

**O diagnóstico molecular de Hemocromatose
ligada ao *HFE*: uma análise das práticas de
referenciação clínica ao longo dos últimos 11
anos**

Bruna Silva Cordeiro

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em

Medicina

(mestrado integrado)

Orientadora: Professora Doutora Maria da Graça Beça Gonçalves Porto

Coorientador: Professor Dr. Jorge Martinez Marcos

Coorientadora: Professora Doutora Célia Maria Pinto Nunes

Abril de 2022

O diagnóstico molecular de Hemocromatose ligada ao *HFE*: uma análise das práticas de referência
clínica ao longo dos últimos 11 anos

Agradecimentos

À Professora Doutora Graça Porto por ter aceitado este desafio e me ter orientado da melhor forma possível ao longo desta dissertação. Por toda a dedicação, motivação e disponibilidade ao longo desta etapa.

Ao Professor Dr. Jorge Martinez Marcos por ter aceitado ser coorientador da minha dissertação e pelo apoio na elaboração da mesma.

À Professora Doutora Célia Nunes por ter aceitado ser coorientadora da minha dissertação e por toda a colaboração e envolvimento ao longo deste processo.

Ao Técnico Informático Sr. Victor Mendes pela disponibilização do documento com a base de dados a analisar.

À minha família por estar sempre presente.

Um muito obrigada.

Resumo

Introdução: A Hemocromatose é uma doença genética que se caracteriza por elevada absorção de ferro e conseqüente deposição em diversos órgãos. Relaciona-se com vários genes sendo que mais de 90% dos casos de doença corresponde à homozigotia C282Y no gene *HFE*. O presente trabalho pretende estudar os pedidos de diagnóstico molecular de Hemocromatose relacionada com o *HFE* do CGPP-IBMC (Centro de Genética Preditiva e Preventiva - Instituto de Biologia Molecular e Celular) analisando a eficácia de detecção de casos positivos (homozigóticos C282Y) com vários fatores, nomeadamente os diferentes motivos de referência clínica.

Materiais e Métodos: Estudo retrospectivo observacional que incluiu todos os pedidos de teste genético *HFE* solicitados ao CGPP-IBMC desde janeiro de 2010 até março de 2021. As variáveis em estudo foram agrupadas em várias categorias: sexo, idade, ano do pedido, especialidade médica, origem do pedido, tipo de pedido, motivo de referência e resultado das variantes C282Y e H63D do gene *HFE*.

Resultados: Analisaram-se 1882 pedidos de teste genético, 73,1% em homens e 26,9% em mulheres, com idade média de 57,5±14,6 anos. As especialidades que efetuaram mais pedidos foram a Medicina Interna (40,7%), a Gastroenterologia (26,5%) e a Imunohemoterapia e Hematologia Clínica (agrupadas) com 19,2%. Globalmente foram identificados 90 casos de homozigóticos C282Y (4,8%). A percentagem de casos positivos foi significativamente superior ($p\text{-value}<0,05$) nas referências para rastreio familiar (9,8%) do que para diagnóstico clínico (3,9%). As referências que incluíram como critério uma elevação da saturação da transferrina sem comorbilidades associadas revelaram a maior percentagem de detecção de homozigóticos C282Y (12,1%), entre os diferentes motivos de referência. Em termos de instituições referenciadoras, a maior percentagem de identificação de homozigóticos C282Y foi obtida na consulta de referência de Hemocromatose do Hospital de Santo António (16,9%), seguindo-se os Centros de Saúde (4,5%) e finalmente os hospitais (2,9%).

Discussão e conclusão: Os resultados obtidos confirmam a importância de se usarem critérios específicos para genotipagem *HFE*, nomeadamente a elevação da saturação da transferrina, hiperferritinemia e a ausência de comorbilidades que justifiquem o aumento dos parâmetros de sobrecarga de ferro, como condições necessárias para a suspeita clínica da doença. Os resultados obtidos com as frequências de detecção da variante H63D contribuem para uma discussão mais ampla sobre a real necessidade de

manutenção da sua pesquisa numa suspeita de diagnóstico de hemocromatose, uma vez que elas são, em geral, sobreponíveis às frequências observadas na população em geral.

Este estudo cumpriu o seu objetivo principal de identificar as formas de referência com maior eficácia na detecção de casos de Hemocromatose ligada ao *HFE*, permitindo assim avançar com a divulgação daquilo que são consideradas as melhores práticas.

Palavras-Chave

Hemocromatose; motivos de referência; *HFE*; C282Y; H63D

Abstract

Introduction: Hemochromatosis is a genetic disorder characterized by high iron absorption and consequent deposition in specific organs. It may be caused by several genes but more than 90% of the disease cases correspond to C282Y homozygosity in the *HFE* gene. The present study aims to analyze the results obtained in requests for molecular diagnosis of *HFE*-related Hemochromatosis referred to the CGPP-IBMC (*Centro de Genética Preditiva e Preventiva - Instituto de Biologia Molecular e Celular*) evaluating the effectiveness of detection of positive cases (C282Y homozygotes) in relation to several factors, including the different reasons for clinical referral.

Materials and Methods: It is a retrospective observational study that included all *HFE* genetic testing orders requested to CGPP-IBMC from January 2010 to March 2021. Study variables were grouped into several categories: sex, age, year of request, medical specialty, place of request, type of request, reasons for referral and result of the C282Y and H63D variants of the *HFE* gene.

Results: The sample consisted of 1882 requests for genetic testing, 73.1% in men and 26.9% in women, with a mean age of 57.5±14.6 years. The medical specialties that requested more often were Internal Medicine (40.7%), Gastroenterology (26.5%) and Immunohemotherapy and Clinical Hematology (grouped) with 19.2%. Overall, 90 cases of C282Y homozygotes were identified (4.8%). The percentage of positive cases was significantly higher ($p\text{-value}<0.05$) in referrals for family screening (9.8%) than for clinical diagnosis (3.9%). Referrals that included an increase in transferrin saturation without associated comorbidities as a criteria revealed the highest percentage of detection of C282Y homozygotes (12.1%), among the different reasons for referral. In terms of referral institutions, the highest percentage of identification of C282Y homozygotes was obtained in the reference Hemochromatosis consultation at *Hospital de Santo António* (16.9%), followed by the Primary Health Care (4.5%) and finally the Hospitals (2.9%).

Discussion and conclusion: The results obtained confirm the importance of using specific criteria for *HFE* genotyping, namely the elevation of transferrin saturation, hyperferritinemia and absence of comorbidities that justify the increase in iron overload parameters, as necessary conditions for clinical suspicion of the disease. The results obtained with the detection frequencies of the H63D variant contribute to a broader discussion about the real need to maintain the search in a suspected diagnosis of

hemochromatosis, since they are, in general, superimposed on the frequencies expected in the normal population. This study achieved its main objective of identifying the most effective criteria for referral in the detection of Hemochromatosis related to *HFE* cases, therefore allowing to move forward with the dissemination of what are considered best practices.

Keywords

Hemochromatosis; reasons for referral; *HFE*; C282Y; H63D

Índice

Agradecimentos.....	III
Resumo.....	V
Abstract.....	VII
Índice.....	IX
Lista de figuras.....	XI
Lista de tabelas.....	XIII
Lista de siglas e acrónimos.....	XV
Introdução.....	1
Objetivos do estudo.....	4
Materiais e Métodos.....	7
Descrição do estudo.....	7
Participantes no estudo.....	7
Recolha de dados.....	7
Variáveis em estudo.....	7
Tratamento estatístico dos dados.....	8
Resultados.....	11
Caraterização da amostra.....	11
Relações entre as variáveis em estudo.....	14
Discussão e conclusão.....	27
Motivos de referência para genotipagem <i>HFE</i>	27
Avaliação da eficácia de deteção de casos positivos.....	29
Idade e HC.....	31
Controvérsias sobre a variante H63D.....	31
Conclusões e perspetivas futuras.....	33
Referências.....	35
Apêndice.....	37

Apêndice 1 - Motivos de referência com apresentação das categorias de forma mais detalhada.....	39
Apêndice 2 – Tabela de verificação da normalidade pelo Teste de KS para a questão “Qual a idade média de detecção de homozigóticos C282Y? Existe diferença de idade para os casos não confirmados?”	40
Apêndice 3 - Tabela de verificação da normalidade pelo Teste de KS para a questão “Como tem variado a idade de apresentação dos pedidos de teste genético ao longo dos anos?”	41
Apêndice 4 - Tabela de verificação da normalidade pelo Teste de KS para a questão “Existe diferença na idade dos participantes com a origem do pedido de teste genético (hospitais, centros de saúde ou consulta de referência de HC do HSA)?”	42
Anexos	43
Anexo I - Parecer da Comissão de Ética e Conduta Responsável na Investigação do Instituto de Investigação e Inovação em Saúde (CECRI-i3S).	45
Anexo II – Nova tabela de classificação da HC por Girelli <i>et al.</i> (1).....	49

Lista de figuras

Figura 1 - Microestrutura hepática: lóbulo hepático (11)	3
Figura 2 - Microestrutura hepática: sinusoides, espaço perisinusoidal e hepatócitos (11)	3
Figura 3 – Idade dos participantes à data do pedido de teste genético agrupada por classes.	11
Figura 4 – Distribuição dos pedidos de teste genético ao longo dos anos.	12
Figura 5 – Número de pedidos de teste genético <i>HFE</i> por períodos.	20
Figura 6 – Resultados, em percentagem, da variante C282Y em cada um dos períodos indicados.....	20

Lista de tabelas

Tabela 1 – Distribuição dos pedidos de teste genético por sexo.	11
Tabela 2 – Análise descritiva da idade dos participantes à data do pedido de teste genético.....	11
Tabela 3 – Distribuição dos pedidos de teste genético por especialidade do médico requisitante.....	12
Tabela 4 – Distribuição dos pedidos de teste genético por origem de referência.	13
Tabela 5 – Distribuição dos pedidos de teste genético por tipo de referência.	13
Tabela 6 – Distribuição dos pedidos de teste genético por motivo de referência.	13
Tabela 7 - Distribuição dos resultados do pedido de teste genético <i>HFE</i> para as variantes C282Y e H63D.....	13
Tabela 8 - Relação entre o tipo de referência e os resultados para a variante C282Y.	14
Tabela 9 - Relação entre os motivos de referência e os resultados para a variante C282Y.	15
Tabela 10 - Relação entre a origem do pedido de teste genético e os resultados para a variante C282Y.	16
Tabela 11 - Relação entre a especialidade do médico que realiza o pedido e os resultados para a variante C282Y.	17
Tabela 12 - Relação entre o motivo de referência ser realizado com ou sem elevação da TSAT e os diferentes períodos.	18
Tabela 13 - Relação entre os vários períodos e os resultados para a variante C282Y.....	19
Tabela 14 - Relação entre a idade dos participantes e os resultados para a variante C282Y.	21
Tabela 15 – Relação entre a idade dos participantes e os vários períodos.....	21
Tabela 16 - Relação entre a idade dos participantes e a origem do pedido de teste genético.	22
Tabela 17 - Comparações múltiplas da média das ordens.....	22
Tabela 18 – Relação entre o tipo de referência e a origem do pedido.	23

Tabela 19 - Relação entre os motivos de referência e o sexo.	24
Tabela 20 - Resultados para as variantes C282Y e H63D com base nos dados em análise (CGPP-IBMC) e na frequência observada na população normal por Cardoso <i>et al.</i> (18).	25
Tabela 21 – Distribuição dos motivos de referência, com apresentação das categorias de referência de forma mais detalhada.....	39
Tabela 22 - Verificação da normalidade.....	40
Tabela 23 - Verificação da normalidade.....	41
Tabela 24 - Verificação da normalidade.....	42

Lista de siglas e acrónimos

CECRI	Comissão de Ética e Conduta Responsável na Investigação
CGPP	Centro de Genética Preditiva e Preventiva
HC	Hemocromatose
HSA	Hospital de Santo António
i3S	Instituto de Investigação e Inovação em Saúde
IBMC	Instituto de Biologia Molecular e Celular
KS	Kolmogorov-Smirnov
MGF	Medicina Geral e Familiar
RM	Ressonância Magnética
TSAT	Saturação da transferrina
VHB	Vírus da Hepatite B
VHC	Vírus da Hepatite C
<i>wt</i>	<i>wildtype</i> (forma nativa, não mutada)

