

**Expressão da Ciclina D1 em Células
Mononucleares fagocitárias (PBMCs):
Um estudo em doentes com Hemocromatose
Hereditária e controlos**

Susana Paula Pinto de Almeida

**UNIVERSIDADE DO PORTO
Faculdade de Medicina**

Porto, 2009

**DISSERTAÇÃO DE CANDIDATURA AO GRAU DE MESTRE
APRESENTADA À FACULDADE DE MEDICINA
DA UNIVERSIDADE DO PORTO**

**ORIENTADOR: Professora Maria da Graça Beça Gonçalves Porto,
Professora Catedrática Convidada do Instituto de
Ciências Biomédicas de Abel Salazar (ICBAS),
Porto, Portugal**

**CO-ORIENTADOR: Doutor Jorge Pereira Pinto, PhD
Investigador Auxiliar do Instituto de Biologia
Molecular e Celular (IBMC), Porto, Portugal**

Artigo 48º, parágrafo 3 – A Faculdade não responde pelas doutrinas expendidas na dissertação.
(Regulamento da Faculdade de Medicina do Porto – Decreto-Lei Nº19337, 29 de Janeiro de 1931).

“Só sabemos com exactidão quando sabemos pouco, à medida que vamos adquirindo conhecimentos, instala-se a dúvida.”

Goethe

Aos meus avós,
António Bazilio e Maria Ludovina,
que sempre acreditaram e se orgulharam de mim...

À minha mãe,
pelo seu incentivo para conclusão desta tese, porque está sempre presente e porque me dá mais do que tudo... Dá-me o seu exemplo, do qual muito me orgulho.

Ao meu pai,
pelo apoio e orgulho que demonstra.

Aos meus irmãos, Zé, Carlos e Filipa,
que adoro e de quem me orgulho, que sempre me apoiaram,
pela presença em todos os momentos, estão sempre lá quando preciso.



Agradecimentos

Agradecimentos

À **Professora Doutora Graça Porto**, pela orientação e supervisão desta tese, pelo apoio e disponibilidade que sempre demonstrou em todas as fases da realização deste trabalho. Acima de tudo, e a um nível pessoal, gostaria de agradecer a confiança depositada em mim e no meu trabalho. A sua confiança fez toda a diferença, sem ela, nada disto teria sido possível.

Ao **Doutor Jorge Pinto**, pelos comentários, observações e disponibilidade.

Ao **Professor Doutor Mário Sousa**, pela sua amizade, exemplo científico e pessoal.

À **Professora Maria de Sousa**, pela oportunidade de efectuar todas as experiências no laboratório do IRIS (Iron Genes and the immune system).

À **Dra. Susana Santos, Dra. Natália Oliveira, Dra. Inês Alencastre, Dra. Joana Cerqueira, Dr. Eduardo Cruz e Dr. Luís Correia**, pelas suas presenças constantes, pelo seu apoio, pelo que aprendi, pelo que me deram, por sempre acreditarem que era possível, mas acima de tudo, por toda a amizade. O meu muito obrigada.

À **Dra. Ana Afonso**, pela amizade e incentivo.

A **todos os colegas do IRIS**, em especial à **Dra. Susana Oliveira** e ao **Dr. João Neves**, pela ajuda e amizade.

A **todos os meus colegas de trabalho do CGPP** (Centro de Genética Preditiva e preventiva).

Às minhas colegas de mestrado e amigas, **Dra. Rita Maia e Dra. Lara Henriques** pelos conselhos e amizade.

À **Enfermeira Graça Melo**, do Serviço de Hematologia Clínica do Hospital Geral de Santo António, pela colheita das amostras nos pacientes e pela sua amizade.

Aos **Pacientes** que gentilmente concordaram em participar deste estudo.

A todos os **professores** que tive durante o mestrado, e à **Faculdade de Medicina** pela oportunidade de realizar este projecto.

Lista de Abreviaturas

CCND1 – Gene da ciclina D1

CDK – Cinase dependente de ciclina

F – Ferritina sérica

Fe - Ferro

G1 – Gap 1

G2 – Gap 2

GAPDH – Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

HH – Hemocromatose hereditária

MHC – Complexo maior de histocompatibilidade

PBMC – Células mononucleares do sangue periférico

PCNA – Antígeno nuclear de proliferação celular

Rb - Retinoblastoma

RR – Redutase ribonucleotídica

RT-PCR – PCR em tempo real



Índice

Índice

Agradecimentos	13
Lista de Abreviaturas	15
Índice	19
Abstract	23
Resumo	27
1. Introdução	31
1.1. Metabolismo do ferro.....	31
1.2. Hemocromatose Hereditária.....	33
1.2.1. O Gene HFE.....	33
1.2.2. A expressão clínica da HH.....	36
1.2.3. Tratamento da sobrecarga de ferro.....	37
1.2.4. Os Linfócitos na HH.....	37
1.3. Ferro e ciclo celular.....	39
1.4. Ciclina D1.....	41
1.5. Objectivos do trabalho.....	45
2. Material e métodos	49
2.1. A população.....	49
2.2. Genotipagem do HFE.....	50
2.2.1. Isolamento do DNA.....	50
2.2.2. PCR.....	50
2.2.3. Hibridização.....	51
2.3. Doseamento da Ciclina D1 em células mononucleares do sangue periférico (PBMC's).....	51
2.3.1. Isolamento de Células Mononucleares do sangue periférico (PBMC'S).....	52
2.3.2. Isolamento de RNA total de sangue periférico.....	52
2.3.3. Isolamento de cDNA.....	53
2.4. Análise da expressão da Ciclina D1.....	53
2.4.1. PCR em tempo real.....	54
2.5. Análise Estatística.....	55
3. Resultados	59
3.1. Quantificação da Ciclina D1.....	59
3.2. Expressão da Ciclina D1 em função dos parâmetros clínicos e laboratoriais.....	61
3.2.1. Parâmetros Clínicos.....	61
3.2.2. Parâmetros Bioquímicos.....	63
3.2.3. Parâmetros Hematológicos.....	66
4. Discussão	75
4.1. Expressão da ciclina D1 no sangue periferico.....	76
4.2. Expressão da ciclina D1 em função dos parâmetros clínicos e laboratoriais.....	76
4.3. Conclusões.....	78

Bibliografia	81
---------------------------	-----------



Abstract

Abstract

Over the last few years there has been growing interest in the study of genes involved in DNA repair, maintenance of genomic integrity, control of cell proliferation and differentiation, or in the metabolism of carcinogenic compounds.

Cyclin D1 gene (*CCND1*) is a proto-oncogene involved in cell cycle regulation, particularly important for the G1/S checkpoint of the cell cycle. This gene is altered in several kinds of tumors. The importance of cyclin D1 expression has been demonstrated in several studies. Iron (Fe) has an important role in cell cycle and tumorigenesis, with iron depletion leading to cell cycle arrest, stopping G1/S progression, and consequently leading to apoptosis.

Recent work demonstrates that cyclin D1 is over-expressed in the iron overloaded liver, and that the expression of cyclin D1 is induced by iron, and can contribute to cell cycle abnormalities. It was also demonstrated that cyclin D1 is expressed in peripheral blood lymphocytes.

The work presented in this thesis describes the analysis of Cyclin D1 expression (*CCND1*) in peripheral blood lymphocytes, and evaluates its correlation with iron overload *in vivo*. To accomplish that goal the expression of Cyclin D1 (*CCND1*) was analyzed in patients that suffer from Hereditary Hemochromatosis (HH), an autosomal recessive disease with altered iron metabolism, and which is characterized by increased iron absorption.

Two groups of patients were analyzed for *CCND1* expression, one undergoing intensive treatment, and the other under maintenance treatment; healthy individuals formed the control group. This study was performed with peripheral blood samples collected from Hemochromatosis patients that undergo regular phlebotomy at the “Serviço de Hematologia Clínica do Hospital Geral de Santo António”, and controls were obtained from healthy blood donors that use the same unit. This study included fifty eight (58) individuals, of which thirty five (35) were men, and twenty three (23) women. Fifty (50) samples were from Hereditary Hemochromatosis patients, of which thirteen (13) were under intensive treatment and thirty seven (37) were in maintenance treatment. The remaining eight (8) individuals were healthy blood donors, and constitute the control group.

The quantification of cyclin D1 expression was performed by *Real-Time Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR).

The data analysis showed no overall differences between patients and controls. However, when analyzing the patients group in more detail, the results show that those undergoing intensive treatment have higher cyclin D1 expression, when compared to the ones on maintenance treatment. The results obtained also demonstrate the presence of cyclin D1 in lymphocytes, as all the samples studied showed relative cyclin D1 expression. The implications of these results are discussed.



Resumo

Resumo

Nos últimos anos tem vindo a aumentar a importância e interesse pelo estudo de genes envolvidos na reparação de DNA e manutenção da integridade genómica, no controlo da proliferação e diferenciação celular ou no metabolismo de carcinogéneos.

O gene da ciclina D1 (*CCND1*) é um proto-oncogene envolvido na regulação do ciclo celular, particularmente importante no ponto de controlo G1/S do Ciclo celular. O gene encontra-se frequentemente alterado em diversos tipos de tumores. A importância da expressão da ciclina D1 tem sido demonstrada por vários estudos. O ferro (Fe) tem um importante papel no ciclo celular e na tumorigénese, sabendo-se que a depleção de ferro leva à paragem do ciclo celular impedindo a passagem da fase G1/S e consequente apoptose. Recentemente foi demonstrado que a ciclina D1 está sobre-expressa no fígado com excesso de ferro, que a expressão de ciclina D1 é induzida pelo Fe e pode contribuir para o desenvolvimento de anormalidades no ciclo celular. Tendo sido também demonstrado que a ciclina D1 é expressa em linfócitos de sangue periférico.

O trabalho apresentado nesta tese descreve a análise da expressão da Ciclina D1 (*CCND1*) em linfócitos de sangue periférico e avalia a sua relação com a sobrecarga de ferro “in vivo”. Para isso foi analisada a expressão da Ciclina D1 (*CCND1*) em doentes com Hemocromatose Hereditária (HH), uma doença autossómica recessiva do metabolismo do ferro, caracterizada pela absorção aumentada de ferro.

Foram analisados dois grupos, um em tratamento intensivo e outro em fase de manutenção, sendo também analisada a expressão da *CCND1* num grupo de indivíduos sem qualquer patologia (grupo controlo). Este estudo foi efectuado em amostras de sangue periférico obtido dos pacientes da consulta de Hemocromatose, que efectuam flebotomias regulares no Serviço de Hematologia Clínica do Hospital Geral de Santo António, bem como sangue de doadores do mesmo serviço, sendo que esses foram usados como controlos. Foram estudados cinquenta e oito (58) indivíduos, dos quais, trinta e cinco (35) eram homens e

vinte e três (23) mulheres. Cinquenta (50) amostras eram de doentes com hemocromatose hereditária. Dos quais, treze (13) se encontravam a efectuar tratamento intensivo e trinta e sete (37) encontravam-se em tratamento de manutenção. O grupo de indivíduos controlo consistiu em oito (8) indivíduos normais e sem patologia conhecida.

A quantificação da expressão de ciclina D1 foi efectuada por *Real-Time Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR).

Através da análise dos resultados observou-se, que, apesar de globalmente não existirem diferenças entre doentes e controlos, ao analisar isoladamente o grupo de doentes, os resultados indicam que doentes em fase de tratamento intensivo apresentam uma maior expressão de ciclina D1 quando comparados com os doentes em tratamento de manutenção. Os resultados obtidos também demonstram a presença de ciclina D1 nos linfócitos, uma vez que se observou expressão relativa de ciclina D1 em todas as amostras amplificadas e estudadas. A implicação destes resultados é discutida.



Introdução

1. Introdução

1.1. Metabolismo do ferro

O ferro é um dos elementos químicos metálicos mais abundantes no planeta e também um elemento chave para a vida. Nos seres humanos, o ferro representa aproximadamente 35 a 45 mg por kilo do peso corporal, em mulheres e homens adultos, respectivamente (Andrews 1999), sendo que 60-70% está presente na hemoglobina dos eritrócitos (Figura 1.1). O restante apresenta-se sob a forma de mioglobina, citocromos e enzimas (aproximadamente 10%) e armazenado como ferritinas e hemosiderinas nos hepatócitos e macrófagos reticuloendoteliais (entre 20-30%) (Conrad, Umbreit et al. 1999). Sendo um dos metais mais abundantes nos organismos, o ferro desempenha um papel importante em vários processos celulares, participando na síntese de DNA, RNA e proteínas, no transporte de electrões, intervindo na respiração celular, na proliferação e diferenciação celular, no transporte de oxigénio pelo sangue, na regulação da expressão de genes e muitas outras funções de menor importância, mas ainda assim, dependentes do ferro. No entanto, o ferro pode danificar tecidos, através da catalisação do peróxido de hidrogénio em radicais livres que atacam as membranas celulares, proteínas e DNA. Para minimizar este efeito as proteínas sequestram o ferro. Iões de ferro circulam ligados à transferrina do plasma e acumulam-se no interior das células sob a forma de ferritina. Em condições normais, apenas vestígios de ferro existem fora dos depósitos fisiológicos. Apesar de armazenado, o ferro pode ser mobilizado para reutilização. O equilíbrio da quantidade de ferro é crítico já que tanto a sua deficiência como o excesso de ferro são prejudiciais. Alterações do metabolismo do ferro estão entre as doenças mais comuns em humanos (Andrews 1999).

Uma vez que o ferro é essencial para um grande número de funções celulares, um balanço constante na sua absorção, transporte e armazenamento é vital para a homeostasia e conseqüentemente para a saúde. Deficiências no

metabolismo do ferro e nos mecanismos de regulação são responsáveis por um grande número de doenças. No Homem, foram identificadas várias patologias directamente relacionadas com defeitos na absorção e/ou transporte de ferro, tal como a anemia e a hemocromatose hereditária, existindo no entanto outras doenças, que apesar de não derivarem directamente de deficiências ou excesso de ferro, estão indirectamente relacionadas com este, como sejam a hepatite C, tumores e doenças degenerativas como Parkinson, Alzheimer ou Doença de Huntington (Lieu, Heiskala et al. 2001).

