

Academia de Ciência e Tecnologia– AC&T

Trabalho de Conclusão de Curso

Bioquímica Clínica e Laboratorial

## **Hemocromatose Hereditária**

Ana Cláudia Gebara

São José do Rio Preto – SP

2014

## Resumo

A Hemocromatose Hereditária é um distúrbio autossômico recessivo ou dominante que ocorre devido ao aumento inapropriado da absorção de ferro pela mucosa gastrointestinal, resultando no armazenamento excessivo desse elemento no fígado, pâncreas, coração, articulações e gônadas. Afeta a população caucasiana, com prevalência de até um em 200 descendentes da população nórdica ou celta. O diagnóstico se faz por critérios clínicos, bioquímicos (ferritina, saturação da transferrina, etc), genéticos e por imagem (ressonância magnética, tomografia e ultrassom).

Palavras-chave: ferro, HFE, sobrecarga de ferro, ferritina

## Introdução

O ferro é um elemento essencial na maioria dos processos fisiológicos do organismo humano, desempenhando função central no metabolismo energético celular. Sua quantidade total, no adulto, é de aproximadamente 3,5 a 4g; a maior parte (de 1,5 a 3,0g) está ligada à heme da hemoglobina e tem como a principal função a oxigenação dos tecidos, e outra parte estão armazenadas sob a forma de ferritina ou hemossiderina nas células do sistema mononuclear fagocitário, principalmente no fígado, na medula óssea e no baço. Fisiologicamente, o organismo não é capaz de aumentar a excreção de ferro, mesmo quando há sobrecarga dele; portanto, o aumento progressivo do aporte de ferro, por via gastrointestinal ou parenteral, leva impreterivelmente à condição patológica de sobrecarga de ferro. (PIETRANGELO, 2004)

Hemocromatose é o termo dado para a manifestação clínica da lesão tissular secundária ao acúmulo de ferro. (ZAGO, 2005)

A hemocromatose hereditária (HH) é um distúrbio autossômico, geralmente recessivo e bastante comum. Transmitida de pais para filhos, ocorre devido ao aumento inapropriado da absorção de ferro pela mucosa gastrointestinal, resultando em um armazenamento excessivo desse elemento, com posterior dano estrutural e funcional, no fígado, pâncreas, coração, nas articulações, nas gônadas e em outros órgãos. Afeta a população caucasiana, com prevalência que alcança até um em 200 descendentes da população nórdica e celta. A hemocromatose é mais comum em homens do que em mulheres. Nas mulheres a apresentação clínica é ligeiramente mais precoce, devido à perda fisiológica de ferro (menstruação, gravidez) que retarda a acumulação deste elemento. A acumulação de ferro e a expressão da doença são modificados por fatores ambientais, incluindo perda ou doação de sangue, uso de álcool, dieta ou contração de infecções, como hepatite viral.

## Importância do ferro e seu papel na doença

A hemocromatose hereditária se manifesta após os 40 anos de idade quando houve um acúmulo de ferro igual ou superior a 20g. O ferro em excesso é tóxico para os tecidos do hospedeiro (pois produz radical hidroxila [OH], que causa danos às membranas celulares, às proteínas e ao DNA) pelas seguintes razões:

- 1- Peroxidação lipídica por meio de reação de radicais catalisados pelo ferro.
- 2- Estimulação de formação de colágeno, promovendo, desta maneira, fibrose progressiva dos órgãos parenquimatosos, como fígado, pâncreas e coração.
- 3- Interação de espécies de oxigênio reativo e do próprio ferro com o DNA, levando à lesão letal ou a predisposição ao carcinoma hepatocelular.

O ferro é essencial para a eritropoese, sendo um componente ativo de muitas enzimas relevantes para o crescimento e a função de outras células dinâmicas, tais como as do sistema imunológico. Está envolvido no percurso imune de neutrófilos e macrófagos, pela formação de radicais hidroxila tóxicos. A sobrecarga desse elemento leva à disfunção dos linfócitos NK (natural killer), à diminuição da citotoxicidade dos neutrófilos e muda a proporção de linfócitos T CD4 (helper) e T CD8 (linfócitos killer). (GASCHE, 2004).

