatura.....	18
2.2 Aquisição, Metabolização e Homeostase do Ferro .....	19
2.3 Hiperferritinemia e Hemocromatose Hereditária.....	20
2.4 Diagnóstico e Tratamento da HH.....	20
2.5 Bases Moleculares da HH.....	21
2.6 De que forma subtipos de HH e as variantes gênicas impactam no quadro clínico?.....	22
2.7 HH no Brasil.....	23
2.8 Existem outros fatores que podem contribuir à patogênese da HH?.....	24
3. MARCO CONCEITUAL.....	25
4. JUSTIFICATIVA.....	26
5. OBJETIVOS.....	27
5.1 Objetivo principal.....	27
5.2 Objetivos secundários.....	27
6. REFERÊNCIAS.....	27
7. ARTIGOS.....	37
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	73
9. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	73
10. APÊNDICE.....	75
11. ANEXOS ( Termos de consentimento, formulário e <i>Strobe Checklist</i> ).....	77

## 1. INTRODUÇÃO

A metabolização e homeostase do ferro são imperativos para a manutenção de atividades fisiológicas normais devido ao envolvimento do elemento em uma variedade de processos biológicos como respiração celular, vias metabólicas, replicação do DNA, reparo, desintoxicação, neurotransmissão e sinalização celular (Gardi *et. al.*, 2002, Abbaspour *et. al.*, 2014, Kim & Wessling-Resnick, 2014, Paul *et. al.*, 2017, Santiago González *et. al.*, 2019). A figura 1 ilustra os 3 eixos principais que garantem essa homeostase: a absorção, transporte e distribuição do metal, salientando a importância dos enterócitos, de proteínas como a transferrina (TF), das células hepáticas, nas quais existe a produção do hormônio hepcidina, peça-chave para o influxo de ferro e distribuição na medida em que se faz necessário.

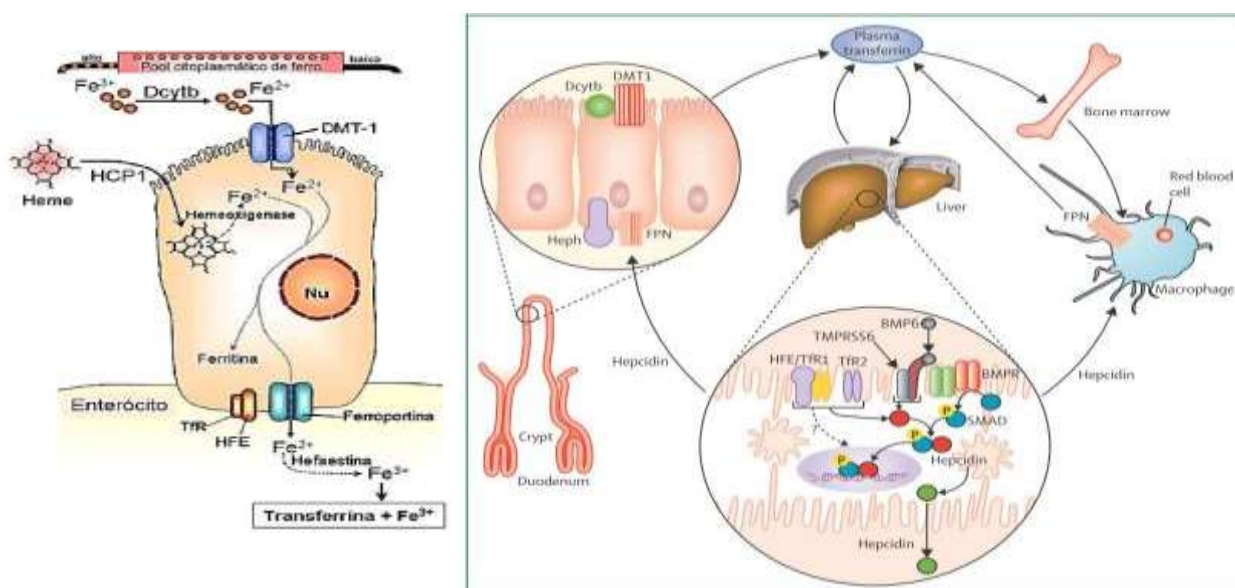


Figura 1: Modelo do Metabolismo do Ferro. Adaptado de Powell *et al.*, 2016, Grotto, 2010.

Quando algum desbalanço ocorre entre esses três eixos, o excesso do metal no organismo gera uma série de disfunções, podendo, inclusive, ser um dos fatores que contribuem para a formação de neoplasias (Zhou *et al.*, 2018, Raza *et al.*, 2014, Xiong *et al.*, 2014).

A sobrecarga de ferro, como diagnóstico clínico, pode ter caráter adquirido ou hereditário. A primeira hipótese relaciona-se a pacientes que são submetidos à terapia transfusional crônica (Cid *et al.*, 2014, Shenoy *et al.*, 2014, Gu *et al.*, 2015, Panch *et al.*, 2015). No caso da condição hereditária, denominada Hemocromatose, variantes gênicas são responsáveis por impactar a expressão ou funcionalidade da Hepcidina (Brissot *et al.*, 2018). Uma vez que, mais de um gene

pode estar envolvido, é consenso na literatura a divisão da condição clínica em 4 isoformas, listadas na tabela 1 a seguir, com os respectivos genes e referências da sua primeira descrição.

Tabela 1. Tipos de HH, Genes Relacionados à Fisiopatologia e referências da primeira descrição. Modificado de Santos *et. al.*, 2009.

<b>Tipo de HH</b>	<b>Gene Associado</b>	<b>Referências</b>
<b>1</b>	<i>HFE</i> <sup>1</sup>	Feder <i>et. al.</i> , 1996
<b>2A</b>	<i>HJV</i> <sup>2</sup>	Papanikolaou <i>et. al.</i> , 2004
<b>2B</b>	<i>HAMP</i> <sup>3</sup>	Park <i>et. al.</i> , 2001
<b>3</b>	<i>TFRC</i> <sup>4*</sup>	Kawabata <i>et. al.</i> , 1999
<b>4</b>	<i>SLC40A1</i> <sup>5</sup>	Donovan <i>et. al.</i> , 2000

<sup>1</sup> *HFE* (homeostatic iron regulator), <sup>2</sup> *HJV* (hemojuvelin BMP co-receptor), <sup>3</sup> *HAMP* (hepcidin antimicrobial peptide), <sup>4</sup> *TFRC* (transferrin receptor) \* type 1 and 2, <sup>5</sup> *SLC40A1* (solute carrier family 40 member 1).

O diagnóstico da Hemocromatose Hereditária (HH) se dá a partir de evidências laboratoriais, nas quais proteínas como a ferritina e a saturação da transferrina fogem dos padrões de normalidade (ferritina sérica (normal: mulheres < 200 ng/mL e homens < 300 ng/mL; normal < 44%). A partir desses achados e do estudo de outras situações que acarretam hiperferritinemia, é recomendado o rastreio das variantes, sendo o gene mais investigado o *HFE* (Brissot *et. al.*, 2018). As demais isoformas da HH, a pesar de serem relacionadas a genes fundamentais na homeostase do ferro, são investigadas, na maioria das vezes, quando existe uma colaboração entre a assistência e a pesquisa científica, independente do grau de desenvolvimento do país. Na literatura, o primeiro estudo que objetiva uma determinação das frequências alélicas das variantes não-*HFE* em escala global data de 2016 (Wallace & Subramaniam, 2016). Em contexto nacional, apenas três artigos são citados na plataforma de busca de dados *NCBI-PUBMED* (Bittencourt *et. al.*, 2009, Santos *et. al.*, 2011, 2012)

Em relação as variantes *HFE*, ganham destaque as seguintes: C282Y, H63D e S65C. É consenso na literatura que pessoas homocigotas para a variante C282Y tendem a cursar a HH de forma mais sintomática, uma vez que há um maior impacto na funcionalidade da proteína *HFE* (Rombout-Sestrienkova *et. al.*, 2016, Powell *et. al.*, 2016)

Os tratamentos da HH caracterizam-se pelo uso de quelantes ou mesmo a flebotomia

(sangria). Evidências já mostram dano genotóxico bem proeminente no uso do quelante, bem como a limitação terapêutica da sangria (Ila *et al.*, 2014). O paciente, portanto, fica sujeito a piora do quadro, com possibilidade de manifestações cardíacas graves, piora do quadro hepático, podendo levar a cirrose, além do risco para o desenvolvimento de morbidades em órgãos endócrinos (Cheung *et al.*, 2013, Gujja *et al.*, 2010, Kohgo, *et al.*, 2008).

Logo, ao se pensar na melhoria das condições desta população, é necessário olhar para outros parâmetros, que não só a análise de DNA ou os tratamentos convencionais. Como é o caso de muitas doenças genéticas, a HH tem caráter multifatorial. Pensando sob esse aspecto, ao analisarmos a homeostase do ferro percebe-se a participação de mecanismos pós-transcricionais como os microRNAs ( Davis & Clarke, 2013, Duan *et al.*, 2020, ). Esses consistem em uma classe de pequenos RNAs não-codificantes de fita simples (18 a 25 nucleotídeos de tamanho), envolvidos na regulação pós-transcricional da expressão gênica em todos eucariotos multicelulares (Ambros, 2004; Bartel, 2004). No caso da hemocromatose, trata-se de um mecanismo com muito potencial a ser explorado, porém pouco estudado. Na literatura existe apenas um artigo com a tentativa de associação dos níveis de miR-31, miR-133a, miR-141, miR-145, miR-149, and miR-182 a desfecho oftalmológico em amostras de HH (Szemraj *et al.*, 2017). Dentro de uma busca menos restrita ao diagnóstico, encontra-se o estudo de Li e colegas , o qual ressalta a importância do microRNA122 no processo inflamatório mediado pela sobrecarga de ferro em modelo animal (Li *et al.*, 2017). Demais estudos, em fisiopatologias similares à HH, reforçam essa hipótese (Liu *et al.*, 2018, Esau *et al.*, 2006 ).

Sendo assim, torna-se importante avaliar os mecanismos relacionados à homeostase do ferro, as possíveis variantes gênicas associadas à Hemocromatose, assim como a maquinaria que pode modelar a expressão de proteínas correlatas, incluindo os miRNAs.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Estratégia de Busca na Literatura

Esta revisão da literatura está focada no entendimento da patogênese causada pela sobrecarga de ferro e no envolvimento dos miRNAs. A estratégia de busca envolveu as seguintes bases de dados: *PubMed*, *Scopus* e na *Web of Science* período de 2000-2022.