Introdução

A Hemocromatose (HC) é uma doença genética que se caracteriza por elevada absorção de ferro e conseqüente deposição em órgãos específicos (principalmente fígado, pâncreas, coração e glândulas endócrinas) e articulações. (1,2) A doença pode estar relacionada com variantes em cinco genes, conhecidos até ao momento: *HFE*, *HJV*, *HAMP*, *TRF2* e *SLC40A1*. (1,3)

A forma mais comum de HC está relacionada com a homozigotia do polimorfismo C282Y (p.Cys282Tyr) no gene *HFE* no cromossoma 6p, sendo que corresponde a mais de 90% dos casos de HC. (2–4) Esta forma de doença tem transmissão autossômica recessiva com penetrância incompleta, não devendo ser vista como um distúrbio monogénico simples, já que a sua penetrância clínica é difícil prever, resultando de um complexo conjunto de fatores: ambientais, estilo de vida (álcool, obesidade) e genéticos, ainda não completamente esclarecidos. (1,5)

Quando se realiza uma genotipagem *HFE* para o diagnóstico de HC, o achado de qualquer outro polimorfismo para além do C282Y deve ser interpretado cautelosamente. Sabe-se que a homozigotia para a variante H63D e a heterozigotia composta C282Y/H63D não são causas suficientes para explicar a sobrecarga de ferro, não fazem diagnóstico de HC, podendo apenas ser considerados genótipos de suscetibilidade para sobrecarga de ferro na presença de outros fatores ou no contexto de hereditariedade digénica. Quando estes genótipos são descritos concomitantemente com parâmetros de ferro indicativos de sobrecarga, encontram-se, muitas vezes, comorbilidades que a justificam, nomeadamente doença hepática, consumo alcoólico ou infeção por VHC (Vírus da Hepatite C). Na presença destes genótipos, e se existir uma sobrecarga severa que não seja explicada por comorbilidades, pode ser considerada a realização de um teste genético de segunda-linha para outras formas raras de HC. (1,6)

A saturação da transferrina (TSAT) e a ferritina são os dois marcadores indicados para avaliar o perfil do metabolismo do ferro. (2,3,7) A TSAT é um marcador bioquímico considerado essencial para a suspeita de HC, o seu valor normal varia entre 20 e 45% e a sua elevação no contexto de HC reflete o aumento do ferro circulante devido à insuficiente produção de hepcidina. A ferritina é a proteína responsável pelo armazenamento do ferro intracelular, cuja concentração sérica varia entre 30 e 200 ou 300 µg/L em mulheres e homens, respetivamente, desde que não existam outros fatores de variação. Sendo também uma proteína de fase aguda pode estar aumentada em várias condições clínicas tais como distúrbios inflamatórios, citólise hepática e síndrome

metabólica. (1,2) O aumento da TSAT nos doentes com HC ocorre, tipicamente, vários anos antes do aumento da ferritina sérica. (1)

Ao longo das últimas décadas, apesar de se ter mantido a idade média do diagnóstico, as manifestações clínicas da HC parecem estar a tornar-se menos severas. Esta diminuição de severidade pode estar associada a mudanças de hábitos das populações nomeadamente a diminuição do consumo alcoólico bem como o aumento de peso, que parece ter aqui um efeito protetor. (8) No entanto, a existência de sobrecarga de ferro, mesmo que moderada, pode provocar lesão tecidual pela produção de espécies reativas de oxigénio que danificam as membranas celulares e organelos, provocando lesão celular (9), sendo, por isso, suspeita de estar envolvida como cofator em várias condições: resistência à insulina, diabetes, complicações cardiovasculares e neoplasias. (10)

A HC apresenta como sintomas precoces e inespecíficos a fraqueza, letargia, perda de peso e artralguas. Já os sinais de doença avançada, sugestivos, mas não específicos de HC incluem a pigmentação cutânea, cirrose hepática, condrocalcinose, artrite, diabetes, hipogonadismo, cardiomiopatia e hepatocarcinoma. (2,3) Um doente com HC tem um risco aproximadamente 200 vezes superior de desenvolver neoplasia hepática primária, em comparação com a população normal, sendo que os principais fatores de risco associados são: sexo masculino, idade superior a 50 anos, cirrose, alcoolismo crónico, ser fumador e ser portador de infeção por VHB (Vírus da Hepatite B) ou VHC. (10)

Atualmente, a presença de homozigotia para a variante C282Y associada a aumento da TSAT e hiperferritinemia é suficiente para o diagnóstico de HC. A realização de diagnóstico em estágio precoce tem como vantagens inequívocas a possibilidade de iniciar tratamento atempadamente prevenindo a ocorrência de lesões orgânicas e a manutenção de uma esperança média de vida normal. (1) As flebotomias são o tratamento de primeira-linha, por serem relativamente simples e de baixo custo, existindo escassas contra-indicações: doentes com anemia crónica dependente de transfusões ou hemodinamicamente instáveis. (2,6) Mesmo em doentes com sobrecarga de ferro ligeira a moderada foi observado um efeito benéfico na gestão precoce e sustentada da doença, sendo que se consideram as flebotomias um tratamento eficaz na redução da mortalidade e morbilidade associada à HC. (9) A cada flebotomia há remoção de ferro circulante e posterior libertação de ferro acumulado nos tecidos, sendo que a repetição das sessões leva à remoção do excesso de ferro corporal. (4) Nos raros casos em que há contra-indicação para flebotomia pode-se fazer tratamento com fármacos quelantes do ferro (como a deferoxamina), não sendo, no entanto, considerada terapêutica de primeira-linha pelos efeitos adversos associados (nomeadamente

ototoxicidade e alterações visuais). (2,11) Uma outra opção terapêutica, realizada principalmente em doentes com sobrecarga de ferro severa, é a eritrocitofereze. Esta é considerada um tratamento mais eficiente do que as flebotomias (por ser um método mais rápido para remoção do excesso de ferro), no entanto, é menos utilizada pela necessidade de equipamento especializado. (12,13) A remoção de ferro pode reverter não só o estado de fibrose hepática, disfunção cardíaca e hiperpigmentação, mas também melhorar o estado de fadiga crônica, no entanto, a artropatia e a disfunção endócrina não parecem melhorar de forma consistente com a terapêutica. (2) Se o estado de cirrose hepática já tiver sido atingido, também não parece haver reversibilidade com as flebotomias. (10)

Atualmente, utiliza-se não só a biópsia hepática, mas também a elastografia hepática (*Fibroscan*[®]), como meios complementares de diagnóstico capazes de avaliar o estado de fibrose ou cirrose existente. A utilização da RM (Ressonância Magnética) também tem vindo a ser cada vez mais utilizada, em substituição da biópsia hepática, como forma de avaliar a concentração de ferro hepática. (1)

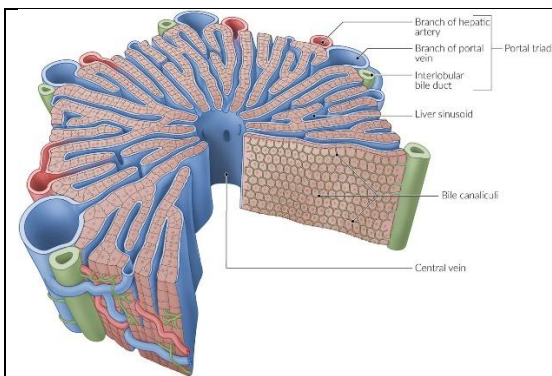


Figura 1 - Microestrutura hepática: lóbulo hepático (11)

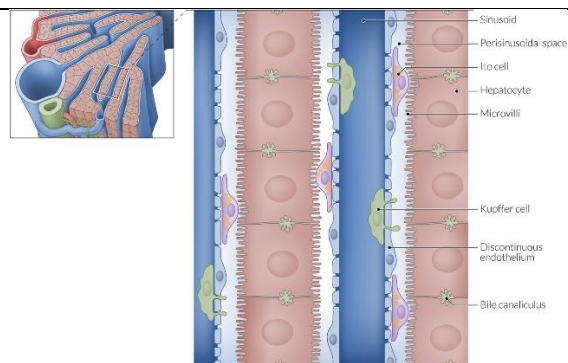


Figura 2 - Microestrutura hepática: sinusoides, espaço perisinusoidal e hepatócitos (11)

Nos estádios iniciais de HC a deposição hepática de ferro atinge preferencialmente as células do parênquima: hepatócitos e células do ducto biliar. Essa sobrecarga de ferro ocorre principalmente no polo biliar dos hepatócitos, distribuídos de forma decrescente da região periportal para as áreas centrolobulares. À medida que a sobrecarga hepatocelular de ferro aumenta, ocorre sideronecrose, que leva à necrose hepatocitária e à redistribuição do ferro pelas células não-parenquimatosas (mesenquimatosas). Essas células incluem as células endoteliais da veia porta, da veia central ou sinusoides, macrófagos, Kupffer e células de gordura dos sinusoides. A avaliação histológica da deposição hepática de ferro na HC é diferente da histologia das síndromes inflamatórias, da doença hepática alcoólica e da cirrose hepática. A sobrecarga de ferro nas síndromes

inflamatórias é geralmente mesenquimal (nas células de Kupffer), com os depósitos de ferro dispersos. Na doença hepática alcoólica a siderose é mesenquimal ou mista. Já na cirrose há distribuição heterogênea no parênquima, no entanto é a ausência de ferro no septo fibroso, nas células biliares e nas paredes vasculares que classifica como sobrecarga de ferro secundária a fibrose em vez de HC. (10) Algumas particularidades parecem ajudar a explicar as diferenças entre o padrão histológico do ferro: variação do Índice de Massa Corporal, etnia, variantes do gene *HFE* e os métodos utilizados para caracterizar os padrões histológicos. (10,14) Atualmente, a biópsia hepática continua a ter utilidade para o estabelecimento do prognóstico em doentes com ferritina superior a 1000 µg/L de forma sustentada, permitindo identificar fibrose avançada ou cirrose subclínica. (1)

A elastografia hepática (*Fibroscan*[®]) é um método não-invasivo fiável para a deteção de fibrose hepática em doentes com HC, limitando assim a necessidade da realização de biópsias. (1)

A RM identifica distribuição heterógena de ferro no fígado e é pelo estudo comparativo com outros órgãos que também distingue sobrecarga de ferro no parênquima ou no mesênquima. Por esta razão, por ser um método não invasivo e pela sua disponibilidade crescente, substitui hoje a biópsia hepática para a identificação e quantificação da sobrecarga de ferro. (1,10) No entanto, a avaliação da concentração de ferro hepático por métodos de imagem é obtida indiretamente e há vários protocolos possíveis, não havendo ainda um consenso sobre o melhor. (1)

Objetivos do estudo

A realização deste trabalho foi motivada pela constatação de que existe, entre os geneticistas, uma perceção generalizada de que a referência para a realização do teste genético *HFE* é muitas vezes incorreta ou não justificada (15), e da necessidade de avaliar, objetivamente, quais os motivos pelos quais os clínicos justificam os seus pedidos, enquadrando os motivos de referência nas recomendações mais atuais. Estabelecemos como objetivo geral do estudo uma revisão dos pedidos de teste genético *HFE* solicitados ao laboratório do CGPP-IBMC desde 2010 até 2021, quer para diagnóstico por suspeita clínica, quer para rastreio familiar, com análise dos seus resultados em termos de eficácia de deteção de casos de HC. Neste contexto, são objetivos específicos do estudo:

- Perceber se existem diferenças na eficácia de detecção de homozigóticos C282Y de acordo com os seguintes fatores: tipo de pedido, motivo de referência, origem do pedido e especialidade do médico que realiza o pedido.
- Perceber se a eficácia de detecção de homozigóticos C282Y tem variado ao longo dos anos.
- Perceber se a idade de referência tem variado ao longo dos anos e se existe diferença na idade de referência entre homozigóticos C282Y e não homozigóticos.

Materiais e Métodos

Descrição do estudo

O presente trabalho de investigação é um estudo retrospectivo observacional. Os dados foram recolhidos em momento único, não havendo seguimento dos casos.

