FATIMA MENDONÇA JORGE VIEIRA

**Porfíria cutânea tardia com mutações do
gene da hemocromatose C282Y e H63D e
análise retrospectiva do perfil de ferro em
relação ao tratamento: estudo de 60 casos**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Programa de Dermatologia

Orientador: Prof. Dr. Vitor Manoel Silva dos Reis

São Paulo

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Vieira, Fatima Mendonça Jorge

Porfiria cutânea tardia com mutações do gene da hemocromatose C282Y e H63D e análise retrospectiva do perfil de ferro em relação ao tratamento : estudo de 60 casos / Fátima Mendonça Jorge Vieira. -- São Paulo, 2012.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Dermatologia.

Orientador: Vitor Manoel Silva dos Reis.

Descritores: 1.Porfiria cutânea tardia 2.Hemocromatose 3.Mutação
4.Frequência do gene 5.Ferro 6.Hepatite C 7.Cloroquina

USP/FM/DBD-297/12

DEDICATÓRIA

Ao meu querido e amado esposo **Alberto** pelo seu amor, dedicação, compreensão e apoio aos meus sonhos e projetos.

Às minhas queridas filhas **Lívia Gabriela** e **Marília Beatriz**, pela alegria e amor que me dão todos os dias, pela sua compreensão e por abdicar do tempo que poderíamos estar juntas, para que eu pudesse concluir este projeto.

À minha querida mãe **Maria Júlia**, cuja vida foi toda dedicada às filhas, agradeço pelo seu incentivo incondicional e ajuda nos cuidados com a família e sem o qual este projeto não seria possível.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao **Prof. Dr. Vitor Manoel Silva dos Reis**, um professor na verdadeira acepção da palavra. Ensinou-me seus conhecimentos com maestria. Tenho orgulho de tê-lo como meu orientador. Agradeço sua orientação, incentivo e apoio.

À biomédica **Maria Cristina Nakhle**, pelo auxílio incondicional na realização do PCR em tempo real para o estudo das mutações do gene HFE e sem o qual este trabalho não seria possível. Agradeço sua simpatia, boa vontade e eficiência.

Ao **Prof. Dr. Eduardo Luiz Rachid Cançado**, professor renomado da gastroenterologia, agradeço por ceder o laboratório (LIM) para a pesquisa das mutações e pelas importantes sugestões e auxílio na interpretação dos resultados. Considero um privilégio ter seu auxílio neste trabalho.

Às biomédicas **Ana Lúcia Bernardes e Clarice Pires Abrantes-Lemos** pela ajuda na extração de DNA genômico dos leucócitos e sua valiosa contribuição na realização dos exames PCR-RT.

Ao **Dr. João Renato Rebello Pinho** e à bióloga **Fernanda de Mello Malta**, responsáveis pelo equipamento *7300 Real Time PCR System ABI PRISM™*, do laboratório de Gastroenterologia e Hepatologia do Instituto de Medicina Tropical do Hospital das Clínicas, por ceder o uso do aparelho para realizar este trabalho.

A minha irmã **Lúcia Filomena Jorge**, sempre amiga e colaborativa, pelo auxílio na revisão do português e do inglês.

Ao estatístico **João Italo Dias França** pela análise estatística, que foi de grande importância neste trabalho.

À **FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo)**, que através dos seus recursos prestigou e valorizou este trabalho.

Aos **doentes, com porfiria cutânea tardia**, sempre dispostos a colaborar. Que este estudo possa trazer uma visão mais ampla em relação à doença e seu tratamento.

AGRADECIMENTOS

À **Profa. Dra. Neusa Uriko Sakai Valente**, pela contribuição na revisão deste trabalho, dando recomendações importantes e pelo seu apoio incondicional.

À **Profa. Dra. Zilda Najjar Prado de Oliveira** por seu apoio e inestimável contribuição na revisão deste trabalho, além de suas importantes sugestões.

À **Profa. Dra. Valéria Aoki**, por suas valiosas orientações e sugestões, contribuindo na revisão deste trabalho.

À **Dra. Marta Mitiko Deguti**, que graças ao seu apoio fez com que este trabalho fosse possível e por sua valiosa contribuição na interpretação dos resultados.

Ao **Prof. Dr. Evandro A. Rivitti**, exemplo de eficiência e sabedoria. Considero um privilégio tê-lo tido como meu professor durante toda minha vida acadêmica.

Aos **Prof. Dr. Cyro Festa Neto** e **Prof. Dr. José Antonio Sanches Junior**, Professores Titulares do Departamento da Dermatologia por sua nobre dedicação à vida acadêmica e por me aceitar na pós-graduação.

À **Prof. Dra. Miriam N. Sotto**, por sua eficiência ao conduzir a pós-graduação e que graças ao seu trabalho e dedicação contribuiu para que este trabalho fosse possível.

Ao **Ricardo S. Nunes**, pela ajuda na coleta dos exames de sangue e, principalmente, pela boa vontade e dedicação que coloca no seu trabalho.

Aos **médicos residentes** que auxiliaram no atendimento ambulatorial dos pacientes.

Aos demais **amigos, colegas e funcionários do Departamento de Dermatologia, do Departamento de Gastroenterologia e do Instituto de Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo**, os quais, de um modo ou de outro, colaboraram na realização deste trabalho.

**"Nada neste mundo é tão poderoso como uma ideia
cuja oportunidade chegou."**

"Rien n'est plus fort qu'une idée dont l'heure est venue."

Victor Hugo (1802-1885)

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: Adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS	3
3	REVISÃO DE LITERATURA	5
3.1	Porfiria cutânea tardia	6
3.1.1	Classificação.....	6
3.1.2	Quadro clínico.....	8
3.1.3	Diagnóstico e achados laboratoriais	10
3.1.4	Mecanismo de inativação da UROD no hepatócito	12
3.1.5	Fatores precipitantes	19
3.1.5.1	Álcool	20
3.1.5.2	Hepatite C.....	21
3.1.5.3	Hepatite B	25
3.1.5.4	Vírus da imunodeficiência humana (HIV).....	25
3.1.5.5	Estrógeno	26
3.1.5.6	Insuficiência renal crônica	27
3.1.6	Doenças associadas.....	28
3.1.6.1	Carcinoma hepatocelular (CHC).....	29
3.1.6.2	Hemocromatose hereditária.....	30
3.1.6.2.1	Homeostase do Ferro	32
3.1.6.2.2	Hemocromatose <i>Hereditária do Adulto ('tipo 1')</i>	36
3.1.6.2.2.1	<i>Fisiopatologia e manifestações clínicas da hemocromatose</i>	36
3.1.6.2.2.2	<i>O Gene HFE e a proteína HFE</i>	39
3.1.6.2.2.3	<i>Mutações e penetrância do gene</i>	42
3.1.6.2.3	<i>Análise quantitativa do ferro do tecido hepático</i>	45
3.1.6.2.4	<i>Diagnóstico e tratamento da hemocromatose</i>	47
3.1.6.2.5	<i>Diagnóstico diferencial de hemossiderose</i>	52

3.1.6.2.5.1	<i>Hemocromatose não-HFE em adultos</i>	53
3.1.6.2.5.2	<i>Hemocromatose juvenil</i>	54
3.1.6.2.5.3	<i>Hemocromatose neonatal</i>	54
3.1.6.2.5.4	<i>Doenças hematológicas</i>	54
3.1.6.2.5.5	<i>Hemossiderose relacionada à cirrose</i>	55
3.1.6.2.5.6	<i>Álcool</i>	56
3.1.6.2.5.7	<i>Hepatite Viral Crônica</i>	56
3.1.6.2.5.8	<i>Porfiria Cutânea Tardia</i>	57
3.1.7	<i>Tratamento da Porfiria Cutânea Tardia</i>	63
3.1.7.1	<i>Monitoramento</i>	67
4	MÉTODOS	69
4.1	<i>Tipo de Estudo e Análise Estatística</i>	70
4.2	<i>Casuística</i>	70
4.3	<i>Aspectos Éticos</i>	72
4.4	<i>Coleta de Dados Clínicos e Laboratoriais</i>	73
4.5	<i>Caracterização dos Parâmetros Coletados</i>	73
4.6	<i>Pesquisa das Mutações no Gene <i>HFE</i></i>	74
4.6.1	<i>Infraestrutura</i>	74
4.6.2	<i>Extração e Análise do DNA Genômico</i>	74
4.6.3	<i>Pesquisa de Mutações C282Y e H63D pela Técnica de Reação de Polimerização em Cadeia em Tempo Real (PCT-RT)</i>	75
5	RESULTADOS	80
6	DISCUSSÃO	103
7	CONCLUSÕES	120
8	ANEXOS	124
9	REFERÊNCIAS	138

LISTAS

ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

%	porcentagem
<	menor que
>	maior que
≥	maior ou igual
♀	sexo feminino
α	alfa
β	beta
γ	gama
°C	graus célsius
μg	micrograma
μL	microlitro
A	adenina
AD	autossômico dominante
AF	antecedentes familiares
AgHBs	antígeno de superfície da hepatite B
ALA	ácido delta-aminolevulínico
ALT	alanina aminotransferase
Anti-HBs	anticorpo contra antígeno de superfície da hepatite B
AR	autossômico recessivo
AST	aspartato aminotransferase
C	citossina
C282Y	substituição da cisteína por tirosina no aminoácido 282 da proteína HFE
CAPPesq	Comissão para Análise de Projetos de Pesquisa
cDNA	ácido desoxirribonucleico complementar
CHC	carcinoma hepatocelular
CLAE	cromatografia líquida de Alta Eficiência
COPRO	coproporfirina
CTF	concentração de ferro tecidual
DEPC	dietilpirocarbonato
DHL	desidrogenase láctica
dL	decilitro
DM	<i>diabetes mellitus</i>
DMT1	transportador de metal divalente 1
DNA	ácido desoxirribonucleico

dNTPs	desoxinucleotídeos trifosfatados
DPOC	doença pulmonar obstrutiva crônica
Dr.	doutor
EDTA	ethylenediamine tetraacetic acid
EROs	espécies reativas de oxigênio
<i>et al.</i>	e outros
ex.	Exemplo
EUA	Estados Unidos da América
FAN	Fator anti-núcleo
Fig.	Figura
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
g	grama
G	guanina
GGT	gama-glutamyl transpeptidase
GTT	teste de tolerância à glicose
h	hora
HAMP	gene da hepcidina
H63D	substituição da histidina por ácido aspártico no aminoácido 63 da proteína HFE
Hb	hemoglobina
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HCLAB	Programa do Laboratório Central do Hospital das Clínicas
HFE	gene da hemocromatose hereditária (tipo I)
HH	hemocromatose hereditária
HIV	vírus da imunodeficiência humana
HJV	gene da hemojuvelina
HLA	antígeno de histocompatibilidade
Ht	hematócrito
IBPs	inibidores de bomba de prótons
IC	intervalo de confiança
IFD	imunofluorescência direta
IFH	índice de ferro hepático
IFN	interferon
IL	interleucina
IRC	insuficiência renal crônica
ISOCOPRO	isocoprotoporfirina
kg	quilograma

L	litro
LIM	Laboratório de Investigação Médica
LSN	limite superior do normal (dos valores de referência estabelecidos pela rotina da Divisão de Laboratório Central HCFMUSP)
mg	miligrama
MHC	complexo principal de histocompatibilidade
min	minutos
mL	mililitro
mM	micro Mol
nm	nanometros
°C	graus célsius
OR	<i>odds ratio</i>
p.ex.	por exemplo
PCR	reação de polimerase em cadeia
PCR-RT	reação de polimerase em cadeia em tempo real
PCT	porfiria cutânea tardia
PCTf	porfiria cutânea tardia familiar
PCTs	porfiria cutânea tardia esporádica
Prof.	Professor
PROTO	protoporfirina
RNA	ácido ribonucleico
RNM	ressonância nuclear magnética
rpm	rotações por minuto
RTf	receptor de transferrina
RTf2	receptor de transferrina 2
s	segundo
satT	saturação de transferrina
S65C	substituição da serina por cisteína na posição do aminoácido 65 da proteína HFE
SCL40A1	gene da ferroportina
T	timidina
TCLE	termo de consentimento livre e esclarecido
TNF	fator de necrose tumoral
Tris-HCL	Tris hidrocloreto
TS	genótipo tipo selvagem (do inglês: <i>Wild Type</i>)
UI	unidades internacionais
URO	uroporfirina

UROD	uroporfirinogênio descarboxilase
UV	ultravioleta
UVA	ultravioleta A
UVB	ultravioleta B
VHB	vírus da hepatite B
VHC	vírus da hepatite C

FIGURAS

Figura 1 -	Porfiria cutânea tardia – Bolhas, lesões ulceradas Encimadas por crostas, lesões cicatriciais e milia no dorso da mão.....	9
Figura 2 -	Porfiria cutânea tardia – Doente feminina com hipertricose acometendo a região malar superior e a região temporal até a região frontal.....	9
Figura 3 -	Patogênese da porfiria cutânea tardia	18
Figura 4 -	Homeostase do ferro	35
Figura 5 -	Modelo hipotético da proteína HFE mostrando sua semelhança com as proteínas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe 1	42
Figura 6 -	Proporção de pacientes homozigotos para C282Y que desenvolvem sobrecarga de ferro e doença hepática	43
Figura 7 -	Análise quantitativa de ferro e o índice de ferro hepático (IFH)	46
Figura 8 -	Algoritmo para avaliar se um indivíduo tem hemocromatose hereditária.....	50
Figura 9 -	Princípio da reação de polimerização em cadeia em tempo real (PCR-RT).....	78
Figura 10 -	Ilustração do gráfico obtido com a técnica de reação de polimerização em cadeia em tempo real (PCR-RT) utilizando o equipamento 7300 Real Time PCR System ABI PRISM™, (Applied Biosystem, EUA).....	79