Deve-se pensar na importância de algumas proteínas responsáveis pela homeostasia do ferro no organismo humano e suas respectivas funções imunológicas: a transferrina (transportador de ferro), presentes nos monócitos/ macrófagos e linfócitos T, necessárias para a diferenciação precoce das células T; o receptor 1 da transferrina (captação celular de ferro), que promove a captação de ferro por ativação dos linfócitos necessários para a síntese de DNA e divisão celular dos linfócitos T; a ferritina (armazenamento de ferro), sintetizada por macrófagos e linfócitos T. Acredita-se que os

linfócitos poderiam facilmente mobilizar o compartimento de armazenamento de ferro no organismo, protegendo-o da toxicidade produzida pelo excesso de ferro. Recentemente foi descoberto o gene da hepcidina – um regulador responsável pela absorção e pela liberação de ferro e pelos macrófagos. (Franchini, 2006). A hepcidina é sintetizada no fígado quando se necessita de ferro devido a mudanças que ocorrem no corpo, como na anemia, na hipóxia e na inflamação, quando é então secretada na circulação.

A hemocromatose hereditária é geralmente associada ao funcionamento inadequado da proteína transmembrana HFE. Normalmente, essa proteína permanece na membrana celular formando um complexo com o receptor de transferrina, onde provavelmente inibe a interação Tf-RfR. Quando esse complexo Tf-TfR é internalizado, a proteína HFE também acompanha o processo e no interior do endossomo inibe a liberação dos átomos de ferro pelo complexo Tf-TfR. (ZAGO,2005)

Duas mutações *in locus* HFE, localizado no cromossomo 6, são prevalentes em populações derivadas de povos do noroeste da Europa: C282Y e H63D. C282Y apresenta-se com prevalência de um em cada dez indivíduos, em heterozigose e um em cada 250 indivíduos, em homozigose, nessas populações da Europa. H63D apresenta-se com prevalência ainda maior nessas populações européias, ocorrendo cerca de 30% dos indivíduos, em heterozigose e 2% a 3% de homozigose. Outras mutações descritas ainda não têm seu papel definido na fisiopatologia da hemocromatose hereditária e são de prevalência muito menor. No Brasil, alguns estudos preliminares confirmam a maior prevalência dessa mutação em indivíduos sadios de origem caucasóide e sua ausência em populações negróides e de origem asiática. A mutação que tem maior relevância clínica é G→A no nucleotídeo 845, resultando na troca do aminoácido 282 de cisteína para tirosina (C282Y) e diminuindo a densidade da proteína HFE na membrana celular. Os homozigotos certamente evoluirão com acúmulo de ferro e os heterozigotos poderiam estar sob maior risco desse acúmulo. Outra mutação, C→G no nucleotídeo 167 resultando na troca do aminoácido 63 de histidina para

ácido aspártico (H63D) compromete a interação entre proteína HFE e o TfR. Clinicamente, no entanto, seu papel ainda não é muito claro. Existe ainda uma terceira mutação no gene HFE, mais rara que as anteriores e menos claramente associada com hemocromatose hereditária, A→T no nucleotídeo 193 do gene HFE, causando a troca da cisteína da posição 65 por uma serina. (ZAGO,2005)

Como consequência dessas alterações moleculares, teremos perda de mecanismos de restrição da incorporação de ferro plasmático em diferentes células, com seu consequente acúmulo intracelular. Ainda não são conhecidos os mecanismos que aumentam a absorção intestinal de ferro nessas situações em que a interação entre HFE e TfR está comprometida, embora proponha-se um papel do aumento da expressão da proteína DMT1 nesses casos. Na hemocromatose, ocorre o acúmulo de ferritina e hemossiderina em diversos tecidos, especialmente nos hepatócitos (primariamente, o acúmulo hepático ocorre nas células de Kupffer), células β-pancreáticas, miocárdio, hipófise e articulações, com pouco acréscimo do conteúdo de ferro nos enterócitos e monócitos do sangue periférico. No citoplasma das células pode ocorrer liberação de  $Fe^{2+}$  das moléculas de ferritina, com consequente conversão citossólica em  $Fe^{3+}$  em processo que libera os radicais superóxidos e hidroxila livre. Após a conversão do superóxido em  $H_2O_2$  pela superóxido dismutase, tem-se o ataque e peroxidação de lípidos de membranas de diversas organelas citoplasmáticas, como mitocôndrias e microsossomos, se a produção de peróxidos for superior à atividade das peroxidases e catalase das células. Em situações de acúmulo intenso de ferro, a consequência inexorável será a progressiva perda de função dos órgãos-alvo, que progressivamente vão sendo substituídos por fibrose. Algumas situações concomitantes, como o abuso de álcool e provavelmente a hepatopatia crônica pelo vírus C, podem agravar e acelerar ainda mais esse processo. (ZAGO,2005)