Participantes no estudo

O estudo inclui os indivíduos de todas as idades a quem foi pedido o teste genético *HFE* para o diagnóstico molecular de HC solicitado ao GCPP-IBMC entre janeiro de 2010 e março de 2021. Foram excluídos os pedidos cujo resultado da pesquisa do gene *HFE* não estivesse completo. Após a aplicação dos critérios de inclusão e exclusão foram obtidos 1882 casos, constituindo assim a amostra do presente estudo. Os testes genéticos que deram origem aos dados a analisar foram objeto de consentimento informado no passado, havendo um registo escrito no caso dos testes preditivos.

Recolha de dados

Antes de ser iniciada a recolha dos dados, o projeto deste trabalho de investigação foi aprovado pela Comissão de Ética e Conduta Responsável na Investigação do Instituto de Investigação e Inovação em Saúde (CECRI-i3S). (Anexo I)

Para a identificação dos casos foi feita uma análise na base de dados do GCPP, identificando-se os casos elegíveis para a obtenção da amostra. A cada participante estava atribuído um número sequencial de entrada no laboratório (UNI) que foi aleatoriamente recodificado de 1 a 1882 de forma a garantir a confidencialidade dos dados e a privacidade dos participantes.

Variáveis em estudo

As variáveis consideradas no estudo foram: sexo, idade, ano do pedido de teste genético, especialidade do médico requisitante, origem do pedido, tipo de pedido (diagnóstico clínico ou rastreio), motivo de referência disponibilizado, resultado da variante C282Y e resultado da variante H63D.

A especialidade do médico assistente inclui: Cardiologia, Cirurgia Geral, Dermatovenereologia, Infeciologia, Endocrinologia, Gastroenterologia, Genética Médica, Ginecologia-obstetrícia, Hematologia Clínica, Imunohemoterapia, Medicina Interna, Medicina Geral e Familiar (MGF), Nefrologia, Neurologia, Oncologia, Patologia Clínica, Pediatria e Reumatologia. Para a análise dos dados as especialidades de Cardiologia, Cirurgia, Dermatovenereologia, Endocrinologia, Genética Médica, Ginecologia-obstetrícia, Infeciologia, Nefrologia, Neurologia, Oncologia, Patologia Clínica, Pediatria e Reumatologia foram agrupadas numa categoria única, tendo em conta o número reduzido de pedidos de cada uma das especialidades. Hematologia Clínica e Imunohemoterapia também foram agrupadas numa só categoria.

A origem do pedido de teste genético foi dividida em três categorias: consulta de referência de HC do Hospital de Santo António (HSA), centros de saúde e pedidos provenientes de meio hospitalar (não incluindo a consulta de referência de HC do HSA).

O tipo de pedido de teste genético foi dividido em diagnóstico por suspeita clínica e em diagnóstico familiar ou estado de portador.

A informação clínica disponibilizada foi agrupada em várias categorias com base no motivo da referência: hiperferritinemia, elevação da TSAT, evidência de sobrecarga de ferro em RM ou biópsia hepática, sobrecarga de ferro no contexto de comorbilidade não-hematológica ou hematológica e rastreios (familiares ou populacionais). Quer a hiperferritinemia, quer a elevação da TSAT podem ter sido referenciadas juntamente com uma comorbilidade, sendo as comorbilidades descritas: consumo alcoólico, infeção por vírus (VHC, VHB, Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH)), cirrose e hepatocarcinoma ou “outra”, sendo que esta inclui síndrome metabólica, alteração inespecífica das enzimas de citólise hepática, doença hepática crónica e inflamação. Quando descrita uma comorbilidade sem que tenham sido apresentados parâmetros do ferro supõe-se, por intuição, haver alguma alteração que levantasse suspeita de HC, sendo, por isso, agrupado na categoria “Sobrecarga de ferro por comorbilidade”. A categoria “Sem informação clínica” foi utilizada na ausência de qualquer informação clínica.

Tratamento estatístico dos dados

Para tratamento estatístico dos dados foi utilizado o *software* SPSS® (*Statistic Package for Social Science*), versão 27.0 para *Windows* e foi considerada uma significância estatística de 5%.

No que respeita à caracterização da amostra, efetuou-se, em primeiro lugar, uma análise descritiva que consistiu no cálculo da média, desvio-padrão, valor mínimo e máximo para as variáveis quantitativas e da frequência absoluta e relativa (%) para as variáveis qualitativas.

De seguida, recorreu-se a alguns métodos de inferência estatística, particularmente para averiguar a existência de relação entre duas variáveis nominais, foi utilizado o teste do Qui-Quadrado de Pearson uma vez que os seus pressupostos se verificaram (menos de 20% das células da tabela de contingência apresentaram frequência esperada inferior a 5 e nenhuma célula apresentou frequência esperada inferior a 1). Foi ainda utilizado o coeficiente de associação V de *Cramer*, por forma a quantificar o grau de associação entre as variáveis.(16) A classificação da associação foi estabelecida de acordo com o seguinte critério:

$V \leq 0,1$ – Associação fraca;

$0,1 < V \leq 0,3$ – Associação moderada;

$V > 0,3$ – Associação forte. (17)

Para verificar a existência de diferenças significativas das idades dos participantes entre dois grupos independentes, recorreu-se ao teste de Mann-Whitney, uma vez que não se verificaram os pressupostos para a utilização do teste t para amostras independentes (normalidade dos dados). Quando se pretendeu comparar as idades dos participantes entre mais do que dois grupos, recorreu-se ao teste de *Kruskal-Wallis*, uma vez que não se verificou o pressuposto da normalidade por forma a se poder utilizar a ANOVA. As comparações múltiplas das médias das ordens foram realizadas através do teste de Scheffé. A normalidade dos dados foi verificada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov (KS) ($n > 30$) (Apêndice 2, 3, 4).

Resultados

Caraterização da amostra

As tabelas seguintes (Tabelas 1-7) descrevem a distribuição dos resultados obtidos para o sexo dos participantes, idade, especialidade do médico requisitante, origem do pedido, tipo de referência, motivo de referência e resultados para as variantes C282Y e H63D do gene *HFE*. A Figura 3 apresenta a idade dos participantes agrupada por classes e a Figura 4 apresenta a distribuição dos pedidos de teste genético ao longo dos anos.

Tabela 1 – Distribuição dos pedidos de teste genético por sexo.

	n	%
Feminino	506	26,9
Masculino	1376	73,1
Total	1882	100,0

Tabela 2 – Análise descritiva da idade dos participantes à data do pedido de teste genético.

	n	Mínimo	Máximo	Média ± Desvio-padrão
Idade	1882	11	100	57,48 ± 14,57

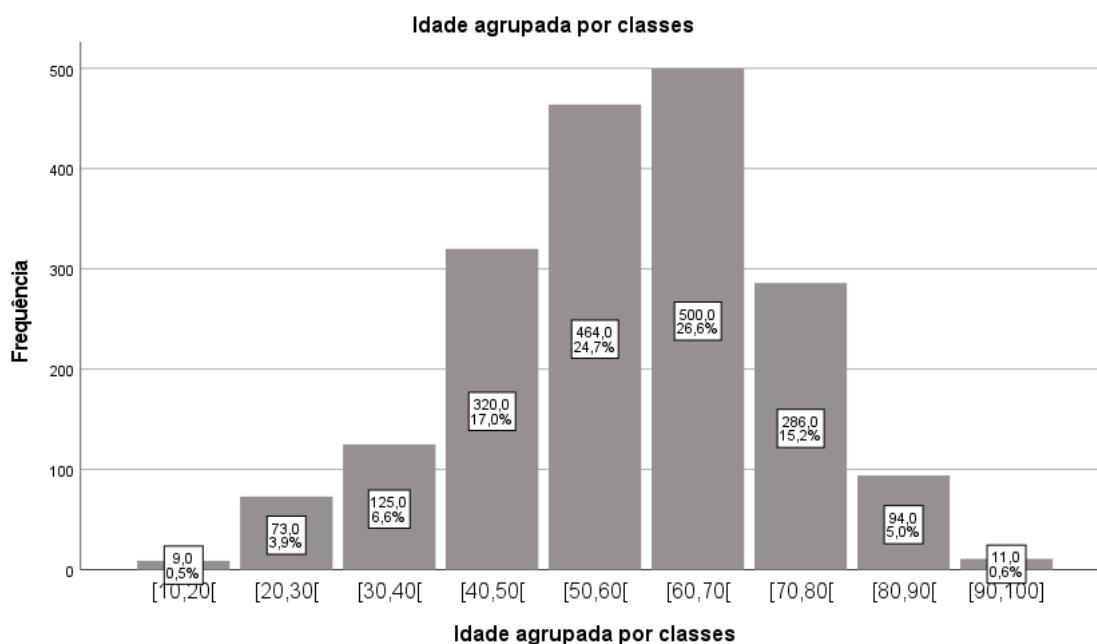


Figura 3 – Idade dos participantes à data do pedido de teste genético agrupada por classes.

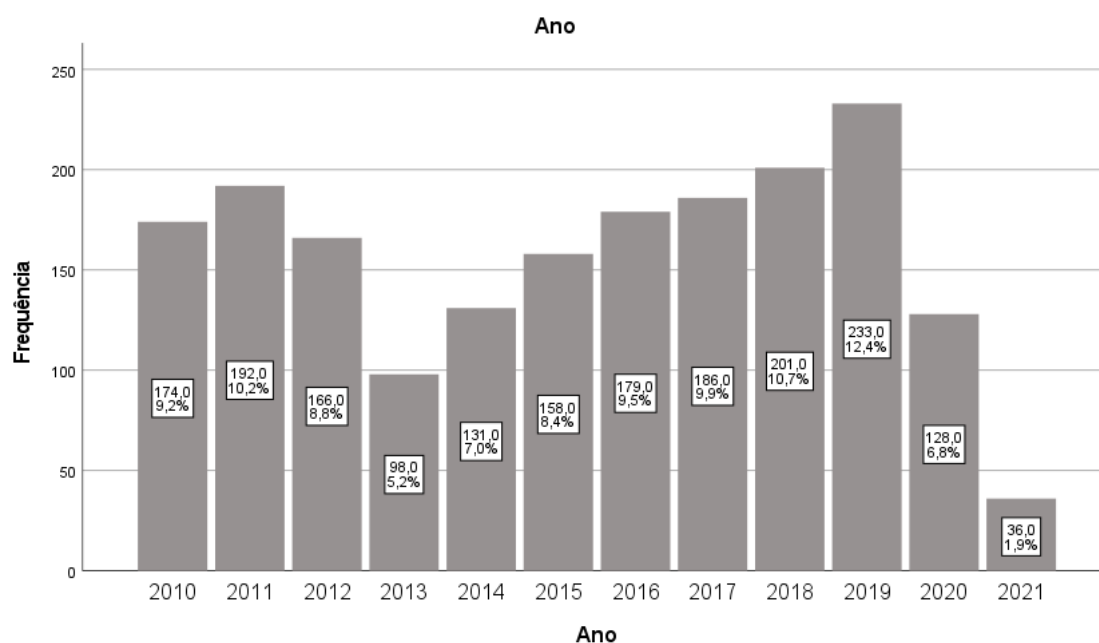


Figura 4 – Distribuição dos pedidos de teste genético ao longo dos anos.

A distribuição dos pedidos de teste genético por ano, observada na Figura 4 apresenta dois anos com um número de pedidos consideravelmente inferior aos restantes: 2013 e 2020. Em 2013 esta descida é explicada pela mudança do IBMC para o i3S, em 2020 deve-se ao início da pandemia por SARS-CoV2. O número reduzido no ano 2021 não reflete o movimento anual, apenas até março, no entanto foi decidido incluí-lo não só para a apreciação global, mas também para contribuir para a evolução temporal.

Tabela 3 – Distribuição dos pedidos de teste genético por especialidade do médico requisitante.

	n	%
Gastroenterologia	492	26,5
Hematologia clínica e Imunohemoterapia	358	19,2
Medicina Interna	757	40,7
Medicina Geral e Familiar	110	5,9
Outra (Cardiologia, Cirurgia Geral, Dermatovenereologia, Endocrinologia, Genética Médica, Ginecologia-obstetrícia, Infeciologia, Nefrologia, Neurologia, Oncologia, Patologia Clínica, Pediatria, Reumatologia)	143	7,7
Total	1860	100,0

Tabela 4 – Distribuição dos pedidos de teste genético por origem de referência.

	n	%
Centros de Saúde	110	5,9
Consulta de HC do HSA	242	12,9
Hospitais	1528	81,3
Total	1880	100,0

Tabela 5 – Distribuição dos pedidos de teste genético por tipo de referência.

	n	%
Diagnóstico por suspeita clínica	1597	84,9
Rastreo familiar ou portador	285	15,1
Total	1882	100,0

Tabela 6 – Distribuição dos pedidos de teste genético por motivo de referência.

	n	%
Sem informação clínica	174	9,2
Hiperferritinemia isolada	287	15,2
Hiperferritinemia e comorbilidade	361	19,2
Elevação da TSAT (apenas ou com hiperferritinemia)	207	11,0
Elevação da TSAT e comorbilidade	398	21,1
Evidência de sobrecarga de ferro em RM ou biópsia hepática	55	2,9
Sobrecarga de ferro por comorbilidade	115	6,1
Rastreios familiares ou estado de portador	285	15,1
Total	1882	100,0

Para apresentação mais detalhada dos motivos de referência consultar o Apêndice 1.