GRÁFICOS

Gráfico 1 - Distribuição dos pacientes pela etnia	81
Gráfico 2 - Distribuição do número de fatores precipitantes coexistentes	82
Gráfico 3 - Frequência de cada fator precipitante (% de pacientes)	88
Gráfico 4 - Distribuição da frequência dos genótipos e do número de alelos C282Y e H63D na população em estudo com porfiria cutânea tardia	91

TABELAS

Tabela 1 -	Fatores precipitantes da porfiria cutânea tardia	13
Tabela 2 -	Classificação genética da hemocromatose hereditária	30
Tabela 3 -	Sintomas e achados físicos nos pacientes com hemocromatose hereditária	40
Tabela 4 -	Principais doenças com sobrecarga de ferro no fígado.....	53
Tabela 5 -	Descrição das mutações HFE (C282Y e H63D), sua localização e sequência de <i>primers</i> e sondas TaqMan	76
Tabela 6 -	Associação dos fatores precipitantes nos 60 pacientes com porfiria cutânea tardia	84
Tabela 7 -	Frequência dos fatores precipitantes nas 16 mulheres com porfiria cutânea tardia	86
Tabela 8 -	Frequência de cada fator precipitante ou doença associada e seu respectivo intervalo de confiança.....	87
Tabela 9 -	Frequência de cada genótipo e dos alelos C282Y e H63D nos 60 pacientes com porfiria cutânea tardia e frequência dos alelos C282Y e H63D nos 395 indivíduos da população controle	90
Tabela 10 -	Fatores precipitantes relacionados com a presença ou não de sorologia positiva para o vírus da hepatite C (VHC)	92
Tabela 11 -	Associação dos fatores precipitantes e doenças associadas com a presença do alelo C282Y e H63D.....	93
Tabela 12 -	Perfil de ferro (ferro sérico, ferritina, saturação de transferrina) e enzimas hepáticas (AST, ALT e GGT) segundo o genótipo HFE do paciente (média $\pm$ desvio padrão) em 60 pacientes.....	95
Tabela 13 -	Comparação entre os parâmetros bioquímicos (perfil de ferro e enzimas hepáticas) dos pacientes com e sem o vírus da hepatite C (VHC) associada	96
Tabela 14 -	Comparação dos parâmetros bioquímicos de todos os pacientes que receberam somente cloroquina (antes e depois do tratamento)	99

Tabela 15 - Parâmetros bioquímicos, antes e depois do tratamento com cloroquina, relacionando-os com a presença ou não do vírus da hepatite C (VHC)	100
Tabela 16 - Parâmetros bioquímicos (média $\pm$ desvio padrão) dos mesmos pacientes, antes e depois do tratamento com cloroquina de acordo com o genótipo	102

QUADROS

Quadro 1 - Frequência das mutações C282Y e H63D e dos seus alelos nos pacientes com porfiria cutânea tardia e na população controle nos diferentes países	61
---	----

RESUMO

Vieira FMJ. *Porfíria cutânea tardia com mutações do gene da hemocromatose C282Y e H63D e análise retrospectiva do perfil de ferro em relação ao tratamento: estudo de 60 casos*. [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012.

Fundamentos: A porfíria cutânea tardia é a forma mais comum das porfirias e caracteriza-se pela diminuição da atividade da enzima uroporfirinogênio descarboxilase. Há vários relatos da associação das mutações do gene HFE da hemocromatose hereditária com porfíria cutânea tardia no mundo, mas até hoje apenas um estudo foi realizado no Brasil. **Objetivo:** Estudar a associação da porfíria cutânea tardia com as mutações C282Y e H63D do gene HFE da hemocromatose hereditária. Identificar a associação com etilismo, hepatite C, hepatite B e infecção pelo HIV e relacioná-los com a presença ou não das mutações do gene HFE e estudar retrospectivamente a resposta terapêutica à cloroquina. **Métodos:** Estudo ambispectivo para detectar as mutações C282Y e H63D em 60 pacientes com porfíria cutânea tardia no período de 2003 até 2012. O histórico familiar, etilismo, hepatite C, hepatite B e anti-HIV foram investigados. O estudo das mutações HFE foi realizado com PCR em tempo real. A resposta terapêutica foi avaliada utilizando a dosagem das porfirinas urinárias (urina de 24 horas), o perfil de ferro (ferro sérico, ferritina e saturação de transferrina) e as enzimas hepáticas antes e após a remissão bioquímica. **Resultados:** A frequência dos alelos das mutações foi significativamente mais elevada nos pacientes com PCT para C282Y (8,3% versus 1,77%, odds ratio 5,02, IC [95%] = [4,1%; 14,8%], p=0,0001) e H63D (27,5% versus 14,05, odds ratio 2,32, IC [95%] = [19,7%; 36,4%], p=0,0004) em relação à população grupo controle. A hepatite C estava presente em 41,7% dos pacientes e estava associada à ingestão de álcool em 71,7% dos casos. **Conclusões:** As mutações HFE e a expressão clínica da hemocromatose hereditária podem contribuir isoladamente para o desencadeamento da PCT, independente-mente da presença de outros fatores precipitantes; o que torna a pesquisa das mutações HFE um exame necessário nos pacientes com PCT. Nos pacientes homozigotos para C282Y e heterozigotos compostos (C282Y/H63D) a flebotomia é o tratamento de primeira escolha. A porfíria cutânea tardia pode ser um marcador cutâneo para a hemocromatose e o dermatologista pode auxiliar no seu diagnóstico e tratamento precoce.

Descritores: Porfíria cutânea tardia, hemocromatose, mutação, frequência do gene, ferro, hepatite C, cloroquina.

SUMMARY

Vieira FMJ. *Porphyria Cutanea Tarda with hemochromatosis gene mutations C282Y and H63D and retrospective analysis of the iron profile in relation to treatment: study of 60 cases* [Thesis] São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2012.

Background: Porphyria cutanea tarda (PCT) is the most common form of porphyria and is characterized by the decreased activity of the uroporphyrinogen decarboxylase enzyme. Several reports associated HFE gene mutations of hereditary hemochromatosis with PCT worldwide, although up to date only one study has been conducted in Brazil. **Objective:** Study the association between porphyria cutanea tarda and C282Y and H63D mutations in the HFE gene of hereditary hemochromatosis. Identify the association with alcoholism, hepatitis C, hepatitis B and HIV infection and relate them with the presence or absence of the HFE gene mutations and study retrospectively the therapeutic response to chloroquine. **Methods:** Ambispective study in the period from 2003 to 2012 to detect the C282Y and H63D mutations in 60 patients with porphyria cutanea tarda. The family history, alcoholism, hepatitis C, hepatitis B and HIV were investigated. HFE mutations were held with real-time PCR. The therapeutic response was assessed using the urinary porphyrins (24h urine), the iron profile (serum iron, ferritin and transferrin saturation) and the liver enzymes, before and after biochemical remission. **Results:** The frequency of alleles of the mutations were significantly higher in patients with PCT for C282Y (8.3% vs. 1.77%, odds ratio 5.02, CI [95%] = [4.1%; 14.8%], $p = 0.0001$) and H63D (27.5% vs. 14.05, odds ratio 2.32, CI [95%] = [19.7% and 36.4%], $p = 0.0004$) in relation to group control population. Hepatitis C was found in 41.7% of the patients and was associated with the ingestion of alcohol in 71.7% of cases. **Conclusions:** The HFE mutations and clinical expression of hereditary hemochromatosis can contribute in an isolated manner to the outbreak of PCT, independently of the existence of other precipitating factors. This makes the search for HFE mutations necessary in patients with PCT. In patients who are homozygous for C282Y and compound heterozygotes (C282Y/H63D) phlebotomy is the treatment of first choice. Porphyria cutanea tarda can be a cutaneous marker for hemochromatosis and the dermatologist can help in its diagnosis and early treatment.

Descriptors: Porphyria cutanea tarda, Hereditary hemochromatosis, iron, mutation, gene frequency, hepatitis C, chloroquine.

1 INTRODUÇÃO

Há um número crescente de publicações estrangeiras, que abordam a associação da hemocromatose hereditária (HH) com a porfiria cutânea tardia (PCT). O que nos motivou a fazer este trabalho foi o fato de existir apenas um trabalho brasileiro estudando a associação da PCT com a HH e porque esta associação pode levar a mudanças no tratamento da porfiria destes pacientes. No Ambulatório de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) tratamos a maioria dos pacientes com baixas doses de difosfato de cloroquina; entretanto nos casos associados à HH a flebotomia deveria ser o tratamento de primeira escolha. A cloroquina é nosso tratamento de escolha para a maioria dos pacientes, por ser um tratamento menos invasivo, efetivo, seguro, de baixo custo e que consome menos tempo que a flebotomia. Este estudo foi ambispectivo (período de 2003 até 2012) e consistiu na detecção das mutações C282Y e H63D do gene da hemocromatose (HFE) nos pacientes com PCT. Estudou-se a resposta terapêutica dos pacientes, portadores ou não das mutações do gene HFE, tratados com difosfato de cloroquina (250mg/ 2x por semana), comparando os níveis de ferro sérico, ferritina, saturação de transferrina (satT), transaminases, gama-glutamil transpeptidase e porfirinas urinárias, antes e após a remissão bioquímica. Os fatores precipitantes associados, tais como: etilismo, vírus da hepatite C (VHC), vírus da hepatite B (VHB) e infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), foram relacionados com as mutações do gene HFE. O perfil de ferro e as enzimas hepáticas de todos os pacientes, independentemente da presença ou não das mutações HFE, também foram relacionados com a presença ou não do VHC.

2 OBJETIVOS

Os pacientes com porfiria cutânea tardia (PCT) são acompanhados no Ambulatório de Fotobiologia do Departamento de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os objetivos deste trabalho foram:

1. Estudar a associação da PCT com as mutações C282Y e H63D do gene HFE nestes pacientes, pois a detecção da hemocromatose e seu tratamento precoce evitam a progressão da doença e melhoram a expectativa de vida do indivíduo.
2. Identificar a associação da porfiria cutânea tardia com etilismo, hepatite C, hepatite B, infecção pelo HIV e estrógenos, relacionando-os com a presença ou não das mutações do gene HFE.
3. Estudar retrospectivamente a resposta terapêutica dos pacientes portadores ou não das mutações do gene HFE, quando tratados com difosfato de cloroquina (250 mg/ 2x por semana), utilizando os níveis de ferro sérico, ferritina, saturação de transferrina (satT), alanina transaminase (ALT), aspartato transaminase (AST), gama-glutamil transpeptidase (GGT) e as porfirinas urinárias, antes do tratamento e após a remissão bioquímica.
4. Comparar os níveis de ferro sérico, ferritina, satT e enzimas hepáticas (ALT, AST e GGT) dos pacientes com PCT associados ou não à hepatite C antes do tratamento e após a remissão bioquímica.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 PORFIRIA CUTÂNEA TARDIA

A porfiria cutânea tardia (PCT), herdada ou adquirida, caracteriza-se pela diminuição da atividade da enzima uroporfirinogênio descarboxilase (UROD) e consequente acúmulo de uroporfirina e hepta-carboxil porfirinogênio predominantemente no fígado ¹.

Embora a PCT seja a mais comum das porfirias, sua prevalência foi estimada em um em cada 10.000, variando de acordo com o país; 1/5000 (0,02%) na antiga Tchecoslováquia e 1/25000 (0,004%) em países como Estados Unidos e Reino Unido ².

A doença geralmente inicia-se em indivíduos de meia-idade, a maioria acima dos 40 anos, podendo se desenvolver antes desta idade ³. No passado a PCT predominava em homens, mas alguns autores encontraram uma incidência aproximadamente idêntica nos dois sexos ⁴. O aumento da incidência em mulheres deve-se à ingestão de estrógenos (anticoncepcionais e reposição hormonal na menopausa) e ao aumento do consumo de álcool pelas mulheres nas últimas décadas ⁵.

3.1.1 *Classificação*

A classificação da PCT reflete a causa subjacente e o tecido onde se localiza a deficiência da enzima UROD ⁶. A PCT apresenta as seguintes formas: tipo I (adquirida ou esporádica), tipo II (hereditária ou familiar) e a tipo III (indistinguível da tipo I, mas agrupados em algumas famílias).

1. PCT tipo I – é a mais comum e representa 75% dos casos ². Na PCT tipo I, as medidas quantitativas da UROD no fígado e nos eritrócitos são normais, mas a atividade da UROD é reduzida no fígado e normal nos

eritrócitos ^{7,8}. As sequências do cDNA da UROD hepática e extra-hepática e de sua região promotora são normais, e não há nenhuma evidência de uma mutação no locus UROD ^{9,10}. Estes resultados são consistentes com a presença de um inibidor da UROD no fígado destes pacientes com a PCT tipo I ². A associação frequente de PCT com sobrecarga de ferro, o consumo de álcool e o aumento dos níveis de estrógenos (natural ou terapêutico) sugerem que a expressão clínica da doença é resultado de algum tipo de interação entre indivíduos geneticamente predispostos e fatores adquiridos ².

