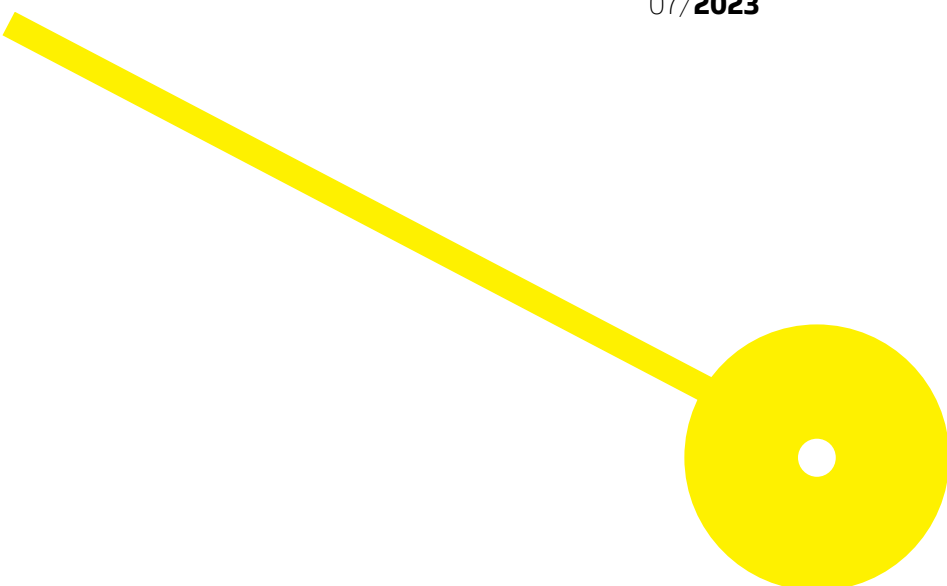




# Eritropoiese em doentes com Hemocromatose e dadores de sangue

Francisco José Pereira Dias

07/2023





**ESCOLA  
SUPERIOR  
DE SAÚDE**



## **Eritropoiese em doentes com Hemocromatose e dadores de sangue**

**Autor**

Francisco José Pereira Dias

**Orientadores**

Professora Doutora Graça Porto (CHUdSA)

Professor Doutor Delfim Duarte (I3S)

Professor Coordenador Especialista Maria Manuela Amorim Sousa,  
Centro de Investigação em Saúde e Ambiente (CISA), ESS|PPorto

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários á obtenção do grau de Mestre em **Análises Clínicas e Saúde Pública** – Área de Especialização em **Imunohemoterapia e Transplantação** pela Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto.

### **Menção de apoio financeiro**

Dissertação realizada com o apoio do Fórum Hematológico do Norte através do projeto FHN - 2021 - MDS NRF2 Iron - intitulado: *"The role of iron overload and oxidative damage in the development of myelodysplastic syndrome"*.

## **Agradecimentos**

A elaboração deste estudo marcou uma etapa importante na minha vida. Como tal gostaria de agradecer a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram e colaboraram para a sua realização.

À Professora Doutora Graça Porto, pelo desafio colocado na escolha do tema para esta tese, pelo seu empenho em aprofundar o conhecimento sobre a Hemocromatose. Pela sua disponibilidade e orientação, que muito útil me foram durante este percurso.

À Doutora Liliana Arede, pela orientação e partilha da sua experiência na utilização dos ensaios clonogénicos. Pela sua inestimável ajuda durante toda a elaboração deste trabalho.

Ao Professor Doutor Delfim Duarte, pela sua disponibilidade e supervisão, permitindo ser possível a realização deste projeto.

À Professora Doutora Maria Sousa, pelo seu encorajamento e orientação na elaboração desta tese.

À enfermeira Graça Melo, pela sua colaboração na seleção da amostra dos doentes e por toda a sua simpatia.

Ao Serviço de Imuno-Hemoterapia do CHUdSA, pela colaboração na seleção da amostra dos doadores, bem como na facilitação para a execução deste estudo.

À minhas filhas Leonor e Mariana, pelo apoio incondicional e incentivo na concretização deste projeto.

À minha esposa Aurelina, pelo amor, partilha, companheirismo, estímulo e apoio na concretização desta caminhada.

Muito Obrigado.

## Resumo

O ferro (Fe) é um nutriente essencial para a vida celular, intervindo na eritropoiese, no transporte e armazenamento de oxigénio, e na síntese proteica, entre outros processos. Não existindo um mecanismo fisiológico para excretar o excesso de Fe, os seus níveis no organismo têm de ser rigorosamente regulados. O principal mediador da homeostasia sistémica do Fe é a hepcidina.

A hemocromatose (HC) é uma doença genética na qual um defeito na regulação da hepcidina provoca uma alteração da homeostasia do Fe, levando ao aumento da sua absorção intestinal e lesão de órgãos, particularmente o fígado. A maioria dos casos de HC é devida à homozigotia para a variante C282Y do gene *hemostatic iron regulator (HFE)* que impede a expressão da proteína à superfície das células. A proteína HFE faz parte do complexo de sinalização da hepcidina no fígado. Assim, a sua ausência na superfície dos hepatócitos resulta numa falha de resposta do fígado à sobrecarga de Fe e consequente diminuição da hepcidina em circulação. O tratamento da HC consiste na realização de flebotomias regulares que mobilizam o Fe armazenado para a eritropoiese, diminuindo o seu depósito noutros tecidos.

O principal objetivo desta dissertação foi avaliar se existe alguma alteração nas etapas iniciais da eritropoiese nos doentes com HC e défice do HFE, e se essa possível alteração é intrínseca à célula eritropoiética ou devida a fatores externos, nomeadamente à sobrecarga prévia de Fe. Foi realizado um estudo observacional, caso–controlo, no qual foram executados ensaios clonogénicos em presença de eritropoietina, que testam a produção de colónias de células fenotipicamente diferenciadas nas diferentes linhagens hematopoiéticas, incluindo na linhagem eritróide. Como controlo, utilizamos um grupo de dadores regulares de sangue

Os resultados demonstraram que os doentes com HC apesar de terem, em média, valores mais elevados de hemoglobina e volume globular médio, têm uma capacidade clonogénica total diminuída, que não parece estar diretamente relacionada com os níveis de Fe, nem com a quantidade total corporal de Fe ao diagnóstico, sugerindo uma alteração específica relacionada com a deficiência de *HFE*.

**Palavras-chave:** Hemocromatose, HFE, homeostasia do ferro, eritropoiese, hepcidina, ensaio de unidade formadora de colónias

## **Abstract**

Iron (Fe) is an essential nutrient for the cellular life cycle, intervening in erythropoiesis, oxygen transportation and storage, and protein synthesis. There are no physiological mechanisms to secrete excess iron from the body therefore its concentration must be rigorously regulated. Hepcidin is the key mediator of systemic iron homeostasis.

Hemochromatosis (HC) is a genetic disorder characterized by a defect in the regulation of hepcidin that alters iron homeostasis, increasing iron intestinal absorption and causing organ damage, particularly in the liver. The majority of HC cases are attributed to the C282Y homozygous variant of the hemostatic iron regulator (*HFE*) gene which impairs the expression of the HFE protein on the cell surface. The HFE protein is part of a protein complex involved in hepcidin signaling within the liver. The absence of HFE protein on the surface of hepatocytes leads to a reduced response of the liver to iron excess, resulting in decreased circulating levels of hepcidin. The standard treatment for HC involves regular phlebotomies, which redirect excess iron to erythropoiesis, thus reducing its accumulation in the body.

The primary goal of this dissertation is to assess whether there are any changes in the early stages of erythropoiesis in patients with HC with HFE deficiency and to determine if these changes are intrinsic to the erythropoietic cell or influenced by external factors, such as the degree of iron excess. To achieve this, we conducted clonogenic assays in the presence of erythropoietin, which assesses the growth of colonies of phenotypically differentiated cells from various hematopoietic lineages, including the erythroid lineage. For comparison, we included a control group comprising regular blood donors.

Our findings demonstrate that patients with HC exhibit a decreased clonogenic capacity, despite having higher hemoglobin levels and mean packed cell volume. This reduction in clonogenic capacity cannot be attributed directly to iron levels or the overall iron load in the body at the time of diagnosis, suggesting a distinct alteration related to HFE deficiency.

**Keywords:** hemochromatosis, HFE, iron homeostasis, erythropoiesis, hepcidin, colony-forming units assay

## Índice

1. Introdução.....	1
1.1. Ferro .....	1
1.2. O Metabolismo do Fe a nível sistémico .....	2
1.3. Mecanismos de absorção do Fe .....	3
1.4. As proteínas do metabolismo do Fe .....	4
1.5. A utilização do Fe nas células eritróides .....	5
1.6. Hpcidina.....	8
1.7. Sobrecarga de Fe e Hemocromatose.....	9
1.8. Genética da Hemocromatose .....	10
1.9. Flebotomias .....	12
1.10. Hemocromatose e eritropoiese .....	13
1.11. Ensaio clonogénico.....	13
2. Objectivos do estudo.....	16
2.1. Objectivos gerais.....	16
2.2. Objectivos específicos.....	16
3. Métodos.....	17
3.1. Seleção e critérios de inclusão dos casos.....	17
3.2. Dados hematológicos e do metabolismo do ferro .....	18
3.3. Estudo da capacidade clonogénica .....	18
3.3.1. Viabilidade celular .....	19
3.3.2. Teste de unidades formadoras de colónias hematopoiéticas .....	21
3.3.3. Leitura das placas – classificação de colónias .....	22
3.3.4 Considerações éticas .....	23
3.3.5 Análise estatística.....	24
4. Resultados.....	25
4.1. Descrição de amostra .....	25
4.2. Ensaio clonogénico.....	27
4.3. Correlações entre os valores obtidos em cada população .....	32
4.3.1. HC ao diagnóstico .....	32
4.3.2. HC manutenção.....	32

4.3.3. Dadores .....	33
5. Discussão.....	34
6. Conclusão.....	37
6.1. Limitações e perspectivas futuras.....	37
7. Referências Bibliográficas.....	39

## Índice de figuras

Figura 1: Absorção de Fe nos enterócitos e as proteínas envolvidas. Ferritorrutase), transportador metal divalente-1, proteína transportadora do heme-1, proteína da hemocromatose, recetor da transferrina. Adaptado de (5)	5
Figura 2: Na medula óssea, os macrófagos são circundados por células eritroides em diferentes estádios de diferenciação (ilhas eritroblásticas). Esses macrófagos dão suporte à proliferação e maturação das células eritroides. Os glóbulos rubros são produzidos através da diferenciação de células-hematopoiéticas pluripotentes para BFU-E, CFU-E, e eritroblastos. Embora a eritropoietina atue tanto nas células BFU-E quanto nas células CFU-E, células CFU-E apresentam maior sensibilidade à eritropoietina, outros fatores, como fator de células-tronco, interleucina-3 e 4 bem como o estimulador de colónias de granulócitos e macrófagos. Adaptado de (13).	6
Figura 3: A regulação do Fe celular e mitocondrial nas células eritróides. A transferrina diférrica é captada através da ligação do receptor de transferrina 1 e endocitose mediada por clatrina. O pH ácido do endossomo favorece a dissociação do ferro da transferrina. A transferrina e TFR1 são reciclados de volta para a superfície da célula. O ferro férrico é reduzido a ferro ferroso pelo antígeno epitelial metaloredutase 6-transmembranar do membro prostático 3 e exportado no citosol pelo transportador de metal bivalente 1. O excesso de ferro é armazenado na ferritina ou exportado para fora da célula através da ferroportina. As proteínas reguladoras de ferro 1 e 2 regulam pós-transcricionalmente o nível de genes relacionados ao ferro ligando o elemento responsivo ao ferro. Adaptado de (20).	7
Figura 4: A hepcidina no metabolismo de ferro. Ao formar um complexo com a ferroportina promove a sua degradação. No enterócito, o ferro não é transportado para o exterior da célula e a sua absorção é inibida. No macrófago o ferro fica acumulado no seu interior ficando diminuída a quantidade de ferro, para o processo da eritropoiese. Adaptado de (5,6).	9
Figura 5: Diagrama da diferenciação de uma célula multipotente e as linhagens celulares que origina. Vários tipos de células podem ser identificados em meios semi-sólido pelo tipo de unidades formadoras de colónias. Adaptado de (56).	15
Figura 6: Separação de células mononucleares de sangue periférico.	19
Figura 7: Cálculo do número de células a plaquear.	20
Figura 8: Análise manual de viabilidade celular com <i>Trypan Blue</i> .	20
Figura 9: Ensaio clonogénico em meio de metilcelulose.	22

Figura 10: Fotos representativas dos tipos de colónias observadas. ....	23
Figura 11: Diferença no índice da hemoglobina. ....	26
Figura 12: Capacidade clonogénica total. ....	28

## Índice de Tabelas

Tabela 1: Genes mutados nas doenças do metabolismo de Ferro. Adaptado de (37) .....	11
Tabela 2: Classificação da hemocromatose segundo alteração molecular de acordo com variantes de fenótipo/genótipo (37) .....	12
Tabela 3: Caracterização das duas populações em estudo. ....	26
Tabela 4: Comparação de resultados ao diagnóstico e no tratamento manutenção dos doentes. ....	27
Tabela 5: Resultados em valores absolutos da capacidade clonogénica das populações em estudo. ....	28
Tabela 6: Correlações entre a capacidade clonogénica eritroide e mieloide atuais dos doentes com hemocromatose e os parâmetros hematológicos e do metabolismo do ferro ao diagnóstico. Em cada localização da tabela estão indicados os valores das correlações Pearson entre cada par de variáveis: coeficientes de correlação, número de pares de dados utilizados para calcular cada coeficiente. ....	32
Tabela 7: Correlações entre a capacidade clonogénica eritróide e mielóide e os parâmetros hematológicos e do metabolismo do ferro em doentes com Hemocromatose em fase de tratamento de manutenção. Em cada localização da tabela estão indicados os valores das correlações Pearson entre cada par de variáveis: coeficientes de correlação, número de pares de dados utilizados para calcular cada coeficiente. ....	32
Tabela 8: Correlações entre a capacidade clonogénica eritroide e mieloide e os parâmetros hematológicos em dadores regulares de sangue. Em cada localização da tabela estão indicados os valores das correlações Pearson entre cada par de variáveis: coeficientes de correlação, número de pares de dados utilizados para calcular cada coeficiente. ....	33

## Índice de abreviaturas

%	Porcentagem
μl	Microlitro
ng	Nanograma
BFU-E	<i>Burst forming unit-erythroid</i>
C-CSF	<i>Granulocyte colony-stimulating factor</i>
CAFC	<i>Cobblestone area-forming cell</i>
CFCH	Células estaminais humanas hematopoiéticas
CFCH	Células formadoras de colónias hematopoiéticas
CFU-E	<i>Colony forming unit-erythroid</i>
CFU-GM	<i>Colony forming unit - granulocyte/macrophage</i>
CFU-G	<i>Colony forming unit - granulocyte</i>
CFU-M	<i>Colony forming unit - macrophage</i>
CFU-GEMM	<i>Colony forming unit - granulocyte, erythrocyte, monocyte, megakaryocyte</i>
CH	Células hematopoiéticas
CHR	Cromossoma
CHUdSA	Centro Hospitalar Universitário de Santo António
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
Dcytb	Citocromo B duodenal
DMT-1	Transportador metal divalente
DPBS	<i>Dulbecco's phosphate-buffered saline</i>
EC	Ensaio colonogénico
EPO	Eritropoietina
Fe	Ferro
FE <sup>2+</sup>	Ferro férrico
FE <sup>3+</sup>	Ferro ferroso
FPN	Ferroportina
FT	Ferritina sérica
g	Aceleração em RCF
GM-CSF	<i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
GR	Glóbulos rubros

## Índice de abreviaturas (cont.)

HGB	Hemoglobina
HC	Hemocromatose
HCP1	Proteína transportadora do heme 1
HFE	Hemostatic Iron Regulator
HSC	Células da medula óssea dos precursores hematopoéticos
IBS	Instituto de Investigação e Inovação em Saúde
IL-3	Interleucina 3
IL-6	Interleucina 6
IMDM	<i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i>
IRP1	<i>Iron regulation protein 1</i>
IRP2	<i>Iron regulation protein 2</i>
ml	Mililitro
mm	Milímetros
PBMNC	Células mononucleares de sangue periférico
rpm	Rotações por minuto
Steap 3	Membro prostático 3
TBD	<i>Trypan Blue Dye</i>
TBIS	<i>Total body iron stores</i>
Tffe2 <sup>+</sup>	Transferrina diférrica
TFR	Transferrina
TSAT	Taxa de saturação da transferina
UFC	Unidades formadoras de colonias
VGM	Volume globular médio

## 1. Introdução

### 1.1. Ferro

O ferro (Fe) é um elemento essencial para a vida. Tem a capacidade de aceitar e fornecer elétrons alternando entre a forma férrica,  $Fe^{3+}$ , ou ferrosa,  $Fe^{2+}$ . Intervém em várias reações bioquímicas, atua como cofator para diversas proteínas e enzimas, participando desta forma nos processos de homeostasia celular, síntese de DNA, metabolismo oxidativo e produção de energia. É um elemento primordial na cadeia respiratória, tendo como função o transporte de oxigênio. No organismo humano o tecido com maior consumo Fe é a medula óssea, utilizando-o na produção da hemoglobina (HGB) pelos glóbulos rubros (GR). A quantidade de Fe necessária para a manutenção da eritropoiese é obtida através da dieta e pelo processo de reciclagem de GR senescentes via fagocitose pelos macrófagos, no baço. É também no baço onde a HGB é degradada sendo o Fe exportado para a circulação e reutilizado (1–3).