Tabela 7 - Distribuição dos resultados do pedido de teste genético *HFE* para as variantes C282Y e H63D.

	n	%	
Resultados para as variantes C282Y e H63D	C282Y/C282Y	90	4,8
	C282Y/ <i>wt</i>	259	13,8
	C282Y/H63D	110	5,8
	H63D/ <i>wt</i>	508	27,0
	H63D/H63D	123	6,5
	<i>wt/wt</i>	792	42,1
Total	1882	100,0	

wt - wildtype: forma nativa, não mutada.

Relações entre as variáveis em estudo

1. Existe diferença na eficácia de deteção de homozigóticos C282Y consoante o pedido seja feito para diagnóstico clínico ou para rastreio familiar?

Tabela 8 - Relação entre o tipo de referência e os resultados para a variante C282Y.

		Resultados para a variante C282Y			<i>p-value</i> ^{#1}	V de Cramer	
		Negativos	Heterozigóticos	Homozigóticos			
Tipo de Referência	Diagnóstico clínico	n	1325	210	62	<0,001	0,411
		%	83,0%	13,1%	3,9%		
	Rastreio familiar / estado de portador	n	98	159	28		
		%	34,4%	55,8%	9,8%		
Total	n	1423	369	90			
	%	75,6%	19,6%	4,8%			

#1 - Teste do Qui-quadrado

Analisando a Tabela 8 concluímos que existe uma relação estatisticamente significativa entre o tipo de referência e o resultado para a variante C282Y (*p-value*<0,001). O grau de associação entre as variáveis é forte (V=0,411). Pela análise da tabela, concluímos ainda que a percentagem de deteção de homozigóticos C282Y é de 9,8% na categoria de rastreios e de apenas 3,9% na categoria de diagnóstico clínico.

2. Existe diferença na eficácia de deteção de homozigóticos C282Y com os diferentes motivos de referência?

Tabela 9 - Relação entre os motivos de referência e os resultados para a variante C282Y.

		Resultados para a variante C282Y		<i>p-value</i> ^{#1}	V de Cramer
		Não homozigóticos	Homozigóticos		
Motivo de referência	Referenciado sem informação clínica	n	163	<0,001	0,182
		%	93,7%		
	Hiperferritinemia isolada	n	279		
		%	97,2%		
	Hiperferritinemia e comorbilidade	n	355		
		%	98,3%		
	Elevação da TSAT (apenas ou com hiperferritinemia)	n	182		
		%	87,9%		
	Elevação da TSAT e comorbilidade	n	389		
		%	97,7%		
	Evidência de sobrecarga de ferro em RM ou biópsia hepática	n	52		
		%	94,5%		
	Sobrecarga de ferro por comorbilidade	n	115		
		%	100,0%		
Rastreio familiar ou estado de portador	n	257			
	%	90,2%			
Total	n	1792			
	%	95,2%			

#1 - Teste do Qui-Quadrado

Pela análise da Tabela 9 concluímos que existe uma relação estatisticamente significativa entre os motivos de referência e os resultados para a variante C282Y (*p-value*<0,001). O grau de associação entre as variáveis é moderado (V=0,186). Analisando os motivos de referência, destaca-se que existe uma maior percentagem de deteção de homozigóticos C282Y quando referenciados com elevação da TSAT e sem comorbilidade (12,1%), enquanto nos pedidos inseridos na categoria “Sobrecarga de ferro por comorbilidade” não foram detetados casos positivos (0,0%). Nos doentes referenciados com hiperferritinemia e comorbilidade ou elevação da TSAT e

comorbilidade obtiveram-se percentagens de homozigotia C282Y de 1,7% e 2,3%, respetivamente, percentagens essas inferiores à percentagem de deteção de casos positivos na totalidade da amostra (4,8%).

3. Existe diferença na eficácia de deteção de homozigóticos C282Y com a origem do pedido de teste genético (hospitais, centros de saúde ou consulta de referência de HC do HSA)?

Tabela 10 - Relação entre a origem do pedido de teste genético e os resultados para a variante C282Y.

		Resultados para a variante C282Y		<i>p-value</i> ^{#1}	V de Cramer
		Não homozigóticos	Homozigóticos		
Origem do pedido de teste genético	Hospitais	n	1484	<0,001	0,220
		%	97,1		
	Centros de saúde	n	105		
		%	95,5		
	Consulta de Hemocromatose do HSA	n	201		
		%	83,1		
Total	n	1790			
	%	95,2			

#1 - Teste do Qui-Quadrado

Observando a Tabela 10 concluímos que existe uma relação estatisticamente significativa entre a origem do pedido de teste genético e o resultado para a variante C282Y (*p-value*<0,001). O grau de associação entre as variáveis considera-se como moderado (V=0,220). A percentagem de homozigóticos C282Y da consulta de HC do HSA é de 16,9%, dos centros de saúde é de 4,5% e do meio hospitalar é de apenas 2,9%.

4. Existe diferença na eficácia de detecção de homozigóticos C282Y entre as diferentes especialidades dos médicos que realizam os pedidos?

Tabela 11 - Relação entre a especialidade do médico que realiza o pedido e os resultados para a variante C282Y.

		Resultados para a variante C282Y		<i>p-value</i> ^{#1}	V de Cramer	
		Não homozigóticos	Homozigóticos			
Especialidades médicas	Gastroenterologia	n	476	<0,001	0,173	
		%	96,7%			3,3%
	Hematologia clínica e Imunohemoterapia	n	314			44
		%	87,7%			12,3%
	Medicina Interna	n	739			18
		%	97,6%			2,4%
	MGF	n	105			5
		%	95,5%			4,5%
	Outra	n	136			7
		%	95,1%			4,9%

#1 - Teste do Qui-quadrado

Observando a Tabela 11 concluímos que existe uma relação estatisticamente significativa entre a especialidade médica que realiza o pedido e os resultados para a variante C282Y (*p-value*<0,001). O grau de associação entre as variáveis considera-se moderado (V=0,173). As especialidades de Hematologia Clínica e Imunohemoterapia têm a maior percentagem de detecção de homozigóticos C282Y, com 12,3%, e a Medicina Interna é a especialidade com menor percentagem de detecção, com 2,4%.

5. A percentagem de pedidos com referência a elevação da TSAT tem aumentado ao longo dos anos?

Tabela 12 - Relação entre o motivo de referência ser realizado com ou sem elevação da TSAT e os diferentes períodos.

	Motivo de referência		Total	<i>p-value</i> ^{#1}	V de Cramer
	Referenciado sem elevação da TSAT	Referenciado com elevação da TSAT			
2010-2011-2012	n	356	176	0,249	0,047
	%	66,9%	33,1%		
2013-2014-2015	n	256	131		
	%	66,1%	33,9%		
2016-2017-2018	n	379	187		
	%	67,0%	33,0%		
2019-2020-2021	n	286	111		
	%	72,0%	28,0%		
			532		
			100,0%		
			387		
			100,0%		
			566		
			100,0%		
			397		
			100,0%		

#1 - Teste do Qui-quadrado

Como $p\text{-value} > 0,05$ não é possível concluir que o motivo de referência, seja este descrito com ou sem elevação do valor de TSAT, esteja relacionado significativamente com a evolução temporal, não havendo, portanto, um aumento dos pedidos de referência com elevação da TSAT.

6. A eficácia da deteção de homozigóticos C282Y tem vindo a aumentar ao longo dos anos?

Tabela 13 - Relação entre os vários períodos e os resultados para a variante C282Y.

		Resultados para a variante C282Y			Total	<i>p-value</i> ^{#1}	V de Cramer
		Negativos	Heterozigóticos	Homozigóticos			
2010-2011-2012	n	370	141	21	532	<0,001	Não foi possível calcular
	%	69,5%	26,5%	3,9%	100,0%		
2013-2014-2015	n	296	66	25	387		
	%	76,5%	17,1%	6,5%	100,0%		
2016-2017-2018	n	440	106	20	566		
	%	77,7%	18,7%	3,5%	100,0%		
2019-2020-2021	n	317	56	24	397		
	%	79,8%	14,1%	6,0%	100,0%		

#1 - Teste do Qui-Quadrado

Pela Tabela 13 percebemos que existe uma relação estatisticamente significativa entre os vários períodos e os resultados obtidos para a variante C282Y ($p\text{-value} < 0,001$). Verifica-se que nos anos em que o número total de pedidos foi inferior (387 de 2013 a 2015 e 397 de 2019 a 2021) a percentagem de deteção de casos positivos foi superior (6,5% e 6,0%, respetivamente), enquanto nos anos em que o número total de pedidos foi superior (532 de 2010 a 2012 e 566 de 2016 a 2018) a percentagem de deteção de casos positivos foi inferior (3,9% e 3,5%, respetivamente). Também se verifica que a eficácia de deteção de homozigóticos C282Y não tem vindo a aumentar de forma consistente ao longo dos anos e que a existência de mais pedidos não se traduz necessariamente numa maior percentagem de deteção de homozigóticos C282Y.

A Figura 5 apresenta o número de pedidos de teste genético *HFE* em cada período indicado e a Figura 6 mostra as percentagens dos resultados obtidos para a variante C282Y nos mesmos períodos.

O diagnóstico molecular de Hemocromatose ligada ao *HFE*: uma análise das práticas de referência clínica ao longo dos últimos 11 anos

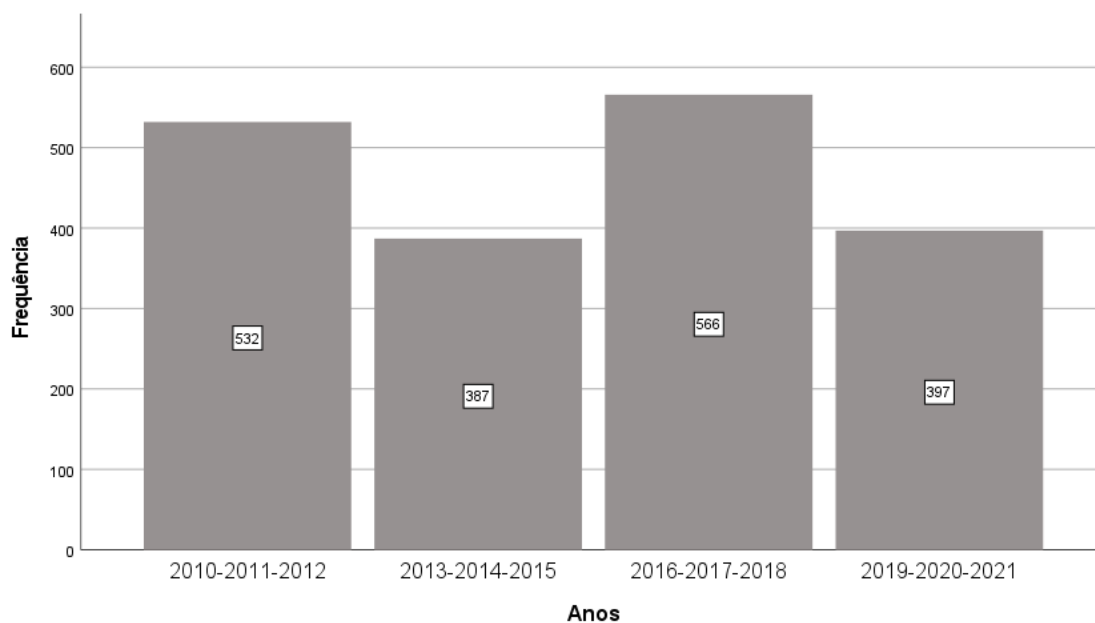
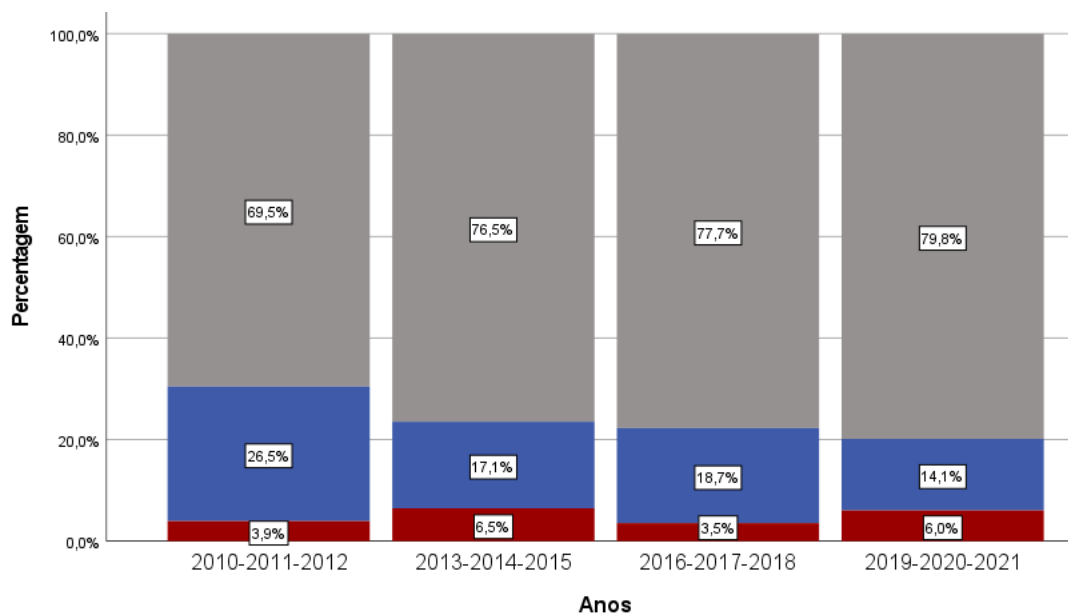