2. PCT tipo II – representa aproximadamente 20% dos casos ². A herança é autossômica dominante e apresenta a atividade da UROD reduzida para 40% a 60% do normal em todos os tecidos ⁸. A atividade enzimática e o nível de enzimas imunorreativas estão reduzidos de forma equivalente nas hemácias ⁸. Várias mutações já foram identificadas no gene da UROD, que fica no cromossomo 1p34. As mutações no gene da UROD diferenciam a PCT familiar da forma esporádica. A expressão clínica do defeito genético é baixa, pois menos de 10% dos indivíduos geneticamente afetados irão expressar os sintomas ^{8,11}.

3. PCT tipo III – é clinicamente indistinguível do tipo I; o defeito enzimático está restrito ao fígado, mas com história familiar presente ^{12,13,14}. Estes representam menos de 5% dos casos; entretanto permanece incerto se realmente representam uma forma distinta de PCT ou se apenas refletem uma importante contribuição genética fora do locus da UROD para a patogênese da PCT tipo I ².

Não devemos esquecer a porfiria cutânea tóxica, clinicamente semelhante à PCT e que resulta da exposição aos hidrocarbonetos halogenados. Os melhores exemplos são o hexa-cloro benzeno, ^{15,16} que foi responsável por um grande surto de porfiria tóxica na Turquia, e o 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina. Estes compostos inativam a UROD em animais, resultando na porfiria experimental ou uroporfiria ^{8,15,17}. A PCT também tem sido descrita em pacientes tratados com drogas antineoplásicas (ciclofosfamida e o tamoxifeno) ^{18,19} e tuberculostáticas ^{20,21}. Estas drogas

são metabolizadas via citocromo P450 ou estimulam a ALA sintetase; a patogênese desta forma de porfiria não está clara ^{18,20,21}.

3.1.2 *Quadro clínico*

O quadro clínico caracteriza-se por: fragilidade da pele fotoexposta; bolhas e erosões acometendo dorso das mãos (**Figura 1**), antebraços e face; cicatrizes atróficas hiperpigmentadas ou hipopigmentadas; mílio; hipertricose na região temporal e malar (**Figura 2**); alterações pigmentares (pigmentação difusa ou semelhante a melasma); eritema ou pletora do centro da face, pescoço e região peitoral; alopecia cicatricial; foto-onicólise; placas esclerodermiformes; calcificações distróficas e urina escura semelhante a chá ou vinho tinto ⁶. Nos exames laboratoriais observamos aumento do ferro sérico e da ferritina, eritrocitose leve, teste de tolerância à glicose (GTT) alterada (25%) e aumento das transaminases hepáticas (Aspartato transaminase (AST), Alanina transaminase (ALT)) e da gama-glutamil transpeptidase (GGT) ⁴. Apesar de doença hepática clinicamente significativa ser incomum na PCT, os testes bioquímicos hepáticos anormais são comuns ^{4,22}, bem como uma variedade de anomalias histopatológicas. Destes, a siderose é geralmente considerada a alteração mais comum, mas esteatose leve, necrose focal, inflamação portal e fibrose também são observadas com frequência ^{23,24,25}. Uma baixa incidência de cirrose, geralmente inferior a 15%, tem sido observada em várias séries ^{22,23}. Estes achados foram considerados inespecíficos. Na PCT, o fígado contém maiores quantidades de uro- e hepta-carboxiporfirinas, além de cristais birrefringentes em forma de agulhas, que são específicos da PCT ²⁶. Desconhecemos se o acúmulo das porfirinas contribui para a patogênese ou progressão da lesão hepática na PCT ²³.

Figura 1 - Porfíria cutânea tardia – Bolhas, lesões ulceradas encimadas por crostas, lesões cicatriciais e milia no dorso da mão

Figura 2 - Porfíria cutânea tardia – Doente feminina com hipertricose acometendo a região malar superior e a região temporal até a região frontal

3.1.3 *Diagnóstico e achados laboratoriais*

Pode-se suspeitar do diagnóstico de PCT pela clínica e histopatologia, mas a análise das porfirinas na urina, nas fezes e no sangue é necessária para distingui-la de outras doenças. Para a análise inicial das porfirinas, podemos utilizar testes de “*screening*” usando a lâmpada de Wood ²⁷. Na PCT este teste é positivo na urina (++) e nas fezes (++) e negativo no sangue (eritrócitos). Os espécimes deverão ser amostras frescas. Usa-se a lâmpada de Wood, que contém comprimento de onda entre 350-420nm, isto é, radiação ultravioleta (RUV) de comprimento de onda longa e luz violeta.

Na PCT mais grave, os pacientes apresentam a urina escura devido ao seu alto conteúdo de porfirinas e a urina (logo após a coleta) exibe uma fluorescência púrpuro-avermelhada à luz de Wood, sem a necessidade de acidificação da amostra. Entretanto, as porfirinas estão frequentemente conjugadas e para sobrepor isto, a urina precisa ser acidificada. Para detectar as porfirinas urinárias no teste de “*screening*” utiliza-se o Método de Rimington ²⁷. As uroporfirinas e coproporfirinas são extraídas no amil álcool onde fluorescem livremente e os outros materiais fluorescentes e quelantes ficam na camada aquosa. Fluorescência rósea ou vermelha pálida na camada superior denota excesso de porfirina. Na análise das porfirinas fecais (coproporfirinas) utiliza-se o mesmo método (Método de Rimington), no entanto as fezes podem conter normalmente pigmentos de clorofila provenientes da dieta (vermelho fluorescente), e pequenas quantidades de COPRO e protoporfirinas ²⁷. Se a coproporfirina ou isocoproporfirina estão presentes em excesso, a fluorescência na camada ácida inferior é forte. Fluorescência avermelhada na camada superior (éter) não tem significado diagnóstico (pigmentos de clorofila). Por fim, para pesquisar o excesso de porfirinas nos eritrócitos, utiliza-se o Método de Rimington-Doyle ²⁷. Este teste é negativo na PCT. Fluorescência rósea a avermelhada na camada ácida inferior indica excesso de porfirina. PROTO, COPRO ou uroporfirinas,

em excesso, são detectadas nos glóbulos vermelhos, se a dosagem estiver acima de 500 µg/100ml.

Utilizam-se os testes de “*screening*” para ajudar no diagnóstico diferencial, e quando este for positivo ou duvidoso, um exame quantitativo deverá ser realizado. Para confirmar o diagnóstico de PCT, utiliza-se a quantificação das porfirinas urinárias pelo método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) ^{28,29}. Este método detecta e identifica as seis frações de porfirinas: Uroporfirina ou URO (8-carboxil), hepta-porfirina (7-carboxil), hexa-porfirina (6-carboxil), penta-porfirina (5-carboxil), e coproporfirina ou COPRO I e III (4-carboxil) na urina de 24 horas. Na PCT, o padrão característico é o aumento da excreção de URO (50 vezes acima do nível normal) e da hepta-porfirina; a hexa e a penta-porfirina também podem estar aumentadas. A COPRO também está aumentada, mas numa extensão menor que a URO ^{25,30}. A URO e a hepta-porfirina são as porfirinas urinárias predominantes na PCT (>90 por cento do total das porfirinas); a relação URO/COPRO é geralmente > 3:1 ³¹. Em condições fisiológicas, a relação URO/COPRO é aproximadamente 1:4 e na PCT há uma inversão desta relação. Isto ocorre em todos os pacientes com doença ativa e também em indivíduos que estão em remissão ^{6,32}. O marcador bioquímico utilizado, para avaliar a atividade da doença e a resposta ao tratamento, é a quantificação da excreção de porfirinas urinárias ³³.

Nos pacientes com insuficiência renal crônica (IRC), a análise das porfirinas diferencia a PCT da pseudoporfiria. Em pacientes anúricos, os níveis elevados de isocoproporfirina nas fezes e de uroporfirina no plasma firmam o diagnóstico de PCT. Caso contrário, o exame de urina é normalmente suficiente e revela aumento significativo de uroporfirina I, e em menor quantidade de uroporfirina III, 8-carboxil porfirina e 7-carboxil porfirina. Os níveis séricos de uroporfirina nos pacientes com PCT e IRC são similares ou excedem os níveis encontrados nos pacientes com PCT e função renal normal ³⁴.

Outras alterações bioquímicas são o aumento dos depósitos de ferro em praticamente todos os pacientes com PCT; apresentam aumento do ferro sérico, saturação de transferrina, ferritina sérica e ferro hepatocelular e diminuição da capacidade de ligação do ferro^{31,35}. A glicemia ou o teste de tolerância à glicose está alterado em uma minoria. As transaminases séricas (alanina transaminase (ALT) e aspartato transaminase (AST)) e a gama-glutamil transpeptidase (GGT) estão elevadas em 50% dos pacientes³⁶ e os pacientes com hepatite C associada apresentam níveis séricos mais altos³⁷.

O diagnóstico de PCT baseia-se no quadro clínico característico, no exame de “*screening*” com a lâmpada de Wood (urina, sangue e fezes), na histopatologia e imunofluorescência direta (IFD) da lesão bolhosa, na elevação dos níveis de ferro, no aumento das enzimas hepáticas, e na dosagem das porfirinas na urina de 24 horas, que confirma o diagnóstico quando o aumento do nível de uroporfirina é pelo menos três vezes maior que o nível de coproporfirina^{4,31,35,38}.

3.1.4 Mecanismo de inativação da UROD no hepatócito

Contrastando com as outras porfirias, a PCT não é uma doença de herança monogênica. Indivíduos com PCT aparentemente são predispostos geneticamente a desenvolver deficiência de UROD como resposta à lesão hepática. A doença é desencadeada pela ingestão de álcool, estrógenos, vírus da hepatite C (VHC), hemodiálise, vírus da imunodeficiência humana (HIV), hidrocarbonetos halogenados e condições que levam ao excesso de ferro (**Tabela 1**)^{39,40,41}.

Estudos bioquímicos e genéticos indicam que não há hereditariedade do defeito específico no fígado (na expressão ou estrutura da UROD) na PCT esporádica^{7,10}. Se fatores hereditários estão envolvidos, outros *loci* devem estar afetados¹⁰. A expressão clínica da PCT aparenta ser um resultado da inativação progressiva da UROD (estruturalmente normal) no fígado, por um

processo específico atingindo o sítio catalítico, não afetando os principais epitopos ⁴². A atividade da UROD no fígado diminui para 25% ou menos do normal, níveis estes que produzem quantidade suficiente de porfirinas para causar fotossensibilização ^{7,42,43}. Embora esteja mais bem relatado na PCT esporádica, provavelmente este processo também ocorre na forma familiar, onde, é provável que uma menor inativação seja necessária, pois nestes casos a concentração da enzima já é baixa ³⁶.

Tabela 1 - Fatores precipitantes da porfiria cutânea tardia

➤ **Fatores Genéticos:**

- Mutação no *locus* UROD
- Mutações HFE – C282Y, H63D, S65C
- Outras *mutações* fora do *locus* da UROD (?)

➤ **Fatores Ambientais / Condições associadas:**

- Álcool
- Estrógenos
- Hidrocarbonos clorados
- Insuficiência renal crônica
- Condições que levam ao excesso de ferro (dieta, suplemento ferro, transfusão, etc.)

➤ **Fatores Infecciosos**

- Hepatite C
 - Hepatite B
 - HIV
-

Nota: UROD: uroporfirinogênio descarboxilase; HFE: gene da hemocromatose hereditária; HIV: vírus da imunodeficiência humana

Elder em 1998 ⁶ revisou os fatores que interferem no mecanismo de inativação da UROD no hepatócito em modelos experimentais e observou que três fatores principais aceleravam sua inativação: a sobrecarga de ferro, a indução do citocromo P450 (especialmente CYP1A2) e o aumento do suplemento de ALA ^{6,44}.

O ferro age promovendo a formação de espécies reatoras do oxigênio (EROs). Há fortes evidências de que o ferro age oxidando o substrato da UROD, isto é, o uroporfirinogênio (UROGEN), gerando uroporfirina (URO) e produtos oxidados não-porfirínicos (uroporfometileno) que inibem a enzima ⁴⁵. O uroporfometileno tem capacidade de se adaptar ao sítio catalítico da UROD ⁴⁵. A oxidação ocorre através dos radicais hidroxil, cuja formação é promovida pelo ferro ⁴³. O ferro também induz a heme oxigenase, causando o esgotamento do *pool* regular de heme e, assim, sem a inibição da ALA sintetase, há aumento da produção do UROGEN e da URO. Por fim, o ferro pode induzir a ALA sintetase e assim aumentar a quantidade de ALA, precursora do UROGEN ⁴⁶. O ferro tem um papel importante na patogênese da doença. A remissão após a flebotomia e a falha do tratamento, se for administrado o suplemento de ferro, sugerem que o ferro contribui para o excesso de produção das porfirinas hepáticas ^{47,48}.