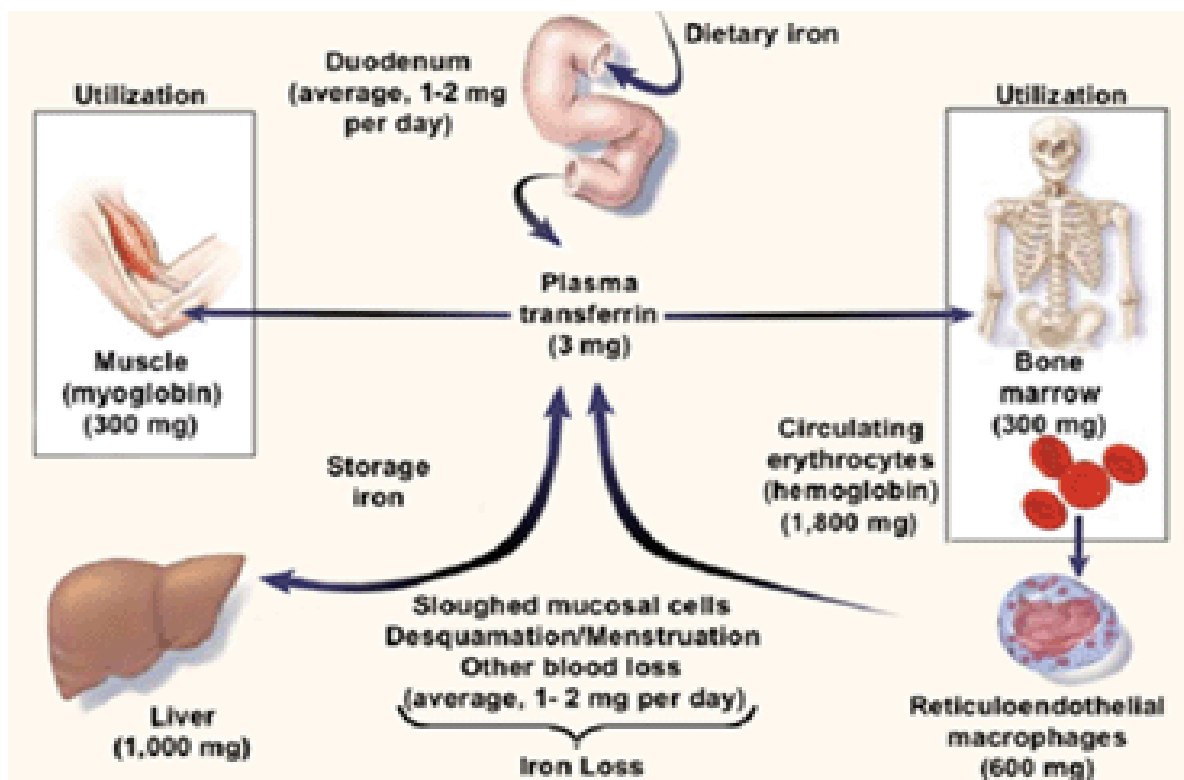


Fig.1.1- Distribuição de Fe no Adulto. Em equilíbrio, 1 a 2 mg de Fe entram e saem do organismo diariamente. O Fe da dieta é absorvido pelos enterócitos duodenais. Circula no plasma ligado à transferrina. A maior parte do ferro do corpo, é incorporado na hemoglobina nos precursores eritróides e células vermelhas maduras. Aproximadamente 10 a 15% está presente nas fibras musculares (na mioglobina) e outros tecidos (em enzimas e citocromos). O ferro é armazenado nas células parenquimatosas do fígado e macrófagos reticulo-endoteliais. Estes macrófagos fornecem a maior parte do ferro utilizável, degradando hemoglobina nos eritrócitos quiescentes e e recarregando Fe férrico em transferrina para ser entregue às células. (adaptada de Andrews et al., 1999).

1.2. Hemocromatose Hereditária

A Hemocromatose Hereditária (HH) é uma doença autossômica recessiva do metabolismo do ferro, caracterizada pela absorção aumentada de ferro e sua deposição no fígado, pâncreas, coração, articulações e glândula pituitária. A cirrose e diabetes mellitus, representam os sinais tardios da doença, em doentes com concentrações marcadamente elevadas de ferro no fígado (Fix and Kowdley 2008). A HH é caracterizada por uma elevada absorção de ferro, que tem como consequência, a acumulação progressiva de ferro nas células parenquimatosas do fígado e de outros órgãos com consequente disfunção e dano dos tecidos, podendo levar a consequências clínicas letais tais como, diabetes, cirrose do fígado e hepatocarcinoma (Hanson, Imperatore et al. 2001; Pietrangelo 2004). A Hemocromatose Hereditária clássica, é a doença genética monoalélica mais frequente em caucasianos. Originalmente descrita como uma doença rara de sobrecarga de ferro grave, a HH acabou por ser reconhecida, no decorrer da última década, e devido ao conhecimento do seu *background* genético, como a doença hereditária de sobrecarga de ferro mais comum entre caucasianos. A maioria dos doentes com HH são provavelmente descendentes de um ancestral comum Celta que viveu há cerca de 60 a 70 gerações atrás (Ajioka, Jorde et al. 1997). O aumento da percepção geral para a doença, entre os clínicos, e o aumento do uso de testes genéticos moleculares na prática clínica, contribuíram para o conceito actual de HH, como doença em que o diagnóstico precoce, estudos familiares e tratamento preventivo são indispensáveis (Porto et al., 2008).

1.2.1 O Gene HFE

Em 1996 foi identificada uma região de 250-kilobases localizada a mais de 3 megabases teloméricas de distância do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) no cromossoma 6 (6p21.3) (Figura 1.2), que era idêntica em mais de 85% dos doentes com HH. Nesta região foi identificado um gene, relacionado com o

complexo maior de histocompatibilidade classe I (MHC classe - I), o gene HFE (Feder, Gnirke et al. 1996).

O gene HFE codifica numa proteína (proteína HFE) transmembranar tipo-I de 343 resíduos, que se associa com a β 2-microglobulina (Feder et al., 1996). Esta proteína liga-se ao receptor da transferrina e reduz a sua afinidade para com o ferro, em 5 a 10 vezes (Feder, Tsuchihashi et al. 1997). O gene HFE está localizado aproximadamente a 4.6 megabases teloméricas do HLA-A, e cobre aproximadamente 10 kilobases (Rhodes and Trowsdale 1999).

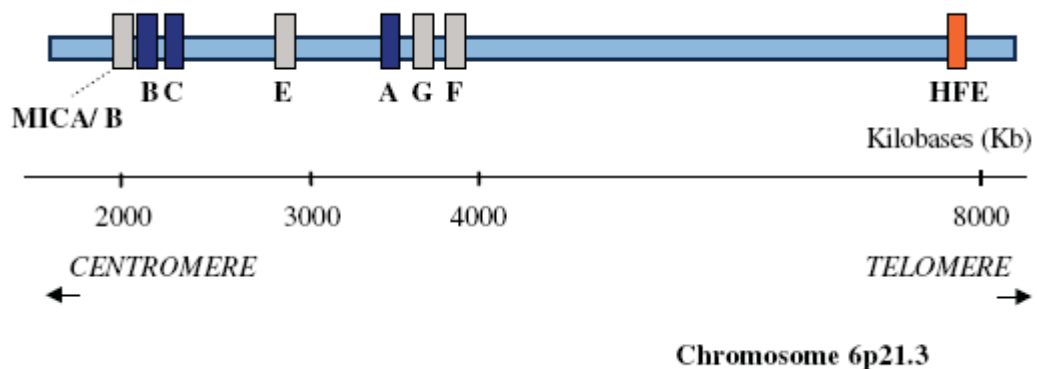


Fig.1.2- Representação esquemática do mapa físico dos genes MHC classe-I, clássicos e não-clássicos, localizados no cromossoma 6. Caixas azuis representam os genes MHC Classe-I clássicos (HLA-A, -B e -C), caixas cinzentas, representam os genes MHC Classe-I não-clássicos (HLA-F, -G, -E e MICA/B) além do HFE, que é representado pela caixa vermelha. De notar a grande distância Física entre o HFE e o alelo HLA-A. (adaptada de Cardoso e De Sousa, 2003).

Existem duas mutações *missense* no gene HFE (C282Y e H63D) (Feder, Gnirke et al. 1996). A mutação C282Y é uma substituição de uma guanidina por uma adenina no nucleótido 845 do gene HFE (845GàA), resultando na substituição da cisteína por uma tirosina no aminoácido 282 e na mutação H63D um G substitui um C no nucleótido 187 do gene (187CàG), resultando na substituição de um aspartato por uma histidina, no aminoácido 63 (Feder, Tsuchihashi et al. 1997; Waheed, Parkkila et al. 1997). Um estudo efectuado por Cardoso e colaboradores, sobre a frequência das duas principais mutações do

HFE (C282Y e H63D) em Portugal (Figura 1.3), demonstram a existência de uma elevada frequência da mutação C282Y no norte do país (Cardoso, Oliveira et al. 2001). A mutação C282Y altera a conformação da proteína HFE e sua associação com a β 2-microglobulina, desregulando o seu transporte e apresentação à superfície da célula, interferindo com a sua função (Lebron, Bennett et al. 1998). Em contraste, a mutação H63D não altera a associação da proteína com a β 2-microglobulina, nem a sua expressão na superfície celular (Waheed, Parkkila et al. 1999), o que indica que a mutação C282Y resulta numa maior perda de função da proteína do que a mutação H63D (Feder, Tsuchihashi et al. 1997). A grande maioria dos doentes com HH, são homocigóticos para a mutação C282Y (Feder, Gnirke et al. 1996).

As mutações no gene HFE estão fortemente associadas ao desenvolvimento da hemocromatose hereditária (Bacon and Sadiq 1997). Apesar de não haver dúvidas de que a mutação C282Y se encontra na maioria dos doentes, existe uma grande variabilidade de expressão clínica nestes doentes, tanto nos homocigóticos para esta mutação, como nos heterocigóticos. Alguns homocigóticos para a C282Y e alguns heterocigóticos não apresentam evidência clínica ou bioquímica da sobrecarga de ferro. Isto indica que outros factores genéticos e ambientais devem afectar a expressão fenotípica da mutação (Bacon, Olynyk et al. 1999).

O diagnóstico de HH pode ser confirmado por análise directa das mutações do gene HFE. Homocigotia para a mutação C282Y juntamente com evidência bioquímica da sobrecarga de ferro, torna inequívoco o diagnóstico de hemocromatose.

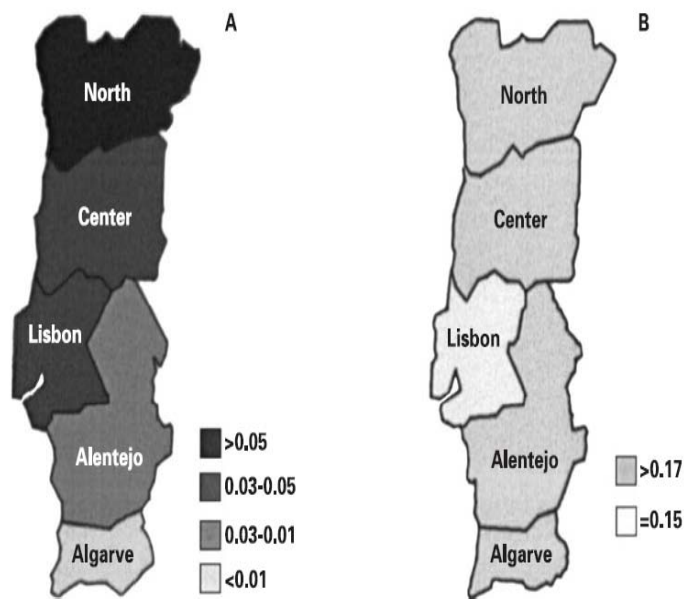


Fig.1.3- Mapas representando a distribuição geográfica das frequências alélicas das mutações C282Y (A) e H63D (B) do HFE, nas 5 regiões de Portugal (adaptada de Cardoso et al., 2001).

1.2.2 A expressão clínica da HH

A HH é caracterizada por uma penetrância incompleta e expressão variável, e as mulheres são menos afectadas do que os Homens pela sobrecarga de ferro e pelas doenças a ela associadas. O diagnóstico de HH é estabelecido por testes genéticos em doentes com valores elevados de saturação transferrina. A Ferritina sérica e a saturação da transferrina, são os indicadores bioquímicos da quantidade de ferro no sangue, podem estar elevadas em pessoas que são heterozigóticos ou homozigóticos para as mutações do HFE (Beutler, Felitti et al. 2000), apesar de apenas os homozigóticos (C282Y/C282Y) e os heterozigóticos compostos (C282Y/H63D) desenvolverem hemocromatose (Bacon, Olynyk et al. 1999).

1.2.3 Tratamento da sobrecarga de ferro

As flebotomias são a terapia recomendada para a diminuição do ferro armazenado na HH, doentes com um diagnóstico estabelecido de HH e sobrecarga de ferro, devem ser tratados com flebotomias para atingirem uma diminuição do ferro corporal, seguidas de flebotomias de manutenção (Fix and Kowdley 2008). Este tratamento é altamente eficaz, seguro e de baixo custo. Os protocolos mais usados actualmente, estabelecem que, no início do tratamento, seja retirada semanalmente, uma unidade de sangue, que corresponde a 400 ml, contendo aproximadamente 250 mg de ferro, até que o nível de ferritina no soro seja <50 ng/ml, altura em que a saturação da transferrina (TfSat) também é, normalmente, inferior a 30%. Esta é a primeira fase do tratamento, ou fase intensiva. Depois da fase intensiva é efectuado um tratamento de manutenção (normalmente de 4 unidades por ano) durante toda a vida, com o objectivo de manter a ferritina do soro abaixo dos 50 ng/ml. Indivíduos homozigóticos para a mutação C282Y, mas nos quais não existem evidências de sobrecarga de ferro, não necessitam de terapia, mas os seus parâmetros bioquímicos do ferro devem ser monitorizados regularmente (Porto, Cardoso et al. 2008).

1.2.4 Os Linfócitos na HH

O gene HFE é um membro da família de genes do MHC classe I. O Complexo MHC é um grupo alargado de genes que se destacam pelo número e importância das funções imunológicas que codificam. Tal como referido por *Feder et al* na sua descrição original do HFE, não é clara a forma como uma proteína do MHC classe I contribui para a sobrecarga de ferro. Uma das hipóteses avançadas foi que a proteína poderia agir indirectamente através de associação com componentes do sistema imunológico e do metabolismo do Fe. A hipótese de que o sistema imunológico teria um papel na monitorização da toxicidade do Fe nos tecidos, como parte de sua função de vigilância, foi inicialmente adiantado em 1978 (De Sousa 1978). Nessa hipótese estava implícito que o sistema linfomiélóide e os seus componentes em circulação participavam no

reconhecimento dos metais, actuando como um mecanismo protector contra a toxicidade do metal e o uso preferencial de metais indispensáveis, tal como o Fe ou zinco, por bactérias ou células transformadas (Porto, Cardoso et al. 2008). Estes estudos reforçam a noção de uma ligação entre o Fe e o sistema imunológico.