A reatividade química do Fe tem uma importante implicação biológica. A oxidação espontânea de  $Fe^{2+}$  em  $Fe^{3+}$ , torna-o fisiologicamente insolúvel, dificultando a sua absorção, independentemente da quantidade. O Fe livre apresenta também a propriedade catalítica do stress oxidativo pela reação de Fenton e Haber-Weiss, produzindo radicais livres. A grande reatividade do Fe torna-o um elemento tóxico para macromoléculas e tecidos quando se encontra em excesso (4–6).

O nosso organismo obtém Fe através de duas fontes: a dieta, e a reciclagem do Fe proveniente da destruição dos GR (5). O ferro dietético é encontrado de duas formas, heme (orgânico) e não heme (inorgânico). O Fe heme pode ser encontrado mais especificamente em carnes como carne vermelha e de caça, e é parte integrante da hemoglobina (HGB) e da mioglobina. Por outro lado, o Fe não heme está presente numa gama mais ampla de alimentos, tanto animais quanto vegetais. No entanto, o Fe não heme está na forma ferrosa, tendo como tal baixa solubilidade e, conseqüentemente, baixa biodisponibilidade. O Fe férrico tem melhor solubilidade e biodisponibilidade (7,8).

O Fe desempenha um papel fundamental na sobrevivência e proliferação celular, regulando a atividade enzimática e as reações de oxidação-redução. Como resultado, a deficiência de Fe pode levar à redução da proliferação celular ou mesmo à morte celular. Por sua vez, o excesso de Fe pode causar toxicidade através da geração de grupos hidroxilo

citotóxicos e radicais livres lipídicos que ativam o sistema reticuloendotelial e exacerbam o processo inflamatório (4). Portanto, o metabolismo do Fe deve ser rigorosamente regulado dentro dos níveis fisiológicos para evitar os efeitos adversos da deficiência ou sobrecarga. O Fe é o único nutriente cuja homeostasia é maioritariamente controlada através da regulação da absorção intestinal (9,10).

Uma ampla variedade de sinais endógenos e exógenos, incluindo a perda de Fe por hemorragia, eritropoiese, inflamação e isquemia tecidual, podem ativar ou desativar as vias de sinalização envolvidas no metabolismo do Fe. Os três principais processos celulares associados ao metabolismo do ferro são: a absorção, o armazenamento e a exportação de ferro (11).

## **1.2. O Metabolismo do Fe a nível sistémico**

A quantidade total de Fe num adulto varia entre 3,5 a 4 g; cerca de 1,5 a 3 g está ligado ao heme da HGB, participando na oxigenação dos tecidos e a restante parte está armazenada sob a forma de ferritina (FT) ou hemossiderina nas células do sistema reticuloendotelial, principalmente no fígado, na medula óssea e no baço (9).

Embora fisiologicamente o ser humano seja dotado de um sistema eficaz de captação de Fe, é desprovido de um sistema de eliminação, pelo que, a longo prazo, o aporte excessivo de Fe via gastrointestinal ou parenteral, levará impreterivelmente à sua acumulação e, por consequência, à condição patológica de sobrecarga de Fe e respetivos efeitos nocivos.

Dada a inexistência de um mecanismo ativo de eliminação do Fe, o organismo humano regula a quantidade de Fe para responder às necessidades fisiológicas através do controlo dos mecanismos de absorção intestinal. No entanto, para a maioria das necessidades diárias, o Fe disponível resulta da reciclagem de GR pelos macrófagos, sendo armazenado no seu interior sob a forma de FT, e depois, exportado para a circulação sendo transportado pela transferrina (TFR) até aos locais onde vai ser utilizado de acordo com as necessidades.

Diariamente, pequenas quantidades de Fe são perdidas através da urina, suor, fezes e células descamativas da pele, pelo que a sua reposição constante é essencial. Embora estes mecanismos permitam alguma eliminação do Fe, não são considerados uma via de excreção, pois não podem ser controlados. Para manter o equilíbrio deste processo, a quantidade de Fe perdida deve ser repostada através da absorção, por meio do consumo de alimentos ricos em Fe.

A homeostasia do Fe é controlada no epitélio intestinal, o local onde a sua absorção é muito ativa. Trata-se de um mecanismo dinâmico no qual, por *feedback* negativo, a fração absorvida pode ser aumentada ou diminuída dependendo do estado de equilíbrio do Fe no organismo. Maiores reservas de Fe levam a uma diminuição da sua absorção, enquanto a falta desse elemento em situações não relacionadas à má absorção levará a uma maior absorção intestinal para restaurar a homeostasia. A chave desta regulação é feita através da síntese de hepcidina, como será descrito no subcapítulo 1.5.

### **1.3. Mecanismos de absorção do Fe**

Na dieta normal, 13 a 18 mg de Fe são consumidos diariamente, contudo, o organismo absorve apenas 1 a 2 mg dessa quantidade. O Fe é absorvido principalmente no epitélio intestinal do duodeno e na parte proximal do jejuno (aproveitando o aumento da área de absorção causada pelas vilosidades). O pH ácido do estômago favorece a conversão do Fe férrico, proveniente da alimentação, em Fe ferroso. A absorção é também facilitada por certas substâncias ácidas, como ácido ascórbico (vitamina C), ácido clorídrico e grupos como sulfidril de aminoácidos contendo enxofre (9).

O transporte de Fe do lúmen intestinal para a corrente sanguínea ocorre em 3 fases: a captação e internalização do na membrana do enterócito, o transporte intracelular e o transporte para o plasma.

Na absorção intestinal na porção apical do enterócito, para que o Fe seja absorvido das vilosidades intestinais, este deve ser convertido de  $\text{Fe}^{3+}$  para  $\text{Fe}^{2+}$  mediante a interação com o citocromo B duodenal (Dcytb), sendo este essencial para essa conversão, pois o portador desse metal, o transportador de metal divalente (DMT-1), só consegue desempenhar a sua função adequadamente se o metal estiver na forma bivalente, ou seja, com número de oxidação  $\text{Fe}^{2+}$ . O Fe extraído na forma heme, também pode ser absorvido diretamente através da proteína transportadora do heme-1 (HCP1). No citoplasma o Fe heme sofre uma metabolização pela hemoxigenase passando o Fe para estado ferroso, de forma a facilitar a sua absorção.

No caso de deficiência de Fe ou hipóxia a HCP1, que se encontra na membrana do enterócito, absorve a maior quantidade possível de heme circulante. Na situação de excesso de Fe, a HCP1 passa para o citoplasma de forma a diminuir a quantidade de Fe a ser absorvido.

Estes mecanismos reguladores pós-translacionais de proteínas levam a uma maior utilização do heme dietético, antes da sua eliminação ativa pelos movimentos intestinais peristálticos, evitando assim a captação desnecessária de Fe (5).

Depois de absorvido, o Fe pode ser armazenado na forma de FT ou então prosseguir a cinética normal saindo do enterócito ligado a ferroportina (FPN). No exterior do enterócito o Fe sofre uma oxidação pela hefastina, que é uma oxidase. Esta, promove a oxidação do Fe e a ligação à TFR, para ser transportado para os locais de utilização ou armazenamento (6).

#### **1.4. As proteínas do metabolismo do Fe**

A homeostasia do Fe depende de proteínas que são essenciais para o seu transporte, utilização, armazenamento e regulação da absorção, nomeadamente a TFR, a HGB, a FT, a FPN e a hepcidina. A TFR é sintetizada e secretada pelo fígado, tendo dois locais homólogos com elevada afinidade pelo Fe<sup>3+</sup>. Além de transportadora de Fe, a TFR atenua as suas capacidades reativas e permite que este seja libertado nas células. O corpo humano produz TFR suficiente para transportar 12 mg de ferro, no entanto o transporte geralmente não ultrapassa os 3-4 mg, havendo assim uma saturação da transferrina (TSAT) a cerca de 30% da sua capacidade total (9).

A maior parte do Fe no organismo está associado à molécula da HGB. A fagocitose e degradação de GR senescentes representam assim uma fonte muito importante de Fe. Modificações bioquímicas na membrana do eritrócito senescente sinalizam para que o macrófago elimine estas células via fagocitose com consequente reciclagem do Fe. Com a digestão proteolítica dos GR, o grupo heme é libertado, e o Fe proveniente deste processo pode ser armazenado no macrófago, que contém moléculas de FT. Alternativamente, o Fe poderá abandonar o macrófago, através da FPN, sendo oxidado pela ceruloplasmina que é sintetizada pelo fígado. O Fe oxidado é transportado pela TFR até à medula óssea, onde irá participar no mecanismo de eritropoiese.

A homeostasia do Fe é essencialmente controlada no epitélio intestinal pelo eixo hepcidina/FPN, sendo o local de absorção ativa do mesmo e onde diariamente são absorvidos de 1 a 2 mg de Fe. Trata-se de um mecanismo dinâmico em que a fração absorvida pode ser aumentada ou diminuída por *feedback* negativo pela hepcidina, dependendo sempre do estado de equilíbrio do Fe no organismo. Este processo funciona em conjunto com a FPN, o único

exportador de Fe conhecido em humanos, presente em macrófagos e enterócitos. A hepcidina funciona assim como principal controlador da quantidade de Fe ligado à TFR, regulando a sua saturação. Com a falha deste mecanismo regulador da hepcidina, a TFR pode ficar mais saturada e quando esta saturação ultrapassa os 50%, o Fe não ligado à TFR pode favorecer a formação de radicais livres de oxigênio ( $O_2$ ), promovendo dano nos tecidos (6) (Figura 1).

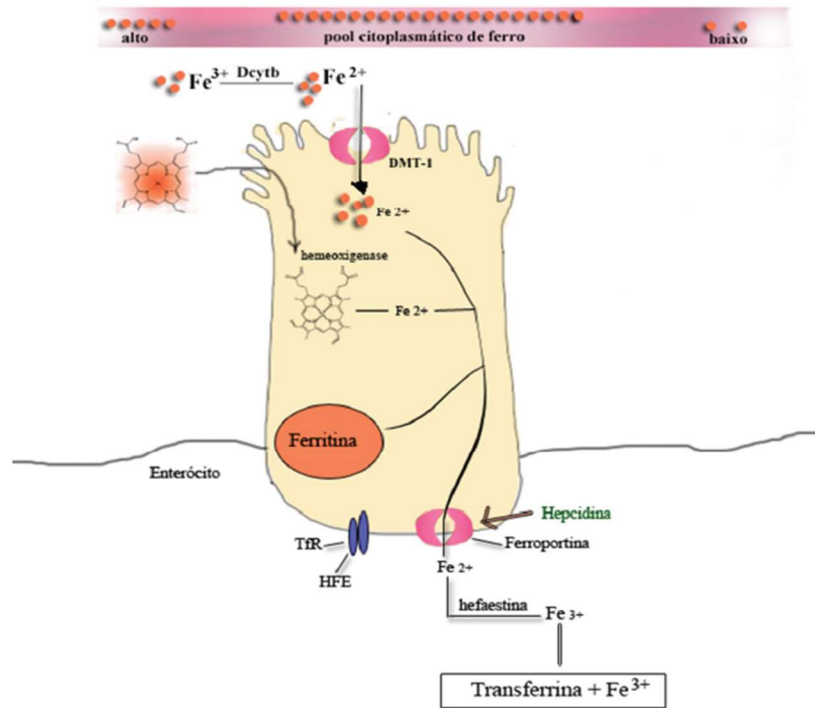


Figura 1: Absorção de Fe nos enterócitos e as proteínas envolvidas. Ferrorredutase (Dcytb), transportador metal divalente -1 (DMT-1), proteína transportadora do heme-1 (HCP-1), proteína da hemocromatose (HFE), recetor da transferrina (TfR). Adaptado de (5)

## 1.5. A utilização do Fe nas células eritróides

O processo da eritropoiese leva à produção de glóbulos vermelhos maduros através de células estaminais hematopoiéticas multipotentes. Este processo de diferenciação celular é dividido em duas fases - numa fase inicial, em que existe a proliferação e maturação de progenitores BFU-E e CFU-E e que é dependente da eritropoietina (EPO), e uma segunda fase, na qual ocorre a diferenciação de proeritroblastos, até células maduras, que é menos dependente de EPO, mas muito dependente de Fe (7). Os progenitores CFU-E dão origem a proeritroblastos, que evoluem para formas basofílicas, policromáticas e ortocromáticas, que

em torno de um macrófago criam uma “ilha eritoblástica” na medula óssea (Figura 2). De seguida os eritoblastos perdem o núcleo, para formar os reticulócitos e serem posteriormente enviados para a corrente sanguínea onde acabam de maturar em eritrócitos (12,13).