Os hidrocarbonetos cíclicos clorados e não clorados induzem o citocromo P450 e causam a PCT tóxica e uroporfiria experimental ⁴⁹. Em roedores, o citocromo P450IA2 catalisa a oxidação microsomal (NADPH-dependente) da UROGEN em URO ⁵⁰. O citocromo humano é menos ativo como catalítico da oxidação do uroporfirinogênio em relação ao do roedor ⁵⁰. O mecanismo responsável por gerar o uroporfometileno *in vivo* não foi definido, mas a CYP1A2 provavelmente desempenha um papel central, pois Sinclair *et al.* ⁵¹ demonstraram que o camundongo Cyp1A2^{-/-} é resistente a regimes que produzem a PCT experimental. Phillips *et al.* ⁴⁵ sugerem que a CYP1A2 converte o uroporfirinogênio em uroporfometileno, em uma reação oxidativa, dependente de ferro. O polimorfismo no intron 1 do CYP1A2 C/A parece estar associado a variações na sua indução. O genótipo A/A é altamente induzível e está associado a aumento na atividade do CYP1A2 após a exposição a determinados agentes; observou-se uma frequência maior deste genótipo A/A entre os pacientes com PCT comparado ao grupo controle, sugerindo que a herança do genótipo CYP1A2 A/A está associada com uma maior predisposição para o desenvolvimento da PCT ⁵².

A indução de uroporfiria em roedores com hidrocarbonetos cíclicos e ferro é acelerada de forma marcante com a adição de ALA ²⁵. A adição de ALA tem efeito acelerador provavelmente porque serve como um fornecedor de uroporfirinogênio, substrato para a UROD que está inibida. A medida da atividade da ALA sintetase, enzima controladora da biossíntese do heme, não está aumentada, provavelmente porque basta estar um pouco acima dos níveis basais para produzir o aumento na produção de porfirinas ²⁵.

Alguns autores sugerem que autoanticorpos podem estar envolvidos na inibição da UROD ^{53,54}. Os pacientes com hepatite C teriam aumento da resposta autoimune no fígado, e os autoanticorpos funcionariam como inibidores da atividade catalítica da UROD. Indivíduos infectados pelo VHC, mas sem PCT, podem apresentar aumento das porfirinas e diminuição da atividade da UROD no fígado; sugere-se que as reações imunológicas podem ser a ligação entre o vírus e a PCT ⁵⁵.

Na **Figura 3** observamos a interação entre os fatores hereditários e adquiridos implicados na inativação da UROD (modelo patogênico modificado de Thunell *et al.* ³⁰ e Bonkovsky *et al.* ⁵⁶). Em condições normais, praticamente todo UROGEN III é convertido em COPROGEN III. Na presença de ferro a proporção oxidada de URO e de produtos de oxidação não-porfirínicos (uroporfometileno) está aumentada; isto ocorre quando há indução do citocromo P450 ou acúmulo intracelular de UROGEN (secundário à deficiência de UROD ou administração de ALA). A inativação da UROD é autosustentada a não ser que a formação de EROs seja prevenida pela remoção de ferro. O uroporfometileno é um inibidor competitivo da UROD, produto da oxidação do uroporfirinogênio. A reação de oxidação de uroporfirinogênio para o uroporfometileno é dependente de ferro, apoiando o conceito de o ferro agir como um cofator na patogênese da PCT ⁴⁵. O ferro age como um interruptor que controla a geração de inibidores da UROD, começando um ciclo vicioso de inativação da UROD; sua remoção permite a restauração da atividade da UROD ⁶. São vários os genes, candidatos a induzir a PCT. Mutações no *locus* da UROD podem diminuir a concentração da enzima de forma que uma inativação menor seria

necessária para atingir o nível no qual surge a doença. Outros *loci*, candidatos potenciais, seriam *loci* envolvidos na regulação do metabolismo do ferro, na produção do heme hepático, na formação de ALA e na indução do citocromo P450. As mutações ocorridas em mais de um destes *loci* podem explicar porque a PCT é uma reação incomum entre as causas frequentes de lesão hepática. Genes de susceptibilidade fora do *locus* da UROD, além do gene HFE da hemocromatose hereditária (HH), ainda não foram identificados ³⁰. Aproximadamente 20% dos pacientes com PCT são homozigotos para a mutação C282Y do gene HFE e 15% são heterozigotos para esta mutação ⁵⁷. Em dois terços dos casos, no entanto, não há explicação aparente para a siderose hepática. Uma constatação importante é que poucos pacientes com hemocromatose ou outras doenças associadas à sobrecarga de ferro desenvolvem PCT, portanto, só a sobrecarga de ferro não é suficiente para produzir o fenótipo de porfiria ⁵⁷. Outros fatores, além dos níveis de ferro, determinam a manifestação da PCT, pois pacientes com PCT ativa podem apresentar níveis de ferro normais e pacientes em remissão bioquímica apresentar níveis de ferro elevados ⁵⁸. Provavelmente, outros genes influenciam no metabolismo do ferro destes pacientes e o que fala a favor disto é que cepas isogênicas de camundongos são sensíveis ou resistentes à porfiria induzida experimentalmente ⁴⁵. Os fatores de risco ambientais associados à PCT (VHC, álcool e estrógenos) são muito mais comuns do que a frequência da PCT, que é estimada em 1 em 5000 para 1 em 25000 pessoas ⁵⁷, portanto, variações genéticas devem influenciar na produção do inibidor da UROD (uroporfometileno) ⁴⁵. Os depósitos de ferro hepático podem estar aumentados pela ingestão de ferro na dieta alimentar ⁵⁸. Álcool e estrógenos aumentam a absorção intestinal de ferro, e a infecção viral crônica pode liberar o ferro ligado à ferritina ³⁰. Há evidências que o álcool e o VHC podem afetar a homeostase do ferro, diminuindo a expressão da hepcidina no fígado ⁵⁹. O álcool e os hidrocarbonetos cíclicos podem também induzir o gene da ALA sintetase, enzima que controla a geração UROGEN, precursor de inibidores da UROD ³⁰. As interações precisas entre os fatores genéticos e ambientais continuam indefinidos ⁴⁵.

Baseando-se neste modelo (**Figura 3**)², podemos concluir:

1. A PCT tipo I desenvolve-se quando a atividade enzimática da UROD é < 25% do normal, uma redução não alcançada até mesmo ao herdar a PCT tipo II, na qual a atividade da UROD é cerca de 50% do normal.
2. Por conseguinte, em todos os três tipos de PCT, fatores fora do *locus* UROD devem estar implicados na patogênese da doença ativa.
3. Foram encontrados vários fatores precipitantes: genéticos, ambientais e infecciosas associados à PCT (**Tabela 1**), todos contribuindo, direta ou indiretamente, para a geração de EROs no fígado e assim para a inativação da UROD.
4. Com relação aos fatores precipitantes, geralmente o indivíduo apresenta vários fatores associados. Em um estudo com 39 pacientes com PCT, apenas três tinham um ou dois fatores precipitantes coexistentes, 28 (72%) tinham três ou quatro fatores precipitantes coexistentes e oito (21%) cinco a sete fatores precipitantes coexistentes⁶⁰. Nesse sentido, a presença de PCT em qualquer paciente individual é multifatorial.
5. Mutações no *locus* UROD que alteram a estrutura ou atividade da UROD ou que modificam a taxa de produção da enzima estruturalmente normal podem aumentar a susceptibilidade do indivíduo para os efeitos dos fatores precipitantes adicionais. Com exceção das mutações conhecidas da PCT tipo II, nenhuma dessas mutações no *locus* UROD foi identificada. Fora do *locus* da UROD, genes envolvidos no metabolismo do ferro (por exemplo, HFE), biossíntese e degradação do heme e níveis do citocromo P450 (especialmente CYP1A2), ou a capacidade de manter os níveis de antioxidantes intra-hepatocelular, bem como uma variedade de fatores ambientais e infecciosos, também contribuem para o risco de desenvolver PCT.
6. Uma decorrência importante destas observações é que vários fatores precipitantes devem ser procurados em qualquer paciente com PCT, pois a identificação dos fatores precipitantes traz implicações terapêuticas.

FONTE: Modificado de Thunell, 2000³⁰; Bonkovsky, 2003⁵⁶; Phillips, 2007⁴⁵

NOTA: ⁽¹⁾ EROs: Espécies reatoras de oxigênio; UROGEN: uroporfirinogênio; URO: uroporfirina; UROD: uroporfirinogênio descarboxilase; ALA: Ácido delta-aminolevulínico; (+) estimula ou induz; (-) inibe.

Figura 3 - Patogênese da porfiria cutânea tardia - Mecanismo de inativação da uroporfirinogênio descarboxilase (UROD) nos hepatócitos e a interação entre fatores hereditários e adquiridos (modelo patogênico). As enzimas que controlam a biossíntese do heme hepático (ALA sintetase) e a sua quebra (heme oxigenase), assim como a UROD, enzima que realiza o descarboxilação gradual do uroporfirinogênio (UROGEN) para coproporfirinogênio (COPROGEN), estão representadas. A atividade da UROD está reduzida em todas as formas de PCT. Na presença de um ou mais fatores precipitantes, o ferro, associado ao citocromo P450, leva à formação de espécies reatoras de oxigênio (EROs), que aumentam a oxidação do UROGEN em URO e uroporfometileno (inibidor da UROD)⁴⁵. O ferro também induz a heme oxigenase,

causando o esgotamento do *pool* regular de heme e, assim, sem a inibição da ALA sintetase, há aumento da produção do UROGEN e da URO ⁴⁶. Com a retirada ou redução dos fatores precipitantes e diminuição da produção das EROs, a atividade da UROD é restaurada com a síntese de UROD ativa ^{30,56}

3.1.5 Fatores precipitantes

A PCT pode ser desencadeada por vários fatores precipitantes (**Tabela 1**): o álcool, os hidrocarbonetos halogenados, a infecção pelo vírus da hepatite B (VHB) e C (VHC) ⁶¹⁻⁶⁶, a infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) ^{67,68}, os estrógenos ⁶⁹ e a hemodiálise na insuficiência renal crônica ^{70,71}. Os diversos fatores precipitantes: excesso de ferro, álcool, hepatite C e estrógeno, contribuem igualmente para a expressão clínica da PCT esporádica e familiar ⁵⁷.

Não foram encontradas diferenças entre a PCT esporádica e familiar em relação à idade de início da doença, gravidade das lesões, distribuição dos sexos, alteração das enzimas hepáticas e nos níveis de ferro ⁵. Bulaj *et al.* ⁵⁷ encontraram a mutação da UROD em 29% dos casos de PCT. A frequência da mutação da UROD na população é desconhecida, mas é pouco provável que seja tão alta quanto aquela encontrada na população com PCT ⁵⁷. Nos familiares de pacientes com PCT tipo II, a maioria dos indivíduos, que carregam a mutação, não expressa a doença, o que indica que não apenas a mutação da UROD seja responsável pelo desenvolvimento da PCT. Outros fatores genéticos não identificados provavelmente desempenham um papel na patogênese, pois até a PCT esporádica parece ter um caráter familiar ¹³. A proporção da população exposta ao excesso de álcool, VHC e estrógenos é bem maior do que a frequência de PCT, indicando que estes fatores precipitantes isolados não causam PCT. Aparentemente, uma interação não elucidada entre os fatores genéticos e ambientais é necessária para a expressão fenotípica da PCT na maioria dos casos ⁵⁷. A maioria dos pacientes com PCT apresenta múltiplos fatores

precipitantes, sendo que a combinação mais comum é o álcool e VHC nos homens (80%); já nas mulheres apenas um fator precipitante isolado é frequente devido ao uso de estrógenos (40%)⁵⁷. Outro fator precipitante suspeito é o tabagismo⁶⁰, mas faltam mais dados científicos para que possamos fazer esta afirmação²¹.

3.1.5.1 Álcool

A associação entre excesso de consumo de álcool e PCT está bem reconhecida, mas é difícil avaliar o álcool como um fator precipitante independente, pois o álcool está presente na maioria dos pacientes com VHC associada (71% homens e 28% mulheres)⁵⁷. Muitos relatos indicam que o álcool acelera o desenvolvimento de fibrose hepática nos pacientes com VHC⁷²⁻⁷⁴. O etilismo crônico também pode exacerbar a infecção pelo VHC e diminuir sua capacidade de resposta ao interferon, portanto se recomenda não ingerir bebida alcoólica antes de iniciar o tratamento⁷⁴. O mecanismo pelo qual o álcool acelera a lesão hepática é desconhecido. Provavelmente vários mecanismos estão envolvidos, como: aumento da replicação viral, mutações do VHC formando quase espécies, mutações no gene viral, aumento da apoptose dos hepatócitos, aumento da inflamação e das proteínas imunoreguladoras (IL, TNF e IFN), inibição da resposta imune contra o VHC mediado pelos linfócitos T *helper* e T citotóxicos, piora da esteatose hepática, aumento do estresse oxidativo, depressão do sistema imunológico e, por fim, aumento da sobrecarga de ferro⁷⁴.