TERMOS PESQUISADOS	PUBLICAÇÕES ENCONTRADAS			PUBLICAÇÕES UTILIZADAS		
	Base de Dados			Base de Dados		
	NCBI-PUBMED	SCOPUS*	Web of Science**	NCBI-PUBMED	SCOPUS	Web of Science
"Iron Overload" OR "Hemochromatosis" OR "Iron Homeostasis"	1017	18932	9961	2	7	5
("Iron Overload" OR "Hemochromatosis" OR "Iron Homeostasis") AND "Pathogenesis"	1017	1468	8067	10	12	11
"Hemochromatosis" AND "Brazil"	84	47	63	14	10	4
("Iron Overload" OR "Hemochromatosis") AND ("miRNA" OR "microRNA")	21	278	14	3	7	1
("Iron Overload" OR "Hemochromatosis") AND ("microRNA-122" OR "miRNA-122")	1	15	1	1	4	1
("microRNA-122" OR "miRNA-122")	663	2971	303	3	12	3

\* Na base de dados *Scopus*, além de aplicar o filtro por período da publicação, ainda se restringiu o conteúdo aos classificados no âmbito das Ciências Médicas, Bioquímica, Genética e Biologia Molecular, Imunologia e Microbiologia, Química e multidisciplinar. Reafirmou-se o uso de revisões.

\*\* Na base dados *Web of Science*, além de aplicar o filtro por período da publicação, ainda se restringiu o conteúdo aos classificados no âmbito da Hematologia, Gastroenterologia e Hepatologia, Bioquímica e Biologia Molecular, Biologia Celular e Genética.



## 2.2 Aquisição, Metabolização e Homeostase do Ferro

O ferro é um mineral imprescindível para diversas reações biológicas e vital, portanto, para a homeostase celular. É obtido pela dieta e reciclagem de hemácias senescentes, sendo encontrado sob as formas orgânica e inorgânica. A aquisição da forma orgânica- ou heme- corresponde a 1/3 do total e é proveniente da quebra da hemoglobina e mioglobina. O ferro inorgânico, ou não-heme, é proveniente de vegetais e grãos (Hoffbrand *et al.*, 2006). Conforme ilustrado na figura 2, o ferro é internalizado pelos enterócitos a partir da proteína transportadora de metal divalente 1 (da sigla em inglês *DMT-1*, *Divalent Metal Transporter 1*) e, também, proteína transportadora do heme-1 ( da sigla em inglês *HCP1*, *Heme Carrier Protein 1*). No interior da célula, o ferro é liberado da protoporfirina pela heme oxigenase. Quando não exigido pelo organismo, um dos principais destinos para armazenamento é o fígado, primariamente nos macrófagos, ligado à ferritina, proteína majoritariamente citosólica com duas subunidades, cadeia leve e pesada, responsável pelo sequestro de até 4500 átomos de  $\text{Fe}^{3+}$  por molécula. O transporte do metal, seja para depósito ou qualquer outra atividade no organismo se dá exclusivamente pela Transferrina (TF), assim como o efluxo celular é dependente da Ferroportina (FPN) (Pietrangelo, 2004, Anderson *et al.*, 2009, Sandnes *et al.*, 2021). A necessidade ou não do influxo de ferro pelo enterócito é diretamente ligado a expressão da Hecpidina (HPN), um hormônio peptídeo circulante, antimicrobiano, pertencente à família das defensinas, produzido principalmente pelos hepatócitos (Ravasi *et al.*, 2012). A função hormonal foi descrita a partir de experimentos animais, em que camundongos deficientes de HPN desenvolveram sobrecarga de ferro (Nicolas *et al.*, 2002).

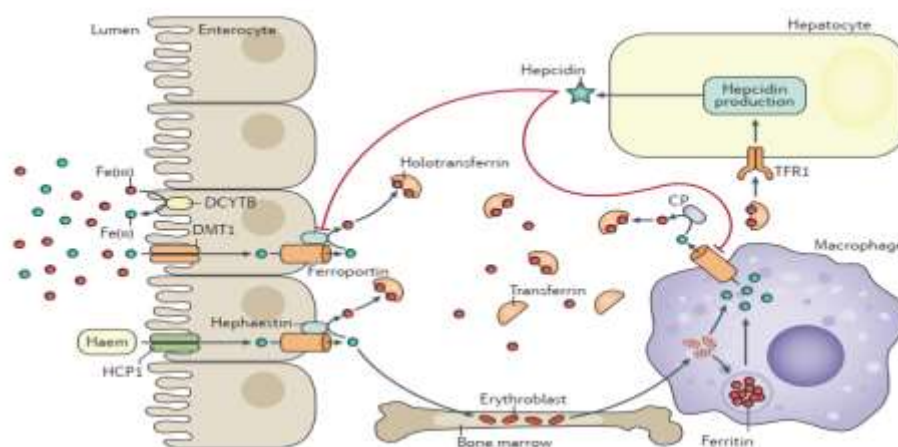


Figura 2. Captação e distribuição do Ferro no organismo (Adaptado de Crielgaard *et al.*, 2017)

### 2.3 Hiperferritinemia e Hemocromatose Hereditária

Conforme já explicitado, a ferritina é a única forma para armazenamento de ferro. No entanto, a ingestão deste metal não é o único estímulo para a produção dessa proteína. Sabe-se que a sua síntese é influenciada, também, por citocinas, estresse oxidativo, hormônios (tireoidianos, principalmente), fatores de crescimento, segundos mensageiros e hipóxia-isquemia (Torti *et. al.*, 2022). Entende-se que todos esses co-fatores ou processos podem fazer parte das funções fisiológicas; no entanto, um desequilíbrio ou exacerbação de qualquer um pode levar ao quadro de hiperferritinemia. Logo, a investigação clínica de um paciente que apresente esta condição perpassa por uma série de exames, sendo necessário, inclusive, o entendimento pela equipe clínica do estilo de vida da pessoa. A partir deste quadro multifatorial, a Hemocromatose Hereditária (HH) é inserida como possível diagnóstico quando evidências apontam para a importância da ingestão de ferro no aumento dos níveis séricos da proteína. O primeiro caso de HH foi relatado em 1865 por Trousseau, quando descreveu um paciente com cirrose hepática, diabetes mellitus e hiperpigmentação da pele. Todavia, o reconhecimento da doença como sendo consequência do aumento progressivo do estoque de metal foi feito em 1889 por Von Recklinghausen, sendo o primeiro a utilizar a expressão "hemocromatose" (von Recklinghausen, 1889).

Com relação aos sinais e sintomas, mesmo com o número crescente de estudos, não são encontradas características que a diferencie. No entanto, o conjunto de comorbidades possivelmente relacionado é extenso na medida que o ferro em excesso pode se alojar em múltiplos órgãos, causando disfunções bioquímicas à nível de citosol e DNA. Destaca-se, principalmente, a Reação de Fenton e Haber-Weiss (Finazzi, *et al.*, 2014). Com a progressão da lesão a nível tecidual, chega-se ao quadro em que comorbidades são diagnosticadas. É relativamente comum pacientes apresentarem disfunções hepáticas, cardio-vasculares, pancreáticas, com o desenvolvimento de Diabetes Mellitus tipo 2, dores articulares e, em casos mais extremos, o depósito do metal pode atingir a pele, gerando manchas (Cheung *et. al.*, 2013, Gujja *et. al.*, 2010, Kohgo *et. al.*, 2008).

### 2.4 Diagnóstico e Tratamento da HH

As principais evidências na prática clínica que direcionam a este diagnóstico incluem o índice de Saturação de Transferrina (ST) acima de 45% e, quando oportunizado, exames de imagem com a quantificação do metal no parênquima tecidual (Brissot *et al.*, 2018). Tratando-se de uma doença hereditária, seria de praxe pensar na investigação molecular dos genes

envolvidos no metabolismo do ferro. No entanto, o exame genético não é procedimento comum a todos os pacientes e, quando possível, restrito a análise do gene *HFE* (*Homeostatic Iron Regulator*). Os métodos empregados na terapêutica compreendem ciclos de sangrias (flebotomias), uso de quelantes de ferro, técnicas dietéticas e tratamentos adjuvantes para as comorbidades (Kontoghiorghes *et al.*, 2016; Powell *et al.*, 2016).

## 2.5 Bases Moleculares da HH

Conceitua-se a HH como uma condição genética de caráter autossômico recessivo. As evidências que levaram a esta classificação foram desencadeadas a partir dos estudos desenvolvidos por Sheldon, em 1935, e dos avanços no entendimento da transmissão genética e das bases moleculares nos anos 1970 e 1980 por Simon e colaboradores (Sheldon, 1935, Simon *et al.*, 1976). Posteriormente, foi descrito o padrão de herança e também a associação com a molécula HLA-A do complexo principal de histocompatibilidade de classe I no cromossomo 6 (Simon *et al.*, 1975, 1977, 1987). As evidências que nos levam ao gene *HFE*, no entanto, só foram descritas em 1996 por Feder e colegas, com a identificação das variantes C282Y e H63D (Feder *et al.*, 1996). A terceira mutação S65C foi descrita em 1997 por Henz e colegas (Henz *et al.*, 1997). A caracterização de novas variantes é um processo contínuo, todavia essas três tem destaque no que chamamos de genótipo clássico ou tipo 1 (Allen *et al.*, 2008).

O gene *HFE* é constituído de 7 éxons e está localizado no braço curto do cromossomo 6 (6p21.3). A variante C282Y (rs 1800562), no éxon 4, consiste na troca de uma guanina (G) para adenina (A) no nucleotídeo 845, que determina a substituição de uma cisteína (C) por uma tirosina (Y) no aminoácido 282, incapacitando a interação entre HFE, transferrina e  $\beta$ 2-microglobulina. Já a variante H63D (rs 1799945) é resultado de outra troca, citosina (C) para guanina (G) no nucleotídeo 187, o qual reflete na substituição de histidina (H) por ácido aspártico (D) no aminoácido 63, que impacta na conformação da proteína HFE minimizando sua afinidade de ligação à transferrina (Feder *et al.*, 1996, 1997). A S65C (rs 1800562) caracteriza-se pela troca de uma adenina (A) por uma timina (T) no nucleotídeo 193, resultando na substituição de uma serina por uma cisteína no aminoácido 65, prejudicial à atividade da proteína em questão, similar a H63D (Henz *et al.*, 1997).

São descritos na literatura mais três tipos de HH, os quais seriam independentes de modificações no *HFE*. O tipo 2 é segmentado em isoforma 2A, relacionada a mutações no gene *HFE2*, também representado pela sigla *HVJ* (*Hemojuvelin BMP Co-Receptor*) (Adams *et al.*, 2005). A isoforma 2B relaciona-se o genótipo com mutações no gene da Hepsidina (sigla em

inglês *HAMP*, *Hepcidin Antimicrobial Peptide*). Variantes patogênicas nos genes do receptores da transferrina ( siglas em inglês *TRFC1* e *TRFC2*, *Transferrin Receptor*), ou mesmo no gene *SCL40A1*( *Solute Carrier Family 40 Member 1*) que codifica a FPN, constituem as tipificações 3 e 4, respectivamente (Pietrangelo, 2010, Kawabata, 2018). Alguns debates existem sobre a classificação da última como HH, uma vez que essa afeta, indiretamente, a atividade da hepdicina e não a expressão. Além disso, o padrão de herança contraria o genótipo clássico, sendo autossômico dominante ( Brissot *et al.*, 2018).