Foi observada uma discrepância nas proporções relativas das duas maiores subpopulações de linfócitos T (CD4+ e CD8+) nos doentes com HH (Reimao, Porto et al. 1991). Doentes com médias elevadas de CD4/CD8 (> 2,9) apresentam uma rápida reentrada de Fe no *pool* de transferrina do soro após tratamentos intensivos com flebotomias, atingindo valores de saturação de transferrina elevados (>60%) mais rapidamente do que doentes com médias de CD4/CD8 normais (aproximadamente 1). Encontrou-se uma correlação significativa entre a quantidade de Fe mobilizado por flebotomias e as células CD8+ mas não com as CD4+ (Cruz, Melo et al. 2006). Apesar de as alterações nas populações de linfócitos serem sistematicamente encontradas na subpopulação de linfócitos T CD8+, a associação com o Fe corporal total pode também ser reflectida nos linfócitos totais. Contagens de linfócitos totais baixas estão significativamente associadas com um elevado grau de sobrecarga de Fe na HFE-HH (Porto et al., 2008). Recentemente foi descrita uma relação inversa significativa da contagem de linfócitos totais com a severidade da sobrecarga de Fe em doentes com HH homozigóticos para a C282Y (Barton, Wiener et al. 2005). Alterações específicas nos linfócitos T CD8+ têm sido descritas consistentemente em doentes com HH (para revisão ver Porto et al., 2008).

. A diminuição de células T CD8+CD28+ totais foi inversamente relacionada com a saturação de transferrina, adicionalmente, um aumento na capacidade das células T produzirem várias citocinas (interferon γ , TNF α , IL-2, IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13) e um maior aumento na produção de IL-4 e IL-10 nos homozigóticos para a C282Y

1.3. Ferro e ciclo celular

O ferro é indispensável para a vida e sabe-se que a falta de Fe leva ao impedimento da progressão do ciclo celular (fase G1/S) e à apoptose. O Fe é indispensável para a proliferação celular, uma vez que proteínas contendo Fe, catalisam reacções-chave envolvidas no metabolismo energético, respiração e síntese de DNA (redutase ribonucleótida RR) sendo um componente essencial de várias proteínas e enzimas envolvidas no crescimento celular e replicação tendo um papel crucial na conversão de ribonucleótidos em desoxirribonucleótidos. Por isso o Fe participa no passo limitante de síntese de DNA catalizado pela redutase ribonucleotídica (RR). Sem Fe, as células são incapazes de prosseguir da fase G1 para a fase S do ciclo celular (Lederman, Cohen et al. 1984). Estudos recentes revelam que existe uma grande variedade de moléculas controladoras do ciclo celular que são reguladas pelo Fe, sendo uma destas moléculas a Ciclina D1 (Yu, Kovacevic et al. 2007). A ciclina D1, está sobre-expressa no fígado com ferro em excesso (Troade, Courselaud et al. 2006).

O ciclo celular (Figura 1.4) é constituído por quatro fases ou processos estritamente coordenados: fase M (mitose), fase G1, fase S (síntese de DNA) e fase G2. Na fase M ocorre mitose (divisão celular), seguida da fase G1, que corresponde a um intervalo entre a mitose e o início da replicação de DNA.

Na fase S, em que ocorre replicação do DNA, que por sua vez é seguida da fase G2, durante a qual a célula continua a crescer e a sintetizar proteínas na preparação para a mitose. A progressão das células através do ciclo celular é regulada por sinais extracelulares e internos que monitorizam e coordenam os vários processos que ocorrem durante as diferentes fases do ciclo celular. Esta coordenação entre fases é dependente de um sistema de *checkpoints* (pontos de controlo) e vias bioquímicas de transdução de sinal, que previnem a entrada numa nova fase até que os eventos que ocorrem na fase anterior sejam completados (Nurse 2002).

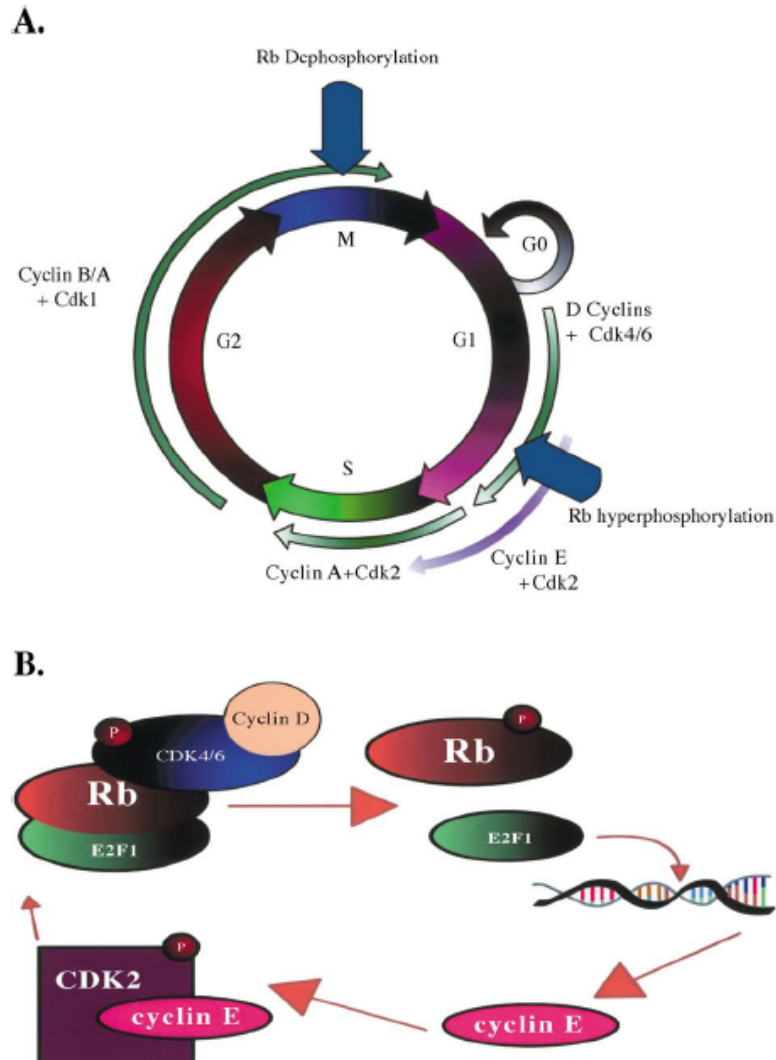


Fig.1.4- (A) Ciclo Celular. (B) Alguns dos eventos moleculares críticos envolvidos na progressão de G1/S. As células entram no ciclo expressando Ciclina D na fase G1, que se liga a cdk4 ou -6 para formar um complexo catalítico envolvido na fosforilação da proteína do retinoblastoma (pRb). Esta última molécula actua como um supressor da família E2F1 de factores de transcrição. A fosforilação do pRb provoca a dissociação do E2F que promove a expressão de uma variedade d genes importantes para a entrada na fase S. Um dos genes sobre-regulado pela E2F1 é a Ciclina E. Esta proteína, quando associada com cdk2 hiperfosforila pRb para levar as células para a fase S. (adaptada de Nghia e Richardson, 2002).

Esta progressão ordenada é controlada por ciclinas, cinases dependentes de ciclinas (CDKs) e pelos seus inibidores. As CDKs promovem o ciclo celular através da fosforilação de proteínas alvo que são necessárias à progressão das

células para uma nova fase do ciclo celular e são activadas por fosforilação após a ligação das ciclina (subunidades reguladoras), formando-se um complexo ciclina-CDK (Kumar V 2003). Embora todas as fases do ciclo celular sejam estritamente reguladas, a transição da fase G1 para a fase S constitui um ponto de controlo com uma importância particular, pois após esta passagem as células são forçadas a progredir através da fase S (Sherr 1996). Quando a célula recebe sinais indutores de crescimento, a síntese de ciclinas D (que complexam com as CDK4 e CDK6) e de ciclina E (que complexa com o CDK2) são estimuladas. Estes complexos fosforilam a proteína retinoblastoma (RB) e provocam a libertação dos factores de transcrição que vão activar a expressão de genes necessários à progressão através da fase S do ciclo celular (Sherr 1995; Hirai and Sherr 1996; Sherr 1996).

A ciclina D1 tem sido particularmente estudada, devido ao seu papel importante na promoção da carcinogénese. Dos três tipos de ciclinas D existentes, sendo que cada uma se liga a cinases dependentes de ciclina específicas (CDKs), é a sobre-expressão da ciclina D1 que está predominantemente associada com as metástases celulares e tumorigénese humana (Fu, Wang et al. 2004).

1.4. Ciclina D1

A ciclina D1 é uma proteína de 33.7 Kda codificada pelo gene CCND1, localizado no cromossoma 11q13 (figura 1.5) (Bates and Peters 1995). O gene CCND1, também é designado de bcl-1 ou PRAD1. Esta proteína actua no ciclo celular acelerando a fase G1 e foi descrita como um oncogene. A Ciclina D1 é essencial para a progressão das células através da fase G1 do ciclo celular. O Proto-oncogene Ciclina D1, é um importante regulador da transição G1/S do ciclo celular. A ligação da Ciclina D1 às cinases CDK4/CDK6 (cinases dependentes da ciclina) resulta na formação de complexos activos que fosforilam a proteína supressora do retinoblastoma (Rb) (figura 1.6). A hiperfosforilação do Rb, resulta na libertação dos factores de transcrição da E2F e subsequente expressão dos genes necessários para entrar na fase S. Estudos iniciais indicavam que a ciclina

D1 se localizava predominantemente no núcleo de células em crescimento (Baldin, Lukas et al. 1993), mas estudos mais recentes mostram que a ciclina D1 também é expressa por linfócitos em repouso, em níveis comparáveis com aqueles observados em linhas celulares tumorais em proliferação (David Kaplan 2005).

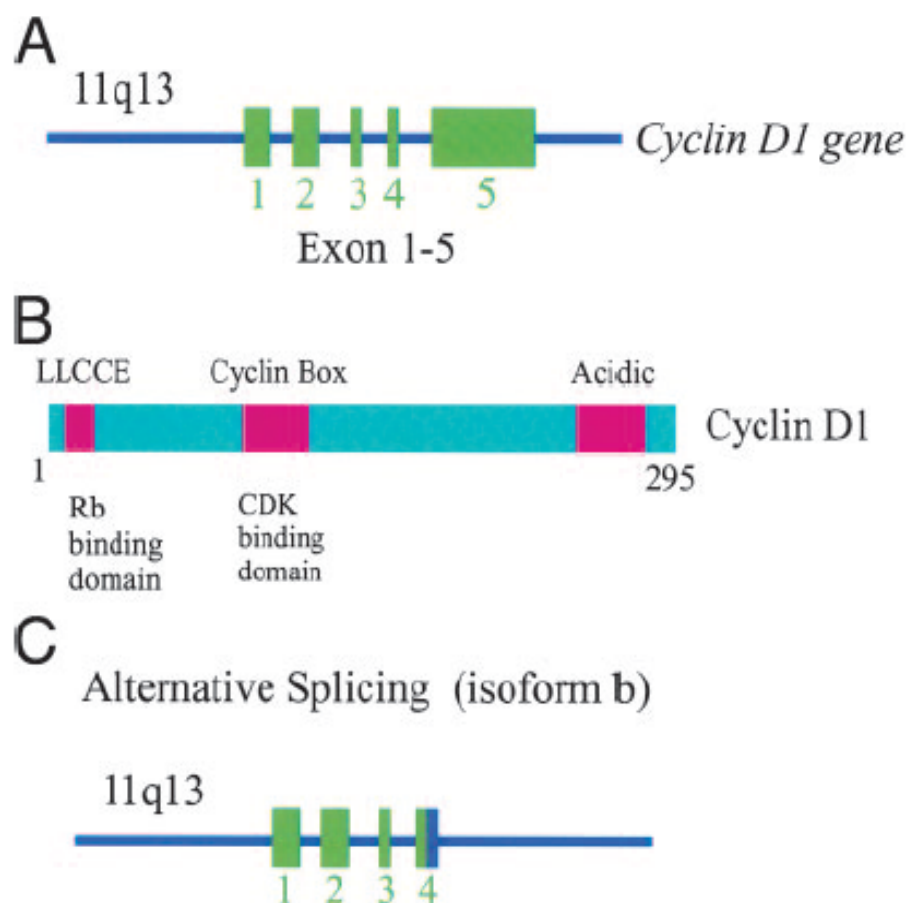


Fig.1.5- Estrutura da Ciclina D1. Representação esquemática da estrutura genômica do gene da Ciclina D1 (A), domínios funcionais da proteína da Ciclina D1 (B), e "splicing" alternativo da ciclina D1 (C). A sequência da Ciclina D1, derivada do intrão 4 é mostrada a azul. (adaptada de Maufu et al., 2004).

Tem sido observado que o aumento da ciclina D1 desregula o ciclo celular e contribui para a formação de tumores. O gene (CCND1) foi originalmente isolado como um gene clonado, rearranjado e sobre-expresso em adenomas da

paratiróide (Motokura, Bloom et al. 1991). A sobre-expressão de CCND1 tem sido descrita em vários tipos de tumores, nomeadamente cólon (Palmqvist, Oberg et al. 1998), mama (Marsh KL 1998), cabeça- pescoço (Callender, el-Naggar et al. 1994), pulmão (Betticher, Heighway et al. 1996), bexiga (Sgambato, Migaldi et al. 2002), fígado (Nishida, Fukuda et al. 1994) e próstata (Chen, Martinez et al. 1998). A sobre-expressão de CCND1 foi correlacionada com a proliferação aumentada, podendo originar a passagem prematura da célula através do ponto e controlo G1/S, resultando na propagação de erros não reparados no DNA, acumulação de erros genéticos e numa vantagem selectiva de crescimento para as células alteradas (Quelle, Ashmun et al. 1993; Zheng, Shen et al. 2001).