Há associação da doença hepática alcoólica (DHA) com o aumento do ferro (aumento da saturação de transferrina, ferritina sérica e do ferro hepático)⁷⁵. Estudos em animais demonstraram que o consumo de álcool causa depósito de ferro no fígado⁷⁶ e estima-se que um terço dos etilistas desenvolve sobrecarga de ferro hepático⁷⁷. O mecanismo que leva ao aumento do ferro hepático na DHA é por meio do estresse oxidativo induzido pelo álcool, que tem sido associado à supressão da expressão da hepcidina hepática⁷⁸. O álcool abole o aumento da hepcidina em resposta à

sobrecarga de ferro, ou seja, ele anula o efeito protetor da hepcidina diante da sobrecarga de ferro ⁷⁸. A hepcidina atua como um regulador negativo da absorção de ferro da dieta, portanto isto resulta em absorção excessiva de ferro. O álcool também interfere na indução da hepcidina mediada pela IL-6, sugerindo outro caminho através do qual afeta a homeostase do ferro ⁷⁹. O ferro e o álcool causam estresse oxidativo; o aumento das espécies reativas de oxigênio (EROs) causa peroxidação lipídica e dano às células. O consumo de álcool pode agravar a lesão hepática na HH, pois vários estudos relatam que pacientes com HH e que ingerem quantidades excessivas de álcool têm um maior risco de desenvolver cirrose e carcinoma hepatocelular (CHC) ⁸⁰⁻⁸³. Como há a associação do álcool com o ferro, vários estudos avaliaram o papel das mutações HFE como um cofator na progressão da DHA e a maioria não encontrou relação entre a presença das mutações HFE e doença hepática avançada nestes pacientes. Entretanto, encontraram uma associação entre as mutações HFE e aumento do ferro sérico ou da concentração de ferro hepático ⁵⁹. Um estudo de 179 pacientes com cirrose alcoólica mostrou uma frequência global das mutações HFE neste grupo semelhante ao controle, mas a frequência de heterozigotos para C282Y entre os 43 pacientes com cirrose e CHC foi significativamente maior do que a frequência desta mutação entre os pacientes só com cirrose, sugerindo que o álcool associado à mutação HFE aumenta o risco de desenvolver CHC ⁸⁴.

3.1.5.2 Hepatite C

A prevalência global de hepatite C nos Estados Unidos é de cerca de 1,7% ⁸⁵. No Reino Unido e Escandinávia a prevalência é de 0,01 a 0,1%, respectivamente. Já no Egito a prevalência é alta (17% a 26%) ⁸⁶. Na Itália, a prevalência de hepatite C global é de 5% ⁸⁷, mas nas comunidades do Sul foi tão alto quanto 12,6% ⁸⁸. Dada a relativa abundância da infecção crônica pelo VHC na população, a conclusão de que alguns pacientes com PCT também tinham infecção pelo VHC podia ter sido facilmente descartada

como uma ocorrência por mero acaso de uma doença muito comum entre os pacientes com PCT ². Entretanto, Fargion *et al.* ⁶¹ fizeram uma investigação sistemática, que resultou no primeiro estudo reconhecendo esta associação; 76% de 74 pacientes com PCT apresentava anticorpos anti-VHC. Uma prevalência elevada de infecção pelo VHC em casos de PCT já foi confirmada por estudos de muitos países, conforme resumido em uma meta-análise de 50 estudos feita por Gisbert *et al.* ⁶⁶. A prevalência média calculada do VHC entre os 2.167 pacientes com PCT foi de 47%. Encontraram sete estudos caso-controle (de 50 estudos), que comparavam a prevalência do VHC na PCT e na população geral: 40% *versus* 0,24% (OR=275; 95% IC = 104-725). A prevalência muito maior do VHC nos pacientes com PCT do que na população em geral, sugere um possível papel etiopatogênico do VHC na PCT ⁶⁶. A prevalência do VHC variava dependendo do país e do tipo de PCT: 57% na PCT tipo I (esporádica) e 26% na PCT tipo II (familiar) ⁶⁶. A prevalência da hepatite C na PCT é variável; no norte da Europa é de 8-10% e no sul da Europa é de 71-91% ¹ e nos Estados Unidos 59% ⁵⁷. A variação geográfica marcante desta associação sugere que os fatores genéticos e/ou ambientais também estão envolvidos na patogênese da PCT. Por outro lado, a prevalência de PCT relatada nos pacientes com VHC é muito baixa (1 a 5%) ^{66,89}, portanto, apesar da associação da infecção pelo VHC e a PCT, a maioria dos pacientes com VHC não desenvolve PCT, sugerindo que a dosagem de porfirinas deve ser limitada àqueles com características clínicas sugestivas de PCT.

A maioria dos pacientes com o VHC foi exposta ao vírus antes da expressão clínica e diagnóstico de PCT ⁸⁹⁻⁹¹. O aumento da prevalência do VHC pode estar relacionado ao aumento de consumo de álcool, devido ao fato da positividade para anti-VHC ter sido relatada em até 25% dos pacientes etilistas crônicos ⁹². No entanto, há estudos que demonstram que o consumo de álcool foi semelhante em pacientes de PCT com ou sem VHC⁹⁰.

A remissão clínica e bioquímica da PCT, com a normalização das enzimas hepáticas e da ferritina, tem sido relatada após o tratamento com interferon⁹³⁻⁹⁵, mas a ausência de alterações na carga viral do VHC sugere que, em alguns casos, a resolução da PCT não está relacionada ao vírus em si, mas a outros mecanismos⁹⁶. Vários autores não confirmaram a melhora com o tratamento antiviral^{37,97-99} e há, inclusive, um estudo que observou o surgimento de PCT durante o tratamento com interferon/ribavirina¹⁰⁰, indicando que o papel do tratamento antiviral para VHC associado à PCT ainda tem que ser definido⁶⁶.

A infecção pelo VHC torna-se crônica em aproximadamente 74% das pessoas expostas ao vírus⁸⁵, mas a evolução da doença é variável⁵⁹. A razão por que alguns indivíduos desenvolvem doença mais avançada do que outros não está clara⁵⁹. Aproximadamente 20% desenvolve cirrose após 20 anos¹⁰¹. A susceptibilidade à cirrose é mais comum em homens, pessoas infectadas após os 50 anos de idade e em indivíduos que consomem quantidades excessivas de álcool¹⁰¹.

O genótipo do vírus pode ser importante, pois os genótipos 1 e 4 são menos responsivos ao tratamento da hepatite C¹⁰¹. Há estudos que não encontraram associação do genótipo do VHC com a PCT³⁷, mas outros sugerem que o genótipo subtipo 1b do VHC estaria mais relacionado à PCT^{90,102}.

Na hepatite C os níveis de ferro sérico e o teor de ferro hepático estão aumentados com frequência, mas o papel do ferro na patogênese da hepatite C ainda não está muito claro⁵⁹. Os indivíduos com hepatite C apresentam diminuição da expressão da hepcidina e isto pode explicar a sobrecarga de ferro associada à hepatite C¹⁰³. Vários estudos sugerem que o ferro contribui para a progressão da doença⁵⁹. O estresse oxidativo foi proposto como um fator importante que contribui na lesão hepática e sabemos que o ferro pode promover estresse oxidativo⁵⁹. Pacientes com sobrecarga de ferro ligado à HH tem maior risco de desenvolver PCT e hepatite C¹⁰⁴. A associação de ferro e a hepatite C crônica levou à

investigação das mutações HFE como um fator contribuindo para a progressão da doença hepática, mas os resultados são conflitantes. Alguns relatam a associação das mutações HFE com doença hepática mais grave, enquanto outros não encontraram esta associação ⁵⁹. No entanto, alguns estudos encontraram uma associação entre o ferro sérico ou hepático e doenças mais graves independentemente das mutações HFE ¹⁰⁵⁻¹⁰⁷. A infecção pelo VHC e a mutação para C282Y são fatores precipitantes para PCT independentes um do outro, pois no estudo de Stuart *et al.* ¹⁰⁸ todos os pacientes com VHC eram homozigotos para o tipo selvagem, ou seja, não apresentavam a mutação e no estudo de Toll *et al.* ¹⁰⁹ a prevalência de C282Y era maior entre os pacientes não infectados pelo VHC. Por outro lado, a prevalência da mutação H63D estava aumentada em pacientes com PCT infectados com o VHC, sugerindo que a mutação H63D deve estar associada com outros fatores para desencadear a PCT, possivelmente por causa de sua incapacidade para aumentar os níveis de ferro por si só ¹⁰⁹. Do mesmo modo, Chiaverini *et al.* ¹¹⁰ já haviam encontrado a prevalência da mutação H63D mais elevada nos pacientes PCT+/VHC+ do que nos pacientes PCT-/VHC+.

Se houver excesso de ferro associado ao VHC, a flebotomia associada ao tratamento antiviral está indicada ¹¹¹⁻¹¹³. Tratamento com flebotomia (às vezes combinada com uma dieta pobre em ferro) foi usado para reduzir a sobrecarga de ferro nos pacientes com hepatite C e resultou na diminuição das transaminases, dos marcadores de fibrose hepática, do dano ao DNA hepático e da incidência de carcinoma hepático ¹¹⁴⁻¹¹⁶. Não está claro se a flebotomia é benéfica para um pequeno número de pacientes com PCT que apresenta a concentração de ferro hepático normal ¹¹³. A depleção de ferro por flebotomia não parece interferir na resposta virológica sustentada quando o indivíduo é tratado com interferon e ribavirina; a sobrecarga de ferro não reduz a probabilidade de uma resposta virológica sustentada. Estudos prospectivos de longo prazo são necessários para estabelecer a eficácia da flebotomia em estabilizar a fibrose hepática e reduzir a incidência da CHC. Entretanto, acredita-se que reduzir o excesso

de ferro é uma abordagem razoável para os pacientes com aumento do ferro hepático e fibrose hepática, especialmente se eles não são candidatos ao tratamento com interferon e ribavirina. Essa abordagem tem baixo risco e teoricamente pode diminuir a progressão da doença e a incidência de carcinoma hepático ¹¹⁷.

3.1.5.3 Hepatite B

O VHB não está tão estreitamente associado à PCT como está o VHC porque o anti-HBc estava positivo em 42% dos pacientes, mas o AgHBs estava presente apenas em 5% e a maioria destes pacientes também era positivo para anti-VHC ⁶¹. Nos pacientes com PCT, a coinfeção para VHB e VHC ocorre em 10,6% a 33% dos casos e estes pacientes apresentam níveis mais altos de ALT e alterações histológicas mais graves no fígado ^{64,65}. Navas *et al.* ⁶², detectaram anticorpos contra VHB em 91% dos pacientes, mas o genoma viral do VHB foi detectado em apenas 41% dos pacientes. O genoma do VHB pode estar presente, mesmo quando o AgHBs está negativo ⁶¹. A infecção oculta pelo VHB é frequente ⁶⁵. Vacinação contra hepatite B deve ser oferecida aos pacientes com anti-VHB negativo ⁶⁵.

3.1.5.4 Vírus da imunodeficiência humana (HIV)

A associação do vírus da imunodeficiência humana (HIV) e a PCT foi inicialmente reconhecida em 1987 ¹¹⁸; no entanto, a maioria dos pacientes com PCT e HIV apresenta outros fatores precipitantes para o desenvolvimento da PCT, como o uso de álcool, a sobrecarga de ferro e a infecção pelo VHC concomitante ¹¹⁹. Nos primeiros relatos a PCT geralmente incidia nas fases mais tardias da infecção pelo HIV ¹²⁰, mas atualmente, na maioria dos casos relatados se fez o diagnóstico de HIV concomitante com a PCT ¹²¹. Alterações nas porfirinas séricas são mais frequentes nos pacientes com as duas infecções (VHC e HIV) e nos pacientes HIV positivo sem VHC, quando comparados aos pacientes HIV negativo com VHC, sugerindo que o HIV tem um papel independente do

VHC⁶⁸. Outros fatores precipitantes geralmente estão associados, tais como álcool, VHB e VHC; provavelmente é a combinação destes fatores que causa a lesão hepática e a infecção pelo HIV potencializa esta lesão¹²¹. Se o HIV é de fato um fator precipitante independente para PCT, permanece controverso, todavia deve-se considerar a sorologia para HIV em todos os pacientes com PCT.

3.1.5.5 Estrógeno

O estrógeno é um fator precipitante independente para o desenvolvimento de PCT e o mecanismo responsável por este efeito é desconhecido, pois não se identificou siderose hepática nestes pacientes¹²². O estrógeno dietilestilbestrol induz a ALA sintetase hepática, mas isto não explica o padrão de excreção de porfirinas encontrado na PCT¹²³. Outros autores vincularam o componente progestagênico do anticoncepcional como mais efetivo na indução da ALA sintetase¹²⁴. Estrógeno é o único fator precipitante em mais de 25% das mulheres com PCT⁵⁷. A remissão clínica e bioquímica pode ocorrer com a suspensão do estrógeno, desde que a exposição não tenha sido prolongada¹²⁵. Pacientes do sexo feminino com PCT induzida por estrógeno apresentam uma predisposição genética à porfiria, pois 84% apresenta diminuição da atividade da UROD para cerca de 50% do valor normal, sugerindo que estes pacientes apresentam uma predisposição genética para desenvolver a PCT³⁹. Devido a esta predisposição genética, alguns autores passaram a usar o termo PCT farmacogenética²¹. Tanto a gravidez¹²⁶ quanto o uso do estrógeno transdermico¹²² não estão associados à recidiva de PCT assintomática. Provavelmente, o efeito do etinil estradiol oral resulta da sua primeira passagem pelo fígado¹²⁶.