## **2.6 De que forma sub-tipos de HH e variantes gênicas podem impactar no quadro clínico?**

Segundo Kowdley e colaboradores, diferenças entre os subtipos podem ser observadas conforme tabela 3. Destaca-se que os subtipos 2, apresentam desfechos com uma idade mais precoce; e no subtipo 4, ao contrário do que possa ser pensado, a sobrecarga de ferro não é indicativo para ausência de anemia e o manejo do tratamento a partir de sangrias terapêuticas pode não ser a melhor opção (Kowdley *et al.*, 2019).

Quanto às variantes gênicas as evidências em maior destaque se dão para as relacionadas ao gene *HFE*, em específico para C282Y, H63D e S65C. Pacientes diagnosticados com a presença da C282Y em homozigose tendem a cursar um história natural da doença com maior risco de desenvolver comorbidades (Allen *et al.*, 2002, Beutler *et al.*, 2008, van Bokhoven *et al.*, 2011). Os genótipos em heterozigose composta com a mesma variante podem apresentar fenótipos similares ou moderados, no caso da presença da H63D, ou mais brandos, com a S65C (Holmstrom *et al.*, 2002, Mura *et al.*, 2000, De Diego *et al.*, 2004 ). Essas diferenças podem ser explicadas pela conformação final da proteína, a qual tem um prejuízo maior na presença da C282Y( de Almeida & de Sousa, 2008).

Diante deste cenário, no entanto, salienta-se mais uma vez o caráter multifatorial da doença, o qual resulta , por vezes, em um quadro clínico igual entre diferentes genótipos. Nestes casos, é lógico hipotetizarmos a presença de fatores exógenos, caso da ingestão excessiva de álcool, ou variantes em outros genes correlatos ao metabolismo do ferro, comprovadamente modificadores de fenótipos e que não são investigados na assistência ( Brissot *et al.*,2018).

Tabela 3 Classificação da HH, Gene Envolvido, Padrão de Herança e Manifestações Clínicas. Modificado de Kowdley *et. al.*, 2019. \* Autossômica Recessiva. \*\* Autossômica Dominante

<b>Classificação</b>	<b>Gene Envolvido (localização)</b>	<b>Padrão de Herança</b>	<b>Manifestações Clínicas Mais Prevalentes</b>
<b>Tipo 1</b>	<i>HFE</i> ( 6p21.3)	AR*	Artropatia, pigmentação na pele, dano hepático, Diabetes Mellitos, disfunção endócrina, cardiomiopatia, hipogonadismo
<b>Tipo 2A</b>	<i>HJV</i> ( 1p21)	AR*	Idade ao diagnóstico inferior aos 30 anos, hipogonadismo e cardiomiopatia
<b>Tipo 2B</b>	<i>HAMP</i> ( 19q13)	AR*	
<b>Tipo 3</b>	<i>TFRC</i> ( 7q22)	AR*	Artropatia, pigmentação na pele, dano hepático, Diabetes Mellitos, disfunção endócrina, cardiomiopatia, hipogonadismo
<b>Tipo 4</b>	<i>SLC40A1</i> ( 2q32)	AD**	Deposição de ferro no baço, baixa tolerância a flebotomias, probabilidade de desenvolver anemia, fadiga e dor articular.

## 2.7 HH no Brasil

A Hemocromatose Hereditária em contexto nacional, quando prospectada nas bases de dados e no período referido desta revisão, apresenta aproximadamente 14 artigos que objetivam a investigação dos aspectos moleculares com ou sem relação a um defeito específico (Bittencourt *et. al.*, 2002, Martinelli *et. al.*, 2005, Pericole *et. al.*, 2005, Zamin *et. al.*, 2006, Cançado *et. al.*, 2006, Oliveira *et. al.*, 2009, Bittencourt *et. al.*, 2009, de Lima Santos *et. al.*, 2010, Santos *et. al.*, 2011, Vieira *et. al.*, 2013, Leão *et. al.*, 2014, Evangelista *et. al.*, 2015, Alves *et. al.*, 2016, Campos *et. al.*, 2017). Dentre esses estudos, destaca-se um maior número na região sudeste, majoritariamente no estado de São Paulo, e, de forma mais incipiente, na região norte e nordeste. O único estudo, similar a esses e desenvolvido com a população do estado do Rio Grande do Sul, trata especificamente de casos com diagnóstico de Diabetes Mellitos tipo 2 ( Colli *et. al.*, 2009). É no mínimo preocupante a falta de literatura com foco nessa região, uma vez que se trata da área, possivelmente, com maior influência europeia no país devido ao processo migratório, principalmente no século XIX. Diferenças nas frequências alélicas devem ser esperadas quando comparada essa região às demais. O único estudo que suscita essa questão étnica foi desenvolvido por Pereira e colegas (2009), no estado de São Paulo, e evidencia que para a variante C282Y mais de 3 pontos percentuais foram observados de diferença entre a incidência na amostragem com ancestralidade europeia e o estrato mais miscigenado; esse percentual aumenta para mais de 7 pontos quando os mesmos grupos são comparados para o caso da variante H63D ( Pereira *et. al.*, 2009) .

## 2.8 Existem outros fatores que podem contribuir à patogênese da HH?

Diante do que já foi explicitado, é clara a natureza diversa da HH. Logo, com a maior elucidação do processo, outros mediadores podem ser hipotetizados. Neste contexto se encaixam os microRNAs, os quais consistem em uma classe de pequenos RNAs não-codificantes de fita simples (18 a 25 nucleotídeos de tamanho), envolvidos na regulação pós-transcricional em todos eucariotos multicelulares (Ambros, 2004; Bartel, 2004). Os microRNAs participam de diversos processos, incluindo proliferação celular, diferenciação, apoptose e desenvolvimento (Lu et al., 2005; Hu et al., 2014). Os sítios para ligação desses estão predominantemente localizados na região 3'UTR dos mRNAs (alvos) e essa ligação ocorre através de complementariedade imperfeita de bases. Análises mostram que um único micro-RNA pode regular negativamente múltiplos alvos com distintas funções (até 200 mRNAs) (Esquela-Kerscher & Slack, 2006; Ruan et al., 2009). Na dinâmica da homeostase do ferro, o possível envolvimento de alguns micro-RNAs é descrito na literatura, conforme tabela 4.

Tabela 4. Descrição dos micro-RNAs, respectivos mRNAs alvo e referências na literatura. Modificado de Davis & Clarke 2013.

<i>miRNA</i>	<i>mRNA- Alvo</i>	<i>Referências</i>
miR-Let-7d	(DMT, BACH1) <sup>1</sup>	Andolfo <i>et al.</i> , 2010, Hou <i>et al.</i> , 2012
miR-122	(HFE, HJV) <sup>2</sup>	Castoldi <i>et al.</i> , 2009
miR-196	BACH1	Hou <i>et al.</i> , 2010
miR-200b	FTH1 <sup>3</sup>	Shpyleva <i>et al.</i> , 2009
miR-210	(ISCU, TFR) <sup>4</sup>	Chan <i>et al.</i> , 2009, Yoshioka <i>et al.</i> , 2012
miR-214	Lactoferrina	Liao <i>et al.</i> , 2010
miR-320	TRF	Schaar <i>et al.</i> , 2009
miR-485-3p	FPN <sup>5</sup>	Sangokoya <i>et al.</i> , 2013
miR-584	Receptor de Lactoferrina	Liao <i>et al.</i> , 2010

<sup>1</sup>DMT (*ΔIRE*): divalent metal transporter 1, BACH1: BTB domain and CNC homolog 1.

<sup>2</sup>HFE, HJV: homeostatic iron regulator, hemojuvelin. <sup>3</sup>FTH1: ferritin heavy chain 1

<sup>4</sup>ISCU, TFR: iron-sulfur cluster assembly enzyme, transferrin receptor. <sup>5</sup>FPN: Ferroportin.

Nota-se pelas referências citadas na tabela 4 que a hipótese a cerca da importância dessas sequências não-codificantes é algo recente. Além disso, quando utilizamos o nome de cada uma como palavra-chave nas bases de dados, o miR-122 tem maior destaque. A notoriedade desse micro-RNA é demonstrada não só pela influência direta na expressão do *HFE* (ou do *HJV*), mas também pela larga discussão dada na literatura relacionando a modulação da expressão desse a desfechos como a insuficiência hepática, a cirrose, carcinomas e leucemias, com e sem componente viral (Jansen *et al.*, 2015, Thakral & Ghoshal, 2015, Zhang & Huang, 2021, Zhan *et al.*, 2015, Li *et al.*, 2020, Wang & Wang, 2020, Heinemann *et al.*, 2018). Destaca-se, também a interferência na expressão de TFRC, SLC11A2 e HAMP (Castoldi *et al.*, 2011, Kutay *et al.*,

2006, Jopling *et. al.*, 2006, Yang *et. al.*, 2017). A dinâmica do miR-122 ainda é contraditória entre os alguns estudos (Liu *et. al.*, 2018) . Todavia, Li e colegas evidenciam a importância do micro-RNA na manutenção do processo inflamatório desencadeado pela sobrecarga de ferro ( Li *et. al.*, 2017). Esau e colegas associaram a expressão do mir-122 a quadro de resistência à insulina, crítico para o desenvolvimento de diabetes tipo 2 ( Esau *et. al.*, 2006). É importante salientar, todavia, que a totalidade desses estudos que conseguem uma relação direta entre o micro-RNA e algum gene correlato a dinâmica do ferro obtém tais evidências em modelos experimentais pré-clínicos. A única publicação a cerca de microRNAs com amostras de pacientes diagnosticados com HH aborda análise de um desfecho oftalmológico e expressão de alguns genes. Neste estudo o miR-122 não foi analisado. Não houve significância estatística, muito provavelmente pelo número amostral pequeno (Szemraj M. *et. al.*, 2017).

### 3 MARCO CONCEITUAL

#### METABOLISMO DO ÍON FERRO

O ferro é um mineral vital para a homeostase celular. É essencial para o transporte de oxigênio, na síntese de DNA e metabolismo energético. Na figura 1, o enterócito e o macrófago ganham destaque, já que são as principais vias de absorção e estoque do metal no organismo, respectivamente. Relacionado à atividade dessas células, a figura também salienta o hormônio Heparidina, molécula central nas vias de sinalização, cuja atividade impede a absorção ou liberação exacerbada. A expressão proteica deste hormônio é dependente de uma cascata de sinalização, ilustrada na figura 2.