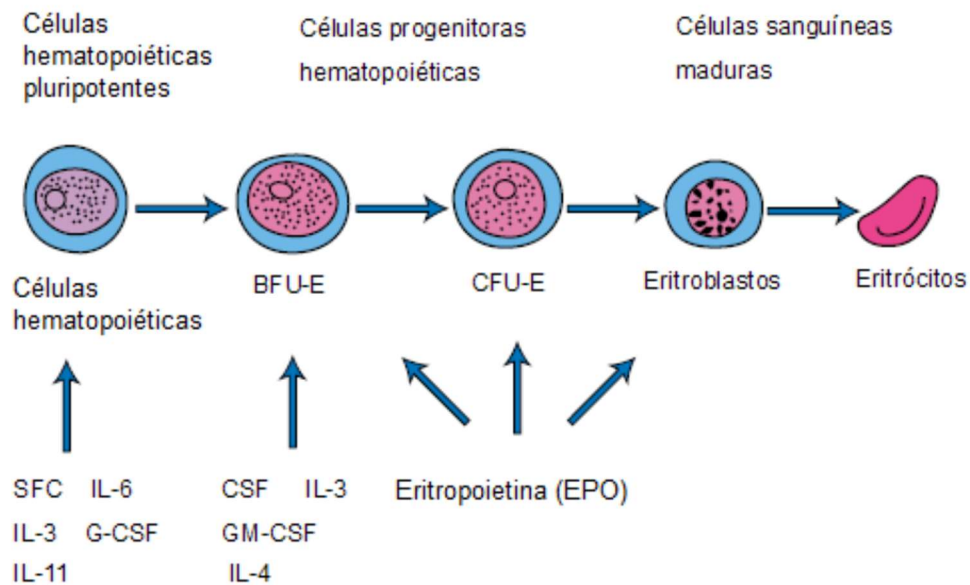


Figura 2: Na medula óssea, os macrófagos são circundados por células eritroides em diferentes estádios de diferenciação (ilhas eritoblásticas). Esses macrófagos dão suporte à proliferação e maturação das células eritroides. Os glóbulos rubros são produzidos através da diferenciação de células-hematopoiéticas pluripotentes para BFU-E, CFU-E, e eritoblastos. Embora a eritropoietina atue tanto nas células BFU-E quanto nas células CFU-E, células CFU-E apresentam maior sensibilidade à eritropoietina, outros fatores, como fator de células-tronco (SCF), interleucina-3 e 4 bem como o estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos fator (GM-CSF). Adaptado de (13).

O Fe é essencial para o heme da síntese da HGB nos eritoblastos maduros. A necessidade do Fe, para o processo da eritropoiese aumenta na fase final da diferenciação eritróide, onde a síntese da HGB acontece. Para a produção diária de 200 bilhões de GR são necessários cerca de 25 mg de Fe, que têm de ser transportados até a medula óssea. A maior parte do Fe necessário para o processo de eritropoiese é fornecido através da reciclagem dos GR senescentes que acontece no sistema reticulo-endotelial do baço e 1 a 2 mg que provem da absorção intestinal da dieta. Como referido acima, é a EPO, produzida no rim em resposta a sinais de hipóxia ou deficiência de Fe sinalizada pelas proteínas iron *responsive proteins 1 e 2* (IRP1 e IRP2), que estimula a proliferação dos progenitores eritropoéticos, acelerando assim o processo de maturação dos GR (14).

No processo de eritropoiese existe interação de várias proteínas reguladoras de Fe (Figura 3). O Fe é capturado pelos precursores eritróides através de recetores específicos da

TFR, que ligam a transferrina diférrica ( $\text{TFFe}^{2+}$ ), sendo esta responsável pelo transporte do Fe em circulação (15). O complexo TFR- $\text{TFFe}^{2+}$  é internalizado através da membrana, sendo conduzido para o endossoma, onde uma bomba de prótons dependente de ATP, reduz o pH, facilitando assim a libertação do Fe da TFR. O Fe é depois exportado do endossoma pela DMT-1, após redução pelo membro prostático 3 (Steap3), e está pronto a ser utilizado. Nos eritroblastos cerca de 90% do Fe é utilizado para a síntese do heme através de um mecanismo denominado "*kiss and run*" (ciclo endossoma), que envolve uma interação entre os endossomas e a mitocôndria (16). Este mecanismo mantém a concentração de  $\text{Fe}^{2+}$  baixa, reduzindo assim a produção de radicais livres. Nas mitocôndrias, a membrana interna contribui para a absorção do Fe que vai ser utilizado para a biossíntese do heme. Este composto heme é exportado para o citoplasma, onde incorpora as cadeias de globina, produzindo a HGB (17). A FPN, também tem um papel importante nas células eritróides ao exportar o Fe em excesso, podendo assim neutralizar o dano oxidativo resultante da acumulação de Fe (18,19).

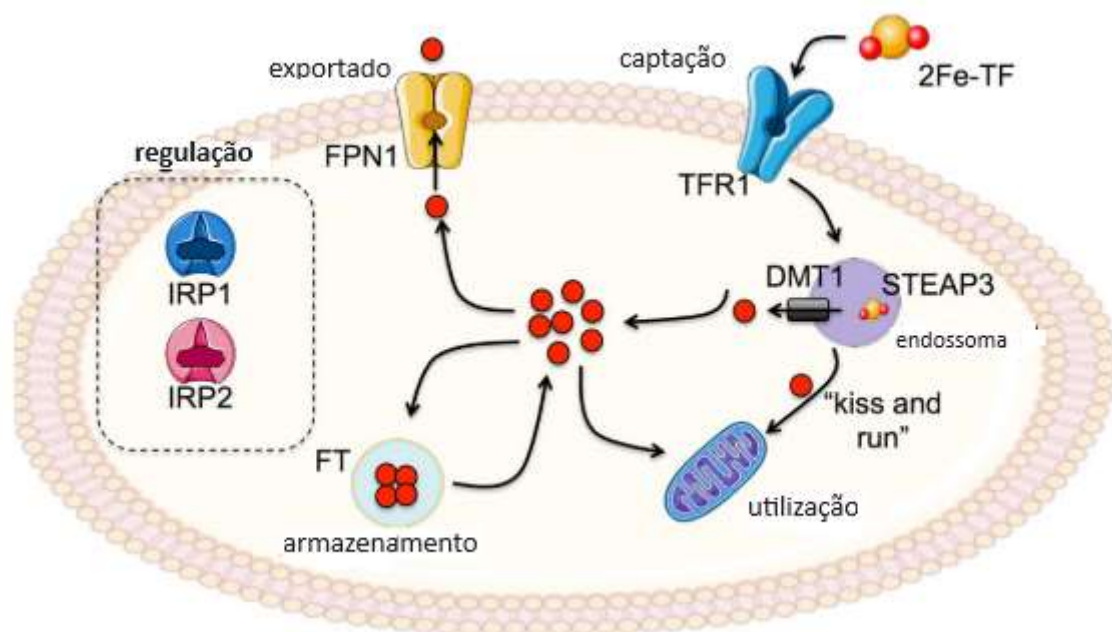


Figura 3: A regulação do Fe celular e mitocondrial nas células eritróides. A transferrina diférrica ( $2\text{Fe-TF}$ ) é captada através da ligação do receptor de transferrina 1 (TFR1) e endocitose mediada por clatrina. O pH ácido do endossomático favorece a dissociação do ferro do TF. TF e TFR1 são reciclados de volta para a superfície da célula. O ferro ( $\text{Fe}^{3+}$ ) é reduzido a  $\text{Fe}^{2+}$  pelo antígeno epitelial metaloredutase 6-transmembranar do membro prostático 3 (STEAP3) e exportado no citosol pelo transportador de metal bivalente 1 (DMT1). O excesso de ferro é armazenado na ferritina (FT) ou exportado para fora da célula através da ferroportina (FPN1). As proteínas reguladoras de ferro 1 e 2 (IRP1 e IRP2) regulam pós-transcricionalmente o nível de genes relacionados ao ferro ligando o elemento responsivo ao ferro (IRE) Adaptado de (20).

## 1.6. Hepcidina

A hepcidina foi originalmente descrita como um péptido anti-microbiano (21,22), mas atualmente é essencialmente reconhecida como o regulador chave da homeostasia sistémica do Fe. É sintetizada como uma molécula imatura, na forma de pré-pró-hormona, constituída por 84 aminoácidos, sendo biologicamente inativa. A sua maturação ocorre no hepatócito sendo clivada e dando origem a uma forma ativa de 25 aminoácidos, que circulam no plasma associados à  $\alpha$ 2-macroglobulina sendo excretada pela urina. A hepcidina é o principal responsável pela regulação da absorção de Fe e da sua distribuição nos tecidos, e estima-se que cerca de 11% esteja livre em circulação e o restante circule em associação à  $\alpha$ 2-macroglobulina. A síntese de hepcidina ocorre principalmente nos hepatócitos, mas também pode ser sintetizada em outros tecidos, como pulmões e coração, em níveis muito mais baixos (23). A hepcidina pode ser regulada pela atividade eritropoiética, pela concentração do Fe circulante ou como resposta a sinais inflamatórios (24).

A expressão da hepcidina é regulada pela quantidade de Fe disponível (a sobrecarga de Fe aumenta sua expressão, enquanto a anemia e hipoxemia reduzem-na) e pelo estado inflamatório, em que a interleucina-6 (IL-6) tem um papel fundamental (25,26). A regulação da síntese de hepcidina depende de um complexo proteico de sinalização na membrana (**Figura 4**), que inclui as chamadas “proteínas da HC”, nomeadamente o HFE, o recetor 2 da transferrina (TfR2) e a hemojuvelina. Mutações de perda de função em qualquer destas proteínas irão ser causa de desregulação da hepcidina e, conseqüentemente, causas de sobrecarga de Fe genética. Por isso a HC tem constituído historicamente o melhor modelo de estudo do metabolismo do Fe. A deficiência da hepcidina é responsável pela sobrecarga de Fe não só na HC, mas também em anemias congénitas. Pelo contrário, o excesso de hepcidina contribui para o desenvolvimento de anemias por restrições de Fe em doenças inflamatórias, infeções, alguns tipos de cancro e doença renal crónica (27,28).

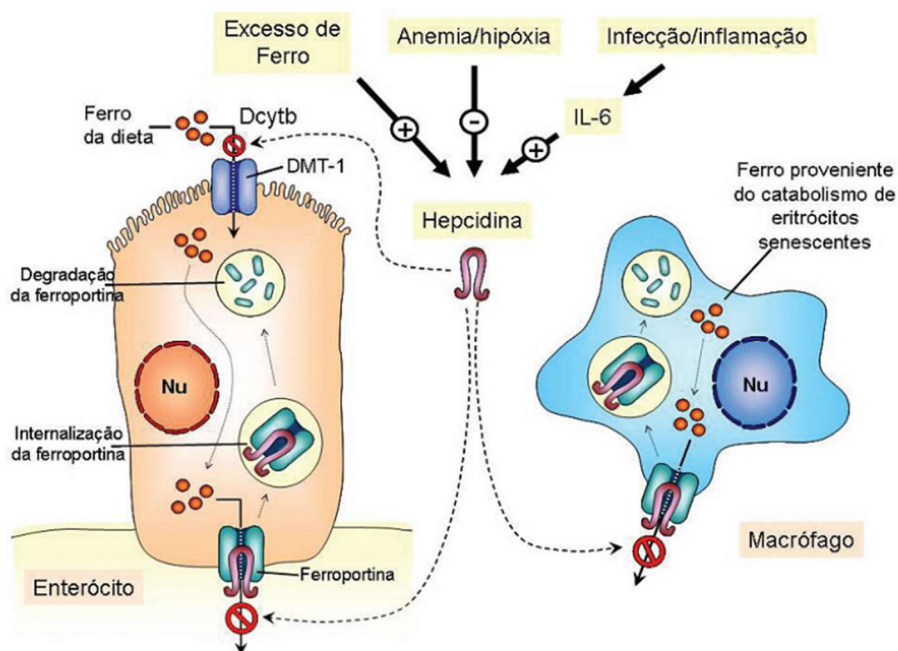


Figura 4: A hepcidina no metabolismo de Fe. Ao formar um complexo com a ferroportina promove a sua degradação. No enterócito, o Fe não é transportado para o exterior da célula e a sua absorção é inibida. No macrófago o Fe fica acumulado no seu interior ficando diminuída a quantidade de Fe, para o processo da eritropoiese. Adaptado de (5,6).

## 1.7. Sobrecarga de Fe e Hemocromatose

O Fe num adulto varia entre 1.5 a 3 g, correspondendo a cerca de 35 a 45 mg por kg de peso corporal na mulher e no homem, respetivamente. Em situações de sobrecarga sistémica severa de Fe, como pode ser o caso da HC, a sua acumulação no organismo ultrapassa o valor de 5 g, sendo que pode chegar até 40 g. Em termos bioquímicos há suspeita de sobrecarga de Fe quando a saturação da transferrina está superior a 45%, e a FT sérica apresenta valores superiores ao esperado que, em situação normal, isto é, sem co-morbilidades associadas, será superior a 300 ng/ml em homens ou superior a 200 ng/ml em mulheres (29). A sobrecarga de Fe pode ser classificada como HC se for de causa genética com manifestações fenotípicas bem caracterizadas, eritropoiese normal, FT e TSAT aumentadas, e com deposição do Fe nos tecidos parenquimatosos, maioritariamente no fígado (30).

## 1.8. Genética da Hemocromatose

A HC foi originalmente descrita por Trousseau e Troisier no século XIX, como a tríada constituída por glicosúria, cirrose e hiperpigmentação da pele, constatando a acumulação de Fe em diferentes órgãos. Em 1889 Von Recklinghausen descreve a doença com a característica de que em estados avançados apresenta uma pigmentação bronzada em doentes com cirrose hepática e denominou-a como hemocromatose (do grego *haima*=sangue e *chromatos*=cor), pois assumiu que tinha origem no sangue (31,32). *Sheldon* em 1935, faz a primeira descrição de um erro no metabolismo do Fe e associa-o a uma origem genética. Já em 1977, *Stevens* define a existência do gene *HFE* e mais tarde Marcel Simon localiza o gene no cromossoma (CHR) 6, próximo de um locus HLA-A, demonstrando a transmissão autossômica recessiva da doença (33). Finalmente, em 1996, Feder et al (34,35), identificam o gene regulador da absorção do Fe, o *HFE*, e descreve as suas principais mutações (36). A análise molecular introduzida por Feder, mudou definitivamente a estratégia para o diagnóstico da HC.

A HC tem como característica base a sua natureza hereditária, autossômica e recessiva, relacionada com acumulação progressiva de Fe. Devido a sobrecarga de Fe, pode ocorrer deposição nos tecidos parenquimatosos, causando cirrose, insuficiência cardíaca doenças endócrinas entre outras. Estes doentes apresentam uma eritropoiese normal e uma boa resposta ao processo de tratamento por flebotomias. No entanto, como podemos verificar na **Tabela 1**, existe uma grande variabilidade de genes mutados que podem expressar diferentes fenótipos, dividindo-se essencialmente em dois grandes grupos: a HC relacionada com o *HFE* (HC-*HFE*), que é a forma comum no adulto, e a HC não-*HFE* fenotipicamente mais severa e com maior incidência em jovens (11). A HC-*HFE* é a causada pela presença da variante p.Cys282Tyr do *HFE* em homozigotia, sendo responsável por 95% dos casos de HC. Esta variante apresenta uma alta frequência na população caucasiana com origem no norte da Europa (10,37). A HC não-*HFE* é causada por mutações nos genes hemojuvelina (*HJV*), hepcidina (*HAMP*), recetor da transferrina 2 (*TFR2*) e ferroportina (*SLC40A1*), descritos na **Tabela 1**.