Assim, a ciclina D1 é um regulador chave da fase G1 do ciclo celular. Inibição da função da ciclina D1, resulta na paragem do ciclo celular, e é necessária para a introdução do PCNA (antígeno nuclear de proliferação celular) nas estruturas nucleares, reparação do DNA e início da replicação, enquanto que a sobre-expressão da ciclina D1 impede a reparação de DNA e introdução do PCNA após danificação do DNA (Pagano, Theodoras et al. 1994; Fukami-Kobayashi and Mitsui 1999). Recentemente, foi demonstrado que a expressão da ciclina D1 em hepatócitos de ratinho é promovida pelo excesso de ferro, alterando assim o ciclo celular. Esta expressão da ciclina D1, induzida pelo Fe, pode contribuir para o desenvolvimento de anormalidades no ciclo celular, indicando um papel da ciclina D1 na hepatocarcinogénese relacionada com o Fe (Troadec, Courselaud et al. 2006). Não existem estudos do papel da ciclina D1 e sua relação com a sobrecarga de ferro em humanos.

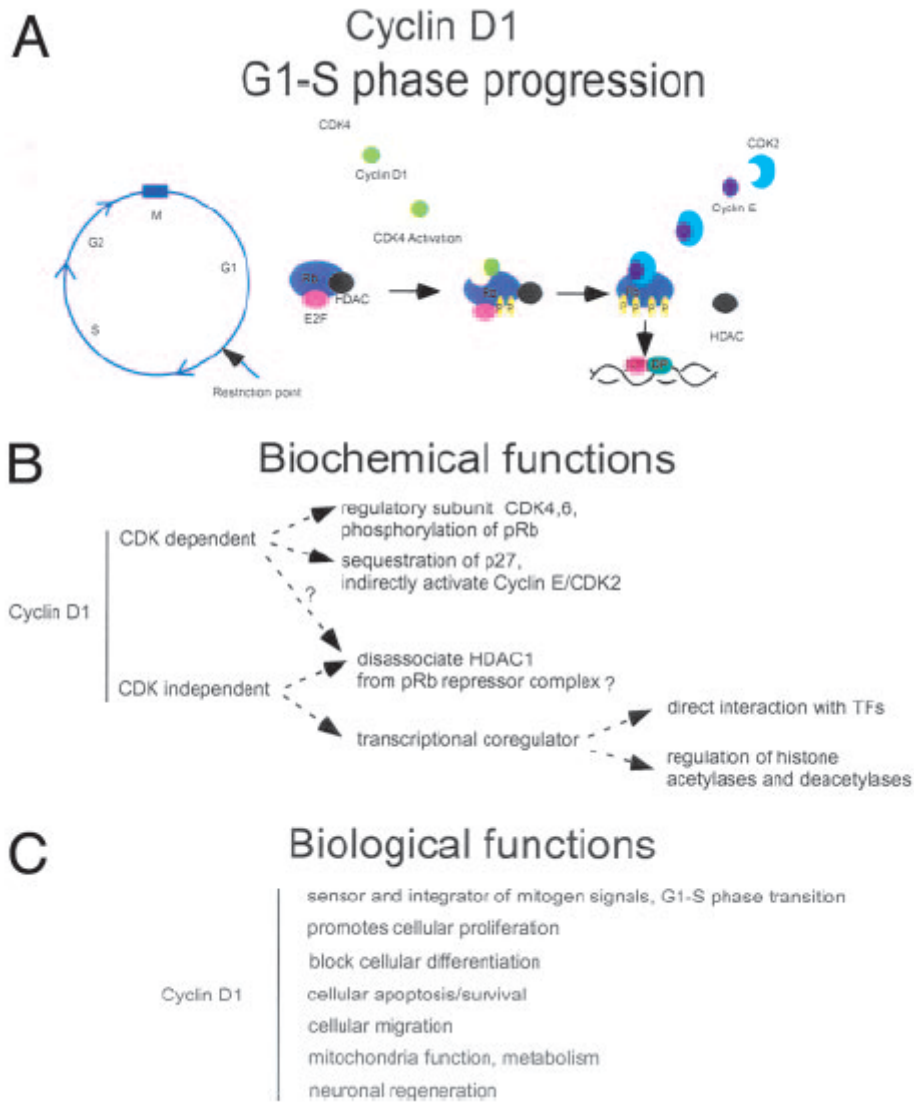


Fig.1.6- Funções da Ciclina D1. Papel da ciclina D1 na progressão da fase G1-S do ciclo celular (A), funções bioquímicas da Ciclina D1 (B), e funções biológicas da ciclina D1 (C).. (adaptada de Maufu et al., 2004)

1.5. Objectivos do trabalho

Este estudo foi desenvolvido com o objectivo de analisar a expressão da Ciclina D1 (*CCND1*) em linfócitos de sangue periférico e avaliar a sua relação com a sobrecarga de ferro “in vivo”.

Para isso foi analisada a expressão da Ciclina D1 (*CCND1*) em dois grupos de doentes com Hemocromatose Hereditária (HH), um em tratamento intensivo e outro em fase de manutenção, sendo também analisada a expressão da *CCND1* num grupo de indivíduos sem qualquer patologia (grupo controlo).



Material e métodos

2. Material e métodos

2.1. A população

Neste trabalho foi realizado um estudo em amostras de sangue periférico obtido dos pacientes da consulta de Hemocromatose, que efectuam flebotomias regulares no Serviço de Hematologia Clínica do Hospital Geral de Santo António, bem como sangue de dadores do mesmo serviço, sendo que esses foram usados como controlos.

Foram estudados cinquenta e oito (58) indivíduos, dos quais, trinta e cinco (35) eram homens e vinte e três (23) mulheres. Cinquenta (50) amostras eram de doentes com hemocromatose hereditária. Dos quais, treze (13) se encontravam a efectuar tratamento intensivo e trinta e sete (37) encontravam-se em tratamento de manutenção. O grupo de indivíduos controlo consistiu em oito (8) indivíduos normais e sem patologia conhecida.

Os dados laboratoriais e clínicos de todos os indivíduos estudados neste trabalho foram obtidos dos seus processos clínicos. Foi previamente obtido de todos os doentes e controlos o consentimento informado de acordo com a Declaração de Helsínquia e aprovado pela Comissão de Ética do Hospital Geral de Santo António. Na tabela 1 é mostrado um resumo das características clínicas dos casos estudados.

Tabela 1- Características clínicas dos casos estudados .

	Frequência	%
Sexo		
Feminino	23	39,7
Masculino	35	60,3
Total	58	100,0
Tratamento		
Controlo	8	13,8
Manutenção	37	63,8
Intensivo	13	22,4
Total	58	100,0

2.2. Genotipagem do HFE

A genotipagem do HFE foi efectuada usando um Kit comercial, Haemochromatosis StripAssay B (Vienna Lab, Vienna, Austria). Este kit é baseado no principio da hibridização reversa. O procedimento inclui 3 passos: (1) Isolamento do DNA, (2) Amplificação por PCR utilizando *primers* biotinilados, (3) Hibridização dos produtos de amplificação numa tira de teste com sondas oligonucleotídicas específicas de um alelo num *array* de linhas paralelas. As sequências biotiniladas ligadas são detectadas usando fosfatase alcalina-estreptavidina e substratos de cor. O teste engloba 3 mutações no gene HFE: H63D, S65D, C282Y.

2.2.1. Isolamento do DNA

Para o isolamento do DNA, foram usados 100µl de sangue total ao qual foi adicionado, 1000µl de *Lysis Solution* do kit da ViennaLab (préviamente colocada à temperatura ambiente). Inverteu-se bem e deixou-se à temperatura ambiente 15 minutos e a seguir centrifugando 5 minutos a 3000 rpm. Retirou-se 1000µl de sobrenadante adicionando ao *pellet* 1000µl de *Lysis Solution*. Centrifugou-se 5 minutos a 11000 rpm.

Retirou-se com a pipeta todo o sobrenadante e adicionou-se ao *pellet* 200µl de solução *GEN*TRACT Resin* e vortex alguns segundos. Os tubos foram colocados no banho a 56°C durante 20 minutos e depois 10 minutos a 96°C. Centrifugou-se 5 minutos a 11000 rpm. Retirou-se o sobrenadante (DNA) para um novo tubo eppendorf.

2.2.2. PCR

Para a amplificação por PCR, para cada reacção colocou-se num tubo de PCR, 6,2µl *Amplification Mix*, 2,1µl *Dilution Buffer*, 2,1µl *Taq DNA Polymerase* e 2,1µl de DNA. O programa de PCR utilizado foi: Pré-PCR: 94°C/2min. PCR: 94°C/15seg.; 58°C/30seg.; 72°C/30seg.; 30 ciclos. Extensão final: 72°C/ 3min.

2.2.3. Hibridização

Adicionou-se 10 µl de *DNAT* no berço de hibridização e em seguida 10 µl de produto de PCR misturando bem. Após 5 minutos adicionou-se 500 µl de *Hybridization Buffer* a cada *lane* do berço. Colocou-se com a pinça uma *strip* em cada *lane* do berço. Este foi depois colocado no banho com agitação moderada a 45°C, durante 30 minutos. Retirou-se a solução com o aspirador de vácuo e procedeu-se à lavagem das *strips* adicionando 500 µl de solução A, colocou-se o berço no banho a 45°C durante 15 minutos a agitar moderadamente. Retirou-se a solução com o aspirador de vácuo e voltou a adicionar-se 500 µl de solução A, voltando a colocar no banho com agitação a 45°C durante 15 minutos.

Para revelação da cor, procedeu-se á aspiração da solução e adicionou-se 500 µl de *Conjugate solution* e colocando em seguida à temperatura ambiente a agitar a ± 400 no agitador orbital durante 15 minutos. Aspirou-se a solução com o aspirador de vácuo e adicionou-se 500 µl de solução B, agitou-se na bancada durante alguns segundos e aspirou-se, repetindo novamente a adição de solução B e colocando a agitar durante 5 minutos, à temperatura ambiente num agitador horizontal.

Retirou-se solução com aspirador de vácuo e adicionou-se 500 µl de *Color Developer Solution* envolvendo de seguida o berço em papel de prata. Este foi depois colocado a agitar num agitador horizontal durante ± 15 minutos. Após as bandas serem visíveis, ou após os 15 minutos, retirou-se a solução com o aspirador de vácuo e lavaram-se as *strips* com água destilada procedendo-se de seguida á interpretação.

2.3. Doseamento da Ciclina D1 em células mononucleares do sangue periférico (PBMC's)

Para dosear a expressão de ciclina D1 nos linfócitos (Células mononucleares de sangue periférico) foi usado sangue total, aproximadamente 30 ml de sangue periférico dos indivíduos atrás referidos. O sangue foi obtido e

usado durante as 4 horas que se seguiram à flebotomia e os PBMC's foram isolados e purificados de acordo com a técnica que se descreve a seguir.

2.3.1. Isolamento de Células Mononucleares do sangue periférico (PBMC'S)

As células mononucleares do sangue periférico, foram isoladas de sangue total.

O sangue foi diluído 1:1 em PBS num tubo falcon, colocou-se 12,5 ml de lymphoprep num tubo falcon e depositou-se com cuidado 25 ml de sangue diluído em cima do lymphoprep no tubo, com recurso a uma pipeta de pasteur descartável, sem misturar. Centrifugou-se a 800g durante 30 minutos. Cuidadosamente retirou-se o buffy coat, com uma pipeta pasteur, e transferiu-se para novo tubo falcon de 50 ml. Seguiu-se uma lavagem adicionando PBS 1X até 50 ml. Sendo esta primeira lavagem efectuada a 1800 rpm, durante 10 minutos. Descartou-se o sobrenadante, ressuspendeu-se o pellet e procedeu-se a uma segunda lavagem, adicionando PBS1X até perfazer os 50 ml e centrifugando a 1500 rpm durante 10 minutos.

2.3.2. Isolamento de RNA total de sangue periférico

RNA total foi extraído dos PBMC's usando o Rneasy Midi Kit (Qiagen) incluindo o passo opcional On-Column Dnase Digestion with Rnase-free Dnase (Qiagen). Os pellets de PBMC's foram ressuspendidos em 2 ml de buffer RLT/ β -ME (10 μ l de β -Mercaptoetanol por 1 ml de buffer RLT, para lise celular), e homogeneizados no vortex durante um minuto. Adicionou-se em seguida um volume (2ml) de etanol a 70%, misturando-se por agitação.

A amostra foi carregada numa coluna Rneasy colocada num tubo de 15 ml e centrifugada durante 5 minutos. Procedeu-se depois a uma primeira lavagem da coluna, com 2 ml de buffer RW1 por centrifugação durante 5 minutos. Após esta primeira lavagem, descartou-se o "Flow-Trough" e adicionou-se 160 μ l de Dnase1

(20 µl solução stock de Dnase1 e 140 µl de buffer RDD, para digestão de DNA genómico), incubado-se durante 15 minutos à temperatura ambiente.

Efectuou-se uma segunda lavagem, com adição de 2 ml de buffer RW1 seguida de 2 lavagens com 2.5 ml de buffer RPE, centrifugando-se durante 2 e 5 minutos, respectivamente. A coluna foi depois transferida para um novo tubo de 15 ml e o RNA retido foi eluído com 150 µl de água livre de Rnases .

A concentração de RNA foi determinada por medição espectrofotométrica a 260 e 280 nm. Todas as centrifugações foram realizadas numa centrífuga Multifuge 3SR (Heraeus), a 23°C e 4000 g.

2.3.3. Isolamento de cDNA

A transcrição reversa do mRNA foi feita usando o kit SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen). Resumidamente, a transcrição reversa usou 0.5 µg RNA, 1 µl 10 mM dNTP mix, 1 µl Oligo(dT)(0,5 µg/µl) e água tratada com DEPC até 10 µl, incubação a 65°C durante 5 minutos, adição de 2 µl de 10x RT Buffer, 4µl 25 mM MgCl₂, 2 µl 0,1 M DTT, 1 µl Rnase OUT, incubação a 42°C por 2 minutos, adição de 1 µl SuperScript II RT, incubação a 42°C durante 50 minutos e 70°C durante 15 minutos. Adição de 1 µl de RNase H e incubação final a 37°C durante 20 minutos.

2.4. Análise da expressão da Ciclina D1

A quantificação da expressão de ciclina D1 foi efectuada por *Real-Time Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR). Para controlar as variações experimentais na quantidade de RNAm usado em cada RT-PCR bem como variações nos reagentes de PCR, foi usada a quantificação de um “*housekeeping gene*”, o Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*) para normalizar os níveis de expressão do RNAm de ciclina D1. Os níveis relativos de expressão do RNAm e *CCND1* foram calculados como $2^{(Ct_{GAPDH} - Ct_{CCND1}) * 10000}$. Para cada gene, uma série de diluições consistindo em 4 diluições seriadas foi usada durante a

otimização do procedimento. Todas as experiências de RTP-CR foram efectuadas em triplicado, com 2 a 3 replicados cada.