Figura 5 – Número de pedidos de teste genético *HFE* por períodos.



Legenda de cores para os resultados da variante C282Y: ■ Negativos ■ Heterozigóticos ■ Homozigóticos

Figura 6 – Resultados, em porcentagem, da variante C282Y em cada um dos períodos indicados.

7. Qual a idade média de detecção de homozigóticos C282Y? Existe diferença de idade para os casos não confirmados?

Tabela 14 - Relação entre a idade dos participantes e os resultados para a variante C282Y.

Resultado para a variante C282Y	Idade	<i>p-value</i> ^{#2}
	Média ± Desvio-Padrão	
Não homozigóticos	57,61 ± 14,54	0,081
Homozigóticos	54,94 ± 14,95	

#2 – Teste de Mann-Whitney

Observando a Tabela 14 conclui-se que a idade dos participantes aquando do pedido de teste genético *HFE* não é significativamente diferente entre os resultados obtidos para a variante C282Y ($p\text{-value} > 0,05$). Assim, os homozigóticos e os não homozigóticos não apresentam diferenças significativas em relação à idade aquando do pedido de teste genético.

8. Como tem variado a idade de apresentação dos pedidos de teste genético ao longo dos anos?

Tabela 15 – Relação entre a idade dos participantes e os vários períodos.

	Idade	<i>p-value</i> ^{#3}
	Média ± Desvio-Padrão	
2010-2011-2012	57,59 ± 15,69	0,434
2013-2014-2015	58,53 ± 13,95	
2016-2017-2018	57,21 ± 14,16	
2019-2020-2021	56,69 ± 14,17	

#3 – Teste de Kruskal-Wallis

Dado que $p\text{-value} > 0,05$ concluímos que para os diferentes períodos não há uma diferença significativa relativamente às idades dos participantes aquando da apresentação dos pedidos de teste genético.

9. Existe diferença na idade dos participantes com a origem do pedido de teste genético (hospitais, centros de saúde ou consulta de referência de HC do HSA)?

Tabela 16 - Relação entre a idade dos participantes e a origem do pedido de teste genético.

Origem do pedido de teste genético	Idade	<i>p-value</i> ^{#3}
	Média ± Desvio-Padrão	
Hospitais	59,01 ± 13,68	<0,001
Centros de saúde	50,90 ± 16,75	
Consulta de Hemocromatose do HSA	50,82 ± 16,23	

#3 – Teste de Kruskal-Wallis

Dado que *p-value*<0,001 concluímos que existe pelo menos um grupo que apresenta uma idade diferente dos restantes.

Tabela 17 - Comparações múltiplas da média das ordens.

Origem do pedido de teste genético		<i>p-value</i> ^{#4}
Hospitais	Centros de saúde	<0,001
Centros de saúde	Consulta de HC do HSA	1,000
Consulta de HC do HSA	Hospitais	<0,001

#4 - Testes de comparações múltiplas de Scheffé da média das ordens

De acordo com a Tabela 17 das comparações múltiplas das médias das ordens, a idade dos participantes à data dos pedidos de referência provenientes das consultas de HC do HSA e dos centros de saúde é significativamente diferente da idade dos participantes aquando dos pedidos oriundos dos hospitais (*p-value*<0,05). Entre os participantes dos pedidos dos centros de saúde e da consulta de HC do HSA não há diferença significativa relativamente à idade (*p-value*>0,05). Concluímos ainda que a idade dos participantes aquando dos pedidos de teste genético da consulta de HC do HSA e dos centros de saúde é significativamente inferior (~51 anos) à idade dos participantes dos pedidos hospitalares (~59 anos).

10. Existe diferença entre o tipo de referência com a origem do pedido de teste genético (hospitais, centros de saúde ou consulta de referência de HC do HSA)?

Tabela 18 – Relação entre o tipo de referência e a origem do pedido.

		Tipo de Referência		<i>p-value</i> ^{#1}	V de Cramer	
		Diagnóstico clínico	Rastreio familiar ou estado de portador			
Origem do pedido de teste genético	Hospitais	n	1460	68	<0,001	0,638
		%	95,5%	4,5%		
	Centros de Saúde	n	22	88		
		%	20,0%	80,0%		
	Consulta de HC do HSA	n	114	128		
		%	47,1%	52,9%		
Total	n	1596	284			
	%	84,9%	15,1%			

#1 - Teste do Qui-quadrado

Analisando a Tabela 18 conclui-se que existe uma relação significativa entre o tipo de referência e a origem do pedido de teste genético ($p\text{-value} < 0,001$). O grau de associação entre as variáveis considera-se como forte ($V = 0,638$). Dos pedidos efetuados pelos hospitais, 95,5% foram feitos para diagnóstico clínico. A maioria dos pedidos efetuados pelos centros de saúde foram para rastreio familiar (80%). Na consulta de HC do HSA aproximadamente metade dos pedidos foram realizados para diagnóstico clínico e metade para rastreio familiar (47,1% e 52,9%, respetivamente).

11. Existe diferença nos motivos de referência dos pedidos de teste genético entre os sexos?

Tabela 19 - Relação entre os motivos de referência e o sexo.

		Sexo		<i>p-value</i> ^{#1}	V de Cramer	
		Feminino	Masculino			
Motivo de referência	Referenciado sem informação clínica	n	45	129	<0,001	0,233
		%	25,9%	74,1%		
	Hiperferritinemia isolada	n	58	229		
		%	20,2%	79,8%		
	Hiperferritinemia e comorbilidade	n	71	290		
		%	19,7%	80,3%		
	Elevação da TSAT (apenas ou com hiperferritinemia)	n	57	150		
		%	27,5%	72,5%		
	Elevação da TSAT e comorbilidade	n	87	311		
		%	21,9%	78,1%		
	Evidência de sobrecarga de ferro em RM ou biópsia hepática	n	8	47		
		%	14,5%	85,5%		
	Sobrecarga de ferro por comorbilidade	n	39	76		
		%	33,9%	66,1%		
	Rastreo familiar ou estado de portador	n	141	144		
		%	49,5%	50,5%		
	Total	n	506	1376		
		%	26,9%	73,1%		

#1 - Teste do Qui-quadrado

Pela análise da Tabela 19 conclui-se que existe uma relação estatisticamente significativa entre o sexo do participante e o motivo de referência ($p\text{-value} < 0,001$). O grau de associação entre as variáveis considera-se como moderado ($V=0,233$). Apenas na categoria “Rastreo familiar ou estado de portador” temos percentagens de pedidos para teste genético *HFE* semelhante em ambos os sexos (49,5% para mulheres e 50,5% para homens). Em todos os restantes motivos de referência essa percentagem é superior no sexo masculino (varia entre 66,1%-85,5%).

12. Existe diferença entre os resultados obtidos para as variantes C282Y e H63D e a frequência observada na população normal?

Tabela 20 - Resultados para as variantes C282Y e H63D com base nos dados em análise (CGPP-IBMC) e na frequência observada na população normal por Cardoso *et al.* (18).

		Dados CGPP-IBMC	Dados do artigo de Cardoso <i>et al.</i> (18)	<i>p-value</i> #1*	V de Cramer*	<i>p-value</i> #1**	V de Cramer**
C282Y/C282Y	n	90	2	<0,001	0,104	<0,001	0,231
	%	4,8%	0,3%				
C282Y/ <i>wt</i>	n	259	27	<0,001	0,131		
	%	13,8%	4,2%				
C282Y/H63D	n	110	12	<0,001	0,081		
	%	5,8%	1,9%				
H63D/ <i>wt</i>	n	508	153	0,131	0,031		
	%	27,0%	23,9%				
H63D/H63D	n	123	32	0,182	0,028		
	%	6,5%	5,0%				
<i>wt/wt</i>	n	792	414				
	%	42,1%	64,7%				
Total	n	1882	640				
	%	100,0%	100,0%				

#1* – Teste do Qui-Quadrado para analisar a relação entre: existência ou não de homozigotia C282Y nos dados analisados e no artigo (18); existência ou não de heterozigotia C282Y nos dados analisados e no artigo (18); existência ou não de heterozigotia composta C282Y/H63D nos dados analisados e no artigo (18); existência ou não de heterozigotia H63D nos dados analisados e no artigo (18); existência ou não de homozigotia H63D nos dados analisados e no artigo (18)).

#1** – Teste do Qui-Quadrado para analisar a relação entre o resultado genotípico e os dois estudos (dados CGPP-IBMC e artigo (18)).

De acordo com a Tabela 20 existe uma relação significativa entre o resultado genotípico *HFE* e os dois estudos (dados analisados e a frequência observada na população normal (18)) (*p-value*<0,001). O grau de associação entre as variáveis é moderado (V=0,231).

Existe uma relação significativa entre a existência ou não de homozigotia C282Y e os resultados nos dois estudos (*p-value*<0,001), sendo que os resultados mostram que a percentagem de detecção de homozigóticos C282Y nos dados em análise (4,8%) é superior à percentagem observada na população normal (0,3%). Este acontecimento é explicado

pelo facto de a população-alvo dos pedidos de teste genético dos dados em análise ter suspeita clínica ou familiar de HC.

Em relação à presença ou ausência de heterozigotia composta C282Y/H63D nos dados em análise e em Cardoso *et. al* (18) verificou-se uma relação estatisticamente significativa ($p\text{-value}<0,001$), sendo que a percentagem de heterozigóticos compostos C282Y/H63D foi de 5,8% no presente estudo e de apenas 1,9% na população portuguesa.

Não existe relação significativa entre a existência ou não de heterozigotia H63D e os resultados nos dois estudos ($p\text{-value}=0,131$).

Também não existe relação significativa entre a existência ou não de homozigotia H63D e os resultados nos dois estudos ($p\text{-value}=0,182$).

Discussão e conclusão

Motivos de referência para genotipagem *HFE*

De acordo com as mais recentes recomendações, Girelli *et al.* (1) definem os seguintes critérios clínicos para suspeita de HC: TSAT superior a 45%, ferritina superior a 200µg/L em mulheres e a 300µg/L em homens, ausência de fatores de risco para déficit de hepcidina (abuso de álcool, doença hepática em estágio terminal), ausência de sobrecarga de ferro iatrogénica (transfusões regulares) e ausência de doenças hematológicas. As doenças hematológicas, como os distúrbios primários eritrocitários (anemia, reticulocitose) e as síndromes mielodisplásicas, podem apresentar parâmetros de ferro com valores compatíveis com sobrecarga, com aumento da TSAT, mas não devem ser consideradas como HC, dada a diferente patogénese e tratamento. De acordo com as boas práticas clínicas e com vista a uma maior eficiência e eficácia, os critérios supracitados deveriam revelar-se sobreponíveis aos motivos de referência apresentados pelos clínicos como justificação para a realização do teste genético.