Tabela 1: Genes mutados nas doenças do metabolismo de Fe. Adaptado de (37)

<i>Gene envolvido e localização</i>	<i>Hereditariedade</i>	<i>Saturação da transferrina</i>	<i>Sinais clínicos</i>
<i>HFE, CHR 6</i>	recessiva	aumentada	Em adultos, mais severo em homens e com dano predominante no fígado.
<i>HJV (Hemojuvelin) CHR 1</i>	recessiva	aumentada	Em jovens, com similaridade nos dois sexos e predominantemente envolvimento cardíaco e endócrino
<i>HAMP (Hepcidina) CHR 19</i>	recessiva	aumentada	Em jovens, com similaridade nos dois sexos e predominantemente envolvimento cardíaco e endócrino
<i>SLC40A1* (Ferroportina) CHR 2</i>	dominante	aumentada	Muito rara e clinicamente similar à do gene HFE

\* Apenas mutações de ganho de função

A classificação de HC é realizada de acordo com sinais clínicos e alterações moleculares identificando assim a complexidade genética da doença. Segundo a BIOIRON Society na classificação da HC (37), devem ser tidos em conta quer critérios clínicos, quer moleculares, como pode ser visto na **Tabela 2**.

Tabela 2: Classificação do HC segundo alteração molecular de acordo com variantes de fenótipo/genótipo (37)

<i>Classificação HC</i>	<i>Alterações moleculares</i>
<i>HFE relacionada</i>	Homozigotia p.Cys282Tyr heterozigotia composta p.Cys282Tyr com outra possível variante patogénica HFE (p.His63Asp) deleção do gene HFE
<i>HFE não relacionada</i>	Variantes patogénicas raras em genes “não-HFE”  genes: HJV-relacionada HAMP- relacionada TFR2- relacionada <i>SLC40A1- relacionada</i>
<i>Digenico</i>	Dupla heterozigotia ou dupla homozigotia/heterozigotia para mutações em 2 genes diferentes envolvidos no metabolismo de Fe
<i>Molecularmente indefinida</i>	Caracterização molecular ainda não definida mesmo após sequenciação do gene (diagnóstico provisório)

## 1.9. Flebotomias

O tratamento de primeira linha da HC consiste em flebotomias terapêuticas. Foi usado pela primeira vez em 1950, sendo uma terapêutica segura e eficiente, para a eliminação do excesso de Fe nestes doentes. A doença tem uma expressão clínica muito variável de doente para doente, nomeadamente em termos de gravidade, apresentação e resposta ao tratamento. Apesar disso, o mesmo protocolo terapêutico com flebotomias é habitualmente aplicado a todos os doentes com HC, independentemente dos seus perfis clínicos particulares. O esquema de flebotomias está organizado em duas fases, uma primeira fase intensiva e uma segunda de manutenção. O objetivo da flebotomia intensiva é a depleção do Fe acumulado no fígado até a um estado de quase deficiência de Fe (38). Inicia-se com a remoção de 400 a 500 ml de sangue, onde se retira aproximadamente 200 a 250 mg de Fe, com uma frequência semanal (tratamento intensivo). A duração desta fase de tratamento pode ser de semanas ou meses, dependendo da quantidade de Fe acumulada, bem como a tolerância do doente a este tipo de tratamento. Este tratamento aplica-se até o organismo expressar valores de FT entre 20 a 50 µg/L. Após este tratamento intensivo, deve-se implementar um esquema de tratamento de manutenção que consiste em 2 a 4 flebotomias anuais, com o intuito de que os

níveis de FT se mantenham entre os 50 a 100 µg/L. Com este esquema deve ser mantida uma atenção especial, para que uma depleção excessiva de Fe, e uma diminuição da FT para níveis demasiados baixos, não levem ao desenvolvimento de anemia. Pretende-se assim que as flebotomias provoquem a transferência do Fe acumulado nos tecidos, para a medula para ser utilizado no processo de eritropoiese (39–42).

Em relação a estes esquemas de tratamento não existem *guidelines* bem definidas do uso da flebotomia terapêutica. Esta deve ser implementada em doentes homozigotos para C282Y, com níveis de FT > 200 µg/L em mulheres e >300 µg/L em homens. As flebotomias podem dar-nos o valor do Fe removido através do índice *total body iron stores* (TBIS). Este índice é estimado utilizando o volume de sangue retirado pela flebotomia relacionando com a HGB retirada, sendo desta forma calculado a quantidade de Fe removido (43,44). Com o desenvolvimento dos testes genéticos, foi evidenciado que aproximadamente 50% das mulheres e 20% dos homozigotos para a mutação C282Y, apresentam valores de FT normais e que pode nunca ser necessária a flebotomia (45).

### **1.10. Hemocromatose e eritropoiese**

Embora seja geralmente aceite que a eritropoiese é normal na ausência de *HFE* (sendo apenas mais eficaz pelo facto de haver mais Fe disponível) (46), trabalhos mais recentes têm vindo a pôr este conceito em causa. *Ramos et al* (47) demonstraram que em ratinhos deficientes em *Hfe*, a eritropoiese é mais eficaz independentemente dos níveis de Fe, sugerindo um papel do próprio gene na modulação do metabolismo do Fe ao nível eritróide (48). Num estudo recente realizado na consulta de HC sobre a resposta dos doentes às flebotomias, *Coutinho et al* (49), verificaram que os doentes têm EPO inapropriadamente elevada para o nível de HGB, sugerindo uma maior sensibilidade destes doentes à deficiência de Fe. Não existem, no entanto, estudos publicados que tenham explorado a função eritropoiética em doentes com HC, nomeadamente por ensaios clonogénicos.

### **1.11. Ensaios clonogénicos**

A produção das células hematopoiéticas (**Figura 5**) é um processo complexo envolvendo proliferação celular, diferenciação, morfogénese, maturação funcional e morte.

As células estaminais hematopoiéticas (*stem cells*) residentes na medula óssea possuem uma capacidade única de auto-renovação e diferenciação nos diferentes tipos de células sanguíneas. A partir da *stem cell* haverá o desenvolvimento dos progenitores numa das três linhagens distintas: mielóide, linfóide e eritróide, em resposta aos fatores de crescimento humoral e citocinas específicas presentes no microambiente. Esta capacidade pode ser testada *in vitro* por meio de ensaios clonogénicos (50).

Os ensaios clonogénicos (EC) ou ensaios formadores de colónias, foram pela primeira vez descritos em 1956, por Puck *et al* (51), e desde então tornou-se o ensaio *in vitro* de referência para estudar células progenitoras hematopoiéticas. Este ensaio é amplamente utilizado para estudar fatores de crescimento estimuladores ou inibidores de produtos celulares utilizados no transplante de células hematopoiéticas. Os EC permitem detetar a produção de progenitores hematopoiéticos, a partir da observação de unidades formadores de colónias (UFC) *in vitro*. Estes são realizados por plaqueamento de células em suspensão num meio de baixa densidade (semi-sólido), à base de metilcelulose, agar, fibrina e com a adição de citocinas (52–54). Estas condições dão suporte à proliferação e diferenciação de células progenitoras individuais ou em colónia, originando colónias discretas. As colónias formadas a partir destas células multipotentes podem ser classificadas com base no número e tipo de células, usando para o efeito, critérios morfológicos e fenotípicos.

Dois tipos de células progenitoras eritróides podem ser detetadas neste ensaio, nomeadamente *Burst forming unit-erythroid* (BFU-E) e *Colony forming unit-erythroid* (CFU-E). As colónias BFU-E, são mais primitivas do que as CFU-E, produzem grandes colónias em vários grupos ou separadas, podem ter de 200 a vários milhares de eritroblastos. A CFU-E é uma célula progenitora mais diferenciada, que gera pequenas colónias com 8 a 200 eritroblastos. Ambos os tipos de colónias são caracterizados pela sua coloração avermelhada devida a presença de HGB. A proliferação deste tipo de colónias depende da presença da EPO no meio de cultura, bem como de outras citocinas como *stem cell factor* e de interleucinas 3 e 6. Estas interleucinas também promovem o desenvolvimento de colónias progenitoras de macrófagos (CFU-M), de granulócitos (CFU-G) e de linhagem mista (CFU-GEMM) (55).

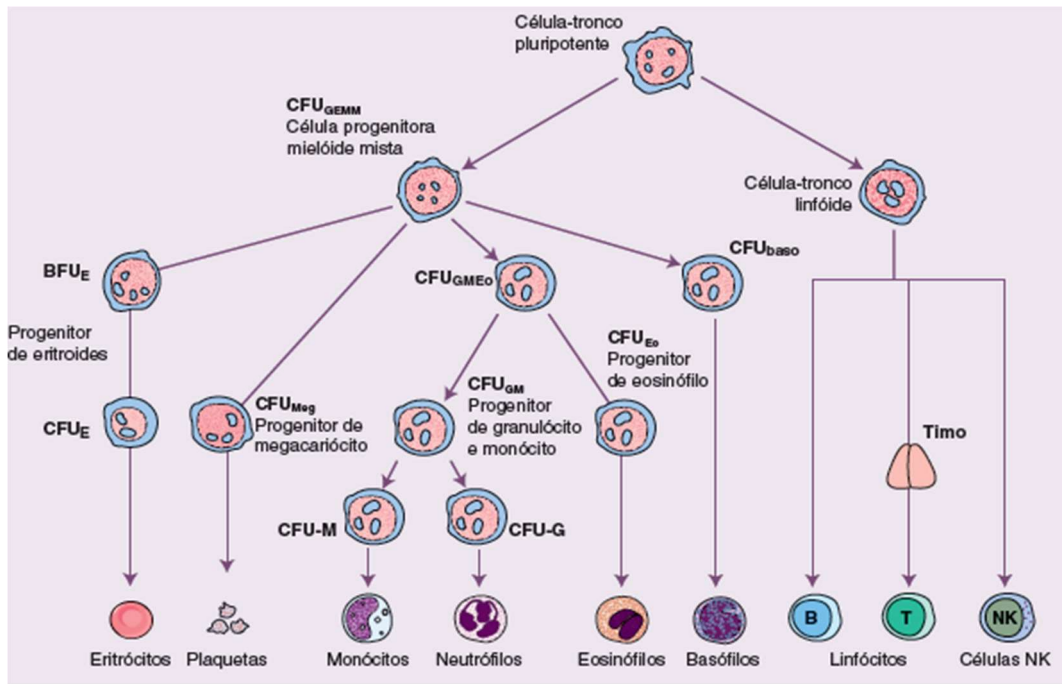


Figura 5: Diagrama da diferenciação de uma célula multipotente e as linhagens celulares que origina. Vários tipos de células podem ser identificados em meios semi-sólido pelo tipo de UFC. Adaptado de (56).

## **2. Objectivos do estudo**

Na Consulta de Hemocromatose do Centro Hospitalar Universitário de Santo António (CHUdSA) são seguidos regularmente doentes com HC homozigóticos para a variante C282Y sob programas de tratamento de manutenção por meio de flebotomias. Estão assim criadas nesta consulta as condições ideais para desenvolver o presente projeto que explora a capacidade eritropoiética destes doentes em comparação com dadores regulares de sangue.

### **2.1. Objectivos gerais**

O objetivo geral do estudo foi avaliar a capacidade eritropoiética de doentes com HC, homozigóticos para a variante C282Y do gene *HFE*, em fase de manutenção da doença. Estes doentes apresentam parâmetros eritropoiéticos normais no sangue periférico, HGB e volume globular medís (VGM), apesar de terem sido depletados de Fe na fase intensiva do tratamento. Este estudo pretende também avaliar a capacidade clonogénica hematopoiética dos doentes em comparação com um grupo de dadores de sangue com uma frequência de flebotomias (dávivas de sangue) semelhante à dos doentes com HC em flebotomia de manutenção.

### **2.2. Objectivos específicos**

1. Comparar o crescimento e diferenciação de precursores hematopoiéticos eritróides, granulócitos e macrófagos e de linhagem mista (CFU-E, BFU-E, CFU-M, CFU-G e CFU-GEMM) em células do sangue periférico (PBMNC) de doentes com HC (homozigóticos para a variante C282Y do *HFE*), com os mesmos parâmetros em dadores de sangue regulares.
2. Analisar se existe alguma correlação entre os parâmetros medidos pelos testes clonogénicos e os parâmetros hematológicos e do metabolismo do Fe nos doentes em dois momentos: no diagnóstico da doença e na fase de tratamento de manutenção (data do estudo).
3. Analisar se existe alguma correlação entre os parâmetros medidos pelos testes clonogénicos e os parâmetros hematológicos nos dadores regulares de sangue.

### **3. Métodos**

A HC é uma doença genética com um diagnóstico bem definido. A população em estudo encontra-se bem identificada e com diagnóstico de doença confirmado por determinação genética. Sendo que as populações em estudo estão bem caracterizadas e controladas justifica-se a escolha de um tipo de estudo caso controlo, que permite comparar os grupos e identificar fatores que possam contribuir para a existência de associação causal.

Foi realizado um estudo, de caso-controlo, conduzido no CHUdSA, e no Instituto de Investigação e Inovação em Saúde (i3S) no Grupo de investigação 'Hematopoiesis and Microenvironments'. A dimensão da amostra foi obtida considerando uma perspetiva conservadora, com o objetivo de obter 42 participantes dos quais 20 casos e 22 controlos. A amostra em estudo foi selecionada por um método de amostragem de conveniência. Consideram-se como *casos* os doentes com HC e como *controlos* os dadores benévolos de sangue. Foi realizado emparelhamento por sexo, flebotomia no mesmo dia.

#### **3.1. Seleção e critérios de inclusão dos casos**

Foram selecionados para o estudo os doentes que frequentam a Consulta de HC do CHUdSA de acordo com os seguintes critérios de inclusão: sexo masculino, homozigotia para a variante C282Y do *HFE* e tratamento em fase de manutenção a realizar flebotomias com uma frequência entre 3 a 5 meses. Os casos foram sucessivamente recrutados no dia do seu agendamento para realizar flebotomia. Foram selecionados como controlos os dadores benévolos de sangue do CHUdSA, sem diagnóstico de HC, com pelo menos três dádivas de sangue no último ano. Com base na informação do processo clínico (S-Clínico), foram selecionados os dadores que realizaram dádiva de sangue no mesmo dia da flebotomia dos doentes de HC, sendo todos dadores do sexo masculino.

O estudo decorreu entre janeiro e março de 2023.

### **3.2. Dados hematológicos e do metabolismo do ferro**

Foram incluídos para análise do estudo os parâmetros hematológicos e do metabolismo do Fe obtidos como rotina na data da amostragem, bem como à data do diagnóstico, tendo sido obtidos através dos processos clínicos dos doentes sob a supervisão direta da responsável da Consulta de HC. Os dados hematológicos incluem os valores de HGB, VGM, hemoglobina globular média (HGM), número de GR. Por sua vez, os parâmetros do metabolismo do Fe incluem a TSAT, FT e ainda na altura do diagnóstico a quantidade total de Fe removido por flebotomias TBIS, como indicador da sobrecarga tecidual total. Os mesmos parâmetros hematológicos foram recuperados dos processos dos dadores de sangue na data do teste.

### **3.3. Estudo da capacidade clonogénica**

No dia das flebotomias, colheram-se duas amostras de sangue total periférico a cada participante no estudo através da utilização de tubos de vácuo Vacuette® EDTA-K3 de 4ml Greiner Bio-one (Austria). Após a colheita e homogeneização das amostras, a separação das células mononucleares e a realização dos ensaios clonogénicos foi efetuada em ambiente estéril numa câmara de fluxo laminar (nível de biossegurança BSL-2) até 12 horas pós-colheita.