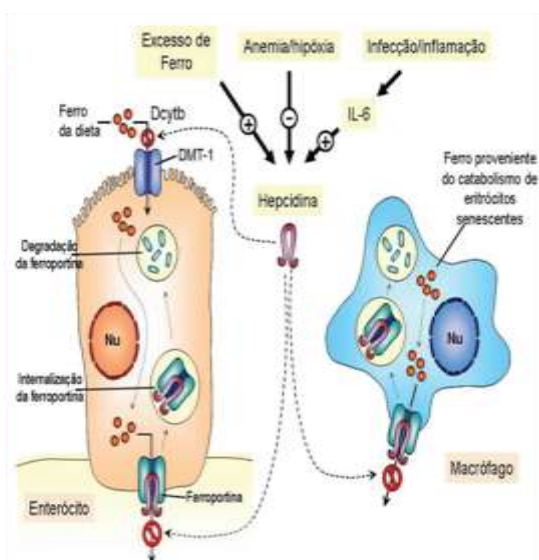
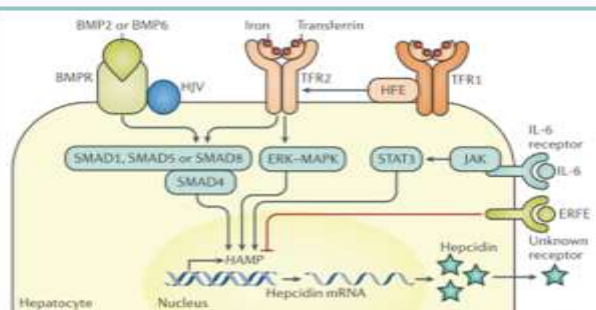


Figura 1. Controle Celular e hormonal da dinâmica do ferro no organismo. Retirado de Grotto, 2008.

Figura 2. Modelo da sinalização celular e metabolização do Ferro. Adaptado de Crielard, B. J. *et al.*, 2017

Falhas nesse processo podem ocorrer, desencadeando a HEMOCROMATOSE HEREDITÁRIA (HH)  
DOENÇA AUTOSSÔMICA RECESSIVA

Mutações germinativas podem ser detectadas nos genes *HFE*, *HFE2*, *TRFC*, *HAMP* e *SLC40A1*.

A PARTIR DESTAS INFORMAÇÕES PERGUNTAS SÃO FEITAS !

Dentre os possíveis genes envolvidos, algum se destaca?

O GENE *HFE* É O MAIS INVESTIGADO NA ASSISTÊNCIA E AS VARIANTES EM DESTAQUE SÃO C282Y, H63D E S65C.

Entre as variantes, alguma é mais prejudicial?

EVIDÊNCIAS NA LITERATURA MOSTRAM QUE A C282Y CAUSA MAIOR ALTERAÇÃO NA ATIVIDADE DA PROTEÍNA HFE ( Rametta *et. al.*, 2020)

No Brasil, qual a frequência destas variantes?

O ESTUDOS DISPONÍVIES REFERENCIAM UM INTERVALO PARA AS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS (%): C282Y ( 0,0- 7,6), H63D ( 1,1-26,6) E S65C ( 0,6- 2,2) (Leão *et. al.*, 2014).

TODAVIA, NENHUM DESSES LEVANTAMENTOS CONSIDERA A REGIÃO SUL, LOCALIDADE DO PAÍS COM PROVÁVEL MAIOR INFLUÊNCIA EUROPEIA, CONTINENTE ONDE OS PRIMEIROS CASOS FORAM DESCRITOS E DE ONDE DERIVA PRINCIPALMENTE A VARIANTE C282Y.

Quais são as consequências da sobrecarga de ferro?



O ACÚMULO DESENCADEA PROCESSOS COMO O ESTRESSE OXIDATIVO, INFLAMAÇÃO, QUE PODEM CULMINAR COM DANOS TECIDUAIS IRREVERSÍVEIS.

Existem biomarcadores que possa alertar sobre esses danos e evitar insuficiências teciduais permanentes?

NÃO EXISTE DESCRIÇÃO NA LITERATURA DE BONS MARCADORES DE PROGNÓSTICO DA HH ENTRE O EXCESSO DO METAL E O ACOMETIMENTO TECIDUAL.



#### LOGO

Mostra-se relevante a descrição de tal população, das variantes correlatas à HH, dos desfechos clínicos, bem como a investigação de possíveis biomarcadores que possam alertar de forma mais precoce o desenvolvimento de comorbidades.

NESTE CONTEXTO, OS miRNAs DESPONTAM EM ESTUDOS PRÉ-CLÍNICOS E, ALGUNS DELES, TEM RELEVÂNCIA SOBRE GENES COMO *HFE* E *HAMP*, CASO DO miR-122 (Thakral & Ghoshal, 2015, Zhang & Huang, 2021, Zhan *et. al.*, 2015, Li *et. al.*, 2020).

Figura 3. Marco Conceitual.

#### 4 JUSTIFICATIVA

Conforme observado pela revisão da literatura, a Hemocromatose Hereditária pode ser influenciada por uma gama de fatores, o que a categoriza, portanto, como uma doença de contexto multifatorial. Logo, é de suma importância a caracterização desta população e o levantamento de hipóteses a cerca de potenciais biomarcadores, que visem o maior entedimento da HH e um caráter preventivo a morbidades secundárias.



## 5 OBJETIVOS

### 5.5 Objetivo Primário

Investigar características clínicas e laboratoriais de pacientes com diagnóstico de hiperferritinemia, submetidos a tratamento de sangria em dois centros de referência no sul do país.

### 5.6 Objetivos secundários

Descrever as frequências genótípicas e alélicas no gene *HFE*.

Comparar os dados coletados estratificando os participantes por centro de pesquisa e pela relevância clínica atribuída a cada genótipo e variante investigada.

Comparar a quantificação da expressão relativa do miR-122 de pacientes com diagnóstico de Hemocromatose Hereditária, em regime de tratamento com flebotomias nos períodos de indução e manutenção.

## 6 REFERÊNCIAS

Abbaspour N, Hurrell R, Kelishadi R. Review on iron and its importance for human health. *J Res Med Sci.* 2014;19(2):164-174.

Adams PC, Reboussin DM, Barton JC, et al. Hemochromatosis and iron-overload screening in a racially diverse population. *N Engl J Med.* 2005;352(17):1769-1778. doi:10.1056/NEJMoa041534

Allen KJ, Gurrin LC, Constantine CC, et al. Iron-overload-related disease in HFE hereditary hemochromatosis. *N Engl J Med.* 2008;358(3):221-230. doi:10.1056/NEJMoa073286

Alves LN, Santos EV, Stur E, Silva Conforti AM, Louro ID. Molecular epidemiology of HFE gene polymorphic variants (C282Y, H63D and S65C) in the population of Espírito Santo, Brazil. *Genet Mol Res.* 2016;15(2):10.4238/gmr.15028189. Published 2016 Apr 27. doi:10.4238/gmr.15028189

Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature.* 2004;431(7006):350-355. doi:10.1038/nature02871

Andolfo I, De Falco L, Ascì R, et al. Regulation of divalent metal transporter 1 (DMT1) non-IRE isoform by the microRNA Let-7d in erythroid cells. *Haematologica.* 2010;95(8):1244-1252.

doi:10.3324/haematol.2009.020685

Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004;116(2):281-297. doi:10.1016/s0092-8674(04)00045-5

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(9302):211-218. doi:10.1016/S0140-6736(02)07447-0

Bittencourt PL, Marin ML, Couto CA, Cançado EL, Carrilho FJ, Goldberg AC. Analysis of HFE and non-HFE gene mutations in Brazilian patients with hemochromatosis. *Clinics (Sao Paulo)*. 2009;64(9):837-841. doi:10.1590/S1807-59322009000900003

Bittencourt PL, Palácios SA, Couto CA, 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(3):329-335. doi:10.1590/s0100-879x2002000300007

Brissot P, Pietrangelo A, Adams PC, de Graaff B, McLaren CE, Loréal O. Haemochromatosis. *Nat Rev Dis Primers*. 2018;4:18016. Published 2018 Apr 5. doi:10.1038/nrdp.2018.16

Cançado RD, Guglielmi AC, Vergueiro CS, Rolim EG, Figueiredo MS, Chiattoni CS. Analysis of HFE gene mutations and HLA-A alleles in Brazilian patients with iron overload. *Sao Paulo Med J*. 2006;124(2):55-60. doi:10.1590/s1516-31802006000200002

Campos WN, Massaro JD, Martinelli ALC, et al. HFE gene polymorphism defined by sequence-based typing of the Brazilian population and a standardized nomenclature for HFE allele sequences. *HLA*. 2017;90(4):238-242. doi:10.1111/tan.13097

Castoldi M, Vujic Spasic M, Altamura S, et al. The liver-specific microRNA miR-122 controls systemic iron homeostasis in mice. *J Clin Invest*. 2011;121(4):1386-1396. doi:10.1172/JCI44883

Chan SY, Zhang YY, Hemann C, Mahoney CE, Zweier JL, Loscalzo J. MicroRNA-210 controls mitochondrial metabolism during hypoxia by repressing the iron-sulfur cluster assembly proteins ISCU1/2. *Cell Metab*. 2009;10(4):273-284. doi:10.1016/j.cmet.2009.08.015

Cheung CL, Cheung TT, Lam KS, Cheung BM. High ferritin and low transferrin saturation are associated with pre-diabetes among a national representative sample of U.S. adults. *Clin Nutr*. 2013;32(6):1055-1060. doi:10.1016/j.clnu.2012.11.024

Cid J, Palomera L, Díaz M, Zamora C, Solano F. Clinical characteristics and management of iron overload in 631 patients with chronic transfusion dependency: results from a multicentre,

observational study. *Blood Transfus.* 2014;12 Suppl 1(Suppl 1):s119-s123. doi:10.2450/2013.0173-12

Colli ML, Gross JL, Canani LH. Mutation H63D in the HFE gene confers risk for the development of type 2 diabetes mellitus but not for chronic complications. *J Diabetes Complications.* 2011;25(1):25-30. doi:10.1016/j.jdiacomp.2009.12.002

Davis M, Clarke S. Influence of microRNA on the maintenance of human iron metabolism. *Nutrients.* 2013;5(7):2611-2628. Published 2013 Jul 10. doi:10.3390/nu5072611

de Almeida SF, de Sousa M. The unfolded protein response in hereditary haemochromatosis. *J Cell Mol Med.* 2008;12(2):421-434. doi:10.1111/j.1582-4934.2007.00179.x

de Diego C, Murga MJ, Martínez-Castro P. Frequency of HFE H63D, S65C, and C282Y mutations in patients with iron overload and controls from Toledo, Spain. *Genet Test.* 2004;8(3):263-267. doi:10.1089/gte.2004.8.263

de Lima Santos PC, Pereira AC, Cançado RD, et al. Hemojuvelin and hepcidin genes sequencing in Brazilian patients with primary iron overload. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2010;14(6):803-806. doi:10.1089/gtmb.2010.0056

Duan L, Yin X, Meng H, Fang X, Min J, Wang F. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 2020;49(1):58-70. doi:10.3785/j.issn.1008-9292.2020.02.25

Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2006;6(4):259-269. doi:10.1038/nrc1840

Esau C, Davis S, Murray SF, et al. miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting. *Cell Metab.* 2006;3(2):87-98. doi:10.1016/j.cmet.2006.01.005

Evangelista AS, Nakhle MC, de Araújo TF, et al. HFE genotyping in patients with elevated serum iron indices and liver diseases. *Biomed Res Int.* 2015; 2015:164671. doi:10.1155/2015/164671

Feder JN, Gnirke A, Thomas W, et al. A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nat Genet.* 1996;13(4):399-408. doi:10.1038/ng0896-399.