Pela análise da Tabela 9, percebemos que a percentagem de deteção de homozigóticos C282Y em pedidos efetuados sem apresentação da informação clínica é de 6,3%, valor este que não é inferior à percentagem global de deteção de casos positivos do presente estudo, que é de 4,8%. Este resultado sugere que, nesta circunstância, os clínicos referenciam por motivos sobreponíveis aos restantes pedidos, sem, no entanto, os apresentarem. Porto *et al.* (3) descrevem que não foram encontradas diferenças significativas a nível da deteção de homozigóticos C282Y entre laboratórios que estabeleceram pré-requisitos na referência e aqueles que não estabeleceram, sugerindo que a prática de usar pré-requisitos não aumenta necessariamente a eficiência.

No presente estudo observa-se que a percentagem de deteção de homozigóticos C282Y nos pedidos onde é referida apenas hiperferritinemia é de 2,8% e nos pedidos nos quais a hiperferritinemia se associa a alguma comorbilidade é de apenas 1,7% (Tabela 9). Estes valores realçam que as hiperferritinemias isoladas devem levar os clínicos a procurar causas secundárias de aumento da ferritina, como síndrome metabólica, doenças inflamatórias, citólise hepática (seja por doença hepática aguda ou crónica) ou esteatose hepática. (1,3) As causas mais comuns de hiperferritinemia estão relacionadas com síndrome metabólica ou inflamatória, alcoolismo e doença hepática, e não com a HC. (2,9) Assim, uma hiperferritinemia sem aumento da TSAT não deve ser um critério para a realização de teste genético *HFE*. (3) Por outro lado, um aumento da TSAT com

ferritina normal pode fazer considerar a hipótese de solicitar o teste genético, isto porque nos doentes com HC o aumento da TSAT reflete o aumento do ferro circulante devido à insuficiente produção de hepcidina e geralmente precede o aumento da ferritina em vários anos. (1–3)

Os pacientes com aumento da TSAT e da ferritina de forma consistente (sendo recomendada a confirmação com uma segunda medição) e na ausência de comorbilidades que justifiquem essa sobrecarga são considerados suspeitos para HC e devem ser referenciados para teste genético. (2,3) No presente estudo, as referências por elevação da TSAT sem comorbilidade associada obtiveram 12,1% de homozigóticos C282Y. Já a percentagem de deteção de casos positivos de referências com aumento da TSAT associada a alguma comorbilidade foi de apenas 2,3%, valor este explicado pelo facto de muitas das comorbilidades associadas serem critérios que excluem a indicação para a realização do teste genético. (1)

Sendo a TSAT um marcador decisivo na deliberação de realização de teste genético *HFE* para diagnóstico clínico, tendo em conta a grande percentagem de pedidos por diagnóstico clínico (84,9%, ver Tabela 5), e com base nos artigos com orientações clínicas que têm sido publicados (*EASL clinical practice guidelines for HFE hemochromatosis* (6) em 2010, Porto *et al.* (3) em 2016, Girelli *et al.* (1) em 2021) seria de esperar que ao longo dos anos a percentagem de referência com elevação da TSAT tivesse aumentado, procurando acompanhar as recomendações. No entanto, no presente estudo tal aumento não se verificou, tendo a percentagem de pedidos efetuados com referência ao aumento da TSAT variado entre 28,0% e 33,9% nos anos em análise (ver Tabela 12).

A existência de sobrecarga de ferro documentada em RM ou biópsia hepática poderia fazer esperar que a percentagem de homozigóticos C282Y obtida fosse considerável. No entanto, no presente estudo, a percentagem de deteção de homozigóticos C282Y referenciados por esse motivo é de 5,5% (Tabela 9). Este valor, cujo resultado pode ser considerado inferior ao que seria expectado, pode ser explicado não só pelas particularidades histológicas de sobrecarga por HC poderem ser confundidas com depósitos de ferro por outros motivos, mas também pela existência de vários protocolos possíveis de ser usados em RM, não existindo um protocolo único. (1,10) É também importante referir que, segundo Porto *et al.* (3), doentes com uma sobrecarga de ferro severa (descrita em RM, biópsia ou flebotomias quantitativas) e não homozigóticos para a variante C282Y devem ser referenciados para teste genético de HC não-*HFE*, após exclusão de comorbilidades hematológicas e não hematológicas (nomeadamente comorbilidades hepáticas ou condições inflamatórias).

No presente estudo é ainda de salientar a percentagem de 0,0% de deteção de homozigóticos C282Y quando apresentada apenas uma comorbilidade, sem descrição dos parâmetros do ferro (categoria “Sobrecarga de ferro por comorbilidade”, Tabela 9). Neste caso, supõe-se, por intuição, ter havido alguma alteração que levantasse suspeita de HC e justificasse o pedido de teste genético *HFE*. No entanto, os resultados obtidos vão de encontro aos critérios definidos por Girelli *et al.* (1) que incluem a ausência de fatores de risco adquiridos para o défice de hepcidina (abuso de consumo de álcool, doença hepática avançada), sobrecarga iatrogénica (transfusões) e também a ausência de sinais de distúrbios eritrocitários primários (anemia e reticulocitose) como condições necessárias para a suspeita de HC.

Ao nível das diferenças existentes nos motivos de referência com o sexo, pela Tabela 19, a percentagem de pedidos é sempre claramente superior nos homens em todas as categorias (varia entre 66,1%-85,5%) com exceção da categoria de “Rastreios familiares ou estado de portador”, cujas percentagens são semelhantes em ambos os sexos (49,5% para mulheres e 50,5% para homens). Sabe-se que a penetrância da doença é variável e que em homozigóticos C282Y as comorbilidades relacionadas com a sobrecarga de ferro se desenvolvem mais em homens do que em mulheres, sendo que Allen *et al.* (19) estimam que a penetrância da doença seja ~30% em homens e ~1% em mulheres. Este resultado explica a maior suspeita clínica da doença em homens e, consequentemente, a maior percentagem de pedidos no sexo masculino por cada motivo de referência clínica (com exceção dos rastreios).

Avaliação da eficácia de deteção de casos positivos

O presente estudo confirma que a existência da consulta de referência de HC do HSA resulta numa maior percentagem de deteção de casos positivos, com 16,9% de homozigóticos C282Y (em comparação com 4,5% dos centros de saúde e 2,9% dos restantes hospitais) (Tabela 10). Este resultado deve incentivar não só a que os pedidos de teste genético sejam realizados, tanto quanto possível, por centros de referência, mas também promover a utilização de critérios adequados pelos outros locais prescritores do teste genético, tal como os utilizados pela consulta de referência, nomeadamente as mais recentes recomendações (Girelli *et al.* (1)).

De acordo com a Tabela 11 não são as especialidades médicas que realizam mais pedidos (Medicina Interna e Gastroenterologia) que apresentam melhor percentagem de deteção de homozigóticos C282Y (2,4% e 3,3%, respetivamente). As especialidades de

Hematologia Clínica e Imunohemoterapia são as especialidades com maior percentagem de deteção de casos positivos, com 12,3%. Estes resultados assinalam a necessidade de divulgar os critérios para suspeita de HC aos clínicos que pelas particularidades das suas especialidades têm maior contacto com potenciais indivíduos suspeitos, procurando tornar os seus pedidos mais eficientes e eficazes.

Avaliando os casos positivos com o tipo de referência percebemos que no presente estudo a percentagem de deteção de homozigóticos C282Y foi de 9,8% na categoria de rastreio familiar e de 3,9% na categoria de diagnóstico clínico (Tabela 8). Sendo a HC relacionada com o *HFE* uma doença autossómica recessiva, nos indivíduos homozigóticos C282Y a prevalência de familiares também homozigóticos C282Y é de ~25% entre irmãos, ~5% para a descendência (filhos) e ~5% para os pais. (3) Qualquer uma destas percentagens é superior em comparação com o valor observado na população portuguesa (~0,3% segundo Cardoso *et al.* (18)). Assim, após o diagnóstico de HC num caso-*índex*, deve ser realizado o rastreio genético aos familiares de primeiro grau, dado ser uma boa estratégia a nível de custo-benefício para aumentar a deteção e diagnóstico precoce. Consequentemente, a promoção da realização de rastreio genético nos familiares de primeiro grau dos casos-*índex*, particularmente nos irmãos, irá contribuir para aumentar a percentagem de deteção de homozigóticos C282Y na categoria de diagnóstico familiar. (3,7) É também importante salientar que estimando o risco médio de desenvolvimento de doença grave na HC (exemplo: cirrose hepática) em ~4% e comparando com o número de casos positivos nos rastreios populacionais implementados (cancro da mama, cólon e colo do útero: 1 em ~1500-2000), estima-se que a implementação do rastreio familiar de HC previna o aparecimento de doença grave em número superior (1 em ~100 nos irmãos, 1 em ~500 nos filhos e pais). (3)

Da análise da variação de casos positivos ao longo dos anos (Tabela 13), verifica-se que nos anos em que número total de pedidos foi inferior, a percentagem de deteção de casos positivos foi superior. Estes resultados mostram não só que ao longo dos anos não tem existido um aumento sustentado da percentagem de casos positivos, como também que não é o facto de não existir limitação aos pedidos que se traduzirá diretamente num aumento da percentagem de deteção. Antes pelo contrário, é levantada a hipótese de que, possivelmente, a redução dos pedidos pode resultar na aplicação de critérios mais restritos e conseqüente maior percentagem de deteção de casos positivos.

Idade e HC

No presente estudo a idade média de deteção de homozigóticos C282Y foi de 55 ± 15 anos e a idade média de todos os pedidos apresentados 57 ± 15 anos (Tabela 2 e Tabela 14). Deugnier *et al.* (8) reportaram que a idade média de diagnóstico em França foi 46 ± 13 anos. Comparando os dois resultados, percebemos que em Portugal existe, claramente, oportunidade para melhorar a idade do diagnóstico, havendo interesse e utilidade em que seja realizado mais precocemente. Os resultados da idade média dos pedidos obtidos no presente estudo são inquietantes uma vez que refletem o insuficiente empenho por parte dos médicos na deteção precoce, especialmente em assintomáticos, mas traduzem, sim, a exclusão de HC em doentes tendencialmente mais velhos e já na suspeita de comorbilidades associadas.

Ao longo dos anos não tem havido uma diminuição estatisticamente significativa da idade média dos pedidos de teste genético (Tabela 15). A existência de uma diminuição seria desejável tendo em conta as várias publicações que têm vindo a ser divulgadas no sentido de definir os critérios para o correto diagnóstico de HC relacionada com o *HFE*.

Analisando a relação entre a idade e a origem dos pedidos, os pedidos provenientes de hospitais revelaram corresponder a idades mais tardias (~ 59 anos) do que os da consulta de HC do HSA e os dos centros de saúde (~ 51 anos) (Tabela 16). O valor da idade média correspondente aos centros de saúde é surpreendentemente semelhante à idade média da consulta de referência de HC do HSA, sendo que este resultado pode ser explicado pelo facto de 80% dos pedidos oriundos dos centros de saúde terem sido realizados para rastreio familiar (ver Tabela 18).

Controvérsias sobre a variante H63D

Os resultados obtidos no presente estudo para as variantes C282Y e H63D e em comparação com os resultados obtidos por Cardoso *et al.* (18) contribuem para a discussão da real necessidade de investigação da variante H63D no gene *HFE* (Tabela 20). A percentagem de indivíduos homozigóticos H63D no presente estudo foi de 6,5% sendo que o valor observado na população portuguesa em geral foi de 5% (18). Já a percentagem de indivíduos heterozigóticos H63D obtida nos dados em análise foi de 27% e na população portuguesa em geral foi de 23,9% (18). Em ambos os casos as diferenças entre a existência ou não do referido polimorfismo no presente estudo e em Cardoso *et al.* (18) não são significativas ($p\text{-value} > 0,05$), sendo que a semelhança entre os

resultados do presente estudo e dos dados observados por Cardoso *et al.* (18) sugere que os valores de heterozigotia e homozigotia H63D no presente estudo possam ser considerados os esperados na população. Por outro lado, os resultados da heterozigotia composta C282Y/H63D nos dois estudos podem, eventualmente, contribuir como argumento para a manutenção da pesquisa da variante H63D, uma vez que apresentam uma relação estatisticamente significativa ($p\text{-value} < 0,001$): 5,8% no presente estudo e 1,9% na população portuguesa em geral (18).