As células formadoras de colónias hematopoiéticas (CFCH) estão presentes na medula óssea, nas células do cordão umbilical, e no sangue periférico, sendo este último a fonte de CFCH usada neste estudo. O isolamento de CFCH do sangue periférico foi feito por gradiente de densidade, que, como o nome indica, envolve a criação de um gradiente de densidade ao longo de um tubo de centrifugação. Este gradiente é obtido adicionando-se um meio de densidade específica dentro do tubo. A centrifugação é realizada em alta velocidade, o que faz com que as células se movam através do gradiente de acordo com sua densidade. Todo o procedimento foi efetuado numa câmara de fluxo laminar, em que o volume de sangue das amostras dos casos ou controlos foi transferido para um tubo de 50mL de fundo cónico (Centrifuge tube, Falcon®), ao qual foi adicionado DPBS (*Dulbecco's phosphate-buffered saline*) até 15 mL, diluindo as amostras 1:2. De seguida, a amostra diluída foi lentamente transferida para um tubo SepMate™-50 (*StemCell Technologies*), contendo 15 mL de Ficol

Histopaque®-1119 (Sigma Aldrich), prosseguindo-se à centrifugação a 1200g, durante 10 minutos, a temperatura ambiente. As células mononucleares do sangue periférico (PBMNCs), que têm uma densidade intermediária, formam uma espécie de anel (*buffy coat*) na interface entre o Ficol e o plasma (**Figura 6**). Já os eritrócitos, por terem uma densidade maior, sedimentam no fundo do tubo. As PBMNCs foram cuidadosamente recolhidas com uma pipeta Pasteur, e transferidas para um novo tubo.

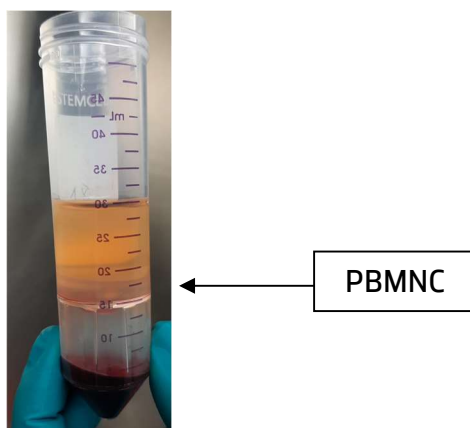


Figura 6: Separação de PBMNC, através de um tubo SepMate

De seguida, foi feita a lavagem das PBMNCs com DPBS (centrifugação 1200 rpm, 6 minutos), e a remoção dos glóbulos vermelhos do *pellet* com 5mL de uma solução de lise composta por cloreto de amónio, carbonato de potássio e EDTA (BioLegend), (centrifugação 1200 rpm, 6 minutos). Após reconstituição do pellet em 20mL de DPBS, procedeu-se a análise da viabilidade celular.

### 3.3.1. Viabilidade celular

A viabilidade celular foi analisada manualmente, com recurso a um marcador denominado Trypan Blue (Thermo Fisher). O Trypan Blue é um corante de exclusão pois apenas consegue penetrar células não viáveis. Com a entrada nas células lesadas estas coram de azul, enquanto as células viáveis permanecem brilhantes e não coradas. Para avaliação ao microscópio de leitura invertida (Leica DMI1), transferiu-se uma suspensão celular constituída por 10µl de PBMNCs e 10µl de Trypan Blue para um hemocitómetro, sendo o número de células calculado conforme indicado na **Figura 7**.

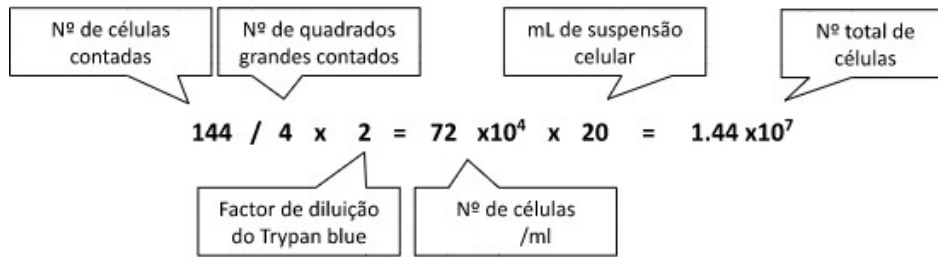


Figura 7: Cálculo do número de células a plaquear.

Usando a objetiva de x20, contaram-se os 4 quadrados grandes (indicados com setas na Figura 8A). A Figura 8B corresponde a cada quadrado pequeno dentro dos quatro quadrados grandes em A), onde são visíveis 8 células viáveis e 17 não viáveis (coradas de azul). A viabilidade foi calculada dividindo o número de células vivas pelo número total de células (mortas e vivas) x 100. Por exemplo: 91 células vivas / 100 células totais = 0.91 x 100 = 91% viabilidade.

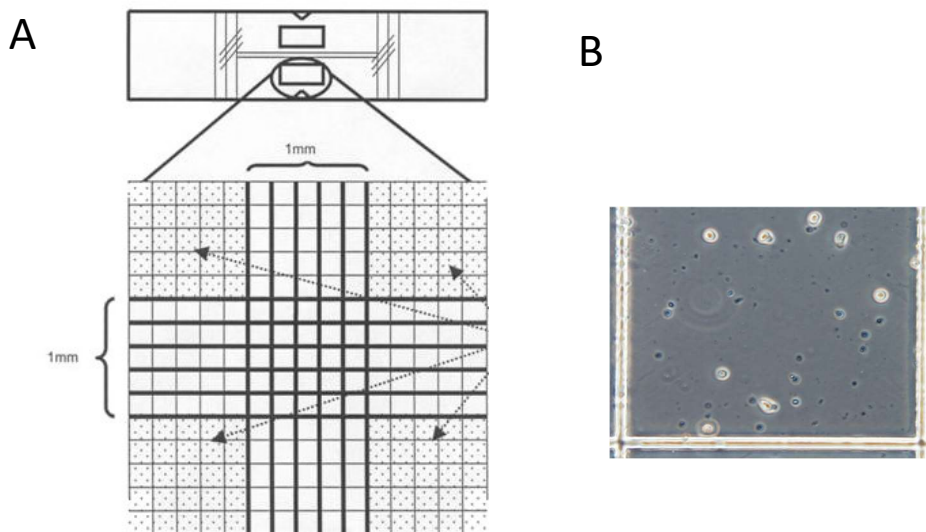


Figura 8: Análise manual de viabilidade celular com Trypan Blue.

### 3.3.2. Teste de unidades formadores de colónias hematopoiéticas

O número de células recomendadas para ensaios clonogénicos a partir de sangue periférico de é  $2 \times 10^5$  /placa de 35mm. Assim, obteve-se um número de células stock 10x o final i.e.:  $2 \times 10^6$ , ajustando-se a concentração de modo a que num volume final de 300  $\mu$ L, se obtivessem  $2 \times 10^6$  PBMNCs (300uL a  $2 \times 10^6 = 6 \times 10^5$ ). Por exemplo, na contagem acima exemplificada (ver 2.4.1), obtiveram-se  $7.2 \times 10^5$ /mL PBMNCs. Assim, foram retirados 833uL células ( $6 \times 10^5 / 7.2 \times 10^5$ ), que após centrifugação foram re-suspendidos em 300uL IMDM (*Iscove's Modified Dulbecco's Medium*). A suspensão celular de 300uL foi depois adicionada a 3mL de metilcelulose (StemMACS™ HSC-CFU, Miltenyi Biotec) (**Figura 9A**). Este meio é constituído por MDM (*metilcelulose em Modified Dulbecco's Medium*), FBS, BSA (*Bovine Serum Albumin*), L-glutamina, SCF (*stem cell factor*), GM-CSF, C-CSF, IL-3, IL 6 e eritropoietina. Antes do começo do ensaio, o meio, previamente aliquotado em 3mL/tubo e guardado a  $-20^{\circ}\text{C}$ , foi deixado descongelar a temperatura ambiente. Após a adição das células à metilcelulose, foi feito o vórtex durante cerca de 30 segundos, deixando depois os tubos repousar durante cerca de 30-40 minutos de modo a homogeneizar a suspensão celular antes de plaquear (**Figura 9B**). Cada amostra foi plaqueada em duplicado: 1,1mL da suspensão celular por placa, em placas de petri de 35 mm com grelha (*StemCell Technologies*), permitindo uma melhor contabilização das colónias observadas. Uma vez que a metilcelulose é um meio muito viscoso, ao plaquear, o meio foi dispensado mantendo a pipeta no meio da placa, e realizando pequenos movimentos circulares por forma a obter uma distribuição o mais homogénea possível por toda a superfície da placa. O procedimento foi ainda realizado lentamente, evitando a formação de bolhas, e assim, uma futura inviabilização da classificação das colónias. Por fim, as placas foram colocadas numa placa maior de 100 mm, junto com uma outra de 35 mm água estéril, para criar um ambiente húmido durante o armazenamento e crescimento das colónias (**Figura 9C**). As placas foram incubadas em estufa a  $37^{\circ}\text{C}$ , 5% de  $\text{CO}_2$  em atmosfera húmida, durante 14 a 16 dias, até à avaliação das colónias.

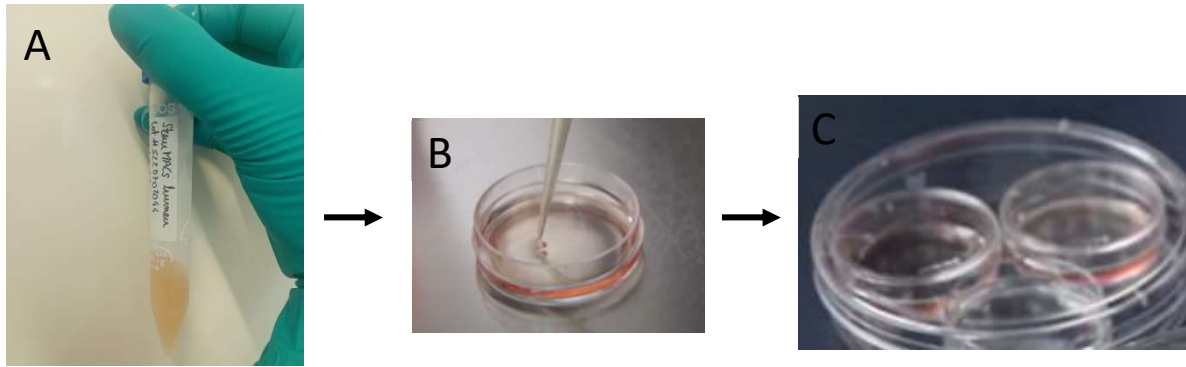


Figura 9: Ensaio clonogénico em meio de metilcelulose.

### 3.3.3. Leitura das placas – classificação de colónias

As colónias hematopoiéticas foram identificadas ao microscópio, e classificadas de acordo com a sua morfologia (**Figura 10**) após 14-16 dias de incubação. Os vários tipos de colónias humanas observadas encontram-se sumarizados em baixo:

BFU-E, corresponde à célula precursora eritróide mais primitiva. Produz uma colónia contendo mais de 200 eritroblastos (células progenitoras eritróides). Estas colónias apresentam uma cor avermelhada ou acastanhada, evidenciando a presença da HGB.

CFU-E, corresponde a uma unidade formadora de colónia eritróide mais tardia (após BFU-E) que se diferencia em eritrócitos. Produz um a dois aglomerados contendo um total de 8 a 200 eritroblastos. Apresentam uma cor entre o avermelhado e o castanho, denotando também a presença da HGB.

CFU-M, corresponde a um aglomerado de mais de 20 células. Progenitores clonogénicos de macrófagos dão origem a uma população homogénea de macrófagos incolores, grandes e redondos. Estas colónias têm tamanho maior que as CFU-G.

CFU-G, corresponde a uma colónia granulocítica, com aspecto translúcido, contendo 20 a 40 células. Estes progenitores clonogénicos dão origem a uma população homogénea de granulócitos incolores e menores que a dos macrófagos.

CFU-GM, corresponde a uma colónia com 20 a 50 células translúcidas de vários tamanhos. Estes progenitores clonogénicos dão origem a uma população heterogénea de macrófagos e granulócitos. As colónias são incolores e têm um aspecto mais compacto na parte central, com células mais individualizadas na periferia.

CFU-GEMM, é capaz de se diferenciar em várias linhagens que dão origem à linhagens eritroide e mieloide (granulócitos, macrófagos), e é, por isso, comumente apelidada de colônia mista. Estas colônias têm um tamanho relativamente grande e de cor avermelhada no centro, evidenciando a presença de HGB.

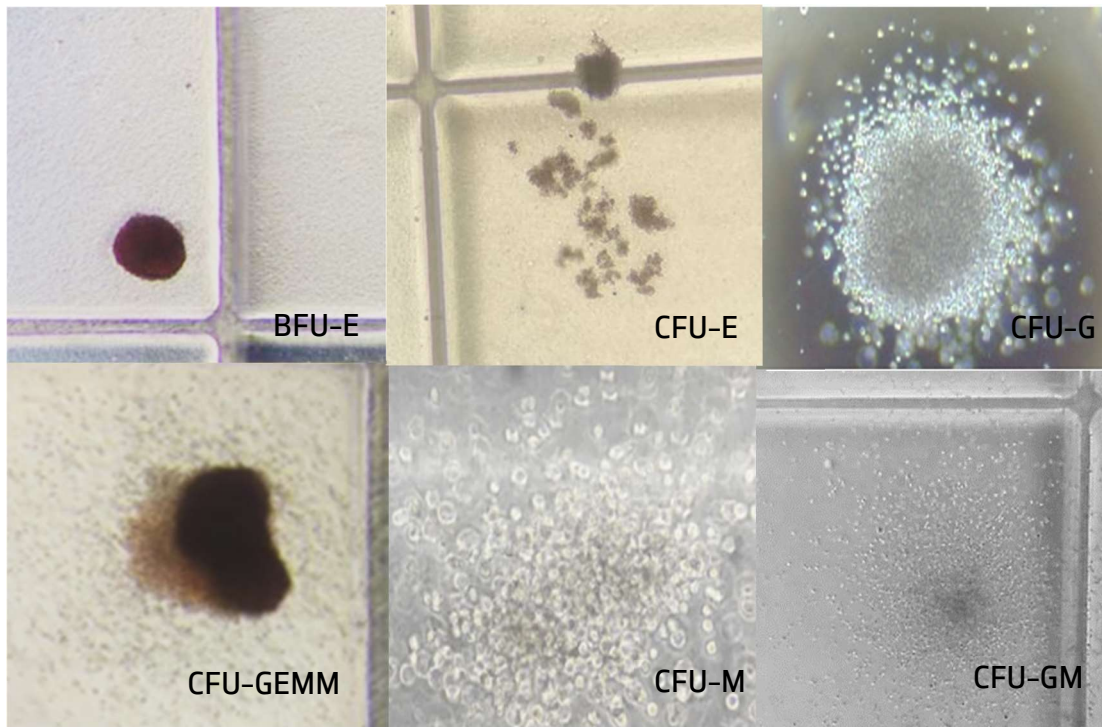


Figura 10: Fotos representativas dos tipos de colônias observadas.

### 3.3.4 Considerações éticas

Foi obtido consentimento informado de todos os participantes no estudo (**Anexo A**). O estudo foi aprovado pelo gabinete de Investigação Clínica e pela comissão de ética do CHUdSA, com a referência 2022-194(154-DEFI/155-CE) (**Anexo B**).

Todos os dados pessoais dos participantes no estudo são pseudonimizados.