Feder JN, Tsuchihashi Z, Irrinki A, et al. The hemochromatosis founder mutation in HLA-H disrupts beta2-microglobulin interaction and cell surface expression. *J Biol Chem.* 1997;272(22):14025-14028. doi:10.1074/jbc.272.22.14025

Finazzi, Dario, and Paolo Arosio. "Biology of Ferritin in Mammals: An Update on Iron Storage, Oxidative Damage and Neurodegeneration." *Archives of Toxicology* 88, no. 10; 2014; 1787–

1802

Gallego CJ, Burt A, Sundaresan AS, et al. Penetrance of Hemochromatosis in HFE Genotypes Resulting in p.Cys282Tyr and p.[Cys282Tyr];[His63Asp] in the eMERGE Network. *Am J Hum Genet.* 2015;97(4):512-520. doi:10.1016/j.ajhg.2015.08.008

Gardi C, Arezzini B, Fortino V, Comporti M. Effect of free iron on collagen synthesis, cell proliferation and MMP-2 expression in rat hepatic stellate cells. *Biochem Pharmacol.* 2002;64(7):1139-1145. doi:10.1016/s0006-2952(02)01257-1

Greene CM, Varley RB, Lawless MW. MicroRNAs and liver cancer associated with iron overload: therapeutic targets unravelled. *World J Gastroenterol.* 2013;19(32):5212-5226. doi:10.3748/wjg.v19.i32.5212

Gu Y, Estcourt LJ, Doree C, Hopewell S, Vyas P. Comparison of a restrictive versus liberal red cell transfusion policy for patients with myelodysplasia, aplastic anaemia, and other congenital bone marrow failure disorders. *Cochrane Database Syst Rev.* 2015;2015(10):CD011577. Published 2015 Oct 5. doi:10.1002/14651858.CD011577.pub2

Gujja P, Rosing DR, Tripodi DJ, Shizukuda Y. Iron overload cardiomyopathy: better understanding of an increasing disorder. *J Am Coll Cardiol.* 2010;56(13):1001-1012. doi:10.1016/j.jacc.2010.03.083

Heinemann FG, Tolkach Y, Deng M, et al. Serum miR-122-5p and miR-206 expression: non-invasive prognostic biomarkers for renal cell carcinoma. *Clin Epigenetics.* 2018;10:11. Published 2018 Jan 23. doi:10.1186/s13148-018-0444-9

Hoffbrand AV, Pettit FE, Moss PAH. *Essential Haematology.* 5th ed. Oxford (UK): Blackwell Publishing; c. Chapter 3, Hypochromic anaemias and iron overload; 2009; p. 28-43

Holmström P, Marmur J, Eggertsen G, Gåfväls M, Stål P. Mild iron overload in patients carrying the HFE S65C gene mutation: a retrospective study in patients with suspected iron overload and healthy controls. *Gut.* 2002;51(5):723-730. doi:10.1136/gut.51.5.723

Hou W, Tian Q, Steuerwald NM, Schrum LW, Bonkovsky HL. The let-7 microRNA enhances heme oxygenase-1 by suppressing Bach1 and attenuates oxidant injury in human hepatocytes. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1819(11-12):1113-1122. doi:10.1016/j.bbagr.2012.06.001

Hou W, Tian Q, Zheng J, Bonkovsky HL. MicroRNA-196 represses Bach1 protein and hepatitis C virus gene expression in human hepatoma cells expressing hepatitis C viral proteins. *Hepatology.* 2010;51(5):1494-1504. doi:10.1002/hep.23401

HU, Jihong et al. Characterization of conserved microRNAs from five different cucurbit species using computational and experimental analysis. *Biochimie*, France, v. 102, p. 137–144, 2014. doi: 10.1016/j.biochi.2014.03.002

Ila HB, Topaktas M, Arslan M, Büyükleyla M. Signs of deferasirox genotoxicity. *Cytotechnology*. 2014; 66(4):647-654.

Jansen C, Reiberger T, Huang J, et al. Circulating miRNA-122 levels are associated with hepatic necroinflammation and portal hypertension in HIV/HCV coinfection. *PLoS One*. 2015;10(2):e0116768. Published 2015 Feb 3. doi:10.1371/journal.pone.0116768

Jopling CL, Norman KL, Sarnow P. Positive and negative modulation of viral and cellular mRNAs by liver-specific microRNA miR-122. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2006;71:369-376. doi:10.1101/sqb.2006.71.022

Kawabata H. The mechanisms of systemic iron homeostasis and etiology, diagnosis, and treatment of hereditary hemochromatosis. *Int J Hematol*. 2018;107(1):31-43. doi:10.1007/s12185-017-2365-3

Kim J, Wessling-Resnick M. Iron and mechanisms of emotional behavior. *J Nutr Biochem*. 2014;25(11):1101-1107. doi:10.1016/j.jnutbio.2014.07.003

Kohgo Y, Ikuta K, Ohtake T, Torimoto Y, Kato J. Body iron metabolism and pathophysiology of iron overload. *Int J Hematol*. 2008;88(1):7-15. doi:10.1007/s12185-008-0120-5

Kontoghiorghes CN, Kontoghiorghes GJ. Efficacy and safety of iron-chelation therapy with deferoxamine, deferiprone, and deferasirox for the treatment of iron-loaded patients with non-transfusion-dependent thalassemia syndromes. *Drug Des Devel Ther*. 2016;10:465-481. Published 2016 Jan 29. doi:10.2147/DDDT.S79458

Kowdley KV, Brown KE, Ahn J, Sundaram V. ACG Clinical Guideline: Hereditary Hemochromatosis [published correction appears in *Am J Gastroenterol*. 2019 Dec;114(12):1927]. *Am J Gastroenterol*. 2019;114(8):1202-1218. doi:10.14309/ajg.0000000000000315

Kutay H, Bai S, Datta J, et al. Downregulation of miR-122 in the rodent and human hepatocellular carcinomas. *J Cell Biochem*. 2006;99(3):671-678. doi:10.1002/jcb.20982

Leão GD, Freire JM, Cunha Fernandes AL, et al. Analysis of HFE genes C282Y, H63D, and S65D in patients with hyperferritinemia from northeastern Brazil. *J Clin Lab Anal*. 2014;28(3):178-185. doi:10.1002/jcla.21663

- Liao Y, Du X, Lönnnerdal B. miR-214 regulates lactoferrin expression and pro-apoptotic function in mammary epithelial cells. *J Nutr.* 2010;140(9):1552-1556. doi:10.3945/jn.110.124289
- Liao Y, Lönnnerdal B. miR-584 mediates post-transcriptional expression of lactoferrin receptor in Caco-2 cells and in mouse small intestine during the perinatal period. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010;42(8):1363-1369. doi:10.1016/j.biocel.2009.07.019
- Li M, Tang Y, Wu L, et al. The hepatocyte-specific HNF4 $\alpha$ /miR-122 pathway contributes to iron overload-mediated hepatic inflammation. *Blood.* 2017;130(8):1041-1051. doi:10.1182/blood-2016-12-755967
- Li XN, Yang H, Yang T. miR-122 Inhibits Hepatocarcinoma Cell Progression by Targeting LMNB2. *Oncol Res.* 2020;28(1):41-49. doi:10.3727/096504019X15615433287579
- Liu CH, Ampuero J, Gil-Gómez A, et al. miRNAs in patients with non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review and meta-analysis. *J Hepatol.* 2018;69(6):1335-1348. doi:10.1016/j.jhep.2018.08.008
- Lu J, Getz G, Miska EA, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature.* 2005;435(7043):834-838. doi:10.1038/nature03702
- Martinelli AL, Filho R, Cruz S, et al. Hereditary hemochromatosis in a Brazilian university hospital in São Paulo State (1990-2000). *Genet Mol Res.* 2005;4(1):31-38. Published 2005 Mar 31.
- Mura C, Le Gac G, Raguénes O, Mercier AY, Le Guen A, Férec C. Relation between HFE mutations and mild iron-overload expression. *Mol Genet Metab.* 2000;69(4):295-301. doi:10.1006/mgme.2000.2981
- Nicolas G, Bennoun M, Porteu A, et al. Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver hepcidin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(7):4596-4601. doi:10.1073/pnas.072632499
- Oliveira VC, Caxito FA, Gomes KB, Castro AM, Pardini VC, Ferreira AC. Frequency of the S65C mutation in the hemochromatosis gene in Brazil. *Genet Mol Res.* 2009;8(3):794-798. Published 2009 Jul 14. doi:10.4238/vol8-3gmr562
- Pacurari M, Addison JB, Bondalapati N, et al. The microRNA-200 family targets multiple non-small cell lung cancer prognostic markers in H1299 cells and BEAS-2B cells. *Int J Oncol.* 2013;43(2):548-560. doi:10.3892/ijo.2013.1963
- Panch SR, Yau YY, West K, Diggs K, Sweigart T, Leitman SF. Initial serum ferritin predicts

number of therapeutic phlebotomies to iron depletion in secondary iron overload. *Transfusion*. 2015;55(3):611-622. doi:10.1111/trf.12854

Paul BT, Manz DH, Torti FM, Torti SV. Mitochondria and Iron: current questions [published correction appears in *Expert Rev Hematol*. 2017 Mar;10(3):275]. *Expert Rev Hematol*. 2017;10(1):65-79. doi:10.1080/17474086.2016.1268047

Pereira AC, Mota GF, Krieger JE. Hemochromatosis gene variants in three different ethnic populations: effects of admixture for screening programs. *Hum Biol*. 2001;73(1):145-151. doi:10.1353/hub.2001.0009

Perícole FV, Alves MA, Saad ST, Costa FF. Hemochromatosis (HFE) gene mutations in Brazilian chronic hemodialysis patients. *Braz J Med Biol Res*. 2005;38(9):1321-1324. doi:10.1590/s0100-879x2005000900005

Pietrangelo A. The ferroportin disease. *Blood Cells Mol Dis*. 2004;32(1):131-138. doi:10.1016/j.bcmed.2003.08.003

Pietrangelo, Antonello. "Hereditary Hemochromatosis: Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment." *Gastroenterology* 139, no. 2, 2010; 393–408, 408-2.