## Fatores de riscos e manifestações clínicas

Os principais fatores de risco são: pessoas que herdam a mutação do gene HFE de ambos os pais apresentam maior risco de desenvolvimento da doença. Embora tanto os homens como as mulheres possam herdar esse gene defeituoso, a probabilidade de ser diagnosticada HH nos homens é maior do que nas mulheres.

- 1- Fator étnico: pessoas brancas descendentes do norte europeu (Inglaterra, Irlanda, Escócia, Dinamarca, França e Escandinávia) apresentam maior probabilidade de mutação do gene HFE.
- 2- História familiar: pessoas com parentes próximos (avós, mãe, pai, irmão, sobrinha, sobrinho) com hemocromatose têm maior probabilidade de apresentar mutação no gene HFE.

O início da doença é insidioso, e seus sintomas são muito inespecíficos. Entre eles se destacam: fadiga, letargia, astenia, perda de peso, encurtamento da respiração, artralgias, perda da libido ou impotência sexual entre os homens e amenorreia entre as mulheres.

A doença pode levar a hiperpigmentação da pele, artrite, diabetes *mellitus*, dor abdominal crônica, fadiga grave, hipotireoidismo, cardiomiopatia, cirrose hepática, carcinoma hepatocelular ou a risco aumentado de certas infecções bacterianas, principalmente por *Yersiniaenterocolitica*, *Vibriovulnificus*, *Listeriamonocytogenes* e *Pasteurellapseudotuberculosis*. Acredita-se que isso ocorra por disfunção dos linfócitos NK e dos macrófagos.

O fígado é um dos primeiros órgãos afetados. Aproximadamente 95% dos pacientes sintomáticos apresentam hepatomegalia, que precede o desenvolvimento de sintomas ou alterações dos testes de função hepática, como, por exemplo, *AST* e *ALT*. A atividade dessas aminotransferases tem sido

anormal em 65%-75% dos estudos clínicos de pacientes com hemocromatose. A hepatomegalia pode evoluir para esteatose hepática, fibrose, cirrose e carcinoma hepatocelular. (BHAVNANI, 2000)

A dor abdominal é o sintoma mais frequente (entre 10% e 50%) em pacientes cirróticos com HH. Geralmente possui caráter crônico e localiza-se na região epigástrica ou no hipocôndrio direito. Sua ocorrência pode ser devido à hepatomegalia e à distensão da cápsula hepática.

A cirrose hepática é um dos principais fatores etiológicos para o surgimento do carcinoma hepatocelular (CH), sendo que a incidência anual desse tipo de carcinoma em doentes com cirrose hepática é de 3%-5%. (BOIGE, 2003). O câncer hepático é uma complicação frequente nos pacientes com HH, nos quais o carcinoma hepatocelular primário (200 vezes) é mais comum, desenvolvendo-se mais frequentemente em fígado cirrótico. O alcoolismo crônico e o fumo são fatores de risco muito importantes para o desenvolvimento de CH. No entanto, existem alguns casos de carcinoma hepatocelular em pacientes com HH sem cirrose e observa-se aumento na frequência de colangiocarcinoma. (DEUGNIER, 2007)

O aumento de melanina e de ferro na pele leva à hiperpigmentação em 27%-85% dos doentes. Ocorre na maioria dos pacientes sintomáticos e geralmente está ausente nos estágios mais precoces da doença. Em geral, a pigmentação é difusa e generalizada, porém pode ser mais pronunciada na face, pescoço, dorso da mão, nos antebraços, pernas, região genital e nas cicatrizes. Também podem ocorrer perda de cabelo, atrofia da pele e distrofias das unhas.