3.1.5.6 Insuficiência renal crônica

PCT pode ocorrer em pacientes com insuficiência renal crônica (IRC), tratados com hemodiálise^{127,128}. Salientamos que o paciente renal crônico pode apresentar: (1) Aumento das porfirinas plasmáticas (2 a 4 vezes) sem lesões cutâneas de porfiria, devido à ligação das porfirinas a proteínas plasmáticas não dialisáveis¹²⁹; (2) PCT verdadeira com aumento das porfirinas (5 a 100 vezes) devido à diminuição da UROD¹³⁰ ou (3) Pseudoporfiria³⁴. Os pacientes com a PCT verdadeira são provavelmente predispostos a PCT pela diminuição pré-existente da atividade da UROD hepática¹³¹. Pseudoporfiria é um termo usado para descrever pacientes que apresentam as manifestações cutâneas (exceto hipertricose, hiperpigmentação e placas esclerodermiformes), histologia e imunofluorescência direta (IFD) da PCT, mas sem alteração no perfil das porfirinas^{34,132-134}. A pseudoporfiria pode ser induzida por drogas como furosemda, ácido nalidixico, tetraciclina, naproxeno, piridoxina, sulfonamidas e isotretinoína¹³⁴⁻¹³⁶ ou ocorrer em indivíduo com insuficiência renal e em hemodiálise, e nesta condição pode ser denominada de dermatose bolhosa da hemodiálise¹³⁷⁻¹³⁹. A dermatose bolhosa da hemodiálise ocorre em 4-7% dos casos de hemodiálise e geralmente se desenvolve após tratamento prolongado (5-7 anos)¹³⁷⁻¹³⁹. Geralmente as porfirinas plasmáticas não passam pelos filtros da hemodiálise, exceto no caso relatado por Garcia-Parrilla *et al.*¹²⁸ onde usaram membranas com alta permeabilidade. A elevação das porfirinas plasmáticas é secundária à: (1) Diminuição do *clearance* renal; (2) Diminuição do *clearance* pelos filtros de diálise (peso molecular de exclusão de 10 kDa)¹²⁹; (3) Inibição da UROD devido à azotemia¹⁴⁰; e (4) Sobrecarga de ferro devido ao tratamento da anemia com transfusões sanguíneas e suplemento de ferro, levando à inibição da UROD, especialmente em indivíduos geneticamente predispostos¹⁴¹.

Cada um destes fatores precipitantes contribui para o excesso da porfirinogênese hepática característica da PCT. Há evidências que a siderose hepática é o evento patológico crítico na PCT e que outros agentes de alguma forma intensificam a habilidade do ferro em oxidar o substrato da

UROD. A maioria dos pacientes apresenta mais de um fator de risco para o desenvolvimento da PCT, frequentemente VHC e álcool, principalmente em homens ³³. A expressão da PCT depende, portanto da interação entre vários fatores, tanto genéticos quanto ambientais.

3.1.6 Doenças associadas

As doenças associadas com maior frequência são: *diabetes mellitus* ⁴, lupus eritematoso ¹⁴², carcinoma hepatocelular (CHC) ¹⁴³, neoplasias hematológicas ^{144,145} e a hemocromatose hereditária ^{57,89,110,146-148}, que será abordada em detalhe adiante.

A incidência de *diabetes mellitus* ⁴ e a intolerância à glicose ⁵⁸ são relatadas com frequência na PCT. Um estudo longitudinal e retrospectivo de 10 anos observou que as alterações do metabolismo da glicose (teste de tolerância a glicose alterado ou *diabetes mellitus*) se desenvolveram um longo período após o diagnóstico da PCT e que estes pacientes apresentavam hiperferritinemia persistente e história familiar de diabetes ¹⁴⁹. Alguns autores associam a intolerância à glicose mais à presença do gene da hemocromatose do que à PCT em si ¹⁵⁰.

Linnet *et al.* ¹⁵¹ observaram que além do aumento do risco de carcinoma hepático primário e do risco de mortalidade por cirrose, havia aumento de câncer de pulmão e de doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) entre os pacientes com PCT, mas estas duas últimas associações requerem confirmação. Egger *et al.* ⁶⁰ observaram que 86% dos pacientes com PCT eram tabagistas, portanto isto pode explicar a associação com DPOC e câncer de pulmão.

3.1.6.1 Carcinoma hepatocelular (CHC)

Fracanzani *et al.*¹⁴³ acompanharam 53 pacientes com PCT e um grupo controle pareado (em relação ao sexo, idade, duração do seguimento (+/- 5 anos), gravidade da doença hepática e infecção pelo VHC) e durante o acompanhamento o CHC se desenvolveu em 18 pacientes com PCT e em quatro pacientes do grupo controle. Variáveis independentes associados com o risco de câncer de fígado foram a presença de porfiria e cirrose na admissão (*Razões de chance*: 5.3, 95% IC 1.4-19 e 3.0, 95% IC 1.2-7.6, respectivamente); concluindo que pacientes com PCT correm maior risco de desenvolver câncer de fígado. Entretanto, Gisbert *et al.*¹⁵² observaram risco relativamente baixo de desenvolver CHC nos pacientes com PCT e atribuem o risco de CHC, pelo menos em parte, à infecção concomitante pelo VHC. Em um estudo epidemiológico brasileiro realizado por Carrilho *et al.*¹⁵³, observou-se que de 1405 pacientes com CHC, 98% apresentavam cirrose e que o VHC foi a principal etiologia (54%), seguida pelo vírus da hepatite B (16%) e álcool (14%); apenas 1% apresentava hemocromatose e nenhum caso de PCT foi citado. A cirrose está presente em menos de 15% dos pacientes e estes apresentam um risco maior de desenvolver CHC do que os outros tipos de cirrose^{143,154,155}. A incidência de CHC em PCT varia de 5 a 16%, mas em necropsias é de 40 a 50% indicando que estes tumores são assintomáticos e progridem lentamente¹⁵⁶. A coexistência de fatores como hepatite viral, álcool e sobrecarga de ferro pode explicar a ocorrência de CHC em pacientes com PCT mesmo na ausência de cirrose^{154,157}. O risco de CHC aumenta nos homens acima de 50 anos com cirrose e que apresentam PCT sintomática por 10 anos ou mais; risco diminui com o tratamento efetivo precoce^{155,156}. Os pacientes devem ser monitorados por ultrassom e dosagem de alfafetoproteína (AFP) sérica para a detecção precoce de malignidade hepática¹⁵⁸. O ultrassom abdominal é mais importante para o diagnóstico precoce do que a AFP, pois a maioria dos pacientes nos estágios iniciais do carcinoma apresentam AFP $\leq 100\text{ng/mL}$

3.1.6.2 Hemocromatose hereditária

O conhecimento da genética da hemocromatose e a penetração fenotípica variável dos genes dificultam a definição de hemocromatose, não havendo um consenso se devemos usar uma definição genotípica ou fenotípica. Tradicionalmente a hemocromatose era definida clinicamente, baseando-se na presença de uma sobrecarga de ferro com deposição de hemossiderina e nas fases finais no dano aos órgãos (fígado, pâncreas, etc), e verificando a presença de sobrecarga de ferro nos familiares. Com a descoberta de Feder *et al.*¹⁵⁹ em 1996, do gene HFE localizado no cromossomo 6, região p21.3, a definição genética evoluiu e a hemocromatose atualmente é definida como um distúrbio do metabolismo de ferro herdada de forma autossômica recessiva devido a dois alelos HFE mutantes; todavia depois da descoberta da penetrância clínica variável das mutações HFE e da caracterização genotípica das formas não-HFE da HH, nem uma definição puramente fenotípica ou genotípica é o ideal¹⁶⁰. Existem diferentes formas de hemocromatose (adulto e juvenil) e pelo menos quatro mutações em genes diferentes já foram descritas (**Tabela 2**)¹⁶⁰.

Tabela 2 - Classificação genética da hemocromatose hereditária

TIPO DE HEMOCROMATOSE	GENE	CROMOSSOMA	PROTEÍNA	HERANÇA	GENÓTIPOS
Tipo 1 Adulto (clássica)	HFE	6p	HFE	AR	C282Y/C282Y C282Y/H63D
Tipo 2A Juvenil	HJV	1q	Hemojuvelina	AR	
Tipo 2B Juvenil	HAMP	19q	Hepcidina	AR	
Tipo 3 Adulto	RTf2	7q	Receptor da Transferrina 2	AR	
Tipo 4 Adulto	SCL40A1	2q	Ferroportina	AD	

FONTE: Tabela de Batts *et al.*¹⁶⁰

Nota: HFE: gene da hemocromatose hereditária; HJV: hemojuvelina; HAMP: gene da hepcidina; RTf2: receptor de transferrina 2; SCL40A1: gene ferroportina-1; AR: autossômico recessivo; AD: autossômico dominante.

A hemocromatose hereditária (HH) é mais comum em caucasoides. Provavelmente a mutação da hemocromatose iniciou-se na população do noroeste da Europa (Celtas, Vikings ou germânicos). A distribuição mundial da HH reflete as migrações das populações afetadas originalmente, ou seja, há uma incidência maior entre os caucasianos do noroeste da Europa, Canadá, EUA, Austrália, Nova Zelândia e África do Sul ¹⁶⁰. A HH afeta uma em cada 200 a 400 pessoas descendentes do norte europeu ¹⁶¹. A frequência estimada dos alelos destas mutações na população branca é 0.04 para C282Y e 0.14 para H63D ¹⁶¹. Hemocromatose hereditária (HFE) é uma causa rara de sobrecarga de ferro entre populações asiáticas, das ilhas do Pacífico, indígenas australianos, africanos e sul-americanos ¹⁶². Na população brasileira observa-se uma grande miscigenação étnica, a população é composta principalmente por descendentes de europeus originários da Itália, Espanha e Portugal, por afrodescendentes (principalmente da Angola, Congo e Moçambique) e pela população indígena nativa, ainda, o Brasil também recebeu imigrantes da Alemanha, Japão e Oriente Médio ¹⁶³. A frequência do alelo da mutação C282Y foi 1,4% (caucasianos), 1,1% (afrodescendentes), 1,1% (com mistura étnica) e 0% (índios Parakanã). A frequência do alelo da mutação H63D foi 16,3% (caucasianos), 7,5% (afrodescendentes), 9,8% (população com mistura étnica) e 0% (índios Parakanã). Observou-se uma frequência baixa da mutação C282Y na nossa população o que está de acordo com a origem céltica ou *viking* da mutação ¹⁶³.

O aparecimento de sintomas clínicos ocorre após a terceira década de vida, pois a deposição do ferro é gradativa e cumulativa. O acúmulo do ferro ocorre no fígado, pâncreas, coração, articulações e glândula pituitária. O *diabetes mellitus* tipo II, a artralgia e a fadiga muscular são manifestações frequentes ¹⁶⁴. As manifestações clínicas mais acentuadas estão relacionadas à mutação C282Y e as mais brandas com as mutações H63D e S65C ¹⁶⁰.

3.1.6.2.1 *Homeostase do Ferro*

O ser humano modifica os níveis de ferro através da variação na taxa de absorção, que ocorre principalmente no duodeno, mas são incapazes de modificar a excreção de ferro porque não há nenhum mecanismo excretor para controle. Normalmente a perda de ferro ocorre pela descamação das células do revestimento intestinal e das células da pele ou pela menstruação nas mulheres ¹⁶⁵. A taxa de absorção de ferro normalmente é baixa (1 a 2 mg/dia), portanto o *turnover* interno do ferro é essencial para satisfazer os requisitos de ferro para a eritropoiese (20-30 mg/d) ¹⁶⁶.

Os elementos-chave do controle da homeostase de ferro são o transportador de metal divalente 1 (DMT1), ferroportina, hepcidina, receptor de transferrina 2 (RTf2) e a proteína HFE — as mutações em todos estes elementos, exceto DMT1, são relevantes nos diversos tipos de HH ¹⁶⁰. O fígado é o centro regulador da homeostase do ferro, pois expressa todas estas moléculas principais, responsáveis pela homeostase de ferro ⁵⁹.

A função do DMT1 é atuar como mediador para a absorção de ferro do enterócito maduro localizado na vilosidade duodenal (**Figura 4** — etapa 1). A expressão de DMT1 no enterócito é determinada pelo teor de ferro das células imaturas na cripta duodenal — ferro intracelular baixo resulta na maior expressão de DMT1 e vice-versa. Atualmente, uma doença relacionada com mutações dos genes que codificam para DMT1 não é conhecida ¹⁶⁰.

Ferroportina-1 é um transportador de ferro localizado em células que normalmente exportam ferro: enterócitos da cripta duodenal, macrófagos, células placentárias e hepatócitos ¹⁶⁷. Nos enterócitos, a ferroportina-1, também conhecida pelo nome do seu gene SLC40A1, está localizada no lado basal do enterócito duodenal maduro (**Figura 4** – etapa 2) ¹⁶⁰. A expressão da ferroportina é semelhante à do DMT1 e é determinada pelo teor de ferro na célula imatura da cripta duodenal — o ferro intracelular baixo resulta no aumento da expressão da ferroportina-1 e vice-versa. A função da ferroportina-1 é modificada pela circulação da hepcidina (veja abaixo).

Mutações no gene ferroportina-1 caracteriza a HH "Tipo 4" e resulta no acúmulo de ferro predominante nos macrófagos, imitando a sobrecarga de ferro secundária ou da anemia de doença crônica ¹⁶⁰.