Powell LW, Seckington RC, Deugnier Y. Haemochromatosis. *Lancet*. 2016;388(10045):706-716. doi:10.1016/S0140-6736(15)01315-X

Ravasi G, Pelucchi S, Trombini P, et al. Hepcidin expression in iron overload diseases is variably modulated by circulating factors. *PLoS One*. 2012;7(5):e36425. doi:10.1371/journal.pone.0036425

Raza M, Chakraborty S, Choudhury M, Ghosh PC, Nag A. Cellular iron homeostasis and therapeutic implications of iron chelators in cancer. *Curr Pharm Biotechnol*. 2014;15(12):1125-1140. doi:10.2174/138920101512141202111915

Rombout-Sestrienkova E, van Kraaij MG, Koek GH. How we manage patients with hereditary haemochromatosis. *Br J Haematol*. 2016;175(5):759-770. doi:10.1111/bjh.14376

RUAN, Kai; FANG, Xiaoguang; OUYANG, Gaoliang. MicroRNAs: novel regulators in the hallmarks of human cancer. *Cancer letters, Ireland*, v. 285, n. 2, p. 116–126, 2009. doi:10.1016/j.canlet.2009.04.031

Sandnes M, Ulvik RJ, Vorland M, Reikvam H. Hyperferritinemia-A Clinical Overview. *J Clin Med*. 2021;10(9):2008. Published 2021 May 7. doi:10.3390/jcm10092008

- Sangokoya C, Doss JF, Chi JT. Iron-responsive miR-485-3p regulates cellular iron homeostasis by targeting ferroportin. *PLoS Genet*. 2013;9(4):e1003408. doi:10.1371/journal.pgen.1003408
- Santos PC, Cançado RD, Pereira AC, et al. Hereditary hemochromatosis: mutations in genes involved in iron homeostasis in Brazilian patients. *Blood Cells Mol Dis*. 2011;46(4):302-307. doi:10.1016/j.bcmd.2011.02.008
- Santiago González DA, Cheli VT, Wan R, Paez PM. Iron Metabolism in the Peripheral Nervous System: The Role of DMT1, Ferritin, and Transferrin Receptor in Schwann Cell Maturation and Myelination. *J Neurosci*. 2019;39(50):9940-9953. doi:10.1523/JNEUROSCI.1409-19.2019
- Santos PC, Dinardo CL, Cançado RD, Schettert IT, Krieger JE, Pereira AC. Non-HFE hemochromatosis. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2012;34(4):311-316. doi:10.5581/1516-8484.20120079
- Schaar DG, Medina DJ, Moore DF, Strair RK, Ting Y. miR-320 targets transferrin receptor 1 (CD71) and inhibits cell proliferation. *Exp Hematol*. 2009;37(2):245-255. doi:10.1016/j.exphem.2008.10.002
- Sheldon JH. Haemochromatosis. London: Oxford University Press; 1935.
- Shenoy N, Vallumsetla N, Rachmilewitz E, Verma A, Ginzburg Y. Impact of iron overload and potential benefit from iron chelation in low-risk myelodysplastic syndrome. *Blood*. 2014;124(6):873-881. doi:10.1182/blood-2014-03-563221
- Shpyleva SI, Tryndyak VP, Kovalchuk O, et al. Role of ferritin alterations in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*. 2011;126(1):63-71. doi:10.1007/s10549-010-0849-4
- Simon M, Pawlotsky Y, Bourel M, Fauchet R, Genetet B. Hémochromatose idiopathique Maladie associée à l'antigène tissulaire HL-A 3 [Letter: Idiopathic hemochromatosis associated with HL-A 3 tissular antigen]. *Nouv Presse Med*. 1975;4(19):1432.
- Simon M, Bourel M, Genetet B, Fauchet R. Idiopathic hemochromatosis. Demonstration of recessive transmission and early detection by family HLA typing. *N Engl J Med*. 1977;297(19):1017-1021. doi:10.1056/NEJM197711102971901
- Simon M, Le Mignon L, Fauchet R, et al. A study of 609 HLA haplotypes marking for the hemochromatosis gene: (1) mapping of the gene near the HLA-A locus and characters required to define a heterozygous population and (2) hypothesis concerning the underlying cause of hemochromatosis-HLA association. *Am J Hum Genet*. 1987;41(2):89-105.



Szemraj M, Oszajca K, Szemraj J, Jurowski P. MicroRNA Expression Analysis in Serum of Patients with Congenital Hemochromatosis and Age-Related Macular Degeneration (AMD). *Med Sci Monit.* 2017;23:4050-4060. Published 2017 Aug 22. doi:10.12659/msm.902366

Thakral S, Ghoshal K. miR-122 is a unique molecule with great potential in diagnosis, prognosis of liver disease, and therapy both as miRNA mimic and antimir. *Curr Gene Ther.* 2015;15(2):142-150. doi:10.2174/1566523214666141224095610

Torti FM, Torti SV. Regulation of ferritin genes and protein. *Blood.* 2002;99(10):3505-3516. doi:10.1182/blood.v99.10.3505

van Bokhoven MA, van Deursen CT, Swinkels DW. Diagnosis and management of hereditary haemochromatosis. *BMJ.* 2011;342:c7251. Published 2011 Jan 19. doi:10.1136/bmj.c7251

Vieira FM, Nakhle MC, Abrantes-Lemos CP, Cançado EL, Reis VM. Precipitating factors of porphyria cutanea tarda in Brazil with emphasis on hemochromatosis gene (HFE) mutations. Study of 60 patients. *An Bras Dermatol.* 2013;88(4):530-540. doi:10.1590/abd1806-4841.20132048

von Recklinghausen FD. Über Hamochromatose. *Tagebl Versamml Natur Ärzte Heidelberg.* 1889;62:324.

Wallace DF, Subramaniam VN. The global prevalence of HFE and non-HFE hemochromatosis estimated from analysis of next-generation sequencing data. *Genet Med.* 2016;18(6):618-626. doi:10.1038/gim.2015.140

Wang Z, Wang X. miR-122-5p promotes aggression and epithelial-mesenchymal transition in triple-negative breast cancer by suppressing charged multivesicular body protein 3 through mitogen-activated protein kinase signaling. *J Cell Physiol.* 2020;235(3):2825-2835. doi:10.1002/jcp.29188

Yang J, Yuan Y, Yang X, Hong Z, Yang L. Decreased expression of microRNA-122 is associated with an unfavorable prognosis in childhood acute myeloid leukemia and function analysis indicates a therapeutic potential. *Pathol Res Pract.* 2017;213(9):1166-1172. doi:10.1016/j.prp.2017.06.017

Yoshioka Y, Kosaka N, Ochiya T, Kato T. Micromanaging Iron Homeostasis: hypoxia-inducible micro-RNA-210 suppresses iron homeostasis-related proteins. *J Biol Chem.* 2012;287(41):34110-34119. doi:10.1074/jbc.M112.356717

Xiong W, Wang L, Yu F. Regulation of cellular iron metabolism and its implications in lung cancer

progression. *Med Oncol*. 2014;31(7):28. doi:10.1007/s12032-014-0028-2

Zamin I Jr, Mattos AA, Mattos AZ, Migon E, Bica C, Alexandre CO. Prevalence of the hemochromatosis gene mutation in patients with nonalcoholic steatohepatitis and correlation with degree of liver fibrosis. *Arq Gastroenterol*. 2006;43(3):224-228. doi:10.1590/s0004-28032006000300013

Zhan G, Jiang H, Yang R, Yang K. miR-122 and miR-197 expressions in hepatic carcinoma patients before and after chemotherapy and their effect on patient prognosis. *Am J Transl Res*. 2021;13(6):6731-6737. Published 2021 Jun 15.

Zhang C, Zhang F. Iron homeostasis and tumorigenesis: molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *Protein Cell*. 2015;6(2):88-100. doi:10.1007/s13238-014-0119-z

Zhang J, Huang H. miR-122-5p/KIF5B/AMPK/AKT regulatory network regulates the progression of NAFLD [retracted in: *Am J Transl Res*. 2021 Jun 15;13(6):7426]. *Am J Transl Res*. 2021;13(2):696-707. Published 2021 Feb 15.

Zhou L, Zhao B, Zhang L, et al. Alterations in Cellular Iron Metabolism Provide More Therapeutic Opportunities for Cancer. *Int J Mol Sci*. 2018;19(5):1545. Published 2018 May 22. doi:10.3390/ijms19051545

## 8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho, assim como os dados já referidos na literatura, ratificam cada vez mais a importância do estudo aprofundado do espectro de condições clínicas que cercam o diagnóstico de Hiperferritinemia. No caso desta investigação, o foco se voltou à Hemocromatose, doença genética, mas com desfechos que direcionam o racional técnico-científico para um caráter multifatorial.

O estudo foi conduzido em duas vias, uma com foco na caracterização clínica-laboratorial de uma amostragem advinda de dois centros assistenciais no estado do Rio Grande do Sul (RS), e a outra objetivando a análise de um potencial biomarcador, o miR-122, em amostras de pacientes com HH. Salienta-se o ineditismo de ambos os trabalhos e a importância de se fomentar a iniciativa de outros projetos, visto que as hipóteses que se apresentam a partir dos resultados é de fundamental importância para o aprimoramento das práticas assistenciais.

Sobre os dados epidemiológicos apresentados, dá-se destaque à prevalência de comorbidades nesta população e do monitoramento laboratorial para a eficácia da terapêutica. Além disso, a importância do diagnóstico molecular é clara, sendo contabilizados no projeto mais de 100 pacientes que se beneficiaram com a genotipagem para as variantes correlatas ao gene *HFE*. Reforça-se que essa análise permitiu comparações com investigações feitas em outras regiões do país, ratificando a hipótese que no RS a prevalência de tais mutações seria maior.

Quanto às análises do miRNA, a revisão da literatura mostra o quão importante é um painel de biomarcadores em uma doença suscetível a tantos fatores. Neste interim, as análises do miR-122 se mostraram efetivas quando comparada a expressão desse em uma amostra estratificada pelos níveis séricos de ferritina ao recrutamento. Entende-se que muitas perguntas podem surgir a partir da hipótese formulada. Logo, estudos longitudinais devem ser propostos no intuito de entender melhor a dinâmica do miRNA dentro do processo terapêutico.

## 9 PERSPECTIVAS FUTURAS

A partir da caracterização desta amostragem, dados de extrema relevância clínica na HH foram colocados em destaque, a ser citadas, por exemplo, as comorbidades mais frequentes. Entende-se que essas devem ser alvos de estudo para melhoria da qualidade de vida dos pacientes, seja por meio do delineamento de coortes clínicas, ou estudos de caso-controle. Em

relação aos dados moleculares, destaca-se que cerca de 30% dos pacientes são negativos para as variantes estudadas no gene *HFE*. Na medida que outras causas que possam justificar o aumento dos níveis de ferritina sérica são descartadas é objetivo do grupo a investigação das isoformas mais raras da HH a partir do uso de um painel de genes correlatos ao metabolismo do ferro e da metodologia de Sequenciamento de Nova Geração.

Os resultados associados ao miR-122 mostram uma prova de conceito importante e com muitas perguntas a serem respondidas. Logo é intuito do grupo a investigação da dinâmica deste miRNA no transcorrer do tratamento, bem como a tentativa de associação destes resultados à análise da expressão do genes importantes ao metabolismo do ferro e que poderiam ser alvos desta molécula, tais como o *HFE*, *HJV* e *HAMP*.