### 3.3.5 Análise estatística

A análise dos dados foi realizada com o programa estatístico GraphPad Prism 9.5.1. Foram determinadas médias, desvios padrão e limites observados. As variáveis qualitativas foram avaliadas por frequências absolutas. Para comparação de médias e de distribuições de valores foram aplicados respetivamente o teste *t-student* e o teste não-paramétrico de *Kolmogorov-Smirnov* (K-S). Para testar a relação entre os parâmetros clonogénicos, os hematológicos e do metabolismo do ferro foi realizada análise de correlação múltipla de Pearson. Considerou-se uma diferença estatisticamente significativa para valores de  $p < 0,05$ .

## 4. Resultados

### 4.1. Descrição de amostra

Foram incluídos na amostra de casos 20 doentes, com diagnóstico confirmado de HC (*HFE* relacionada), sendo homocigóticos para a mutação p.Cys282Tyr e que realizaram procedimento de flebotomia entre janeiro e março de 2023, e 22 controlos.

Para avaliação da eficácia de utilização do Fe para a eritropoiese, os melhores marcadores são os parâmetros hematológicos disponíveis em hemogramas de rotina. Os valores foram obtidos através da consulta do hemograma publicado no programa S-Clinico, realizado no dia da flebotomia/dádiva. Foram obtidos os dados descritos no ponto 3.2. Os resultados obtidos são apresentados na **Tabela 3**, tendo sido observadas diferenças significativas entre doentes e dadores para as variáveis idade e HGB.

Em relação à idade, os doentes apresentam uma média superior à dos dadores (57 *vs* 48 anos), sendo a diferença justificada pelo tipo de doença na qual o diagnóstico é geralmente realizado entre a quarta e a quinta décadas de vida, e o tratamento de manutenção se prolongar por toda a vida.

O valor de HGB, apresenta diferença significativa sendo inferior nos dadores em relação aos doentes (dadores:  $15,3 \pm 0,8$  *vs* doentes:  $16,2 \pm 0,9$ ), (**Tabela 3 e Figura 11,  $p=0,0020$** ). No entanto, apesar da diferença encontrada, o valor de GR não é significativamente diferente entre dadores e doentes (5,0 *vs* 5,2).

Tabela 3: Caracterização das duas populações em estudo.

	<i>Dadores (n=22)</i>	<i>Doentes (n=20)</i>	Nível de significância (P)
	Media ± desvio padrão (limites)	Tratamento manutenção Media ± desvio padrão (limites)	t student
<i>Idade (anos)</i>	48 ± 10 (28-63)	57 ± 15 (27-82)	0,0402
<i>GR (x10<sup>12</sup>/L)</i>	5,0 ± 0,4 (4,1-5,7)	5,2 ± 0,4 (4,26-6,11)	ns
<i>HGB (g/dl)</i>	15,3 ± 0,8 (13,5-16,6)	16,2 ± 0,9 (14,3-18,1)	0,0010
<i>VGM (fI)</i>	89,0 ± 4,7 (95,1-96,0)	90,2 ± 5,3 (79,5-102,6)	ns
<i>HGM (pg)</i>	30,6 ± 1,7 (27,50 – 32,9)	31,3 ± 2,1 (26,8-36,4)	ns

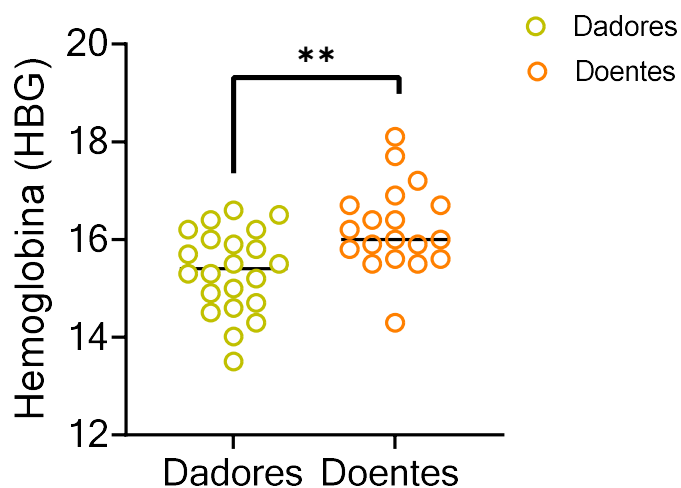


Figura 11: Diferença no índice da HGB.

Nos doentes, foi avaliada a FT e a TSAT, bem como os índices GR, HGB, VGM e HGM, por forma a avaliar a variação entre o diagnóstico e a fase de tratamento manutenção em que estes doentes se encontram. Os resultados obtidos ao diagnóstico estavam disponíveis em 19 dos 20 doentes selecionados.

Observou-se um aumento do valor de GR e de HGB entre o diagnóstico e o tratamento de manutenção (GR diagnóstico:  $4,9 \pm 0,4$  vs GR tratamento manutenção:  $5,2 \pm 0,4$ ,  $p=0,0027$ ); (HGB diagnóstico:  $15,7 \pm 1,3$  vs tratamento manutenção:  $16,3 \pm 0,9$ ). Ainda, à data do tratamento de manutenção, detetamos uma redução dos valores de VGM, FT, e TSAT em relação ao diagnóstico. Estes resultados identificam que entre o diagnóstico e fase de manutenção da doença, ocorre, como esperado, uma diminuição do valor da FT, TSAT e do VGM. Por outro lado, há um aumento dos GR, HGB.

O índice TBIS, foi também avaliado, e reflete a quantidade de Fe removida através da FT. Os resultados obtidos são apresentados na **Tabela 4**.

Tabela 4: Comparação de resultados ao diagnóstico e no tratamento manutenção dos doentes.

	<i>Ao diagnóstico</i> (n=19)	<i>Tratamento manutenção</i> (n=20)	<i>Nível de significância (p)</i>
	Media $\pm$ desvio padrão (limites)		t student
<i>GR (<math>\times 10^9/L</math>)</i>	$4,9 \pm 0,4$ (4,16-5,81)	$5,2 \pm 0,4$ (4,26-6,11)	0,0027
<i>HGB (g/dl)</i>	$15,7 \pm 1,3$ (13,8-19,1)	$16,3 \pm 0,9$ (14,3-18,1)	ns
<i>VGM (fI)</i>	$93,3 \pm 5,7$ (82,4-105,7)	$90,2 \pm 5,3$ (79,5-102,6)	ns
<i>HGM (pg)</i>	$32,2 \pm 1,8$ (28,9-35,8)	$31,3 \pm 2,1$ (26,8-36,4)	ns
<i>FT (ng/ml)</i>	1441,6 (128-4004)	124,5 (33-194)	
<i>TSAT (%)</i>	77,68 (52,4-114)	41,9 (5-80)	
<i>TBIS (g) *</i>		6,11 (2,19-15,99)	

\*n=15; ns= not significant

## 4.2. Ensaio clonogénicos

Para avaliar a capacidade clonogénica das células hematopoiéticas, foram realizados ensaios clonogénicos em meio semi-sólido nas 42 amostras. Os resultados obtidos das UFC para BFU-E, CFU-E, CFU-M, CFU-GM, CFU-G e CFU-GEMM, revelaram que, no geral, os

doentes apresentam uma capacidade clonogénica mais baixa do que as dos dadores. (Figura 12, Tabela 5).

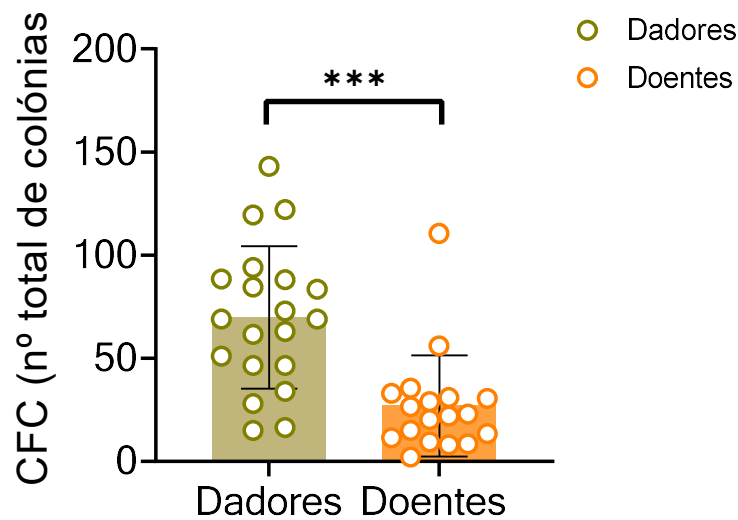


Figura 12: Capacidade clonogénica total.

Os resultados obtidos demonstram que a capacidade clonogénica dos dadores é superior em relação aos doentes ( $p=0,0027$ ), em todas as linhas celulares (Tabela 5).

Tabela 5: Resultados em valores absolutos da capacidade clonogénica das populações em estudo.

Capacidade clonogénica total	Dadores (n=22)	Doentes (n=20)	Nível de significância (p)	
	Media $\pm$ desvio padrão (limites)		teste t	K-S
Total	78,5 $\pm$ 57,3 (15-291,5)	32,4 $\pm$ 30,0 (2-121,5)	0,0027	0,0007

Em relação às UFC eritróides, os resultados revelaram diferenças significativas entre as duas amostras, para CFU-E ( $p=0,0112$ ) e BFU-E ( $p=0,0372$ ), sendo inferior nos doentes (Figura 13, Tabela 6).

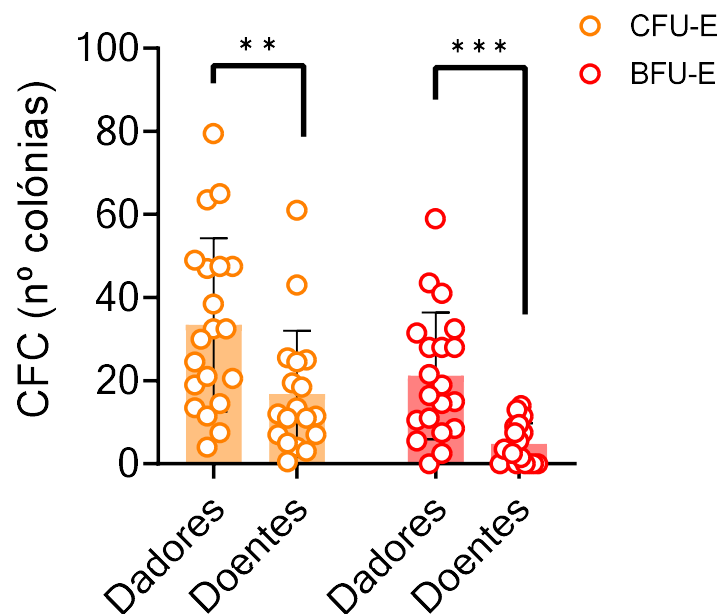


Figura 13: Capacidade clonogênica de progenitores eritroides (CFU-E e BFU-E).

Tabela 6: Progenitores eritroides (CFU-E e BFU-E).

Capacidade Clonogênica Eritróide	Dadores (n=22)	Doentes (n=20)	Nível de significância (p)	
	Media ± desvio padrão (limites)		teste t	KS
<i>Eritróide total</i>	64,8 ± 54,9 (14-282,5)	27,5 ± 26,1 (2-104)	0,0086	0,0006
<i>BFU-E</i>	29,8 ± 42,3 (0-202,5)	8,3 ± 14,2 (0-64)	0,0372	0,0028
<i>CFU-E</i>	35,6 ± 22,7 (4-80)	19,2 ± 16,1 (1-61)	0,0112	0,0067

Os resultados obtidos para a capacidade clonogênica mieloide, também apresentaram diferenças significativas entre dadores e doentes para CFU-GM ( $p=0,0082$ ), CFU-M ( $p=0,0011$ ), sendo que os doentes apresentam uma capacidade inferior (**Figura 14, Tabela 7**). Para as células CFU-G, os resultados não apresentaram diferenças.

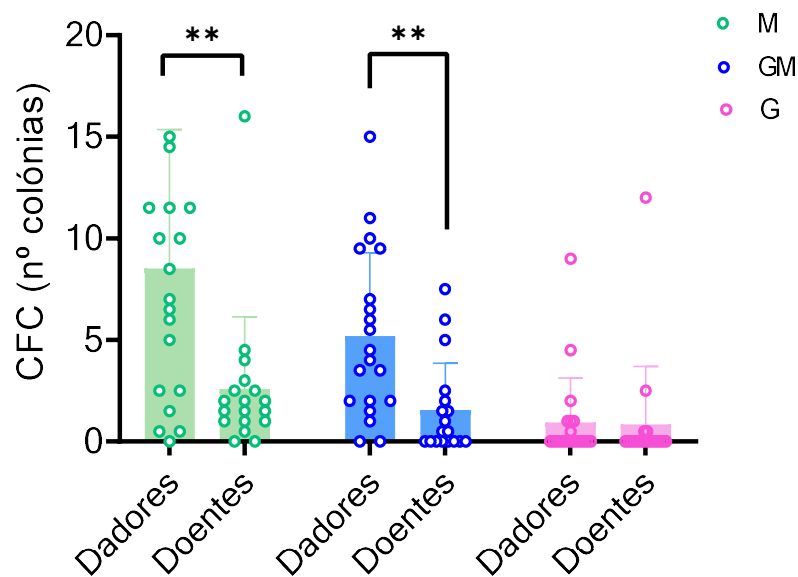


Figura 14: Capacidade clonogénica de progenitores granulócitos, macrófagos (CFU-G, CFU-M e CFU-GM).

Tabela 7: Capacidade clonogénica mieloide

Capacidade Clonogénica Mieloide	Dadores (n=22)	Doentes (n=20)	Nível de significância (p)	
	Media ± desvio padrão (limites)		teste t	K-S
<i>UFC mielóide total</i>	14,6 ± 10,3 (0-35,5)	5,5 ± 7,9 (0-35,5)	0,0050	0,0033
<i>CFU-GM</i>	5,3 ± 3,9 (0-15)	2,15 ± 3,3 (0-12,5)	0,0082	0,0035
<i>CFU-M</i>	8,4 ± 6,6 (0-25,5)	2,6 ± 3,4 (0-16)	0,0011	0,0008
<i>CFU-G</i>	0,9 ± 2,1 (0-9)	0,8 ± 2,7 (0-12)	ns	

n.s.= not significant

Em relação às colónias mistas (GEMM), verificou-se também uma menor capacidade de formação de colónias nos doentes (Figura 15, Tabela 8).

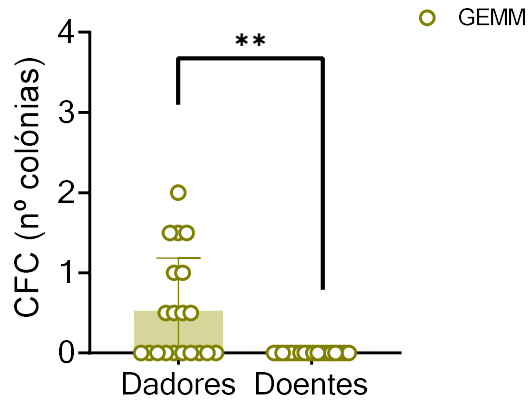


Figura 15: Capacidade clonogénica de progenitores de múltiplas linhagens granulócitos, eritrócitos, macrófagos e megacariócitos (CFU-GEMM).

Tabela 8: Capacidade clonogénica de progenitores de múltiplas linhagens granulócitos, eritrócitos, macrófagos e megacariócitos (CFU-GEMM).