Os primers usados para amplificar o RNAm da ciclina D1 e do GAPDH estão listados na tabela 2.

Tabela 2- Primers usados no Real-Time Quantitive Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction Assay.

Primers	Sequências nucleotídicas
<i>Cyclin D1</i>	
Forward (CycD1 F4)	5' – TCC TCT CCA AAA TGC CAG AG - 3'
Reverse (CycD1 R4)	5' – GGC GGA TTG GAA ATG AAC TT – 3'
<i>GAPDH</i>	
Forward (GAPDH F10)	5'- GAA GGT GAA GGT CGG AGT C -3'
Reverse (GAPDH R10)	5'- GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC -3'

2.4.1. PCR em tempo real

Na quantificação por Real-Time PCR dos RNAm da ciclina D1 e do *GAPDH* usou-se o iQ5 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). Foram usados 3µl do produto da transcrição reversa na reacção de PCR tendo-se utilizado o fluorocromo iQ™SYBR®Green SuperMix (Bio-Rad) , de acordo com as instruções do fabricante.

A formação de dímeros de *primers* e a pureza do produto amplificado foram avaliadas através da análise das *melting curves* dos PCR em tempo real. A expressão de *GAPDH* não variou significativamente entre os grupos experimentais, tendo este gene sido usado como controlo interno.

Foi usada a seguinte Master Mix:

- 10µl de iQ™SYBR®Green (BioRad)

- 0,25µl Primer CycD1 F4 (5'–TCC TCT CCA AAA TGC CAG AG - 3')
- 0,25µl Primer CycD1 R4(5'–GGC GGA TTG GAA ATG AAC TT – 3')
- 7,5 µl H2O Sigma

2.5. - Análise Estatística

A análise estatística dos resultados foi efectuada com o auxílio do software estatístico Statgraphics™ centurion (Version XV).

Uma vez que os valores obtidos não têm uma distribuição normal, para efeito de comparação dos valores de CCND1 entre os grupos, foi usado o teste não paramétrico Kolmogorov-Smirnov (K-S). A correlação entre variáveis foi testada na análise de Regressão Simples. Também foi usado o teste Mann-Whitney-Wilcoxon em todas as análises.

Em todos os testes estatísticos utilizados o valor de p obtido foi considerado estatisticamente significativo quando inferior a 0,05.



Resultados

3. Resultados

3.1. Quantificação da Ciclina D1

Após a separação dos PBMC'S, extração de RNAm e subsequente síntese de cDNA a partir de sangue periférico obtido das flebotomias dos doentes, todas as amostras foram amplificadas por PCR em tempo real para a respectiva quantificação e análise da expressão relativa da ciclina D1.

Para controlar a integridade do RNA e normalizar o número de cópias de CCND1 nos PBMC's, o GAPDH, um *housekeeping gene*, também foi amplificado por real-time RT-PCR.

O RNAm da ciclina D1 e do GAPDH foi detectado em todas as amostras testadas (tabela 3). A formação de dímeros de *primers* e a pureza do produto e amplificação foram avaliadas através da análise das *melting curves* dos PCR em tempo real (figura 3.1 e figura 3.2) A expressão de GAPDH não variou significativamente entre os grupos experimentais, tendo este gene sido usado como controlo interno.

Os valores da expressão relativa da ciclina D1 observados variaram entre 3,74 e 60,87. Esses valores foram analisados e comparados de acordo com diferentes parâmetros: Clínicos (a idade, sexo, classe -doente ou controlo, tipo de tratamento- intensivo ou manutenção, número de flebotomias), bioquímicos (ferritina , saturação da transferrina) e hematológicos (Leucócitos totais, linfócitos, neutrófilos e monócitos).

Tabela 3- Os níveis de mRNA do GAPDH e da CCND1 são expressos em número de cópias por µg de RNA Total. Controlos(0), Tratamento intensivo (1), Tratamento de manutenção (2).

Indivíduo	Sexo	Idade	Tratamen to	GAPDH AVG	CYC D1 AVG	Indivíduo	Sexo	Idade	Tratamen to	GAPDH AVG	CYC D1 AVG
1	M	45	0	21,13	31,77	32	M	52	1	22,41	31,81
2	F	43	0	18,97	29,6	33	M	47	1	22,33	31,55
3	M	54	0	20,04	30,25	34	M	45	1	20,56	29,62
4	F	48	0	21,45	31,22	35	M	49	1	20,16	29,16
5	M	23	0	21,44	30,65	36	M	54	1	21,12	30,11
6	F	36	0	21,26	30,03	37	F	49	1	19,76	28,75
7	F	43	0	21,62	29,63	38	M	42	1	20,16	29,13
8	F	38	0	21,61	29,56	39	M	62	1	22,86	31,63
9	M	31	1	22,76	37,48	40	F	66	1	21,49	30,21
10	M	59	1	22,58	34,77	41	F	-	1	21,46	30,16
11	M	64	1	19,93	31,32	42	F	71	1	21,12	29,82
12	F	66	1	19,7	30,98	43	M	31	1	20,35	28,93
13	M	56	1	18,57	29,74	44	M	32	1	21,39	29,84
14	M	64	1	18,8	29,66	45	F	62	1	21,04	29,38
15	F	65	1	20,67	31,14	46	M	56	1	22,14	30,43
16	F	54	1	20,42	30,84	47	M	42	1	22,84	31,03
17	M	62	1	21,24	31,61	48	M	56	1	20,59	28,74
18	F	46	1	21,87	32,19	49	F	54	1	20,69	28,77
19	M	61	1	25,59	35,75	50	M	62	1	22,55	30,54
20	M	69	1	21,31	31,46	51	M	42	1	21,97	29,64
21	F	53	1	20,06	30,16	52	F	61	1	21,84	29,45
22	M	52	1	20,91	30,96	53	F	61	1	23,53	30,89
23	M	31	1	19,54	29,51	54	M	40	2	21,19	31,45
24	M	48	1	20,45	30,34	55	F	71	2	20,59	30,66
25	M	33	1	19,22	29,11	56	F	71	2	20,1	29,72
26	M	58	1	20,24	30,04	57	M	68	2	20,81	30,31
27	F	57	1	22,64	32,39	58	M	46	2	24,14	33,4
28	M	54	1	19,68	29,35	59	F	70	2	21,49	30,68
29	M	49	1	24,23	33,8	60	M	67	2	21,03	29,94
30	F	67	1	20,27	29,72	61	M	49	2	20,8	29,63
31	M	31	1	20,08	29,48	62	F	54	2	21,79	30,24

3.2. Expressão da Ciclina D1 em função dos parâmetros clínicos e laboratoriais

3.2.1. Parâmetros Clínicos

Ao analisar a expressão relativa da ciclina D1 e relacionando os valores obtidos com o sexo, 35 indivíduos do sexo masculino e 23 do sexo feminino, não foi observada uma correlação ($p=0,689$), como descrito na figura 3.3.

Em relação à idade dos indivíduos testados, que varia entre os 23 e os 71 anos, a expressão relativa da ciclina D1 também não se encontrou uma correlação significativa ($p=0,423$) como se pode observar na figura 3.4.

No que diz respeito à classe doentes versus controlos, foram analisados 8 controlos e 36 doentes não tendo sido observada uma correlação significativa em relação à expressão relativa da ciclina D1 em ambos os grupos ($p=0,675$). Fig.3.5.

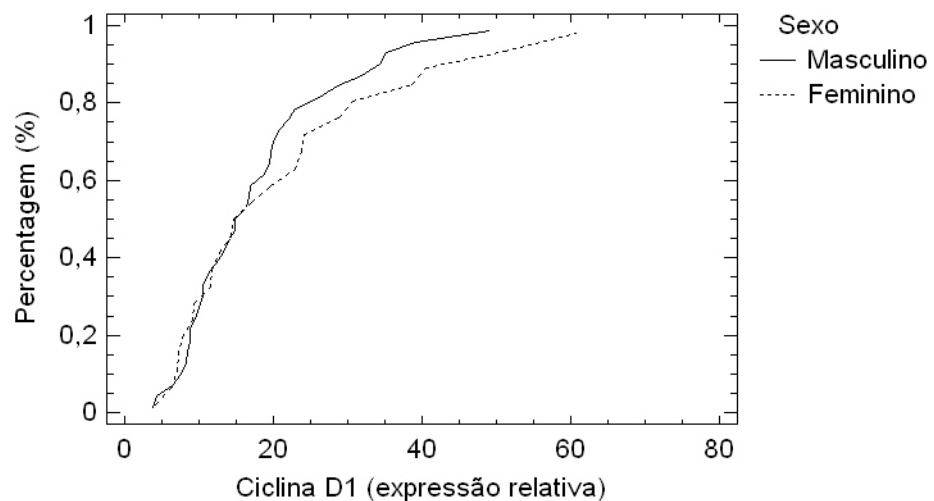


Fig.3.3- Expressão relativa da ciclina D1 de acordo com o sexo.

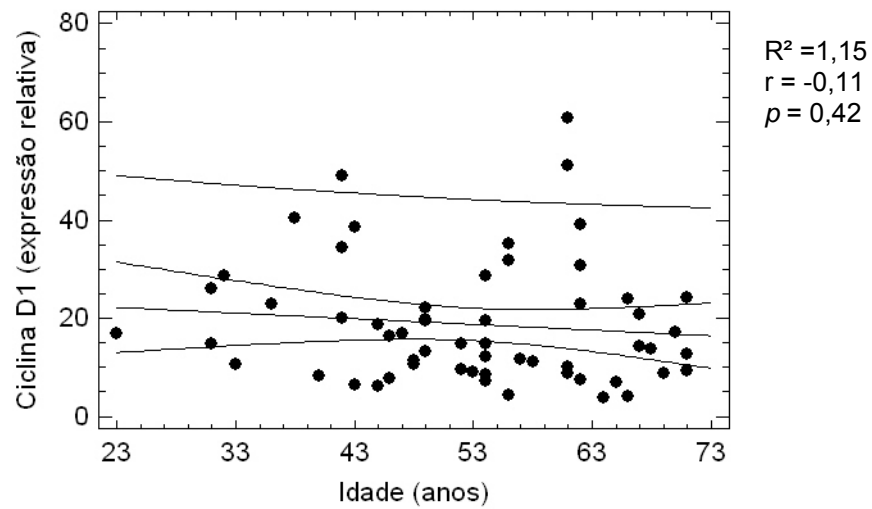


Fig.3.4- Regressão linear simples da expressão relativa da CCND1 em diferentes idades. Os valores do R-Quadrado (R^2), coeficiente de correlação (r) e do nível de significância (p) estão indicados.

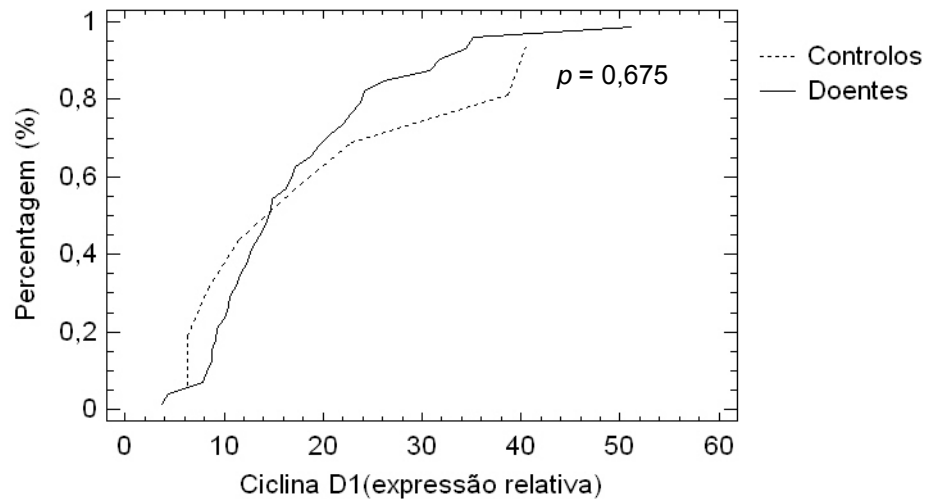


Fig.3.5- Frequências da distribuição comparativa e cumulativa da expressão relativa da Ciclina D1 entre doentes e controlos. O nível de significância (p) está indicado e foi testado pelo teste não- paramétrico Kolmogorov-Smirnov.

No entanto, ao comparar a expressão da ciclina D1 do subgrupo de doentes que se encontravam em tratamento de manutenção (n=37) com o subgrupo de doentes em tratamento intensivo (n=13), verificou-se que os doentes diferiam significativamente de acordo com a fase de tratamento, tendo os doentes em tratamento intensivo valores mais elevados do que os doentes em tratamento de manutenção. De acordo com o teste Mann-Whitney-Wilcoxon existe uma correlação entre a expressão relativa da ciclina D1 e a fase de tratamento ($p=0,028$; $W=-99,5$). Este resultado está ilustrado na figura 3.6.

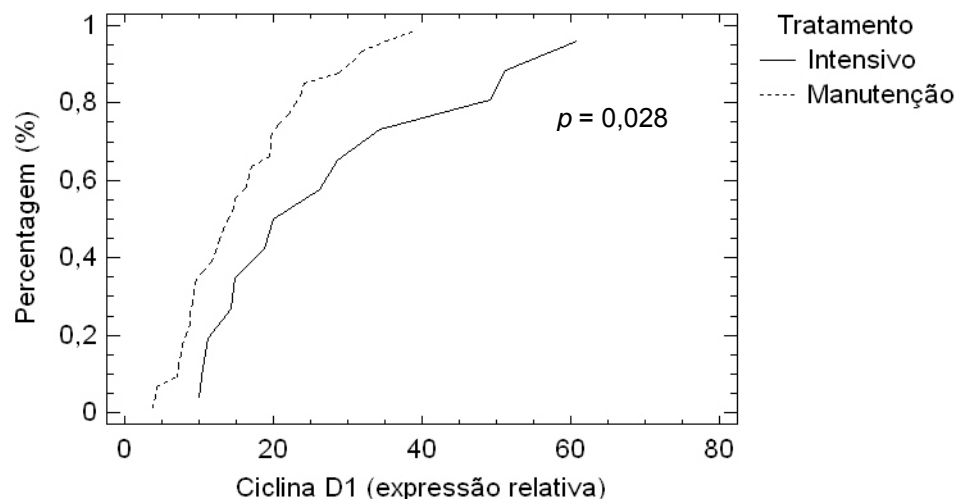


Fig.3.6- Frequências da distribuição comparativa e cumulativa da expressão relativa da Ciclina D1 entre doentes em fase de tratamento intensivo e doentes em fase de tratamento em manutenção. O nível de significância (p) está indicado e foi testado pelo teste Mann-Whitney-Wilcoxon.