Atualmente ainda não há consenso acerca da necessidade e implicações da testagem para a variante H63D. A maioria dos peritos argumenta que o seu resultado não é clinicamente relevante, tem uma alta frequência na população normal e pode gerar ansiedade desnecessária. (3,18) Por outro lado, alguns laboratórios consideram importante a manutenção da testagem para H63D, acautelando a necessidade de uma redação cuidadosa dos relatórios. A justificação mais consistente para a manutenção da pesquisa da variante H63D passa pelo risco aumentado de sobrecarga de ferro na heterozigotia composta C282Y/H63D e por um possível risco na homozigotia H63D, sendo nestes dois casos de destacar a possibilidade de realizar recomendações relacionadas com o estilo de vida. (3,6,20) Nos indivíduos heterozigóticos compostos C282Y/H63D, apesar da possibilidade de alterações nos parâmetros do ferro, a existência de doença associada a essa sobrecarga é rara, sendo que a existir está frequentemente associada a fatores de risco adicionais para a existência de sobrecarga ou para doença hepática (como consumo alcoólico, esteatose hepática, infeção por VHC e síndrome dismetabólica) ou então no caso de hereditariedade digénica (*digenic inheritance*, ver Anexo II.) (1–3) Assim, apesar da heterozigotia composta C282Y/H63D poder ser um fator de risco para elevação dos parâmetros do ferro, este genótipo não é considerado suficiente para o diagnóstico de HC. De igual forma, a homozigotia H63D também não é considerada um genótipo associado à doença. (3,7) Estas são as razões pelas quais ainda existe discussão acerca da conveniência da genotipagem H63D, sendo que em alguns países, como em França, não é de todo realizada. (3)

Em caucasianos cujo teste genético não confirme a homozigotia C282Y e em não-caucasianos que apresentem sobrecarga de ferro severa, não podem ser excluídas outras formas raras de HC, sendo de considerar a sua referência para centros de referência para a realização de teste genético de segunda-linha. (1,3) Geralmente, essas formas mais raras de HC são menos influenciadas por cofatores e as manifestações clínicas costumam ser mais graves e em idade mais jovem. (1)

Conclusões e perspectivas futuras

Este estudo confirma a impressão clínica acerca da forma menos adequada como são frequentemente efetuados os pedidos de teste genético *HFE* e cumpre o seu objetivo principal de identificar as formas de referência mais eficazes e eficientes para o diagnóstico da doença. Com a elaboração deste trabalho espera-se contribuir para melhorar as práticas de referência para a realização do diagnóstico molecular de HC relacionada com o *HFE*, ambicionando que os pedidos para diagnóstico clínico resultem da aplicação de critérios claros, incluindo obrigatoriamente uma TSAT consistentemente elevada na ausência de comorbilidades que impliquem um aumento dos parâmetros do ferro.

Sobre a manutenção de testagem para a variante H63D, e tendo em conta a sobreposição entre os resultados obtidos e os observados na população em geral, reforça-se a imprescindibilidade de redação cautelosa dos relatórios genéticos, enfatizando a ausência de critério de classificação de homocigóticos ou heterocigóticos H63D como genótipos de HC, bem como a impossibilidade de deixar passar a oportunidade de realizar recomendações relacionadas com fatores de risco para sobrecarga de ferro, designadamente de estilo de vida.

Os resultados obtidos na presente dissertação destacam também o dever de suspeição da doença em idades mais precoces, de forma a promover um tratamento atempado e evitar as principais complicações associadas à doença. Realça-se, ainda, a necessidade de se apostar na divulgação das recomendações mais atuais para o diagnóstico molecular de HC relacionada com o *HFE*, entre os médicos portugueses que, pelas particularidades das suas especialidades, têm maior contacto com potenciais indivíduos suspeitos, como os Internistas e os Gastroenterologistas, podendo esta ideia passar pela necessidade da publicação de uma Norma de Orientação Clínica pela Direção Geral de Saúde com o objetivo de divulgar, promover e orientar as melhores práticas terapêuticas entre todos os clínicos.

Referências

1. Girelli D, Busti F, Brissot P, Cabantchik I, U Muckenthaler M, Porto G. Hemochromatosis classification-update and recommendations by the BIOIRON Society. American Society of Hematology; 2021.
2. Murphree CR, Nguyen NN, Raghunathan V, Olson SR, DeLoughery T, Shatzel JJ. Diagnosis and management of hereditary haemochromatosis. *Vox Sang*. 2020;115(4):255–62.
3. Porto G, Brissot P, Swinkels DW, Zoller H, Kamarainen O, Patton S, et al. EMQN best practice guidelines for the molecular genetic diagnosis of hereditary hemochromatosis (HH). *Eur J Hum Genet*. 2016;24(4):479–95.
4. McLaren GD, Gordeuk VR. Hereditary hemochromatosis: insights from the Hemochromatosis and Iron Overload Screening (HEIRS) Study. *Am Soc Hematol*. 2009;195–206.
5. Fleming RE, Britton RS, Waheed A, Sly WS, Bacon BR. Pathophysiology of hereditary hemochromatosis. *Semin Liver Dis*. 2005;25(4):411–9.
6. European Association for the Study of the Liver. EASL clinical practice guidelines for HFE hemochromatosis. *J Hepatol* [Internet]. 2010;53(1):3–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2010.03.001>
7. Adams P. Epidemiology and diagnostic testing for hemochromatosis and iron overload. *Int J Lab Hematol*. 2015;37(S1):25–30.
8. Deugnier Y, Morcet J, Lainé F, Hamdi-Roze H, Bollard AS, Guyader D, et al. Reduced phenotypic expression in genetic hemochromatosis with time: Role of exposure to non-genetic modifiers. *J Hepatol* [Internet]. 2019;70(1):118–25. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.09.009>
9. 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. *Hepatol Int*. 2018;12:83–6.
10. Deugnier Y, Turlin B. Pathology of Hepatic Iron Overload. *Semin Liver Dis*. 2011;31(03):260–71.
11. Hemochromatosis (Iron overload disease) [Internet]. Amboss. [cited 2021 Dec 1].

Available from: <https://next.amboss.com/us/article/qSoCof>

12. Muncunill J, Vaquer P, Galmés A, Obrador A, Parera M, Bargay J, et al. In hereditary hemochromatosis, red cell apheresis removes excess iron twice as fast as manual whole blood phlebotomy. *J Clin Apher.* 2002;17(2):88–92.
13. Rombout-Sestrienkova E, Winkens B, van Kraaij M, van Deursen CTBM, Janssen MCH, Rennings AMJ, et al. A predictive model for estimating the number of erythrocytapheresis or phlebotomy treatments for patients with naïve hereditary hemochromatosis. *J Clin Apher.* 2021;36(3):340–7.
14. Cheng R, Barton JC, Morrison ED, Pradyumna D, Krawitt EL, Gordon SC, et al. Differences in Hepatic Phenotype Between Hemochromatosis Patients with *HFE* C282Y Homozygosity and Other *HFE* Genotypes. *J Clin Gastroenterol.* 2010;43(6):569–73.
15. Montanez K, Berninger T, Willis M, Harding A, Lutgendorf MA. Genetic testing costs and compliance with clinical best practices. *J Genet Couns.* 2020;29(6):1186–91.
16. Maroco J. *Análise Estatística com o SPSS Statistic.* 8th ed. ReportNumber; 2021.
17. Nominal Variable Association [Internet]. Statistics Solutions. [cited 2021 Nov 3]. Available from: <https://www.statisticssolutions.com/free-resources/directory-of-statistical-analyses/nominal-variable-association/>
18. Cardoso CS, Oliveira P, Porto G, Oberkanins C, Mascarenhas M, Rodrigues P, et al. Comparative study of the two more frequent *HFE* mutations (C282Y and H63D): Significant different allelic frequencies between the North and South of Portugal. *Eur J Hum Genet.* 2001;9(11):843–8.
19. Allen KJ, Gurrin LC, Constantine CC, Osborne NJ, Delatycki MB, Nicoll AJ, et al. Iron-Overload–Related Disease in *HFE* Hereditary Hemochromatosis. *N Engl J Med.* 2008;358:221–30.
20. Gurrin LC, Bertalli NA, Dalton GW, Osborne NJ, Constantine CC, McLaren CE, et al. *HFE* C282Y/H63D compound heterozygotes are at low risk of hemochromatosis-related morbidity. *Hepatology.* 2009;50(1):94–101.

Apêndice

Apêndice 1 - Motivos de referência com apresentação das categorias de forma mais detalhada.

Apêndice 2 – Tabela de verificação da normalidade pelo Teste de KS para a questão “Qual a idade média de detecção de homozigóticos C282Y? Existe diferença de idade para os casos não confirmados?”.

Apêndice 3 - Tabela de verificação da normalidade pelo Teste de KS para a questão “Como tem variado a idade de apresentação dos pedidos de teste genético ao longo dos anos?”.

Apêndice 4 - Tabela de verificação da normalidade pelo Teste de KS para a questão “Existe diferença na idade dos participantes com a origem do pedido de teste genético (hospitais, centros de saúde ou consulta de referência de HC do HSA)?”.

Apêndice 1 - Motivos de referência com apresentação das categorias de forma mais detalhada

Tabela 21 – Distribuição dos motivos de referência, com apresentação das categorias de referência de forma mais detalhada.

	n	%
Referenciação sem informação clínica	174	9,2
Hiperferritinemia isolada	287	15,2
Hiperferritinemia + álcool	26	1,4
Hiperferritinemia + vírus	33	1,8
Hiperferritinemia + cirrose/hepatocarcinoma	33	1,8
Hiperferritinemia + outras	269	14,3
Elevação da TSAT (apenas ou com hiperferritinemia)	207	11,0
Elevação da TSAT + álcool	40	2,1
Elevação da TSAT + vírus	64	3,4
Elevação da TSAT + cirrose/hepatocarcinoma	81	4,3
Elevação da TSAT + outras	211	11,2
RM/ biópsia hepática	55	2,9
Sobrecarga de ferro por comorbilidade não-hematológica	86	4,6
Sobrecarga de ferro por comorbilidade hematológica	29	1,5
Familiares homozigóticos	132	7,0
Familiares heterozigóticos ou heterozigóticos compostos	83	4,4
Familiar desconhecido	61	3,2
Rastreio populacional ou familiar não-HFE	11	0,6
Total	1882	100,0

As comorbilidades hematológicas associadas à categoria “Sobrecarga de ferro por comorbilidade hematológica” foram: anemia congênita, porfiria cutânea tardia, pancitopenia, policitemia, anemia hemolítica imune, estomatocose hereditária, linfoma de Hodgkin, trombocitopenia, anemia e mielodisplasia.

As comorbilidades não-hematológicas associadas à categoria “Sobrecarga de ferro por comorbilidade não-hematológica” foram: cirrose hepática, doença hepática alcoólica, VHC, VHB, HIV, hepatocarcinoma, gastrite crônica, doença hepática crônica, diabetes, alteração analítica do perfil hepático, artrite reumatoide, esteatose.

Categoria “Outras” inclui: síndrome metabólica, alteração inespecífica das enzimas de citólise hepática, doença hepática crônica e inflamação.

Apêndice 2 – Tabela de verificação da normalidade pelo Teste de KS para a questão “Qual a idade média de detecção de homozigóticos C282Y? Existe diferença de idade para os casos não confirmados?”

Tabela 22 - Verificação da normalidade.

	Resultado para a mutação C282Y	<i>p-value</i> ^{#5}
Idade	Não homozigóticos	<0,001
	Homozigóticos	0,200*

#5 - Teste de Kolmogorov-Smirnov

Como *p-value*<0,05 num dos grupos rejeitamos a normalidade dos dados. Falhando o pressuposto da normalidade dos dados, deveremos recorrer a um teste não paramétrico, neste caso, ao teste de Mann-Whitney.