Capacidade Clonogenica Mista	Dadores (n=22)	Doentes (n=20)	Nível de significância (p)	
	Media ± desvio padrão (limites)		teste t	K.S
Capacidade mista	0,66 ± 0,76 0-3	0,13 ± 0,46 0-3	0,0096	<0,0001

### 4.3. Correlações entre os valores obtidos em cada população

#### 4.3.1. HC ao diagnóstico

Foi verificado que existe uma correlação negativa entre a capacidade clonogénica (CC) mieloide e a idade do doente  $p=0,0235$ .

Tabela 6: Correlações entre as CC eritroide e mieloide atuais dos doentes com Hemocromatose e os parâmetros hematológicos e do metabolismo do ferro ao diagnóstico. Em cada localização da tabela estão indicados os valores das correlações Pearson entre cada par de variáveis: coeficientes de correlação, número de pares de dados utilizados para calcular cada coeficiente (em parêntesis).

	Idade	HGB	GR	VGM	HGM	TFTAT	FERRITINA	TBIS
C.C. Eritroide	-0,4957 (15)	0,0906 (15)	0,1441 (15)	0,1972 (15)	-0,0598 (15)	-0,2724 (15)	-0,4056 (15)	-0,2618 (15)
	0,0602	0,7481	0,6084	0,4812	0,8322	0,3259	0,1336	0,3459
C.C.. Mieloide	-0,5796 (15)	-0,0683 (15)	0,0709 (15)	-0,0238 (15)	-0,2565 (15)	-0,1960 (15)	-0,4154 (15)	-0,2014 (15)
	<b>0,0235</b>	0,8089	0,8018	0,9328	0,3561	0,4838	0,1236	0,4716

#### 4.3.2. HC manutenção

Não foram encontradas correlações entre a CC e os parâmetros hematológicos.

Tabela 7: Correlações entre as CC eritroide e mieloide e os parâmetros hematológicos e do metabolismo do ferro em doentes com Hemocromatose em fase de tratamento de manutenção. Em cada localização da tabela estão indicados os valores das correlações Pearson entre cada par de variáveis: coeficientes de correlação, número de pares de dados utilizados para calcular cada coeficiente (em parêntesis).

	Idade	HGB	GR	VGM	HGM	TFTAT	FERRITINA
C.C. Eritroide	-0,4988 (15)	-0,0379 (15)	-0,1396 (15)	0,2614 (15)	0,1458 (15)	0,3413 (15)	-0,0970 (15)
	0,0584	0,8934	0,6196	0,3466	0,6041	0,2132	0,7309
C.C.. Mieloide	-0,6268 (15)	-0,1865 (15)	-0,0835 (15)	-0,0950 (15)	-0,0644 (15)	0,4812 (15)	-0,0332 (15)
	<b>0,0124</b>	0,5057	0,7674	0,2228	0,8197	0,0694	0,9066

### 4.3.3. Dadores

Não foram encontradas correlações entre a CC e os parâmetros hematológicos.

Tabela 8: Correlações entre as CC eritróide e mielóide e os parâmetros hematológicos em dadores regulares de sangue. Em cada localização da tabela estão indicados os valores das correlações Pearson entre cada par de variáveis: coeficientes de correlação, número de pares de dados utilizados para calcular cada coeficiente (em parêntesis).

	<b>Idade</b>	<b>HGB</b>	<b>GR</b>	<b>VGM</b>	<b>HGM</b>
<b>C.C. Eritróide</b>	0,1116 (22)	0,3043 (22)	0,2589 (22)	-0,1443 (22)	-0,1314 (22)
	0,6210	0,1686	0,2447	0,5218	0,5599
<b>C.C. Mielóide</b>	0,3873 (22)	0,3398 (22)	0,2924 (22)	-0,1244 (22)	-0,1082 (22)
	0,0749	0,1218	0,1867	0,5813	0,6319

## 5. Discussão

Com a realização deste estudo os resultados obtidos demonstram que a capacidade clonogénica dos doentes com HC com a mutação C282Y é inferior aos dadores em todas as linhagens celulares. Isto sugere existência de um defeito ao nível das células estaminais humanas hematopoiéticas (CEHs). Uma possível explicação para esta diferença é o efeito prévio da sobrecarga de Fe nestas células. Como foi descrito anteriormente por Silvestri *et al* (20), o Fe estimula a diferenciação das CEHs, sendo a fase terminal da eritropoiese muito dependente deste ião. Neste sentido as células eritroides utilizam estratégias para garantir as condições basais de Fe de forma a manter a sua regular função. Este fato, poderá ser a causa para se observar um menor número de colónias eritroides (quer BFU-E, quer CFU-E) nos doentes em relação aos dadores, indo ao encontro do acima referido. Assim, no futuro seria importante estudar em mais detalhe o papel da sobrecarga de Fe na diferenciação das CEHs.

Num estudo realizado por Xiao Chai *et al*(57), foi avaliado o possível dano nas CEHs, pela sobrecarga de Fe no modelo animal. Estes autores identificaram uma diminuição da função clonogénica, devido às reações de oxidação redução por excesso de Fe. Estes resultados demonstraram que a sobrecarga de Fe afeta o rácio das células hematopoiéticas imaturas. Embora os doentes do nosso estudo não estejam atualmente na fase de sobrecarga de Fe, já o estiveram previamente. Esta situação pode ter levado a uma alteração nas HSCs, e, embora a sobrecarga de Fe já não exista, a alteração tenha permanecido. Esta hipótese deve ser testada em estudos futuros, de forma a poder ser avaliada a capacidade clonogénica dos doentes ao diagnóstico e depois poder ser comparada na fase de manutenção (58).

No presente estudo, a alteração da CC dos doentes, pode dever-se ao *HFE* propriamente dito, isto é, a um mecanismo intrínseco não dependente do Fe. Para dar continuidade a este estudo, seria relevante no futuro realizar os mesmos ensaios clonogénicos no modelo animal de *Hfe*-KO. Contudo, existe a possibilidade de não serem observadas as mesmas diferenças no modelo animal. A possível falha da replicação no modelo animal poderá dever-se ao fato de nos doentes existir a mutação do *HFE*, enquanto no modelo animal se trata da ausência do gene (KO) e não da mutação específica, como nos doentes (48).

Comparando os valores dos parametros hematológicos entre os dadores e doentes constata-se que os parametros de Hb, GR, VMG e HGM, são superiores nos doentes, mesmo estando muito depletados de Fe. Esta evidência era esperada replica os resultados do estudo HEIRS de Christine E. McLaren (59,60). Esta diferença poderá significar um processo de

eritropoiese, em que pela existência de maior quantidade de Fe, os GR não necessitem de realizar o mesmo número de divisões, até estarem na forma madura e em circulação. Isto é, um menor número de divisões poderá significar eritrócitos maiores e com mais HGB, como pode ser evidenciado por uma HGM ligeiramente mais elevada nos doentes do que nos dadores (**Tabela 3**). Além disso, *Barton et al* (61), verificaram através de esfregaços sanguíneos realizados antes da flebotomia a existência de GR com diâmetro aumentado e “bem preenchidos” com HGB.

Não foram encontradas correlações significativas entre as capacidades clonogénicas eritroides e mieloides, assim como nos parâmetros hematológicos e do metabolismo do Fe nos doentes com HC, quer na data do teste, quer na altura do diagnóstico. Isto sugere que os defeitos clonogénicos encontrados não são diretamente devidos à sobrecarga de Fe, mas poderão estar relacionados com algum tipo de sinalização mediada pelo *HFE*.

Foi detetada uma correlação negativa com a idade, apenas para a capacidade clonogénica mieloide nos doentes. Esta correlação negativa pode ter a ver com a média de idade dos doentes ser superior à dos dadores, em virtude de o tratamento da doença ser para toda a vida.

Nos dadores não há qualquer relação com os parâmetros hematológicos do sangue periférico com a capacidade clonogénica. Relativamente às correlações entre os parâmetros hematológicos entre si, observamos como esperado, uma correlação positiva entre os valores de HGB e GR, quer nos doentes, quer nos controlos. No entanto, apenas nos doentes encontramos correlações negativas muito significativas entre os GR e o VGM e HGM. Uma explicação provável poderia ser o aumento do VGM e HGM devido a uma maior disponibilidade de Fe circulante, sendo compensado por um bloqueio da eritropoiese através de um mecanismo, que ainda não está bem esclarecido, mas que poderá envolver a redução da capacidade clonogénica que observamos neste estudo.

Foi verificado a redução de valores dos parâmetros VGM, FT e TSAT entre a fase de diagnóstico e tratamento de manutenção. Estes resultados identificam que entre o diagnóstico e a fase de manutenção da doença, ocorre, como esperado, uma diminuição do valor da FT, TFTAT e do VGM. Por outro lado, há um aumento dos índices GR, HGB. Como descrito por McLaren (59), valores elevados de VGM estão associados a valores mais elevados de FT e da TFTAT. A normalização dos valores da FT e da TFTAT, faz baixar os valores do VGM, fazendo aumentar o número de GR.

A possibilidade de o próprio *HFE* estar envolvido nesse mecanismo é muito atrativa, conforme proposto por Ramos *et al* (47). Neste estudo no modelo animal, é demonstrado que ratinhos *Hfe*-KO podem recuperar de estados de anemia induzida por flebotomia mais rapidamente que os *Wild Type*. Os autores identificaram que a falta de *Hfe* pode ser vantajosa, pois em situações de stress (flebotomia) os ratinhos *Hfe*-KO recuperaram mais rapidamente os índices de GR e HGB, em comparação com WT com sobrecarga de Fe. Este estudo sugere ainda, que a falta de *Hfe* e uma regulação negativa da hepcidina à sobrecarga de Fe, pode levar a uma resposta mais rápida de recuperação da anemia em situações de stress (48). Futuramente, esta evidência merece uma investigação mais profunda em modelo animal.

Outra hipótese a considerar para a explicação da diminuição da CC nos doentes, será o potencial envolvimento do *HFE* com o TFR. Foi demonstrado por Dick *et al* (62) que CEHs com expressão alta de TRF correspondem a uma população mais proliferativa, e mais diferenciada, enquanto que os CEHs com baixa expressão de *Trf1* são mais quiescentes. No entanto, não existem ainda estudos que explorem essa relação ao nível da eritropoiese e seria interessante explorar futuramente (63).

## 6. Conclusão

A grande quantidade de Fe necessária para a síntese de HGB mantém a homeostase do Fe e a eritropoiese interligadas, sendo que os níveis de Fe são afetados pelo aumento da eritropoiese e a eritropoiese regulada pelo Fe sérico disponível. A conexão entre estes dois processos é mantida mesmo quando a eritropoiese é ineficaz.

Este estudo foi realizado para investigar a capacidade clonogénica hematopoiética em doentes de HC. Verificou-se que existem diferenças significativas na formação de colónias hematopoiéticas em todas as linhagens entre as duas amostras. Em relação às colónias eritroides propriamente ditas, o nosso estudo não foi conclusivo a que nível do processo de maturação dos percursores esta alteração acontece, pois foram utilizadas PBMNC em circulação no sangue periférico e não células CD34+ (CEHs). Esta questão não respondida, mostra o quão delicada é a organização do processo de formação das células do sangue, e em particular, a eritropoiese, nas suas fases de proliferação, diferenciação e autorrenovação.

Apesar da capacidade clonogénica ser inferior nos doentes em relação aos dadores, os primeiros apresentam valores superiores nos valores de HGB, VGM e HGM. Este resultado poderá refletir um processo de eritropoiese mais eficaz na presença prévia de níveis de Fe mais elevados. Por último, o papel direto do *HFE* neste processo não está ainda esclarecido e sem dúvida merece uma investigação mais profunda no futuro.

Este trabalho foi submetido para apresentação em forma de poster no "1st Symposium on Iron Metabolism and Cancer".

### 6.1. Limitações e perspetivas futuras

A amostra selecionada, por ter sido de conveniência, pode não ser representativa, já que os doentes não foram selecionados por fenótipo o que levou a alguma heterogeneidade individual dos doentes em fase de tratamento de manutenção. O tamanho da amostra ficou condicionado pelos doentes que estavam com o seu processo de flebotomia agendado, tendo no período do estudo sido incluídos todos os doentes em fase de manutenção da doença. O número baixo de doentes que foram selecionados pode condicionar os resultados obtidos.

A idade dos doentes é superior à dos dadores pelo fato de se tratar de uma doença de quarta ou quinta década de vida, pelo que não foi possível emparelhar as amostras por idades.

Os dados ao diagnóstico foram apenas comparados com as capacidades clonogénicas atuais (tratamento de manutenção), e não sabemos se seriam diferentes ao diagnóstico, quando há grande sobrecarga de Fe. Este estudo poderia ser alargado a doentes que se encontrem em sobrecarga de Fe para poder comparar com os resultados obtidos neste estudo.

Outro ponto a ter em consideração é que este estudo foi realizado a partir de células mononucleares isoladas de sangue periférico, em que a população CD34+ (marcador para HSCs humanas) não foi isolada. Assim, fica em aberto se o defeito na capacidade clonogénica nos doentes se deve à mobilização de células para o sangue periférico. Para avaliar esta questão, poderia ser realizado o mesmo ensaio clonogénico, mas a partir de células CD34+.

Como o efeito de redução da capacidade clonogénica nos doentes é de multilinhagem, sugerindo um defeito a nível das HSCs, poderiam ser realizados *long term reconstitution assays* (Cobblestone area-forming cell (CAFC) (64)) para investigar melhor esta questão. O CAFC é um teste *in vitro* de co-cultura de células da medula óssea do estroma mesenquimal (MSCs) e de HSCs. Os ensaios de CAFC são comparáveis aos estudos *in vivo* de medula óssea e podem ser usados como ensaios de triagem rápida para testar a atividade das HSCs e atividade de suporte de MSCs (65).

## 7. Referências Bibliográficas

1. Wessling-Resnick M. Iron homeostasis and the inflammatory response. Vol. 30, Annual Review of Nutrition. 2010. p. 105–22.
2. Mast AE, Schlumpf KS, Wright DJ, Johnson B, Glynn SA, Busch MP, et al. Hepcidin level predicts hemoglobin concentration in individuals undergoing repeated phlebotomy. *Haematologica*. 2013 Aug 1;98(8):1324–30.
3. Graça Porto SOJPP. Hepsidina a molecula chave na regulação do metabolismo do ferro. *Gastrenterology*. 2012;19:26–32.
4. Nancy C Andrews. Disorders of Iron Metabolism. *New England Journal of Medicine* [Internet]. 2000 Apr 27;342(17):1293–4. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM200004273421716>
5. Grotto HZW. Fisiologia e metabolismo do ferro. Vol. 32, Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia. 2010. p. 8–17.
6. W Grotto HZ, Associado P. Metabolismo do ferro: uma revisão sobre os principais mecanismos envolvidos em sua homeostase Iron metabolism: an overview on the main mechanisms involved in its homeostasis. 2010.
7. Ponka P, Sheftel AD. Erythroid iron metabolism. In: *Iron Physiology and Pathophysiology in Humans*. Humana Press Inc.; 2012. p. 191–209.
8. Powell LW, Seckington RC, Deugnier Y. Haemochromatosis. Vol. 388, *The Lancet*. Lancet Publishing Group; 2016. p. 706–16.
9. Papanikolau G, Pantopoulos K. Systemic iron homeostasis and erythropoiesis. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*. 2017;69(6):399–413.
10. Pietrangelo A. Hereditary hemochromatosis: Pathogenesis, diagnosis, and treatment. Vol. 139, *Gastroenterology*. W.B. Saunders; 2010.
11. Brissot P, Pietrangelo A, Adams PC, De Graaff B, McLaren CE, Loreál O. Haemochromatosis. *Nat Rev Dis Primers*. 2018 Apr 5;4.
12. Nobili L, Lionetti M, Neri A. Long non-coding RNAs in normal and malignant hematopoiesis. *Oncotarget* [Internet]. 2016;7(31). Available from: [www.impactjournals.com/oncotarget](http://www.impactjournals.com/oncotarget)
13. Muckenthaler MU, Rivella S, Hentze MW, Galy B. A Red Carpet for Iron Metabolism. Vol. 168, *Cell*. Cell Press; 2017. p. 344–61.