3.2.2. Parâmetros Bioquímicos

Ao analisar a expressão da ciclina D1 de acordo com os valores da saturação da transferrina (TfSat) e com os valores da ferritina sérica (F) nos doentes, não foi encontrada nenhuma correlação entre os valores de ciclina D1 e os valores de TfSat (Fig. 3.7 e 3.8) nem com os valores de F (Fig. 3.9 e 3.10).

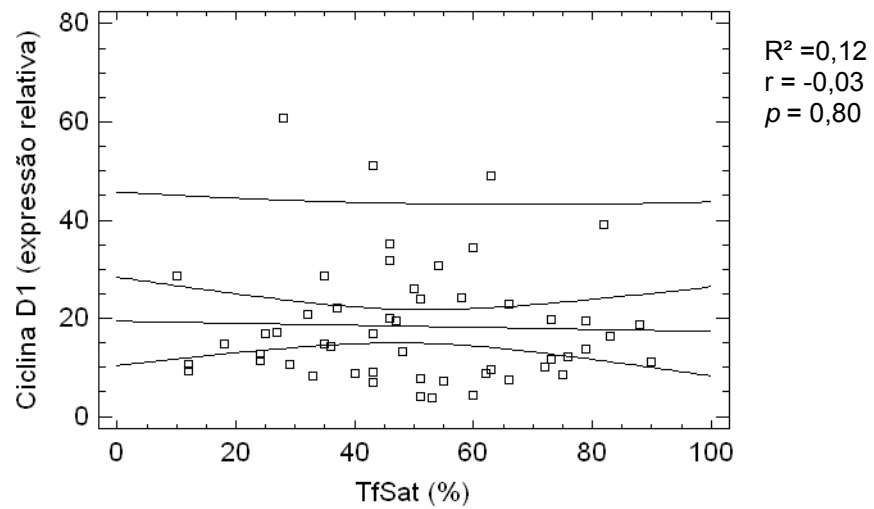


Fig.3.7- Regressão linear simples da expressão relativa da CCND1 com a TfSat dos doentes. Os valores do R-Quadrado (R^2), coeficiente de correlação (r) e do nível de significância (p) estão indicados.

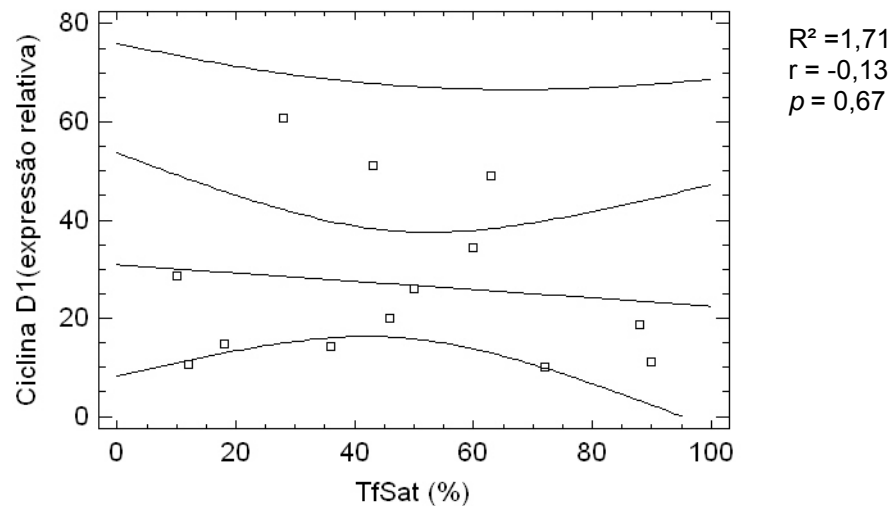


Fig.3.8- Regressão linear simples da expressão relativa da CCND1 com a TfSat dos doentes em tratamento intensivo. Os valores do R-Quadrado (R^2), coeficiente de correlação (r) e do nível de significância (p) estão indicados.

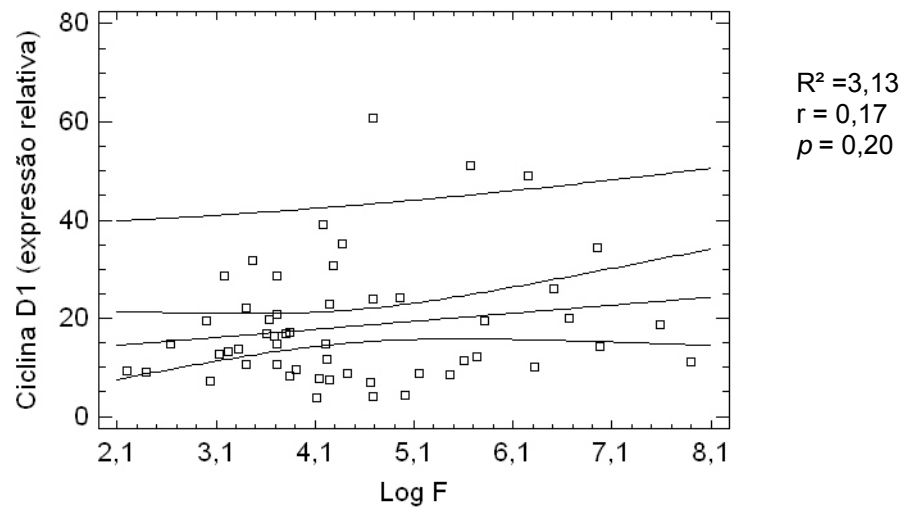


Fig.3.9- Regressão linear simples da expressão relativa da CCND1 com a Ferritina sérica (F) dos doentes . Os valores do R-Quadrado (R^2), coeficiente de correlação (r) e do nível de significância (p) estão indicados.

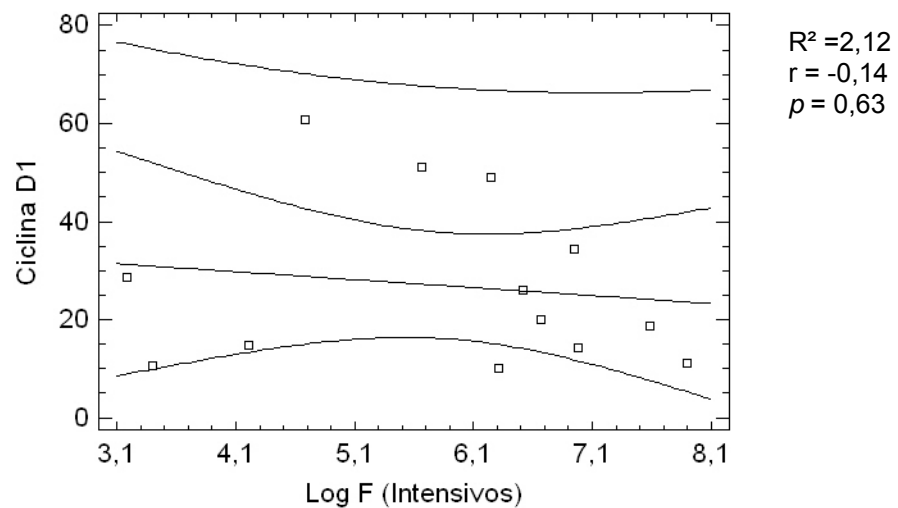


Fig.3.10- Regressão linear simples da expressão relativa da CCND1 com a Ferritina sérica (F) dos doentes em tratamento intensivo. Os valores do R-Quadrado (R^2), coeficiente de correlação (r) e do nível de significância (p) estão indicados.

3.2.3. Parâmetros Hematológicos

3.2.3.1. Leucócitos totais

De acordo com os valores obtidos, não existe correlação na expressão de ciclina D1 em relação ao número de leucócitos nos doentes analisados ($p=0,452$), mas ao efectuar esta mesma análise apenas no subgrupo de doentes em tratamento intensivo ($n=13$) foram encontradas diferenças significativas ($p=0,0103$). Figura 3.11.e 3.12

3.2.3.2. Linfócitos

A expressão da ciclina D1 observada de acordo com o número de linfócitos dos doentes, não apresentou correlação significativa ($p=0,794$) e dentro do grupo de doentes, no subgrupo em tratamento intensivo também não foi encontrada correlação ($p=0,249$). Fig. 3.13 e Fig. 3.14.

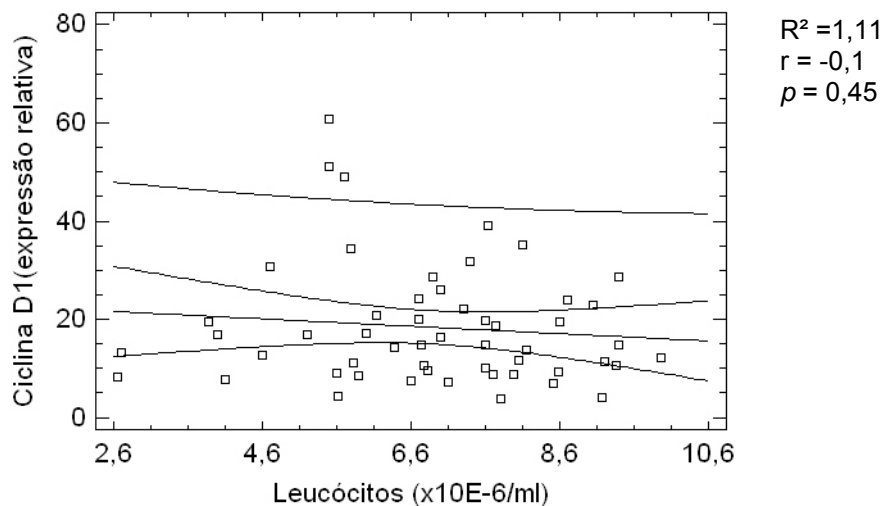


Fig.3.11- Regressão linear simples da expressão relativa da CCND1 com o número de Leucócitos totais dos doentes. Os valores do R-Quadrado (R^2), coeficiente de correlação (r) e do nível de significância (p) estão indicados.

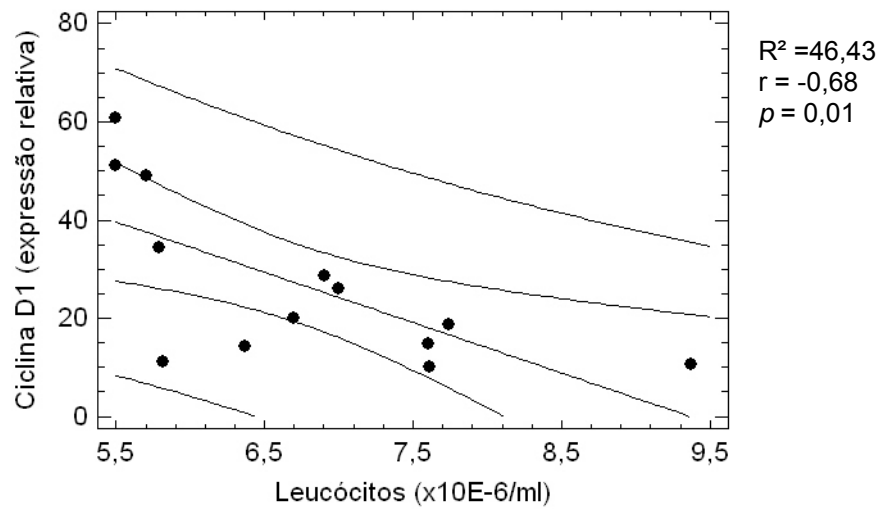


Fig.3.12- Regressão linear simples da expressão relativa da CCND1 com o número de Leucócitos totais dos doentes em tratamento intensivo. Os valores do R-Quadrado (R^2), coeficiente de correlação (r) e do nível de significância (p) estão indicados.

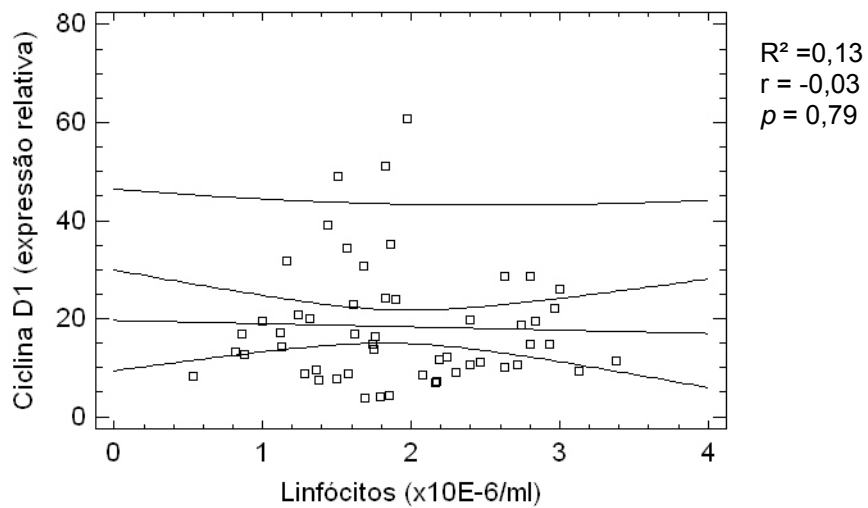


Fig.3.13- Regressão linear simples da expressão relativa da CCND1 com o número de Linfócitos dos doentes. Os valores do R-Quadrado (R^2), coeficiente de correlação (r) e do nível de significância (p) estão indicados.

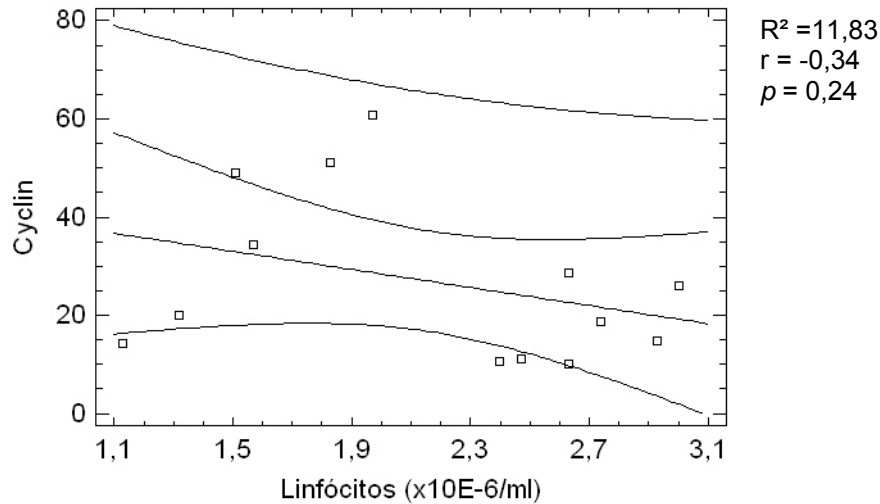


Fig.3.14- Regressão linear simples da expressão relativa da CCND1 com o número de Linfócitos dos doentes em tratamento intensivo. Os valores do R-Quadrado (R^2), coeficiente de correlação (r) e do nível de significância (p) estão indicados.