## 10 APÊNDICE

### ESTA SEÇÃO TEM POR OBJETIVO APRESENTAR TRABALHO DESENVOLVIDO DE FORMA ADJACENTE AO PROJETO DE DOUTORADO

#### **A HIPERFERRITINEMIA E A HEMOCROMATOSE AO OLHAR DE QUEM DIAGNOSTICA E DE QUEM É TRATADO: PODEMOS MELHORAR?**

( O Texto abaixo foi baseado em resumo submetido e apresentado ao congresso da Associação Brasileira de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular- HEMOPLAY 2021)

A Hiperferritinemia e, mais especificamente, a Hemocromatose Hereditária (HH) são condições clínicas amplamente tratadas em ambulatórios hematológicos e hemoterápicos. No entanto, até este paciente chegar para o procedimento de flebotomia, o diagnóstico passa por uma diversidade de profissionais, os quais nem sempre tem a expertise para conduzir o diagnóstico da melhor forma possível, podendo incorrer em uma impressão clínica incompleta. Quando pensamos em termos laboratoriais esta investigação pode ser mais prejudicada. Poucas são as equipes clínicas com entendimento translacional para interpretar e correlacionar um dado molecular ao achado clínico. Sendo assim, os Serviços de Hemoterapia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), do Hospital São Vicente de Paula de Passo Fundo e a Universidade de Passo Fundo, que iniciaram uma cooperação com o Serviço de Genética do HCPA em 2018 com o objetivo primário de estudar a população com hiperferritinemia, direcionaram esforços na criação de um material digital (*handbook*) que esclarecesse tanto os profissionais expostos a estes casos, bem como pacientes e familiares que lidam com a condição diariamente. A partir dos parâmetros clínicos elecados pela equipe clínica do projeto, foram suscitadas perguntas sobre a patogênese e a falta de alguns dados e condutas. Para a construção das respostas foi feita uma revisão na literatura nas bases de dados *SCOPUS* e *NCBI-PUBMED* com os seguintes termos: “*Hemochromatosis*”, “*Iron Overload*”, “*Hyperferritinemia*”. Foram também pesquisados guidelines para entender o que informam e suas diferenças. Baseado nesta revisão, a cartilha foi fragmentada em 3 vertentes instrutivas descritas a seguir: aos leigos, foram elaboradas perguntas e respostas sobre o ferro, qual a função do metal no corpo, necessidades de ingesta, quais alimentos contém, in natura ou suplementado. Além disso, foi elaborado um fluxograma lúdico sobre o excesso no sangue, sinais e sintomas, possíveis causas primárias e secundárias, a influência familiar e quando procurar um médico. Já para os pacientes, houve foco em orientações gerais como, por exemplo, cuidados com a alimentação, se existe alguma contraindicação, se os familiares deveriam investigar também, como é feito o tratamento e se existe cura. Aos profissionais de saúde, um fluxograma do atendimento, quando pedir exames e

quais, o que fazer mediante alteração, como proceder a investigação, como fazer o diagnóstico, quando encaminhar para o especialista, como é feito o tratamento, quando indicar a sangria. Este material foi publicado e identificado com ISBN 978-65-00-12140-7, e vem sendo incorporado a veículos de comunicação das instituições relacionadas. Como perspectiva, a ideia é submeter o material a apreciação de profissionais e pacientes em ambos hospitais e posteriormente publicar o retorno desta avaliação em periódico específico.

**O projeto vinculado ao trabalho foi registrado e aprovado pelos comitês de ética de todas as instituições citadas, tendo registro na Plataforma Brasil sob número CAAE 25978619.0.3001.5327**

**Link para acesso ao material:**

**[https://www.upf.br/ uploads/Conteudo/handbook%20hh%20isbn%20registrado.pdf](https://www.upf.br/uploads/Conteudo/handbook%20hh%20isbn%20registrado.pdf)**

## 11 ANEXOS

### **ANEXO 1. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE) PROJETO 2018-0542**

**Nº do projeto GPPG 2018-0542**

**Título do Projeto: Do Laboratório ao Manejo Clínico: A Patogênese da Hemocromatose**

Você está sendo convidado (a) a participar deste projeto de pesquisa por ter o diagnóstico ou suspeita de sobrecarga de ferro (Hemocromatose)

A Hemocromatose –ou sobrecarga de ferro- tem sua etiologia ou por critérios genéticos ou pelas recorrentes transfusões, as quais são justificadas por quadros de Talassemias, Anemia Falciforme, Anemia Aplásica Refratária, Síndromes Mielodisplásicas, Aplasia Pura de Série Eritroide e Leucemias Agudas. Atualmente, o manejo com os pacientes diagnosticados com sobrecarga de ferro compreende a flebotomia, ou sangria, e a manipulação de fármacos classificados como quelantes de ferro. No entanto, esta condição clínica pode gerar doenças secundárias que afetam órgãos como fígado, baço e coração, contra as quais não existe qualquer manejo profilático e mesmo com as terapias vigentes. Em outras palavras, a sobrecarga de ferro desencadeia vários processos celulares, eventos microscópios sem grande relevância quando isolados, mas que em conjunto podem gerar quadros clínicos importantes de serem tratados para manutenção da qualidade de vida.

Nosso objetivo é caracterizar todo esse processo desencadeado pela sobrecarga de ferro com a perspectiva de pensar em novos manejos para a equipe clínica junto ao paciente, seja para evitar o desenvolvimento de destas doenças secundárias ou mesmo a progressão. Esse estudo será desenvolvido pelos Serviços de Hemoterapia e Genética.

Se você concordar com a participação na pesquisa, será submetido às seguintes etapas:

- 1) Entrevista clínica de aproximadamente 15 minutos;
- 2) Autorizar a consulta de dados clínicos do seu prontuário;
- 3) Coleta de 8 ml de sangue (equivalente a 2 colheres de sopa) para análises no material genético.

Rubrica do participante \_\_\_\_\_

Rubrica do pesquisador \_\_\_\_\_

Página 1 de 3

Importante salientar que todo procedimento será feito aproveitando as consultas assistenciais e serão realizados em um único encontro no Serviço de Hemoterapia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

Os riscos envolvidos nessa pesquisa estão relacionados principalmente à coleta de sangue, com possível mal-estar passageiro e mancha roxa no local. Em alguns casos, já existe a indicação de coleta de sangue (sangrias terapêuticas), logo se pode desconsiderar este risco.

A entrevista clínica não acarreta riscos ou constrangimento ao participante, é feita em sala reservada, sendo necessária somente para registro das informações pertinentes ao projeto de forma atualizada. Qualquer pergunta que o paciente não se sinta confortável em responder, por mais simples que seja, será mantido o respeito à privacidade. A participação na pesquisa não trará benefícios diretos a todos. Porém, uma vez que existem participantes que não fizeram qualquer exame genético quando do diagnóstico de Hemocromatose Hereditária, considera-se benefício no delineamento do projeto a execução deste exame para as mutações mais frequentes e com influência na sintomatologia. Caso você se encaixe neste perfil, a equipe de pesquisa, ao findar do projeto, irá contatá-lo e encaminhará o resultado, se for do seu interesse. Ressalta-se que qualquer resultado aparecerá de forma codificada em banco de dados sigiloso com acesso somente pelos pesquisadores responsáveis, sem ser disponibilizado em prontuário eletrônico diretamente. Além disso, salienta-se que as demais descobertas do projeto contribuirão para o aumento do conhecimento sobre o assunto estudado, e poderá beneficiar futuros pacientes.

Sua participação na pesquisa é totalmente voluntária, ou seja, não é obrigatória. Caso você decida não participar, ou ainda, desistir de participar e retirar seu consentimento, não haverá nenhum prejuízo ao atendimento que você recebe ou possa vir a receber na instituição. Não será previsto qualquer tipo de pagamento pela sua participação no estudo. Você também não terá nenhum custo com respeito aos procedimentos, além de ter garantido o ressarcimento de despesas relacionadas ao estudo. Caso ocorra alguma intercorrência ou dano, resultante de sua participação na pesquisa, você receberá atendimento integral pelo tempo que for necessário, sem nenhum custo pessoal.

Rubrica do participante \_\_\_\_\_

Rubrica do pesquisador \_\_\_\_\_

Página 2 de 3



Os dados coletados durante a pesquisa serão sempre tratados confidencialmente. Os resultados serão apresentados de forma conjunta, sem a identificação dos participantes, ou seja, o seu nome não aparecerá na publicação dos resultados. Caso você autorize o armazenamento das amostras coletadas neste projeto, ficaremos com seu endereço e telefone para entrar em contato caso seja necessário lhe contatar para consentir novamente com a utilização. Novos projetos de pesquisa que aparecerem no futuro também deverão obter aprovação prévia do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP HCPA) e, se necessário, da Comissão Nacional de Pesquisa (CONEP). Eu autorizo o armazenamento de minhas amostras biológicas para outros estudos. Entendi que, nesse caso, eu serei contatado novamente para fins de convite e para que eu dê autorização expressa do novo uso.

( ) SIM, autorizo o armazenamento

( ) NÃO, não autorizo o armazenamento \*

\* Neste caso, minhas amostras serão descartadas ao final deste estudo.

Caso você tenha dúvidas, poderá entrar em contato com a pesquisadora responsável profa. Dra. Sandra Leistner-Segal pelo telefone (51)33598011, com a pesquisadora Nathália Kersting dos Santos, pelo mesmo telefone ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), pelo telefone (51) 33597640, ou no 2º andar do HCPA, sala 2227, de segunda à sexta, das 8h às 17h. Esse Termo é assinado em duas vias, sendo uma para o participante e outra para os pesquisadores.

\_\_\_\_\_  
Nome do participante da pesquisa

\_\_\_\_\_  
Assinatura

\_\_\_\_\_  
Nome do pesquisador que aplicou o Termo

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Local e Data: \_\_\_\_\_

Rubrica do participante \_\_\_\_\_

Rubrica do pesquisador \_\_\_\_\_

Página 3 de 3

**PROJETO 2018-0576**

Nº do projeto GPPG: 2018-0576

Título do Projeto: Investigação de microRNAs como Potenciais Biomarcadores para Desfechos da Hemocromatose.

Você está sendo convidado (a) a participar deste projeto de pesquisa por ter o diagnóstico de sobrecarga de ferro (Hemocromatose).

A Hemocromatose –ou sobrecarga de ferro- pode ser causada por critérios genéticos ou pelas recorrentes transfusões, que estão relacionadas com quadros de Talassemias, Anemia Falciforme, Anemia Aplásica Refratária, Síndromes Mielodisplásicas, Aplasia Pura de Série Eritroide ou Leucemias Agudas. Atualmente, o manejo com os pacientes diagnosticados com sobrecarga de ferro compreende a flebotomia, ou sangria, e a manipulação de fármacos classificados como quelantes de ferro, de acordo com cada situação clínica específica. No entanto, esta condição pode gerar outras doenças relacionadas à sobrecarga de ferro que pode afetar órgãos como fígado, baço e coração. Em outras palavras, a sobrecarga de ferro desencadeia vários processos celulares, eventos microscópios sem grande relevância quando isolados, mas que em conjunto podem ser importantes para entender e buscar alternativas de prevenção destas doenças que podem ser desencadeadas.