A hepcidina é um peptídeo plasmático, produzido nos hepatócitos (**Figura 4** — etapa 4) que é regulado homeostaticamente sobretudo por anemia e hipoxemia, provavelmente através do receptor da transferrina 2 (RTf2) e a proteína HFE (veja abaixo), embora o mecanismo preciso não esteja definido ¹⁶⁸. A interação direta da hepcidina com a ferroportina permite uma resposta adaptativa do organismo em situações que alteram a homeostase do ferro (hipóxia, anemia, deficiência de ferro, sobrecarga de ferro e inflamação). A hipóxia e anemia regulam a hepcidina para baixo. A sobrecarga de ferro e as citocinas produzidas na inflamação aumentam a síntese de hepcidina ¹⁶⁹. Esta em resposta à sobrecarga de ferro ou inflamação reduz a absorção intestinal de ferro e a liberação de ferro dos macrófagos e outras células. A hepcidina consegue isso se ligando à ferroportina na superfície das células, induzindo sua internalização e degradação ⁵⁹. A função da hepcidina é reduzir a ferroportina nos enterócitos e nos macrófagos ¹⁶⁸ (**Figura 4** — etapa 2). Portanto a diminuição da produção de hepcidina resulta no aumento da circulação de ferro do enterócito (via ferroportina) para o plasma e aumento do ferro total do corpo e vice-versa. Hepcidina também aumenta em resposta à inflamação. Supõe-se que a hepcidina desempenha um papel na defesa microbiana, pois o ferro é vital para a invasão de agentes patogênicos. Limitando a liberação de ferro das células mediada pela ferroportina, a hepcidina cria um meio relativamente deficiente de ferro, que é desfavorável para o patógeno ¹⁷⁰. Se os baixos níveis de hepcidina são prolongados, as consequências para o paciente são acúmulo de ferro nos enterócitos e macrófagos e redução da disponibilidade de ferro para eritropoiese (anemia de doença crônica). Mutações no gene da hepcidina caracteriza a HH 'Tipo 2B', uma forma de hemocromatose juvenil ¹⁶⁰. Todas as moléculas das diversas formas de HH estão envolvidas na função ou expressão da hepcidina ⁵⁹.

A produção de hepcidina dos hepatócitos é controlada pelo receptor de transferrina 2 (RTf2), uma proteína da membrana celular, e a proteína HFE. O complexo do RTf2 e HFE resulta em aumento na produção de hepcidina e correspondente diminuição no transporte de ferro mediada por ferroportina do enterócito para o plasma (**Figura 4** — etapa 3). RTf2 e HFE também estão presentes nos enterócitos duodenais. Mutações no gene RTf2 caracterizam a HH tipo 3 e mutações no gene HFE caracterizam a HH tipo 1. Esta última é a forma mais comum de sobrecarga de ferro hereditária e será enfatizada aqui ¹⁶⁰.

Como o fígado desempenha um papel central no controle da homeostase de ferro, não é surpreendente que doenças hepáticas podem levar a alterações no metabolismo do ferro. Os portadores de mutações associadas a HH, tais como as mutações C282Y e H63D do gene HFE, podem vir a ter uma doença mais grave quando estão associados a uma doença hepática coexistente ⁵⁹.

FONTE: Adaptado de Batts KP, 2007 ¹⁶⁰

Figura 4 - Homeostase do ferro. Etapa 1: representa a absorção do ferro mediada pelo transportador de metal divalente 1 (DMT1) para dentro do enterócito maduro. Etapa 2: indica o movimento do ferro dos enterócitos e macrófagos para a circulação mediada pela ferroportina. Etapa 3: ilustra o movimento do ferro da circulação para dentro dos hepatócitos e enterócitos duodenais promovido por um complexo formado pelo receptor de transferrina 2 e proteína HFE. Etapa 4: indica a produção de hepcidina pelo hepatócito e sua excreção para a circulação. A Hepcidina regula para baixo a atividade da ferroportina, predominantemente nos enterócitos duodenais e macrófagos (Etapa 2) ¹⁶⁰.

3.1.6.2.2 **Hemocromatose Hereditária do Adulto ('tipo 1')**

3.1.6.2.2.1 *Fisiopatologia e manifestações clínicas da hemocromatose*

A HH Tipo 1 é a mais estudada e é o tipo de hemocromatose associado com as mutações no gene HFE¹⁵⁹. Nesta forma de HH o excesso de ferro ocorre pela absorção excessiva de ferro no duodeno. Foram propostas duas teorias¹⁶⁰ diferentes de como a proteína HFE anormal, codificada pelos genes mutantes, leva ao acúmulo excessivo de ferro (**Figura 4 — etapa 3**) e uma não exclui a outra¹⁷¹. A '*hipótese da hepcidina*' sugere que a proteína HFE anormal, quando se liga ao receptor de transferrina (RTf) na superfície do hepatócito, resulta em níveis anormalmente baixos de produção de hepcidina no hepatócito e no plasma. A hepcidina atua como um regulador negativo da absorção de ferro da dieta. Assim, a mutação HFE resulta na absorção excessiva de ferro¹⁶⁰. A '*hipótese da programação da célula da cripta duodenal*' propõe que a proteína HFE, quando se liga ao RTf na superfície do enterócito da cripta, normalmente facilitando a absorção de ferro para o enterócito. Uma proteína anormal de HFE falha nesta absorção de ferro para o enterócito, resultando em uma célula deficiente em ferro que, em seguida, tenta absorver excessivamente o ferro da dieta para corrigir este déficit¹⁶⁰.

A relevância funcional da proteína mutante C282Y tem sido esclarecida por ensaios com transfecção das células, onde se observou que na sua síntese apresentava um bloqueio do seu transporte intracelular, ficando retida no retículo endoplasmático e sofrendo uma degradação acelerada, além de falhar na sua apresentação na superfície celular e prejudicando a ligação da proteína HFE com a β 2-microglobulina¹⁷². Deste modo, a mutação C282Y abole a interação da proteína HFE com o receptor de transferrina (RTf), o que pode ser suficiente para causar uma sobrecarga nos depósitos de ferro¹⁷³.

A mutação H63D no gene HFE tem uma distribuição variável pelo mundo e é mais prevalente do que a mutação C282Y¹⁷⁴. A mutação H63D

ocorre em 4% dos pacientes com HH ^{159,175}. A mutação H63D não tem este efeito sobre a ligação da β 2-microglobulina. Feder *et al.* ¹⁷³ demonstraram em um ensaio de transfecção de células que a proteína HFE tipo selvagem ou H63D formaram complexos estáveis com o receptor de transferrina (RTf), sendo que a proteína HFE tipo selvagem diminuiu a afinidade do RTf pela transferrina; a proteína H63D não teve esse efeito, fornecendo uma primeira evidência direta de que a mutação H63D induz a uma alteração funcional, que leva a uma perda da capacidade de reduzir a afinidade do RTf pela transferrina. Há estudos clínicos que sugerem um papel para a mutação H63D/H63D na sobrecarga de ferro ¹⁷⁶⁻¹⁷⁹, no entanto, este papel permanece incerto ¹⁸⁰. A mutação H63D está aumentada em pacientes com sobrecarga de ferro quando comparado com uma população controle normal (37,4% versus 16,5%; $p < 0,0001$) ¹⁷⁶. O homozigoto H63D tem satT elevada em relação ao genótipo selvagem, comparável ao homozigoto C282Y e ao heterozigoto composto ¹⁷⁹. Entretanto, outros trabalhos observaram nos pacientes homozigotos para H63D (sem hepatite viral), satT normal e aumento de ferritina associado a esteatose hepática ¹⁸⁰. De Diego *et al.* ¹⁸¹ queriam esclarecer a importância da mutação homozigota para H63D em pacientes com HH da região do mediterrâneo, onde as frequências desta mutação são mais elevadas. A homozigose para H63D estava presente em 45 de 285 (16%) pacientes com sobrecarga de ferro e eles não identificaram outras mutações no gene HFE ou em outros genes (RTF2, ferroportina 1 e HAMP) nestes pacientes ¹⁸¹. Nos casos H63D/H63D, 80% são clinicamente normais e 20% desenvolvem sobrecarga de ferro, que é quase duas vezes a percentagem encontrada nos indivíduos com HFE homozigoto para o tipo selvagem (TS/TS) ¹⁷⁷. A mutação H63D está associada a aumento dos depósitos de ferro e também a uma forma mais branda da HH, revelando uma penetrância incompleta ¹⁸². O que pode explicar a expressão fenotípica variável do homozigoto para H63D são: mutações em outros genes, a penetrância variável do gene, fatores ambientais e outros fatores não genéticos ainda desconhecidos ¹⁸³. Nos adultos com HH tipo 1, independentemente do exato mecanismo, o resultado é aumento gradual do

ferro total do corpo, refletido por aumento da saturação de transferrina (satT) e da ferritina no plasma, resultando na deposição anormal de ferro predominantemente nos hepatócitos, mas também afetando outros órgãos. Na HH tipo 1 o acúmulo de ferro geralmente é assintomático até a quinta ou sexta década ¹⁸³.

A complicação mais temida da HH, mas rara, é fibrose hepática progressiva e, finalmente, cirrose, acompanhado de aumento do risco de carcinoma hepatocelular (CHC). Os pacientes com HH têm um risco relativo estimado de CHC aumentado 240 vezes; o grau de risco tem correlação com a quantidade e a duração da sobrecarga de ferro e o grau de fibrose ¹⁸⁴. O ferro tem uma função carcinogênica através da produção de estresse oxidativo ferro-mediada, facilitação do crescimento tumoral e/ou modificação do sistema imunológico ¹⁸⁴. O CHC na HH pode ocorrer em até um terço dos pacientes com hemocromatose e cirrose ¹⁸⁵. Em um grande estudo com 5224 pacientes submetidos a transplante de fígado, a sobrecarga de ferro foi associada ao CHC de forma significativa, independentemente da etiologia da doença hepática subjacente, sugerindo um possível efeito carcinogênico do ferro na doença hepática crônica ¹⁸⁶. O CHC normalmente se desenvolve no fígado cirrótico, no entanto, alguns casos podem ocorrer em pacientes não cirróticos com HH, sugerindo um papel direto do ferro na carcinogênese ⁵⁹.

Esteatose não é a priori um componente da HH, no entanto, há uma prevalência elevada de obesidade entre as populações propensas a desenvolver a HH tipo 1, logo a esteatose é comum na HH ¹⁸⁷. Na Austrália, 41% dos pacientes com HH tipo 1 tinha esteatose, sendo 14,5% moderada ou intensa ¹⁸⁷. A esteatose simultânea pode ser um cofator para acelerar a fibrose na HH ¹⁸⁷.

Os sintomas mais comuns são artropatia difusa e fadiga generalizada. A artralgia e artrite envolvem inicialmente as junções metacarpo falangeanas (MCF), principalmente a segunda e terceira MCF, e depois há o acometimento das grandes articulações, como os quadris, joelhos e ombros ¹⁸⁸. Doença cardíaca e insuficiência cardíaca ocorrem em uma minoria dos

pacientes com HH tipo 1, mas são características dominantes nas formas juvenis de HH ¹⁸⁹. Osteoporose é uma complicação frequente, pois o ferro suprime a formação do osso pelos osteoblastos e estimula a reabsorção óssea pelos osteoclastos ¹⁹⁰. Alterações endocrinológicas também são observadas, como hipotireoidismo, *diabetes mellitus* e hipogonadismo. O ferro também inibe a síntese de gonadotrofinas pela hipófise anterior resultando na diminuição da produção de hormônios. A tendência à osteoporose pode ser reforçada pela deficiência hormonal ¹⁹⁰. Raramente observamos pigmentação cutânea ('diabetes de bronze'). Indivíduos com hemocromatose hereditária apresentam predisposição a certas infecções causadas por patógenos como *Vibrio vulnificus*, *Listeria* e vírus da hepatite C ¹⁹¹. Mecanismos causadores de prejuízos no metabolismo de ferro podem estar envolvidos na suscetibilidade a infecções bacterianas decorrentes de *Vibrio vulnificus*. Os riscos potenciais de infecções devido à sobrecarga de ferro sistêmica não estão bem caracterizados ¹⁶⁰. As alterações clínicas estão descritas na **Tabela 3** ¹⁹².

3.1.6.2.2.2. O Gene HFE e a proteína HFE

Em 1996, Feder *et al.* ¹⁵⁹ identificaram uma região de 250 kilobases, localizada a mais de três megabases teloméricas do complexo principal de histocompatibilidade no cromossomo 6. Dentro desta região identificaram um gene relacionado à família do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe I, que chamaram de HLA-H, e que continha duas mutações tipo *missense*. Este gene foi depois chamado de HFE ¹⁹³. O gene HFE localiza-se no braço curto do cromossomo 6 (6p21.3), cerca de 4.6 megabases teloméricas da HLA-A e abrange aproximadamente 10 kilobases ¹⁹⁴. A mutação 'major' é a transição de guanina para adenina no nucleotídeo 845 do gene HFE (845G → A), que leva a uma substituição da cisteína por tirosina no aminoácido 282 da proteína HFE, habitualmente chamada de mutação 'C282Y'. A mutação C282Y incide em 80% a 90% dos cromossomos para a HH ¹⁸².