O diabetes *mellitus* é um dos maiores distúrbios endócrinos associados à HH. Desenvolve-se em 30% a 60% dos portadores dessa doença e piora bastante o prognóstico. Acredita-se que a sobrecarga de ferro no fígado leve à resistência à insulina e ao acúmulo de ferro nas células beta pancreáticas, resultando em danos celulares e diminuição da secreção de insulina. (HAHN, 2006)

Depois do diabetes *mellitus*, o hipogonadismo hipogonadotrópico (deficiência de gonadotropina por deposição de ferro na glândula pituitária ou em nível hipotalâmico) é a endocrinopatia mais frequente associada a HH, apresentando prevalência que varia entre 10% e 100% dos casos.

As anormalidades cardíacas mais clássicas são a insuficiência cardíaca global (2% a 35% dos casos) e as arritmias cardíacas (7% a 36% dos casos).

As artropatias são encontradas em 20% a 70% dos pacientes sintomáticos. A característica da artropatias hemocromatótica é o envolvimento do segundo e terceiro ossos metacarpais, que frequentemente estão rígidos, dolorosos e associados a pequenos cistos com osteófitos em forma de gancho, que se desenvolvem na cabeça dos ossos metacarpais. Um achado frequente é a deposição de pirofosfato de cálcio com condrocalcinose, acometendo 36% a 72% dos casos. Essa deposição afeta os punhos, os joelhos, os quadris, a sínfise púbica e as articulações intervertebrais. As artropatias não estão associadas à extensão ou à duração da sobrecarga de ferro e podem surgir ou se agravar mesmo após a remoção do excesso dos estoques férricos. São degenerativas, em vez de inflamatórias (a taxa de sedimentação eritrocitária é tipicamente normal), e podem levar a uma extensa destruição da articulação, sendo que um terço dos pacientes cujos quadris são afetados requerem substituição da articulação. (HAHN,2006)

## Classificação

- 1- Hemocromatose tipo 1:** Representa mais de 90% dos casos de hemocromatose, está associada ao gene HFE e afeta apenas a população caucasiana, principalmente masculina.

Os sintomas clínicos começam após a 4ª década. Apresenta fadiga crônica, dores nas articulações, impotência, infertilidade, diabetes, pigmentação da pele, cirrose hepáticas e arritmias.

Os sintomas bioquímicos são aumento do ferro sérico, da saturação da transferrina (ST) e da ferritina sérica.

O sintoma morfológico é a sobrecarga de ferro (Fe) nos hepatócitos.
- 2- Hemocromatose tipo 2 (“juvenil”):** Ambos os sexos são igualmente afetados. Resulta na mutação do gene hepcidina (tipo 2A) e no gene hemojuvelina (tipo 2B). Os sintomas clínicos começam após a primeira década. Dor abdominal, hipogonadismo, arritmias cardíacas, insuficiência cardíaca intratável e diminuição da tolerância à glicose.

Os sintomas bioquímicos são aumento de ferro sérico, da saturação da transferrina (ST) e ferritina.

Os sintomas morfológicos são sobrecarga de ferro no fígado, no coração, glândulas endócrinas e músculo esquelético.
- 3- Hemocromatose tipo 3:** mutação do receptor 2 da transferrina no gene (TFR2); clinicamente imita a hemocromatose tipo 1.

Os sintomas clínicos, bioquímicos e morfológicos são semelhantes a hemocromatose do tipo 1.
- 4- Hemocromatose tipo 4:** a doença da ferroportina resulta da mutação do gene da ferroportina, e subdivide-se em: Subtipo “A” (caracterizado por baixa saturação da

transferrina e deposição de ferro nos macrófagos) e a Subtipo “B” (mimetiza a hemocromatose tipo 1 com alta saturação da transferrina e deposição de ferro nos hepatócitos).

Os sintomas clínicos são comparáveis aos da hemocromatose do tipo 1 apresentam anemia precoce.

O sintoma bioquímico é o aumento significativo da ferritina sérica, com ligeiro aumento da ST.

O sintoma morfológico é a sobrecarga de ferro predominantemente nas células reticuloendoteliais.