3.2.3.3. Neutrófilos

A expressão da ciclina D1 observada de acordo com o número de neutrófilos dos doentes, não apresentou nenhuma correlação ($p=0,4048$) e no subgrupo em tratamento intensivo também não foi encontrada correlação ($p=0,064$) Fig. 3.15 e Fig. 3.16.

3.2.3.4. Monócitos

A expressão da ciclina D1 observada de acordo com o número de monócitos dos doentes, não apresentou diferenças estatisticamente significativas ($p=0,360$) e dentro do grupo de doentes, no subgrupo em tratamento intensivo também não foram encontradas diferenças significativas ($p=0,162$) Fig. 3.17 e Fig. 3.18.

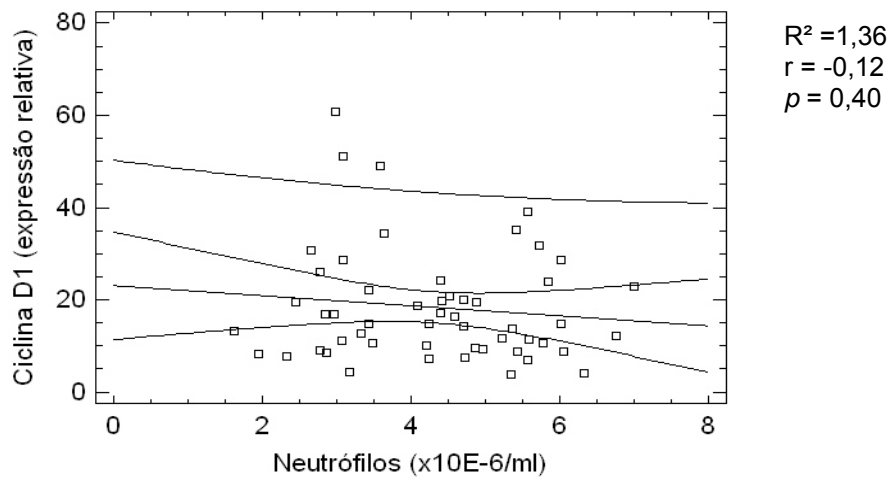


Fig.3.15- Regressão linear simples da expressão relativa da CCND1 com o número de Neutrófilos dos doentes. Os valores do R-Quadrado (R^2), coeficiente de correlação (r) e do nível de significância (p) estão indicados.

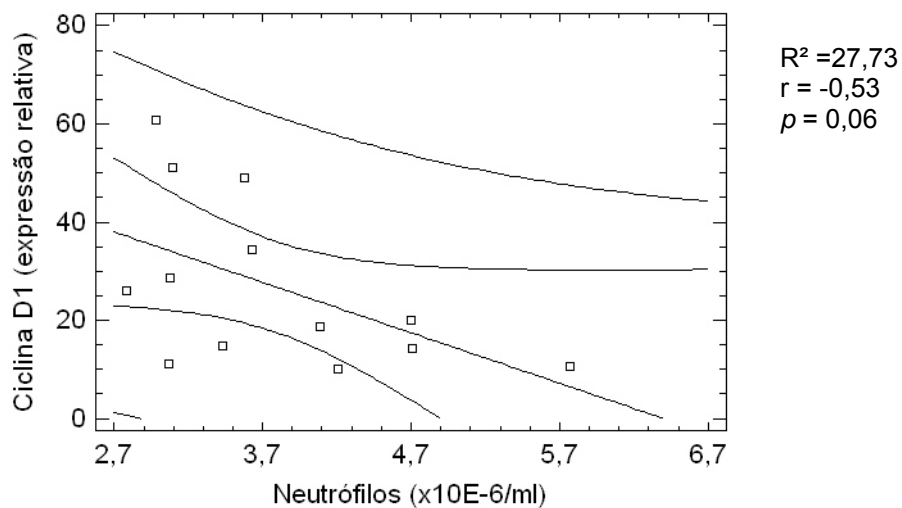


Fig.3.16- Regressão linear simples da expressão relativa da CCND1 com o número de Neutrófilos dos doentes em tratamento intensivo. Os valores do R-Quadrado (R^2), coeficiente de correlação (r) e do nível de significância (p) estão indicados.

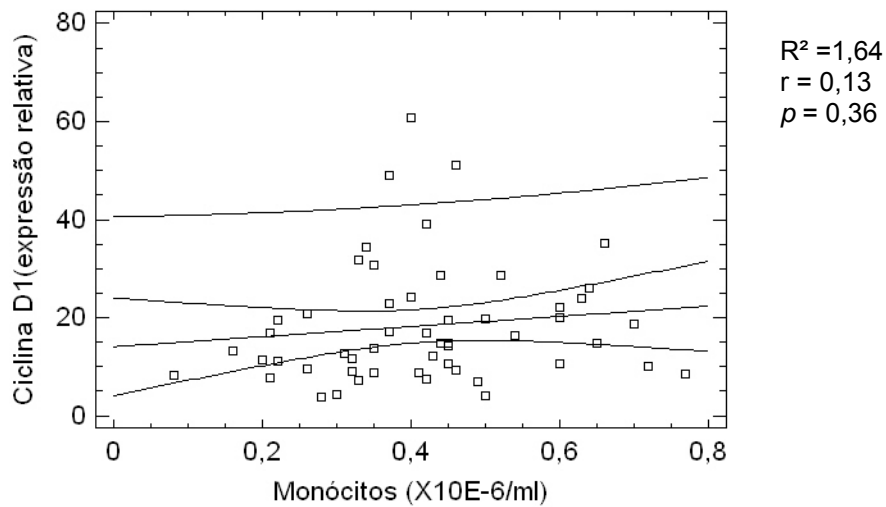


Fig.3.17- Regressão linear simples da expressão relativa da CCND1 com o número de Monócitos dos doentes. Os valores do R-Quadrado (R^2), coeficiente de correlação (r) e do nível de significância (p) estão indicados.

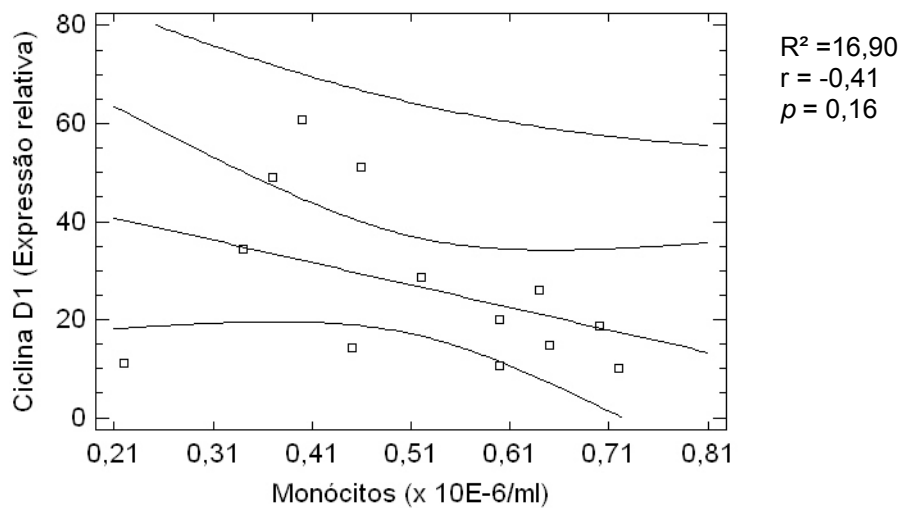


Fig.3.18- Regressão linear simples da expressão relativa da CCND1 com o número de Monócitos dos doentes em tratamento intensivo. Os valores do R-Quadrado (R^2), coeficiente de correlação (r) e do nível de significância (p) estão indicados.

3.2.3.5. Flebotomias

A expressão da ciclina D1 observada de acordo com o número de flebotomias realizadas pelos doentes estudados, não apresentou uma correlação significativa ($p=0,060$), no entanto, parece não atingir esse significado estatístico possivelmente pelo baixo número de doentes. Fig. 3.19

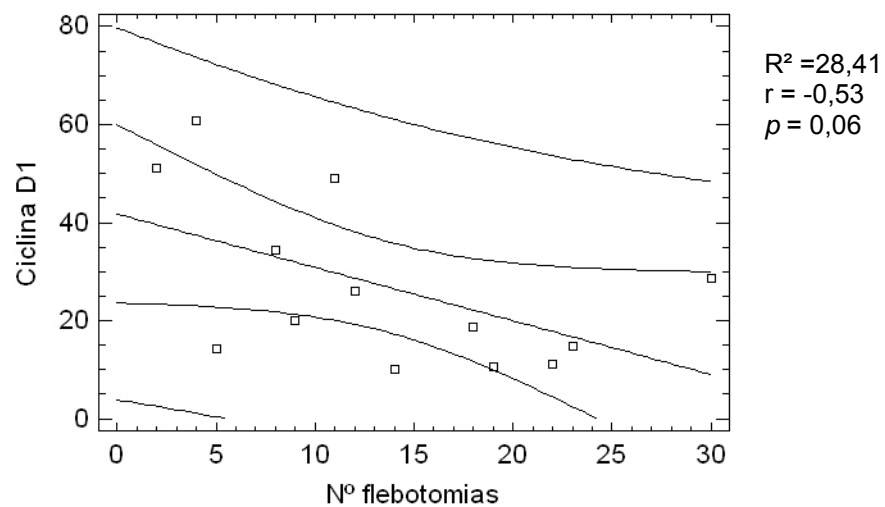


Fig.3.19- Regressão linear simples da expressão relativa da CCND1 com o número de flebotomias efectuadas pelos doentes em tratamento intensivo. Os valores do R-Quadrado (R^2), coeficiente de correlação (r) e do nível de significância (p) estão indicados.

Nas tabelas 4 e 5 estão resumidos os valores da análise correlacional para a ciclina D1 de acordo com os parâmetros bioquímicos e hematológicos.

Tabela 4- Análise correlacional dos valores de ciclina D1 de acordo com os parâmetros bioquímicos nos dois grupos definidos:

Parâmetros bioquímicos	Grupo 1 (n = 58)			Grupo 2 (n = 13)		
	R ²	r	p	R ²	r	p
TfSat	0,12	-0,034	0,80	1,71	-0,13	0,67
Ferritina sérica	3,13	0,17	0,20	2,12	-0,14	0,63

Grupo1, todos os indivíduos estudados; Grupo 2, Doentes em tratamento intensivo; n, número de indivíduos
R², R-quadrado; r, coeficiente de correlação; p, nível de significância; TfSat, Saturação de transferrina

Tabela 5- Análise correlacional dos valores de ciclina D1 de acordo com os parâmetros hematológicos nos dois grupos definidos:

Parâmetros Hematológicos	Grupo 1 (n = 58)			Grupo 2 (n = 13)		
	R ²	r	p	R ²	r	p
Leucócitos totais	1,11	-0,10	0,45	46,43	-0,68	0,01
Neutrófilos	1,36	-0,12	0,40	27,73	-0,53	0,06
Linfócitos	0,13	-0,04	0,80	11,83	-0,34	0,25
Monócitos	1,64	0,13	0,36	16,90	-0,41	0,16

Grupo1, todos os indivíduos estudados; Grupo 2, Doentes em tratamento intensivo; n, número de indivíduos
R², R-quadrado; r, coeficiente de correlação; p, nível de significância



Discussão

4. Discussão

Nos últimos anos tem vindo a aumentar a importância e interesse pelo estudo de genes envolvidos na reparação de DNA e manutenção da integridade genómica, no controlo da proliferação e diferenciação celular ou no metabolismo de carcinogénicos.

O gene da ciclina D1 (CCND1) é um proto-oncogene envolvido na regulação do ciclo celular, particularmente importante no ponto de controlo G1/S do Ciclo celular. O gene está mapeado no cromossoma 11q13 e encontra-se frequentemente alterado em diversos tipos de tumores. A importância da expressão da ciclina D1 tem sido demonstrada por várias descobertas importantes como por exemplo, a verificação de que a ciclina D1 está sobre-expressa em mais de 50% dos carcinomas mamários (Gillett, Fantl et al. 1994; McIntosh, Anderson et al. 1995) e também, na observação de que ratinhos *knockout* que não expressam ciclina D1 estão protegidos da formação de cancro da mama (Yu, Geng et al. 2001).

O ferro (Fe) tem um importante papel no ciclo celular e na tumorigénese, sabendo-se que a depleção de ferro leva à paragem do ciclo celular impedindo a passagem da fase G1/S e consequente apoptose. Existem vários estudos que demonstram que os quelantes de ferro podem inibir o crescimento de tumores agressivos tais como o neuroblastoma (Le and Richardson 2002). Recentemente foi demonstrado que a ciclina D1 está sobre-expressa no fígado com excesso de ferro, que a expressão de ciclina D1 é induzida pelo Fe e pode contribuir para o desenvolvimento de anormalidades no ciclo celular o que sugere que a ciclina D1 desempenha um importante papel na hepatocarcinogénese relacionada com o Fe (Kyle, Mathahs et al. 2006; Troadec, Courselaud et al. 2006).

O objectivo deste trabalho foi analisar a expressão da ciclina D1 em linfócitos de sangue periférico e avaliar a sua relação com a sobrecarga de ferro *in vivo*. Para isso, foi amplificado por PCR em tempo real cDNA obtido de PBMC's de sangue periférico de doentes com sobrecarga de ferro por HH e

controles normais, e os resultados foram analisados em função de vários parâmetros clínicos, incluindo os parâmetros de ferro.

4.1. Expressão da ciclina D1 no sangue periférico

Embora tenha sido objecto de grande controvérsia nos últimos anos, está hoje demonstrado que a ciclina D1 é expressa em linfócitos de sangue periférico (Howe and Lynas 2001; David Kaplan 2005).