Nosso objetivo é encontrar marcadores biológicos dos processos desencadeados pela sobrecarga de ferro com a ideia de futuramente estas moléculas poderem ser utilizadas como um indicador de prognóstico, o que poderia facilitar o manejo precoce das consequências relacionadas à sobrecarga de ferro. Esse estudo será desenvolvido pelo Serviço de Genética em colaboração com os Serviços de Hemoterapia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e São Vicente de Paulo- Passo Fundo (RS).

Caso você aceite participar, serão realizadas as seguintes etapas:

- 1) Autorizar a consulta de dados clínicos do seu prontuário, como diagnóstico, exames e tratamentos realizados;
- 2) Entrevista clínica de aproximadamente 15 minutos, onde serão confirmados alguns dados clínicos sobre a sua condição de saúde;

Rubrica do participante \_\_\_\_\_

Rubrica do pesquisador \_\_\_\_\_

Página 1 de 3

3) Coleta de 4 ml de sangue (equivalente a 1 colher de sopa) para análises de marcadores biológicos relacionado ao material genético.

Importante salientar que todas as etapas serão realizadas aproveitando as consultas assistenciais e serão realizados em um único encontro no Serviço de Hemoterapia que você realiza acompanhamento. Caso você possua a indicação assistencial de realizar alguma coleta de sangue ou mesmo o procedimento de sangria, não será necessária uma coleta adicional. Caso você não possua esta indicação, a coleta será realizada por um profissional habilitado.

Os riscos envolvidos nessa pesquisa estão relacionados principalmente à coleta de sangue para os participantes que realizarão uma coleta exclusiva para a pesquisa, com possível mal-estar passageiro e mancha roxa no local. Para os participantes que realizarem a coleta junto com o procedimento assistencial, não há riscos adicionais. A entrevista clínica poderá gerar algum desconforto por tratar-se de informações pessoais, mas será feita pela pesquisadora em uma sala reservada.

A participação na pesquisa não trará benefícios diretos aos participantes. No entanto, salienta-se que as descobertas do projeto contribuirão para o aumento do conhecimento sobre o assunto estudado, e poderá beneficiar futuros pacientes.

Sua participação na pesquisa é totalmente voluntária, ou seja, não é obrigatória. Caso você decida não participar, ou ainda, desistir de participar e retirar seu consentimento, não haverá nenhum prejuízo ao atendimento que você recebe ou possa vir a receber na instituição.

Não será previsto qualquer tipo de pagamento pela sua participação no estudo. Você também não terá nenhum custo com respeito aos procedimentos, além de ter garantido o ressarcimento de despesas relacionadas ao estudo.

Caso ocorra alguma intercorrência ou dano, resultante de sua participação na pesquisa, você receberá atendimento integral pelo tempo que for necessário, sem nenhum custo pessoal.

Os dados coletados durante a pesquisa serão sempre tratados confidencialmente. Os resultados serão apresentados de forma conjunta, sem a identificação dos participantes, ou seja, o seu nome não aparecerá na publicação dos resultados.

Rubrica do participante \_\_\_\_\_

Rubrica do pesquisador \_\_\_\_\_

Página 2 de 3

projeto, ficaremos com seu endereço e telefone para entrar em contato caso seja necessário lhe contatar para consentir novamente. Novos projetos de pesquisa que forem realizados no futuro também deverão obter aprovação prévia do Comitê de Ética em Pesquisa e, se necessário, da Comissão Nacional de Pesquisa (CONEP).

Caso você tenha dúvidas, poderá entrar em contato com a pesquisadora responsável profa. Dra. Sandra Leistner-Segal pelo telefone (51)33598011, com a pesquisadora Nathália Kersting dos Santos, pelo mesmo telefone, ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), pelo telefone (51) 33597640, ou no 2º andar do HCPA, sala 2227, de segunda à sexta, das 8h às 17h. Caso você seja assistido pelo Hospital São Vicente de Paulo, poderá contatar pelo telefone (54) 3316-4000, ou no 6º andar do HSVP, Comissão de Pós-Graduação e Pesquisa, de segunda à sexta, das 8h às 17h.

Sobre a autorização para o armazenamento de minhas amostras biológicas para outros estudos, conforme descrito acima:

( ) SIM, autorizo o armazenamento.

( ) NÃO, não autorizo o armazenamento.\*

\*Neste caso, minhas amostras serão descartadas ao final deste estudo.

Esse Termo é assinado em duas vias, sendo uma para o participante e outra para os pesquisadores.

\_\_\_\_\_  
Nome do participante da pesquisa

\_\_\_\_\_  
Assinatura

\_\_\_\_\_  
Nome do pesquisador que aplicou o Termo

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Local e Data: \_\_\_\_\_

Rubrica do participante \_\_\_\_\_

Rubrica do pesquisador \_\_\_\_\_

Página 3 de 3

**ANEXO 3. FORMULÁRIO PARA COLETA DE DADOS DOS PACIENTES  
ARROLADOS NOS PROJETOS**

**FICHA DE IDENTIFICAÇÃO DO PARTICIPANTE DE PESQUISA**

**Projetos: Do Laboratório ao Manejo Clínico: A Patogênese da Hemocromatose  
Investigação de microRNAs como Potenciais Biomarcadores para Desfechos da  
Hemocromatose.**

Nome Completo:		
Nome do responsável (se menor de 18 anos)		
Endereço 1 (Ponto de Ref.)	Telefone principal: Telefone secundário:	
E-mail 1:		
E-mail 2:		
Aplicador do TCLE		
HCPA Prontuário:	Data de nascimento: _ / _ / _ _ _ _	Data _ / _ / _ _ _ _
Idade atual: _ _ _	Sexo: ( ) F      ( ) M	IMC:

<b>FICHA CLÍNICA</b>	<b>*NA= Não se aplica</b>
Hemocromatose    ( ) Hereditária    ( ) Adquirida    ( ) HFAM    ( ) NA	
Ferritina e Transferrina:	

Histórico de Transfusões:	( ) NA
Histórico de Flebotomia:	( ) NA
Aloimunização ou auto-imunidade (esclarecer se foi pregressa ou após sobrecarga de ferro):	( ) NA
Tratamento com quelantes de ferro:	( ) NA
Outros fármacos utilizados:	
Comorbidades:    ( ) Sim        ( ) Não Se sim, órgão afetado: ( ) Fígado    ( ) Baço    ( ) Pâncreas    ( ) Medula Óssea    ( ) Coração    ( ) outros Tem exames recentes?	
Fez algum processo cirúrgico (incluir transplante)?  Fumante?  Sinais e Sintomas atuais:	

## ANEXO 4. CHECKLIST STROBE – ARTIGOS

	Item No	Recommendation
<b>Title and abstract</b> ✓	1	(a) Indicate the study's design with a commonly used term in the title or the abstract (b) Provide in the abstract an informative and balanced summary of what was done and what was found
<b>Introduction</b>		
Background/rationale ✓	2	Explain the scientific background and rationale for the investigation being reported
Objectives ✓	3	State specific objectives, including any prespecified hypotheses
<b>Methods</b>		
Study design ✓	4	Present key elements of study design early in the paper
Setting ✓	5	Describe the setting, locations, and relevant dates, including period of recruitment, exposure, follow-up, and data collection
Participants ✓	6	(a) <i>Cohort study</i> —Give the eligibility criteria, and the sources and methods of selection of participants. Describe methods of follow-up <i>Case-control study</i> —Give the eligibility criteria, and the sources and methods of case ascertainment and control selection. Give the rationale for the choice of cases and controls <i>Cross-sectional study</i> —Give the eligibility criteria, and the sources and methods of selection of participants (b) <i>Cohort study</i> —For matched studies, give matching criteria and number of exposed and unexposed <i>Case-control study</i> —For matched studies, give matching criteria and the number of controls per case
Variables ✓	7	Clearly define all outcomes, exposures, predictors, potential confounders, and effect modifiers. Give diagnostic criteria, if applicable
Data sources/ measurement ✓	8*	For each variable of interest, give sources of data and details of methods of assessment (measurement). Describe comparability of assessment methods if there is more than one group
Bias ✓	9	Describe any efforts to address potential sources of bias
Study size ✓	10	Explain how the study size was arrived at
Quantitative variables ✓	11	Explain how quantitative variables were handled in the analyses. If applicable, describe which groupings were chosen and why
Statistical methods ✓	12	(a) Describe all statistical methods, including those used to control for confounding (b) Describe any methods used to examine subgroups and interactions

		(c) Explain how missing data were addressed
		(d) <i>Cohort study</i> —If applicable, explain how loss to follow-up was addressed
		<i>Case-control study</i> —If applicable, explain how matching of cases and controls was addressed
		<i>Cross-sectional study</i> —If applicable, describe analytical methods taking account of sampling strategy
		(e) Describe any sensitivity analyses
<b>Results</b>		
Participants✓	13*	(a) Report numbers of individuals at each stage of study—eg numbers potentially eligible, examined for eligibility, confirmed eligible, included in the study, completing follow-up, and analysed
		(b) Give reasons for non-participation at each stage
		(c) Consider use of a flow diagram
Descriptive data✓	14*	(a) Give characteristics of study participants (eg demographic, clinical, social and information on exposures and potential confounders
		(b) Indicate number of participants with missing data for each variable of interest
		(c) <i>Cohort study</i> —Summarise follow-up time (eg, average and total amount)
Outcome data✓	15*	<i>Cohort study</i> —Report numbers of outcome events or summary measures over time
		<i>Case-control study</i> —Report numbers in each exposure category, or summary measures of exposure
		<i>Cross-sectional study</i> —Report numbers of outcome events or summary measures
Main results✓	16	(a) Give unadjusted estimates and, if applicable, confounder-adjusted estimates and their precision (eg, 95% confidence interval). Make clear which confounders were adjusted for and why they were included
		(b) Report category boundaries when continuous variables were categorized
		(c) If relevant, consider translating estimates of relative risk into absolute risk for a meaningful time period
Other analyses✓	17	Report other analyses done—eg analyses of subgroups and interactions, and sensitivity analyses
<b>Discussion</b>		
Key results✓	18	Summarise key results with reference to study objectives
Limitations✓	19	Discuss limitations of the study, taking into account sources of potential bias or imprecision. Discuss both direction and magnitude of any potential bias
Interpretation✓	20	Give a cautious overall interpretation of results considering objectives, limitations, multiplicity of analyses, results from similar studies, and other relevant evidence
Generalisability✓	21	Discuss the generalisability (external validity) of the study results



---

**Other informatior**

---

Funding✓ 22 Give the source of funding and the role of the funders for the present study and, if applicable, for the original study on which the present article is based