A hemocromatose do tipo 1, 2 e 3 envolve uma deficiência sistemática de hepcidina, cujo gene é fundamental na homeostasia do ferro, e a sua disrupção resulta em hemocromatose. O padrão de herança da hemocromatose dos tipos 1, 2 e 3 é autossômico recessivo, enquanto que o do tipo 4 é autossômico dominante.(BRISSOT,2006)

## **Diagnóstico**

Deve-se estar atento à “regrados três As” tanto para homens quanto para mulheres, em qualquer idade na vida adulta, quando os mesmos apresentam astenia crônica imotivada e/ou artralgia e/ou aminotransferases (ALT ou AST) aumentadas sem motivo aparente, geralmente acima de três vezes o limite superior de normalidade. Estes fatores são significativos, e nos levam a suspeitar de Hemocromatose Hereditária. De acordo com Tavill, o diagnóstico da HH é baseado no aumento dos níveis séricos de ferritina e da ST, e ambos avaliam alterações no metabolismo do ferro. De fato, a ST é o primeiro parâmetro alterado e o mais barato e fácil de mensurar; é utilizado

usualmente no *screening* dos pacientes com HH, além de ser o teste mais sensível para avaliação de acúmulo de ferro no corpo. (FRANCHINI, 2006).

De acordo com Pietrangelo, o padrão-ouro para o diagnóstico de HH tem sido a quantificação de ferro hepático e a observação histológica da distribuição de ferro. Isto implica em biopsia hepática, com aumento dos riscos de morbimortalidade. Com o aparecimento da bioquímica e dos testes genéticos, pode-se evitar a biopsia na grande maioria dos casos. Além disso, a doença também pode ser definida genotipicamente pela ocorrência familiar de sobrecarga de ferro, principalmente naqueles indivíduos homocigotos para o gene C282Y/H63D no caso da hemocromatose tipo 1, que é a mais prevalente (BRISSOT, 2006). O teste de DNA para HH em populações de alto risco tem validade e utilidade clínica. A ressonância magnética pode ser utilizada para detectar o aumento de ferros nos tecidos, particularmente no fígado. Apesar deste método não ser invasivo e auxiliar na detecção de fibrose hepática, apresenta baixa sensibilidade para o diagnóstico quando as concentrações desse metal não forem muito elevadas. A propriedade paramagnética da hemossiderina e da ferritina permite que se utilize um dispositivo supercondutor com interferência quântica (SQUID) para medir a suscetibilidade magnética do fígado, e correlaciona com a concentração hepática de ferro. A estimativa da concentração hepática de ferro pode também ser feita pela tomografia computadorizada. Nos pacientes com cirrose e carcinoma hepatocelular concomitante indica-se também *screening* semestral com ultrassom e AFP ( $\alpha$ -fetoproteína). O reconhecimento e o diagnóstico precoces objetivam minimizar a progressão e as complicações da hemocromatose. As maiores causas de morte por essa doença são cirrose descompensada, carcinoma hepatocelular, diabetes *mellitus* e miocardiopatia.

## Tratamento

Uma dieta balanceada é usualmente suficiente para os pacientes com HH, os quais devem evitar principalmente os suplementos com vitamina C (BRISSOT, 2006), porque aumentam a absorção intestinal de ferro e potencializam a atividade de agente pró-oxidantes e radicais livres, podendo ser responsáveis por casos letais e raros de insuficiência cardíaca (BRISSOT, 2006). Evitar alimentos com alto teor de ferro, como carne vermelha e bife de fígado; certos frutos do mar, como ostras cruas; também evitar bebidas que contenham álcool, porque podem acelerar danos hepáticos. A flebotomia, ou “sangria” terapêutica, é o tratamento mais seguro, eficaz e econômico para a HH (FRANCHINI, 2006). Deve-se enfatizar aos pacientes que a terapia deve começar antes que se desenvolvam danos irreversíveis aos órgãos (FRANCHINI, 2006), principalmente antes de apresentar diabetes e/ou cirrose, o que significa uma redução significativa da morbimortalidade. Os pacientes com hemocromatose tipo 4 não toleram um regime semanal de flebotomia e se tornam rapidamente anêmicos, apesar da elevação persistente dos níveis de ferritina. Nesses casos, indica-se um regime menos agressivo e a utilização de eritropoietina, que pode melhorar a tolerância hematológica à terapia (FRANCHINI, 2006). Quando a flebotomia não é viável (como, por exemplo, nos casos de anemia, disfunção cardíaca avançada ou cirrose hepática), a deferoxamina – um agente quelante de ferro – pode ser utilizada com sucesso (FRANCHINI, 2006). No entanto, devido à sua má absorção gastrointestinal e meia-vida curta, ela deve ser administrada por via subcutânea (20-40mg/kg/dia) por infusão contínua (8h-10h), ou duas vezes ao dia pela mesma via, por meio de injeção em bolo, tornando-se mais tolerada pelos pacientes (FRANCHINI, 2006). Além disso, existem complicações potenciais com o uso crônico da deferoxamina, tais como infecções por *Yersinia* sp., lesões retinianas e de nervo acústico. Deve ser encorajada uma dieta rica em proteínas, vitamina B12 e folato pois acelera a eritropoese que é intensificada com a sangria terapêutica.