Os resultados do PCR em tempo real realizados neste estudo demonstram a presença de ciclina D1 nos linfócitos, uma vez que se observou expressão relativa de ciclina D1 em todas as amostras amplificadas e estudadas vindo corroborar as observações de Kaplan *et al.* Deve-se ter em atenção, no entanto, que as células mononucleares do sangue periférico (PBMC's) consistem não só em linfócitos mas também monócitos, sabendo-se que os monócitos representam apenas aproximadamente 10% desta população e que apresentam uma baixa expressão da ciclina D1 em relação aos linfócitos (David Kaplan 2005). Assim sendo, estes resultados são concordantes com os resultados publicados por Kaplan e colaboradores.

4.2. Expressão da ciclina D1 em função dos parâmetros clínicos e laboratoriais

Tendo em conta a associação da HH com a sobrecarga de ferro, esta patologia foi utilizada neste estudo como modelo para analisar o efeito do ferro na expressão de ciclina D1. Globalmente, não se verificaram diferenças entre a população de doentes com HH e a população controlo na expressão da ciclina D1, como se pode observar na figura 3.5. Observou-se, em ambos os grupos, uma grande variabilidade de valores que não é explicada por diferenças de sexo ou idade. Uma hipótese para explicar a grande variabilidade na expressão da CCND1 poderia ser a existência de polimorfismos genéticos que se sabe

existirem neste gene. Num estudo recente, foi demonstrado que o polimorfismo da CCND1 870G>A está associado a um maior risco de cancro do endométrio e que esta susceptibilidade pode variar de acordo com o genótipo do mesmo polimorfismo (Ashton, Proietto et al. 2008). O estudo de polimorfismos não foi no entanto, realizado no âmbito desta tese.

Apesar de, globalmente, não existirem diferenças entre doentes e controlos, ao analisar isoladamente o grupo de doentes, os resultados indicam que doentes em fase de tratamento intensivo apresentam uma maior expressão de ciclina D1 quando comparados com os doentes em tratamento de manutenção. Uma possível explicação para este facto seria a contribuição do Fe que se encontra em concentrações mais elevadas nos doentes ainda em tratamento intensivo. Apesar destes resultados no grupo de doentes em tratamento intensivo poderem constituir um argumento a favor do papel do Fe no aumento da expressão da ciclina D1 nos linfócitos de doentes, esta hipótese teve de ser excluída uma vez que, ao analisar os resultados obtidos de acordo com os parâmetros bioquímicos (TfSat e ferritina sérica) encontrou-se uma enorme variabilidade nos valores de expressão da ciclina D1, não sendo possível estabelecer uma correlação entre esses valores e os parâmetros bioquímicos.

Uma análise dos resultados de acordo com os parâmetros hematológicos (leucócitos totais, linfócitos, neutrófilos e monócitos) mostrou mais uma vez uma enorme variabilidade na expressão da CCND1, não tendo sido possível estabelecer, em geral, uma correlação com nenhum dos parâmetros analisados. No entanto, ao analisar os valores de leucócito totais apenas em doentes na fase de tratamento intensivo, observou-se haver uma correlação significativa negativa entre estes e a expressão relativa de CCND1. Dado o grande *turnover* celular que se sabe existir nas células hematopoiéticas durante a realização de flebotomias intensivas, o passo seguinte na tentativa de explicar as diferenças observadas em doentes em tratamento intensivo foi uma análise dos valores da expressão da ciclina D1 em relação ao número de flebotomias realizadas. Observou-se uma tendência para a diminuição da expressão da ciclina D1 à medida que o número de flebotomias realizadas aumenta mas, no entanto, esse resultado não tem significado estatístico, provavelmente pelo baixo número de doentes analisados.

4.3. Conclusões

Em conclusão, neste estudo foi confirmada a existência de expressão da ciclina D1 nos Infócitos de células mononucleares de sangue periférico, mas não foi demonstrado nenhum efeito do Fe circulante na expressão da CCND1, apesar de estudos recentes demonstrarem que o excesso de Fe produz um aumento dos níveis de CCND1, tanto em ratos como em ratinhos (Deane, Parker et al. 2001; Troadec, Courselaud et al. 2006). Fica por esclarecer se os aumentos da ciclina D1 observados em estudos anteriores noutros modelos em resposta ao Fe dependem da via de administração ou forma química do Fe, ou se existe um valor limiar de concentração deste metal que provoque a sobre-expressão da CCND1.



Bibliografia

Bibliografia

- Ajioka, R. S., L. B. Jorde, et al. (1997) . "Haplotype analysis of hemochromatosis: evaluation of different linkage-disequilibrium approaches and evolution of disease chromosomes." Am J Hum Genet **60** (6) : 1439-47.
- Andrews, N. C. (1999) . "The iron transporter DMT1." Int J Biochem Cell Biol **31** (10) : 991-4.
- Ashton, K. A., A. Proietto, et al. (2008) . "The influence of the Cyclin D1 870 G>A polymorphism as an endometrial cancer risk factor." BMC Cancer **8**: 272.
- Bacon, B. R., J. K. Olynyk, et al. (1999) . "HFE genotype in patients with hemochromatosis and other liver diseases." Ann Intern Med **130** (12) : 953-62.
- Bacon, B. R. and S. A. Sadiq (1997) . "Hereditary hemochromatosis: presentation and diagnosis in the 1990s." Am J Gastroenterol **92** (5) : 784-9.
- Baldin, V., J. Lukas, et al. (1993) . "Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1." Genes Dev **7** (5) : 812-21.
- Barton, J. C., H. W. Wiener, et al. (2005) . "Total blood lymphocyte counts in hemochromatosis probands with HFE C282Y homozygosity: relationship to severity of iron overload and HLA-A and -B alleles and haplotypes." BMC Blood Disord **5**: 5.

- Bates, S. and G. Peters (1995) . "Cyclin D1 as a cellular proto-oncogene." Semin Cancer Biol **6** (2) : 73-82.
- Betticher, D. C., J. Heighway, et al. (1996) . "Prognostic significance of CCND1 (cyclin D1) overexpression in primary resected non-small-cell lung cancer." Br J Cancer **73** (3) : 294-300.
- Beutler, E., V. Felitti, et al. (2000) . "The effect of HFE genotypes on measurements of iron overload in patients attending a health appraisal clinic." Ann Intern Med **133** (5) : 329-37.
- Callender, T., A. K. el-Naggar, et al. (1994) . "PRAD-1 (CCND1) /cyclin D1 oncogene amplification in primary head and neck squamous cell carcinoma." Cancer **74** (1) : 152-8.
- Cardoso, C. S., P. Oliveira, et al. (2001) . "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 **9** (11) : 843-8.
- Chen, Y., L. A. Martinez, et al. (1998) . "Increased cell growth and tumorigenicity in human prostate LNCaP cells by overexpression to cyclin D1." Oncogene **16** (15) : 1913-20.
- Conrad, M. E., J. N. Umbreit, et al. (1999) . "Iron absorption and transport." Am J Med Sci **318** (4) : 213-29.
- Cruz, E., G. Melo, et al. (2006) . "The CD8+ T-lymphocyte profile as a modifier of iron overload in HFE hemochromatosis: an update of clinical and immunological data from 70 C282Y homozygous subjects." Blood Cells Mol Dis **37** (1) : 33-9.

- David Kaplan, H. M., William Husel, Kristine Lewandowska, Grayden MacLennan, (2005) . "D cyclins in lymphocytes." Cytometry Part A **63A** (1) : 1-9.
- De Sousa, M. (1978) . "Lymphoid cell positioning: a new proposal for the mechanism of control of lymphoid cell migration." Symp Soc Exp Biol **32**: 393-410.
- Deane, N. G., M. A. Parker, et al. (2001) . "Hepatocellular carcinoma results from chronic cyclin D1 overexpression in transgenic mice." Cancer Res **61** (14) : 5389-95.
- Feder, J. N., A. Gnirke, et al. (1996) . "A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis." Nat Genet **13** (4) : 399-408.
- Feder, J. N., Z. Tsuchihashi, et al. (1997) . "The hemochromatosis founder mutation in HLA-H disrupts beta2-microglobulin interaction and cell surface expression." J Biol Chem **272** (22) : 14025-8.
- Fix, O. K. and K. V. Kowdley (2008) . "Hereditary hemochromatosis." Minerva Med **99** (6) : 605-17.
- Fu, M., C. Wang, et al. (2004) . "Minireview: Cyclin D1: normal and abnormal functions." Endocrinology **145** (12) : 5439-47.
- Fukami-Kobayashi, J. and Y. Mitsui (1999) . "Cyclin D1 inhibits cell proliferation through binding to PCNA and cdk2." Exp Cell Res **246** (2) : 338-47.
- Gillett, C., V. Fantl, et al. (1994) . "Amplification and overexpression of cyclin D1 in breast cancer detected by immunohistochemical staining." Cancer Res **54** (7) : 1812-7.

- Hanson, E. H., G. Imperatore, et al. (2001) . "HFE gene and hereditary hemochromatosis: a HuGE review. Human Genome Epidemiology." Am J Epidemiol **154** (3) : 193-206.
- Hirai, H. and C. J. Sherr (1996) . "Interaction of D-type cyclins with a novel myb-like transcription factor, DMP1." Mol Cell Biol **16** (11) : 6457-67.
- Howe, D. and C. Lynas (2001) . "The cyclin D1 alternative transcripts [a] and [b] are expressed in normal and malignant lymphocytes and their relative levels are influenced by the polymorphism at codon 241." Haematologica **86** (6) : 563-569.
- Kumar V, C. R., Robbins SL, Ed. (2003) . Robbins Basic Pathology, Saunders USA.
- Kyle, E. B., M. M. Mathahs, et al. (2006) . "Chronic iron overload stimulates hepatocyte proliferation and cyclin D1 expression in rodent liver." Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine **148** (2) : 55-62.
- Le, N. T. and D. R. Richardson (2002) . "The role of iron in cell cycle progression and the proliferation of neoplastic cells." Biochim Biophys Acta **1603** (1) : 31-46.
- Lebron, J. A., M. J. Bennett, et al. (1998) . "Crystal structure of the hemochromatosis protein HFE and characterization of its interaction with transferrin receptor." Cell **93** (1) : 111-23.
- Lederman, H. M., A. Cohen, et al. (1984) . "Deferoxamine: a reversible S-phase inhibitor of human lymphocyte proliferation." Blood **64** (3) : 748-53.
- Lieu, P. T., M. Heiskala, et al. (2001) . "The roles of iron in health and disease." Mol Aspects Med **22** (1-2) : 1-87.

- Marsh KL, V. J. (1998) . "Frequent alterations of cell cycle regulators in early-stage breast lesions as detected by immunohistochemistry." *Br J Cancer* **77**: 9.
- McIntosh, G. G., J. J. Anderson, et al. (1995) . "Determination of the prognostic value of cyclin D1 overexpression in breast cancer." *Oncogene* **11** (5) : 885-91.
- Motokura, T., T. Bloom, et al. (1991) . "A novel cyclin encoded by a bcl1-linked candidate oncogene." *Nature* **350** (6318) : 512-5.
- Nishida, N., Y. Fukuda, et al. (1994) . "Amplification and overexpression of the cyclin D1 gene in aggressive human hepatocellular carcinoma." *Cancer Res* **54** (12) : 3107-10.
- Nurse, P. (2002) . "Cyclin dependent kinases and cell cycle control (nobel lecture) ." *Chembiochem* **3** (7) : 596-603.
- Pagano, M., A. M. Theodoras, et al. (1994) . "Cyclin D1-mediated inhibition of repair and replicative DNA synthesis in human fibroblasts." *Genes Dev* **8** (14) : 1627-39.
- Palmqvist, R., A. Oberg, et al. (1998) . "Systematic heterogeneity and prognostic significance of cell proliferation in colorectal cancer." *Br J Cancer* **77** (6) : 917-25.
- Pietrangelo, A. (2004) . "Hereditary hemochromatosis--a new look at an old disease." *N Engl J Med* **350** (23) : 2383-97.
- Porto, G., S. C. Cardoso, et al. (2008) . Hereditary hemochromatosis type I: Genetic, clinical and immunological aspects. *Iron Metabolism and Disease*: 435-460.

- Quelle, D. E., R. A. Ashmun, et al. (1993) . "Overexpression of mouse D-type cyclins accelerates G1 phase in rodent fibroblasts." Genes Dev **7** (8) : 1559-71.
- Reimao, R., G. Porto, et al. (1991) . "Stability of CD4/CD8 ratios in man: new correlation between CD4/CD8 profiles and iron overload in idiopathic haemochromatosis patients." C R Acad Sci III **313** (11) : 481-7.
- Rhodes, D. A. and J. Trowsdale (1999) . "Alternate splice variants of the hemochromatosis gene Hfe." Immunogenetics **49** (4) : 357-9.
- Sgambato, A., M. Migaldi, et al. (2002) . "Cyclin D1 expression in papillary superficial bladder cancer: its association with other cell cycle-associated proteins, cell proliferation and clinical outcome." Int J Cancer **97** (5) : 671-8.
- Sherr, C. J. (1995) . "D-type cyclins." Trends Biochem Sci **20** (5) : 187-90.
- Sherr, C. J. (1996) . "Cancer cell cycles." Science **274** (5293) : 1672-7.
- Troadec, M. B., B. Courselaud, et al. (2006) . "Iron overload promotes Cyclin D1 expression and alters cell cycle in mouse hepatocytes." J Hepatol **44** (2) : 391-9.
- Waheed, A., S. Parkkila, et al. (1999) . "Association of HFE protein with transferrin receptor in crypt enterocytes of human duodenum." Proc Natl Acad Sci U S A **96** (4) : 1579-84.
- Waheed, A., S. Parkkila, et al. (1997) . "Hereditary hemochromatosis: effects of C282Y and H63D mutations on association with beta2-microglobulin, intracellular processing, and cell surface expression of the HFE protein in COS-7 cells." Proc Natl Acad Sci U S A **94** (23) : 12384-9.

Yu, Q., Y. Geng, et al. (2001) . "Specific protection against breast cancers by cyclin D1 ablation." Nature **411** (6841) : 1017-21.

Yu, Y., Z. Kovacevic, et al. (2007) . "Tuning cell cycle regulation with an iron key." Cell Cycle **6** (16) : 1982-94.

Zheng, Y., H. Shen, et al. (2001) . "Cyclin D1 polymorphism and risk for squamous cell carcinoma of the head and neck: a case-control study." Carcinogenesis **22** (8) : 1195-1199.