14. Camaschella C, Pagani A, Nai A, Silvestri L. The mutual control of iron and erythropoiesis. *Int J Lab Hematol*. 2016;38 (suppl 1):20–6.
15. Lab F, Jesus de M. Endocitose e tráfico intracelular de nanomateriais Endocytosis and intracellular trafficking of nanomaterials. *Acta Farmacêutica Portuguesa* [Internet]. 2014;3(2):143–54. Available from: <http://lattes.cnpq.br/9611381402490228>
16. Hamdi A, Roshan TM, Kahawita TM, Mason AB, Sheftel AD, Ponka P. Erythroid cell mitochondria receive endosomal iron by a “kiss-and-run” mechanism. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 2016 Dec 1;1863(12):2859–67.
17. Zhang DL, Hughes RM, Ollivierre–Wilson H, Ghosh MC, Rouault TA. A Ferroportin Transcript that Lacks an Iron–Responsive Element Enables Duodenal and Erythroid Precursor Cells to Evade Translational Repression. *Cell Metab*. 2009 May 6;9(5):461–73.
18. Das A, Nag S, Mason AB, Barroso MM. Endosome–mitochondria interactions are modulated by iron release from transferrin. *Journal of Cell Biology*. 2016;214(7).
19. Zhang DL, Wu J, Shah BN, Greutelaers KC, Ghosh MC, Ollivierre H, et al. Erythrocytic ferroportin reduces intracellular iron accumulation, hemolysis, and malaria risk. *Science* (1979). 2018 Mar 30;359(6383):1520–3.
20. Silvestri L, Nai A. Iron and erythropoiesis: A mutual alliance. *Semin Hematol*. 2021 Jul 1;58(3):145–52.
21. Ganz T, Nemeth E. Heparin and iron homeostasis. Vol. 1823, *Biochimica et Biophysica Acta – Molecular Cell Research*. 2012. p. 1434–43.
22. Pigeon C, Ilyin G, Courselaud B, Leroyer P, Turlin B, Brissot P, et al. A New Mouse Liver–specific Gene, Encoding a Protein Homologous to Human Antimicrobial Peptide Heparin, Is Overexpressed during Iron Overload. *Journal of Biological Chemistry*. 2001 Mar 16;276(11):7811–9.
23. Ganz T. Heparin and iron regulation, 10 years later. Vol. 117, *Blood*. American Society of Hematology; 2011. p. 4425–33.
24. Domenico I, Ward D, Kaplan J. Heparin regulation: ironing out the details. *Journal of Clinical Investigation*. 2007 Jul 2;117(7):1755–8.
25. Rivera S, Liu L, Nemeth E, Gabayan V, Sorensen OE, Ganz T. Heparin excess induces the sequestration of iron and exacerbates tumor–associated anemia. 2005; Available

- from:<http://ashpublications.org/blood/article.pdf/105/4/1797/1706456/zh800405001797.pdf>
26. Nemeth E, Rivera S, Gabayan V, Keller C, Taudorf S, Pedersen BK, et al. IL-6 mediates hypoferrremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *Journal of Clinical Investigation*. 2004 May 1;113(9):1271–6.
  27. Rishi G, Wallace DF, Subramaniam VN. *Hepcidin: Regulation of the master iron regulator*. Vol. 35, *Bioscience Reports*. Portland Press Ltd; 2015.
  28. Camaschella C, Nai A, Silvestri L. Iron metabolism and iron disorders revisited in the hepcidin era. Vol. 105, *Haematologica*. Ferrata Storti Foundation; 2020. p. 260–72.
  29. Crownover BK, Covey CJ. *Hereditary Hemochromatosis* [Internet]. Vol. 87. 2013. Available from: [www.aafp.org/afp](http://www.aafp.org/afp).
  30. Yun S, Vincelette ND. Update on iron metabolism and molecular perspective of common genetic and acquired disorder, hemochromatosis. Vol. 95, *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. Elsevier Ireland Ltd; 2015. p. 12–25.
  31. Brissot P, De Bels F. *Current Approaches to the Management of Hemochromatosis* [Internet]. 2006. Available from: <http://www.radio.univ-rennes1.fr>
  32. Pietrangelo A. *Hereditary Hemochromatosis—A New Look at an Old Disease* [Internet]. Vol. 350, *n engl j med*. 2004. Available from: [www.nejm.org](http://www.nejm.org)
  33. Simon M, Le Mignon L, Fauchet R, Yaouanq J, David V, Edan G, et al. A Study of 609 HLA Haplotypes Marking for the Hemochromatosis Gene: (1) Mapping of the Gene near the HLA-A Locus and Characters Required to Define a Heterozygous Population and (2) Hypothesis Concerning the Underlying Cause of Hemochromatosis–HLA Association. Vol. 41, *Am. J. Hum. Genet*. 1987.
  34. Feder John N. The Hereditary Hemochromatosis Gene (HFE) A MHC Class I-Like Gene That Functions in the Regulation of Iron Homeostasis. Vol. 20, *Immunologic Research*. 1999.
  35. Feder JN, Gnirk A, Thomas W, et al. (A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis) [Internet]. 1996 Aug. Available from: <http://www.nature.com/naturegenetics>
  36. Reuben AR. *praise ye god os iron*. *Hepatology*. 2004;40:1231–4.
  37. Girelli D, Busti F, Brissot P, Cabantchik I, Muckenthaler MU, Porto G. *Hemochromatosis classification: update and recommendations by the BIOIRON Society*. 2022.

38. European Association for the Study of the Liver. EASL clinical practice guidelines for HFE hemochromatosis. *J Hepatol.* 2010 Jul;53(1):3–22.
39. Adams P, Altes A, Brissot P, Butzeck B, Cabantchik I, Cançado R, et al. Therapeutic recommendations in HFE hemochromatosis for p.Cys282Tyr (C282Y/C282Y) homozygous genotype. Vol. 12, *Hepatology International.* Springer; 2018. p. 83–6.
40. Guerreiro T. ABO 2009 38. *ABO.* 2009; 38:35–53.
41. Adams PC, Barton JC. How I treat hemochromatosis. Vol. 116, *Blood.* American Society of Hematology; 2010. p. 317–25.
42. Barton JC, Bottomley SS. Iron deficiency due to excessive therapeutic phlebotomy hemochromatosis. *Am J Hematol.* 2000;65(3):223–6.
43. Costa M, Cruz E, Barton JC, Thorstensen K, Morais S, Da Silva BM, et al. Effects of highly conserved major histocompatibility complex (MHC) extended haplotypes on iron and low CD8+ T lymphocyte phenotypes in HFE C282Y homozygous hemochromatosis patients from three geographically distant areas. *PLoS One.* 2013 Nov;8(11).
44. Manuele E, Ngelucci A, Rittenham AMB, Hristine C, Aren L, Arta M, et al. Hepatic iron concentration and total body iron stores in thalassemia major. *N Engl J Med.* 2000;343(5):327–31.
45. Cancado RD, Alvarenga AM, Santos PCJ. HFE hemochromatosis: an overview about therapeutic recommendations. *Hematol Transfus Cell Ther.* 2022 Jan 1;44(1):95–9.
46. Souto NLR, Pugliesi PR, Lopes ICR. Hereditary hemochromatosis: literature review. *Revista Médica de Minas Gerais.* 2016;26.
47. Ramos P, Guy E, Chen N, Gardenghi S, Grady RW, De Sousa M, et al. Absence of the Hemochromatosis Gene Hfe Confers Protection Under Conditions of Stress Erythropoiesis. *Blood.* 2009 Nov 20;114(22):4044–4044.
48. Ramos P, Guy E, Chen N, Proenca CC, Gardenghi S, Casu C, et al. Enhanced erythropoiesis in Hfe-KO mice indicates a role for Hfe in the modulation of erythroid iron homeostasis. *Blood.* 2011 Jan 27;117(4):1379–89.
49. Coutinho MP, Teles MJ, Melo G, Lopes M, Duarte D, Duarte TL, et al. Ferritin Increase in Hemochromatosis Subjects After Discontinuing Their Regular Maintenance Treatment: A Longitudinal Analysis Performed During the COVID-19 Imposed Hospital Lockdown. *Hemasphere.* 2022 Sep;6(9):e770.

50. Baines P, Truran L, Bailey-Wood R, Hoy T, Lake H, Poynton CH, et al. Haemopoietic colony-forming cells from peripheral blood stem cell harvests: cytokine requirements and lineage potential. Vol. 88. 1994.
51. Puck ET. Action of x-rays on mammalian cells. 1956 Feb.
52. DeZern AE, Pu J, McDevitt MA, Jones RJ, Brodsky RA. Burst-forming unit-erythroid assays to distinguish cellular bone marrow failure disorders. *Exp Hematol*. 2013 Sep;41(9):808–16.
53. Stemcell.com. HUMAN HEMATOPOIETIC COLONIES Atlas of Human Hematopoietic Colonies. 2019.
54. Helgason CD, Miller CL. Basic Cell Culture Protocols. Third Edition. Vol. 290, From: Methods in Molecular Biology. Humana Press; 2005. 71–90 p.
55. Doulatov S, Notta F, Laurenti E, Dick JE. Hematopoiesis: A human perspective. Vol. 10, Cell Stem Cell. 2012. p. 120–36.
56. Hoffbrand's Essential Haematology 8th Edition. Hematopoese Tópicos-chave.
57. Chai X, Li D, Cao X, Zhang Y, Mu J, Lu W, et al. ROS-mediated iron overload injures the hematopoiesis of bone marrow by damaging hematopoietic stem/progenitor cells in mice. *Sci Rep*. 2015 May 13;5.
58. Hartmann J, Bräulke F, Sinzig U, Wulf G, Maas JH, Konietzschke F, et al. Iron overload impairs proliferation of erythroid progenitors cells (BFU-E) from patients with myelodysplastic syndromes. *Leuk Res*. 2013 Mar;37(3):327–32.
59. McLaren CE, Barton JC, Gordeuk VR, Wu L, Adams PC, Reboussin DM, et al. Determinants and characteristics of mean corpuscular volume and hemoglobin concentration in white HFE C282Y homozygotes in the Hemochromatosis and Iron Overload Screening Study. *Am J Hematol*. 2007 Oct;82(10):898–905.
60. Barton JC, Bottomley SS. Iron deficiency due to excessive therapeutic phlebotomy hemochromatosis. *Am J Hematol*. 2000;65(3):223–6.
61. Barton J, Bertoli L, Rothenberg B. Pheripheral blood erythrocyte parameters in hemochromatosis. Edidence for increased erythrocyte hemoglobin content. *J Lab Clin Med*. 2000 Jan;135:96–104.
62. Takayama N, Murison A, Takayanagi S ichiro, Arlidge C, Zhou S, Garcia-Prat L, et al. The Transition from Quiescent to Activated States in Human Hematopoietic Stem Cells Is

- Governed by Dynamic 3D Genome Reorganization. *Cell Stem Cell*. 2021 Mar 4;28(3):488–501.e10.
63. Wang S, He X, Wu Q, Jiang L, Chen L, Yu Y, et al. Transferrin receptor 1-mediated iron uptake plays an essential role in hematopoiesis. *Haematologica*. 2020 Aug 1;105(8):2071–82.
  64. Haan G, Ploemacher R. The Cobblestone–Area–Forming Cell Assay. *Hematopoietic Stem Cell Protocols Methods in Molecular Medicine*. 2002;63.
  65. Amarachintha S, Pang Q. Cobblestone Area-forming Cell Assay of Mouse Bone Marrow Hematopoietic Stem Cells. *Bio Protoc*. 2018;8(9).

## Anexo A



Centro Hospitalar Universitário do Porto

### **TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO**

#### **TÍTULO DO ESTUDO DE INVESTIGAÇÃO: HFE E ERITROPOIESE**

Eu, abaixo-assinado, fui informado de que o estudo de investigação acima mencionado se destina a esclarecer se existe algum defeito intrínseco da eritropoiese em doentes com hemocromatose.

Sei que neste estudo está prevista a realização de testes laboratoriais com as células do meu sangue, aproveitadas do excedente das flebotomias que realizo regularmente como forma de tratamento, tendo-me sido explicado em que consistem e que para o efeito não serão necessárias deslocações adicionais ao hospital.

Neste estudo sei que o meu sangue vai ser utilizada de imediato para fazer os ensaios laboratoriais e que não será armazenado para ser utilizado posteriormente. Também sei que os testes laboratoriais não podem ser efetuados neste hospital e que, por isso, têm que ser realizadas num laboratório de investigação no Instituto de Investigação e Inovação em Saúde da Universidade do Porto (i3S). Não irão ser realizados estudos genéticos no âmbito deste projeto.

Foi-me garantido que todos os dados relativos à identificação dos participantes neste estudo são confidenciais e que será mantido o anonimato.

Sei que posso recusar-me a participar ou interromper em qualquer momento a participação no estudo, sem nenhum tipo de penalização por este facto. Compreendi a informação que me foi dada, tive oportunidade de fazer perguntas e as minhas dúvidas foram esclarecidas.

Aceito participar de livre vontade no estudo acima mencionado e concordo que sejam efetuados os exames e a colheita de amostras de sangue para realizar os testes laboratoriais que fazem parte deste estudo. Também autorizo a divulgação dos resultados obtidos no meio científico, garantindo o anonimato.

Nome do Participante no estudo:

Data

Assinatura

\_\_/\_\_/\_\_

\_\_\_\_\_

Nome do Médico Responsável:

Data

Assinatura

\_\_/\_\_/\_\_

\_\_\_\_\_

## Anexo B



**SNS** SERVIÇO NACIONAL  
DE SAÚDE



Exmo. Sr. Dr. Francisco Dias  
Serviço de Hematologia Clínica

ASSUNTO: TA-Mestrado - “**GENE HFE E ERITROPOISE**” – N/ REF.º 2022.194(154-DEFI/155-CE)

O Conselho de Administração do Santo António na reunião de 29 de junho de 2023 emitiu a seguinte deliberação: “Autorizado” para a realização do estudo de investigação acima mencionado, após a implementação das recomendações elaboradas pela Encarregada da Proteção de Dados do CHUdSA, a realizar no Serviço de Hematologia Clínica desta Instituição e tendo como Investigador Principal o Dr. Francisco Dias.

O estudo foi previamente analisado pela Comissão de Ética do CHUdSA |ICBAS, pelo Serviço de Investigação Clínica, pela Direção do Departamento de Ensino e Formação do CHUdSA e pelo Presidente do Conselho de Administração, tendo obtido parecer favorável.

Cumprimentos,

Assinado por: **Cláudia Alexandra Oliveira Santos**  
Num. de Identificação: 11089889  
Data: 2023.06.30 12:44:34+01'00'