Existem dois quelantes orais: a deferiprona, que não foi aprovada com abordagem terapêutica, pois apresenta um efeito colateral significativo ( aagranulocitose), evidenciando risco muito maior quando comparada com a flebotomia. O deferasirox, que foi recentemente aprovado, não apresenta tantos efeitos colaterais em longo prazo, e pode ser uma terapia substitutiva da flebotomia em alguns casos (BRISSOT, 2006). O transplante hepático ortotópico (OLT) é o tratamento de preferência em muitos pacientes com estágios terminal de doença hepática, embora para a HH seja uma indicação incomum (BRANDHAGEN, 2001). No entanto, a taxa de sobrevivência nesse tipo de paciente é menor, quando comparada à de outras doenças que requeiram o OLT. A maioria das mortes ocorre no período peroperatório, por complicações cardíacas ou relacionadas a infecções. Conforme Limdi&Cramptom, o principal motivo que leva à morte nos estados de sobrecarga de ferro, como no caso da HH, são arritmias cardíacas e miocardiopatia. Assim, é necessário preocupar-se com o tratamento de algumas das consequências dessa doença, como, por exemplo, o diabetes, que requer insulina e um tratamento apropriado para as complicações macro e microvasculares; a artrite, que deve ser tratada com uma simples analgesia; e o hipogonadismo hipogonadotrópico, que, por sua vez, necessita de reposição hormonal.

## **Objetivo**

O estudo quer demonstrar que devido a um fator genético, há importante aumento inapropriado da absorção de ferro. Ocasionalmente ocasionando dificuldades no mecanismo fisiológico, que leva a complicações com diferentes características dependendo do sexo, atitudes comportamentais, alimentares, etc. E mostra que hoje contamos com métodos diagnósticos específicos para ajudar a população afetada.

## **Materiais e Métodos**

Levantamento bibliográfico e de artigos sobre a Hemocromatose Hereditária.

## **Conclusão**

A Hemocromatose Hereditária é um distúrbio genético cujo diagnóstico se faz por critérios clínicos, bioquímicos, genéticos e por imagem. O reconhecimento e o diagnóstico precoces são importantes, pois minimizam a progressão e as complicações futuras dessa doença. A flebotomia, a deferoxamina, a deferiprona e o deferasirox são as opções terapêuticas atualmente existentes.

## Bibliografia

1. ZAGO, M.A., FALCÃO, R.P., PASQUINI, R. – Hematologia: Fundamentos e Práticas – 2ª Reimp., 1ª edição, p.232-237, 2005.
2. BRISSOT, P. & BELS, F. - Current approaches to the management of hemochromatosis. *Hematology*, p. 36-41, 2006.
3. BHAVNANI, M.; LLOYD, D. *et al.* – Screening for genetic haemochromatosis in blood samples with raised alanine aminotransferases. *Gut*, 46:707-10,2000.
1. BOIGE, V.; CASTÉR, L. *et al.* – Lack of association between HFE gene mutations and hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis. *Gut*, 52: 1178-81, 2003.
2. DEUGNIER, Y. & TURLIN, B. – Pathology of hepatic iron overload. *World J. Gastroenterol.*, 13(35): 4755-60, 2007.
3. FRANCHINI, M. – Hereditary iron overload: Update on pathophysiology, diagnosis, and treatment. *Am. J. Hematol.*, 81: 202-9, 2006.
4. GASCHE, C.; LOMER, M.C.E. *et al.* – Iron, anaemia, and inflammatory bowel diseases. *Gut*, 53: 1190-7, 2004.
5. HAHN, J.U.; STEINER, M. *et al.* – Evaluation of a diagnostic algorithm for hereditary hemochromatosis in 3,500 patients with diabetes. *Diabetes Care*, 29(2): 464-6,2006.