Apêndice 3 - Tabela de verificação da normalidade pelo Teste de KS para a questão “Como tem variado a idade de apresentação dos pedidos de teste genético ao longo dos anos?”

Tabela 23 - Verificação da normalidade.

	Anos	<i>p-value</i> ^{#5}
Idade	2010-2011-2012	0,024
	2013-2014-2015	<0,001
	2016-2017-2018	0,001
	2019-2020-2021	0,006

#5 - Teste de Kolmogorov-Smirnov

Como *p-value*<0,05 em todos os grupos rejeitamos a normalidade dos dados. Falhando o pressuposto da normalidade dos dados, deveremos recorrer a um teste não paramétrico, neste caso, ao teste de Kruskal-Wallis.

Apêndice 4 - Tabela de verificação da normalidade pelo Teste de KS para a questão “Existe diferença na idade dos participantes com a origem do pedido de teste genético (hospitais, centros de saúde ou consulta de referência de HC do HSA)?”.

Tabela 24 - Verificação da normalidade.

	Origem do pedido de teste genético	<i>p-value</i> ^{#5}
Idade	Hospitais	<0,001
	Centros de saúde	0,200
	Consulta HC HSA	0,200

#5 - Teste de Kolmogorov-Smirnov

Como *p-value*<0,05 num dos grupos rejeitamos a normalidade dos dados. Falhando o pressuposto da normalidade dos dados, deveremos recorrer a um teste não paramétrico, neste caso, ao teste de Kruskal-Wallis.

Anexos

A I - Parecer da Comissão de Ética e Conduta Responsável na Investigação do Instituto de Investigação e Inovação em Saúde (CECRI-i3S).

A II – Tabela da nova classificação de HC (1)

Anexo I - Parecer da Comissão de Ética e Conduta Responsável na Investigação do Instituto de Investigação e Inovação em Saúde (CECRI-i3S).



COMISSÃO de ÉTICA e CONDUTA
RESPONSÁVEL na INVESTIGAÇÃO (CECRI)

PARECER N.º 04/CECRI/2021

**“O diagnóstico molecular de Hemocromatose ligada ao HFE: uma
análise das práticas de referenciação clínica nos últimos 10 anos”**

SUBMITTED BY:

Bruna Silva Cordeiro

Porto, 21 de maio de 2021

0/2



Título do projeto: "O diagnóstico molecular de Hemocromatose ligada ao *HFE*: uma análise das práticas de referência clínica nos últimos 10 anos"

Investigador principal: Bruna Silva Cordeiro, estudante de Mestrado Integrado em Medicina na Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior, sob orientação da Professora Doutora Graça Porto e coorientação do Dr. Jorge Martinez. A investigadora apresenta ainda declaração da Professora Doutora Graça Porto, enquanto Group Leader do Basic & Clinical Research on Iron Biology (BCRIB), e do Professor Doutor Jorge Sequeiros, diretor do Centro de Genética Preditiva e Preventiva (CGPP), atestando a concessão à investigadora das condições para obter os dados necessários ao estudo, constantes nos registos do CGPP.

Natureza e objetivos do estudo: O objetivo do estudo é analisar a evolução no modo de referência para realização do teste genético *HFE* nos últimos 10 anos. As hipóteses orientadoras prendem-se com a alteração na eficácia de deteção (definida como a percentagem de homocigóticos C282Y diagnosticados), com variações nessa eficácia consoante a especialidade requisitante, etc. A investigadora, durante o mês de Junho de 2021, fará estágio presencial no CGPP sob orientação da Professora Doutora Graça Porto, período em que obterá informação da base de dados do CGPP, armazenando os dados em ficheiro excel, para posterior tratamento estatístico.

Pertinência do estudo: A confirmarem-se algumas das hipóteses orientadoras, a divulgação dos resultados contribuirá para melhores recomendações para o diagnóstico molecular de hemocromatose pelos médicos prescritores dos testes, resultando em aplicação de critérios de diagnóstico mais eficazes.

Confidencialidade: Os dados a extrair da base de dados do CGPP incidem sobre o tipo de referência (diagnóstico ou teste preditivo, sexo, idade, data, especialidade, informação clínica do pedido). A investigadora assinala que a cada requisição do CGPP é atribuída um número sequencial de entrada no laboratório (uni), aos quais se associam dados confidenciais acessíveis pelo responsável clínico do diagnóstico (nome do doente, nome do médico requisitante, hospital de origem). Significa então que os dados que a investigadora pretende, enquanto associados a tal número sequencial de entrada no laboratório (uni), podem permitir a identificação dos doentes em causa. Nesse sentido, fossem os dados entregues com essa informação suplementar, tratar-se-iam apenas de dados pseudonimizados, nos termos do art.º 4 do Regulamento (UE) 2016/679 do Parlamento e do Conselho (Regulamento Geral sobre a Proteção de Dados), pois que sempre seria possível voltar a identificar os doentes. Informa, porém, a investigadora que os dados serão recolhidos anonimamente na fonte, identificando corretamente o risco de ser exposta informação indevida sobre nomes de doentes e médicos requisitantes e hospitais, pelo que adequadamente aponta como ação preventiva que os dados sejam anonimizados sob responsabilidade da Professora Doutora Graça Porto. A preconizada intervenção da orientadora (e responsável pelo tratamento dos dados) assegurará a confidencialidade e anonimato, garantindo que do conjunto de dados a transmitir à investigadora não faça parte o número sequencial de entrada no laboratório (uni) nem seja possível voltar a associar tal número aos dados extraídos. Apenas com a entrega à investigadora dos dados pretendidos mas já despidos de qualquer ligação àquele identificador (uni) é que se poderá falar de dados anonimizados pois, dessa forma, após essa operação, já não será possível por pessoa alguma e por qualquer modo voltar a identificar os doentes. A única dúvida que poderá surgir a esse respeito será quanto à idade, caso seja extraída data de nascimento completa. Recomenda-se nesse caso que a investigadora pondere a hipótese de pedir a extração do dado idade na forma mês/ano, ou até apenas ano, caso isso não interfira com os objetivos do estudo, para maximizar a proteção da identidade e minimizar qualquer hipótese de identificação posterior. A investigadora afirma ainda que irá manter os dados em documento excel apenas até à publicação dos resultados da investigação. Presume-se que se refere aos dados já anonimizados, pelo

O diagnóstico molecular de Hemocromatose ligada ao *HFE*: uma análise das práticas de referência
clínica ao longo dos últimos 11 anos

que, já não sendo possível a qualquer pessoa, a partir daqueles dados, identificar os doentes, não parece que se coloquem de forma tão aguda as preocupações que levam normalmente ao encurtar dos prazos de manutenção dos dados. As boas práticas de gestão de dados científicos, nomeadamente para manutenção da garantia da reprodutibilidade, rastreabilidade e responsabilidade (2.5 do Código Europeu de Conduta para a Integridade da Investigação) poderão impor a conservação dos dados para lá da eventual publicação de artigo em revista científica, o que se recomenda. Por último, recomenda-se ainda que a investigadora pondere a forma de informar os doentes de hemocromatose em geral sobre o conhecimento produzido, canalizando a divulgação dos resultados da investigação pelo próprio CGPP, de forma genérica, também assim minimizando qualquer risco de quebra de anonimato.

Risco/Benefício: O risco e desconforto físicos associados são inexistentes, uma vez que não irá ser efetuada nova colheita biológica, apenas se analisando os dados já existentes. Os riscos mais evidentes são de confidencialidade, já assinalados e abordados com a preconizada intervenção anonimizadora da responsável pelo tratamento dos dados e com as recomendações sugeridas. Os benefícios são teóricos, proporcionando a aquisição de conhecimento que poderá vir a beneficiar toda a população no futuro. Não há benefícios diretos para os participantes, para os doentes cujos dados serão analisados, no imediato.

Respeito pela autonomia – Os testes que deram origem aos dados que se pretende tratar foram já objeto de consentimento informado (havendo mesmo registo escrito, no caso dos preditivos).

Financiamento: Não vem indicada no requerimento a existência de qualquer financiamento, pelo que se presume lapso da investigadora o assinalar da opção “não aplicável” e que os custos do estudo/projeto/protocolo são suportados pela própria investigadora e pelos respetivos orientadores.

Seguro: Não está prevista a obtenção de seguro, o qual, face à natureza do estudo, é dispensável.

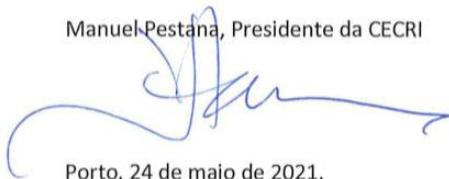
Conclusão: Em face da análise do protocolo do estudo intitulado “ O diagnóstico molecular de Hemocromatose ligada ao *HFE*: uma análise das práticas de referência clínica nos últimos 10 anos”, considera-se que o mesmo preenche as exigências éticas que se colocam em estudos desta natureza e fica por isso aprovado pela CECRI.

Recomenda-se que

- o processo de extração dos dados resulte em dados anonimizados, i.e., que do conjunto de dados a transmitir à investigadora não faça parte o número sequencial de entrada no laboratório (uni) nem seja possível voltar a associar tal número aos dados extraídos;
- a investigadora pondere a hipótese de pedir a extração do dado idade na forma mês/ano, ou até apenas ano, caso isso não interfira com os objetivos do estudo, para maximizar a proteção da identidade e minimizar qualquer hipótese de identificação posterior;
- em caso de publicação dos resultados em revista científica, os dados anonimizados sejam mantidos pela investigadora pelo período que considere razoável e conforme com as boas práticas de gestão de dados científicos, nomeadamente para manutenção da garantia da reprodutibilidade, rastreabilidade e responsabilidade (2.5 do Código Europeu de Conduta para a Integridade da Investigação);
- a investigadora pondere a forma de informar os doentes de hemocromatose em geral sobre o conhecimento produzido, canalizando a divulgação dos resultados da investigação pelo próprio CGPP, de forma genérica, também assim minimizando qualquer risco de quebra de anonimato.

Foi relator deste processo o membro da CECRI Rui Vieira da Cunha

Manuel Pestana, Presidente da CECRI



Porto, 24 de maio de 2021,

Anexo II – Nova tabela de classificação da HC por Girelli *et al.* (1)

Table 4. New classification of HC proposed by the working group

Novel classification	Molecular pattern	Note
<i>HFE</i> -related	<i>p.Cys282Tyr</i> homozygosity or compound heterozygosity of <i>p.Cys282Tyr</i> with other rare <i>HFE</i> pathogenic variants ¹⁰⁶⁻¹⁰⁹ or <i>HFE</i> deletion ¹¹⁰	Low penetrance; consider presence of host-related or environmental cofactors for IO In subjects with other <i>HFE</i> genotypes (e.g. <i>p.Cys282Tyr/His63Asp</i> compound heterozygosity or <i>p.His63Asp</i> homozygosity) consider second-line genetic testing for rarer variants.
<i>Non HFE</i> -related	Rare pathogenic variants in “ <i>non-HFE</i> ” genes: <ul style="list-style-type: none"> - <i>HJV</i>-related - <i>HAMP</i>-related - <i>TFR2</i>-related - <i>SLC40A1</i> (GOF)-related 	Potentially, mutations in any hepcidin-regulatory gene may be causative (the effects of novel mutations should be confirmed through functional and epidemiological studies). Molecular subtypes characterization only at specialized centers, but the diagnosis of <i>non-HFE</i> related HC is sufficient to start phlebotomies at non-specialized centers*.
Digenic**	Double heterozygosity and/or double homozygosity/heterozygosity for mutations in two different genes involved in iron metabolism (<i>HFE</i> and/or <i>non-HFE</i>)	More commonly, <i>p.Cys282Tyr</i> mutation in <i>HFE</i> gene might coexist with mutation in other genes; rarely, both mutations involve <i>non-HFE</i> genes
Molecularly undefined	Molecular characterization (still) not available after sequencing of known genes (provisional diagnosis)	Patients should be referred (or DNA should be sent) to specialized centers

*Providing that iron overload is confirmed by MRI. If this is not accessible, close monitoring of Hb level is needed to avoid the occurrence of anemia.

** Caution is needed to interpret as digenic inheritance results from NGS outputs reporting several variants in gene panels. Whenever possible, strict criteria for defining pathogenic variants should be adopted, and corroborated by family segregation and/or functional studies.