Tabela 3 - Sintomas e achados físicos nos pacientes com hemocromatose hereditária

➤ **Assintomáticos**

- Alteração no perfil de ferro
- Alteração das enzimas hepáticas
- Pode ter hepatomegalia

➤ **Sintomáticos**

- **Sintomas inespecíficos**

- Fraqueza
- Fadiga
- Sonolência
- Apatia
- Emagrecimento

- **Sintomas e achados físicos específicos relacionados com o órgão acometido:**

- **Abdômen:** Hepatomegalia, esplenomegalia, dor abdominal, diabetes, insuficiência hepática (ascite, encefalopatia, etc.)
 - **Esqueleto e articulações:** Artrite, artralgia, edema das articulações, osteoporose
 - **Coração:** Cardiomiopatia dilatada, insuficiência cardíaca congestiva, arritmia
 - **Pele:** Hiperpigmentação, sinais cutâneos de cirrose
 - **Endócrino:** Atrofia testicular, hipogonadismo, impotência, perda de libido, amenorreia, hipotireoidismo
-

FONTE: Bacon *et al.* ¹⁹²

A mutação 'minor' é uma substituição de citosina (C) por guanina (G) no nucleotídeo 187 do gene HFE (187C→G), resultando na substituição da histidina por ácido aspártico no aminoácido 63 da proteína HFE, chamada de mutação 'H63D' ¹⁹⁴. A mutação H63D, associada a uma forma mais branda da doença, representa 40 a 70% dos cromossomos na HH ¹⁸². A mutação H63D em si não está associada à sobrecarga de ferro no mesmo grau que a mutação C282Y, mas quando a mutação H63D está associada à mutação C282Y ela favorece que a sobrecarga de ferro seja mais pronunciada ¹⁴⁸. Entre os pacientes com sobrecarga de ferro marcante (fenótipo de hemocromatose) as mutações HFE predominam (HH tipo 1). Cerca de 80 a

85% destes pacientes (variando entre 59–100%) irão demonstrar um genótipo C282Y/C282Y e aproximadamente 5% (intervalo de 4 a 8%) terão um genótipo C282Y / H63D¹⁸⁹. Vários polimorfismos intrônicos no gene HFE têm sido descritos¹⁹⁴, mas raramente ocorrem mutações HFE em *loci* diferentes dos aminoácidos 282 ou 63^{171,195}. Os genótipos C282Y/TS, H63D/TS e o H63D/H63D não estão associados com a manifestação fenotípica da doença, embora apresentem pequenas elevações de saturação do ferro¹⁹⁶. O genótipo H63D/TS é comum em brancos (24%), americanos nativos (20%) e hispânicos (18%)¹⁶².

Além da mutação C282Y e H63D, outra mutação tipo *missense* é a substituição do nucleotídeo adenina (A) por timidina (T), na posição 193 do gene HFE (193A→T), que leva a uma substituição da serina por cisteína na posição do aminoácido 65 localizada no exon 2 na vizinhança da H63D, chamada de mutação S65C. A mutação S65C tem sido associada a uma forma branda de HH¹⁸². As hipóteses para as consequências funcionais da substituição 193A→T na sobrecarga de ferro são: 1. Como a S65C está localizada próximo à H63D é possível que não seja capaz de reduzir a afinidade do RTf pela transferrina de forma eficiente como no tipo selvagem; 2. Outra explicação possível é que a substituição 193A→T pode ser um polimorfismo ligado a uma alteração genética diferente afetando o nível de expressão do HFE e a mutação S65C não teria efeito por conta própria¹⁸². A mutação S65C é significativamente mais elevada entre os cromossomos da HH que não apresentam as mutações C282Y ou H63D¹⁸². A taxa de prevalência global da mutação S65C varia de 1,5 a 2,5% na Alemanha¹⁹⁷, Dinamarca¹⁹⁸, França¹¹⁰ e Estados Unidos^{182,199}. No Brasil a frequência da mutação S65C na população é baixa, entre 148 doadores de São Paulo encontrou-se 0.7% com H63D/S65C e 1.3% com S65C/TS²⁰⁰. Em mais um estudo encontrou-se uma frequência do alelo S65C de 0,87% na população controle²⁰¹. Outros estudos do Brasil não encontraram a mutação S65C em pacientes com sobrecarga de ferro^{202,203}.

A proteína HFE tem 343 aminoácidos e é semelhante às proteínas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC - *major histocompatibility*

complex) classe 1¹⁷¹. A proteína contém um domínio extracelular de ligação peptídica ($\alpha 1$ e $\alpha 2$), um domínio imunoglobulina símile ($\alpha 3$) que se situa na região transmembrana e uma cauda curta citoplasmática (**Figura 5**)¹⁵⁹. A estrutura cristalina da proteína e a sua interação com o receptor de transferrina (RTf) é discutida em detalhe por Lebrón *et al.*²⁰⁴.

FONTE: Figura modificada de Feder *et al.*¹⁵⁹

Figura 5 - Modelo hipotético da proteína HFE mostrando sua semelhança com as proteínas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe 1. A proteína HFE apresenta: porção extracelular com três domínios α ($\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$), sendo que o domínio $\alpha 3$ se liga à $\beta 2$ microglobulina, uma região transmembrana plasmática e uma cauda curta citoplasmática. A mutação C282Y compromete a ligação de bissulfeto no domínio $\alpha 3$ ¹⁵⁹

3.1.6.2.2.3 Mutações e penetrância do gene

A descoberta das mutações HFE por Feder *et al.* resultou em um dilema: se a HH deveria ser definida pelo fenótipo clínico e laboratorial ou pelo genótipo. Usar somente o genótipo é problemático, pois a expressão

(penetrância) do gene é muito variável ¹⁵⁹. Com a descoberta do gene HFE foi possível identificar o risco 'potencial' de desenvolver sobrecarga de ferro, mas nem todos os homozigotos desenvolverão sobrecarga de ferro ou HH. Nosso conhecimento é insuficiente para prever o grau de expressão fenotípica destes indivíduos. A homozigose para C282Y é mais comum do que a sobrecarga de ferro hepática, que por sua vez é mais comum do que os danos aos órgãos (**Figura 6**) ²⁰⁵.

FONTE: Figura adaptada de Ayonrinde e Olynyk ²⁰⁵
Nota: CHC – Carcinoma hepatocelular

Figura 6 - Proporção de pacientes homozigotos para C282Y que desenvolvem sobrecarga de ferro e doença hepática

Estima-se que 40,0% a 70,0% dos indivíduos homozigotos para C282Y desenvolverão alguma evidência laboratorial de sobrecarga de ferro sem complicações clínicas e que, pelo menos, 50,0% dos homens e 25,0% das mulheres com este genótipo desenvolverão complicações clínicas secundárias à sobrecarga de ferro ²⁰³. Um a 11% dos heterozigotos compostos vão manifestar a HH clinicamente ²⁰⁶. Parece haver genes modificadores, que modulam a expressão das mutações HFE ^{207,208} e que, quando combinados com as variações individuais de perda de ferro (como a

menstruação em mulheres), resultam em uma variação considerável na expressão clínica dos genótipos de risco (C282Y/C282Y e C282Y/H63D) ¹⁶⁰.

Foi desenvolvido um sistema de classificação do grau de expressão fenotípica do homozigoto C282Y por Brissot *et al.* ²⁰⁹ usando uma escala de 0 a 4. Nesta graduação, os indivíduos assintomáticos apresentam graus 0 a 2. Usa-se esta graduação para definir a conduta nestes pacientes ¹⁶⁰: grau 0: é homozigoto para C282Y, mas não apresenta sintomas ou alterações do níveis de ferro; grau 1: aumenta a saturação de transferrina (satT>45%) com ferritina normal e sem sintomas; grau 2: tem aumento da saturação de transferrina e aumento da ferritina sérica, mas sem sintomas; grau 3: engloba os pacientes com sintomas que afetam a qualidade de vida (astenia, impotência, artralgia, etc); e grau 4: são aqueles com lesão dos órgãos alvo, principalmente cirrose, risco de carcinoma hepatocelular, diabetes e cardiopatia.

Entre os indivíduos homozigotos para C282Y, o efeito do gênero masculino ou feminino na penetrância é particularmente evidente nos graus 1 e 2. Em uma revisão que compilou 153 homens e 206 mulheres homozigotos para C282Y encontraram a satT elevadas em 73,7% dos homens (valor médio satT - 65.3%) e 50,6% das mulheres (valor médio satT - 47,1%) ²¹⁰. Níveis séricos elevados de ferritina (grau 2) são vistos com menor frequência do que o grau 1 tanto nos homens (65,4%, entre 34–100%) quanto nas mulheres (40,5%, entre 9–63%) ²¹⁰. Entre homozigotos C282Y com sintomas menores (grau 3), os sintomas mais comuns são dor nas articulações (36%) e fadiga (32%). A doença de grau 4 (potencialmente letal) é muito rara nos homozigotos para C282Y; estima-se uma frequência menor que 1% ²¹¹.

O prognóstico dos pacientes com HH complicada, com fibrose hepática e cirrose, depende não só da quantidade de ferro que é responsável pela lesão hepática, mas também do tempo de exposição ao ferro com a idade ²⁰⁵. Indivíduos que consomem álcool em excesso podem

desenvolver fibrose hepática e cirrose com concentrações mais baixas de ferro hepático do que aqueles que não consomem álcool em excesso⁸².

3.1.6.2.3 *Análise quantitativa do ferro do tecido hepático*

Nos últimos 25 anos, a medição da concentração de ferro em amostras de biopsia hepática provou ser uma valiosa ferramenta de diagnóstico que serviu também para ampliar nosso conceito de hemocromatose²¹². Seu valor tem diminuído depois dos testes genéticos, mas a quantificação do ferro ainda pode desempenhar um papel no diagnóstico e prognóstico de alguns casos.

Os resultados são relatados em $\mu\text{mol/g}$ de massa seca ou em $\mu\text{g/g}$ de massa seca. Sobrecarga de ferro leve a moderada (grau 1 e 2) geralmente correlaciona quantitativamente com valores de ferro entre 3.000 e 10.000 $\mu\text{g Fe/g}$ peso seco fígado. Sobrecarga de ferro histológico (grau 3 e 4) geralmente reflete depósitos $>10.000 \mu\text{g Fe/g}$ peso seco fígado. Na HH, a maioria dos pacientes com concentrações de ferro de 22.000 $\mu\text{g Fe/g}$ peso seco fígado provavelmente já desenvolveram fibrose²¹².

O conceito do índice de ferro hepático (IFH) foi introduzido por Bassett *et al.*²¹² em 1986 e se revelou útil, especialmente na interpretação da sobrecarga de ferro hepático de grau leve a moderado. O IFH foi desenvolvido para quantificar o acúmulo de ferro progressivo que ocorre ao longo do tempo na HH — uma determinada quantidade de ferro aos 25 anos indica uma acumulo mais rápido de ferro, que a mesma quantidade de ferro em um indivíduo de 50 anos de idade (**Figura 7**).

FONTE: Figura de Batts *et al.*¹⁶⁰

Figura 7 - Análise quantitativa de ferro e o índice de ferro hepático (IFH). A quantidade de ferro medido (eixo y), no contexto da idade do paciente (eixo x), resulta no índice de ferro hepático, definido pela quantidade de ferro em mmoles/g, dividida pela idade do paciente e expressa em micromoles/g/ano. Mas como a concentração de ferro hepático geralmente é expressa em mg/g o valor é dividido pelo peso atômico do ferro (55,8) para transformar o valor em mmoles/g. Atualmente, considera-se que valores >1,9 (linhas pontilhadas) refletem os pacientes em risco de desenvolver consequências adversas devido à sobrecarga de ferro e valores <1,9 (linha tracejada) são aqueles com pouco/nenhum risco de consequências adversas. No exemplo colocado na tabela o indivíduo apresenta um acúmulo de ferro anormal e se não tratado evoluirá para fibrose¹⁶⁰

Um IFH ≥ 1.9 (em indivíduos normais, IFH é <1.0) foi considerado anteriormente como indicador de 'homozigoto para hemocromatose'. No entanto, no contexto do conhecimento sobre a penetrância do homozigoto para C282Y, o que um IFH ≥ 1.9 realmente indica são os pacientes em risco de doença sintomática (ou seja, os graus 3 e 4). Provavelmente, quando o ferro no hepatócito predomina na zona 1 e o valor de IFH < 1.9 , grande parte

é homozigoto para C282Y com penetrância leve (graus 1 e 2) ou heterozigoto para C282Y ¹⁶⁰.

Existe uma correlação razoável entre a hemossiderina visualizada e valores quantitativos de ferro; portanto, se o patologista encontrar pouco ferro na coloração, a medição da concentração de ferro hepática é desnecessária. Para fins de diagnóstico, a análise quantitativa do ferro na histologia acrescenta pouca informação, mas pode fornecer dados objetivos sobre a penetrância da doença e estimar a duração da flebotomia ¹⁶⁰. A quantificação de ferro e determinação do IFH para fins de diagnóstico devem ser restritas aos casos em que a distribuição histológica do ferro sugere a HH, ou seja, o ferro predomina nos hepatócitos mais do que nas células de Kupfer, pois a hemossiderose transfusional, especialmente em indivíduos mais jovens, pode facilmente elevar o ferro hepático a índices >1.9. O IFH deve ser interpretado com cautela em pacientes com doença hepática crônica avançada, pois "falsos positivos" são comuns na cirrose ^{75,160}.

3.1.6.2.4 Diagnóstico e tratamento da hemocromatose

Atualmente a presença de homozigose para C282Y, associada a evidências de sobrecarga de ferro, como o aumento da concentração de ferro hepático, aumento da saturação de transferrina (satT) e dos níveis de ferritina, constituem o padrão ouro para o diagnóstico definitivo de HH ^{161,213}.

O diagnóstico de hemocromatose segue cinco etapas sucessivas ²¹⁴:

1. *Suspeitar de HH quando o indivíduo apresentar sinais clínicos como:* astenia, artropatias, impotência, hiperpigmentação, hepatomegalia, elevação de enzimas hepáticas, *diabetes mellitus*, cardiopatia e perfil bioquímico de sobrecarga de ferro, lembrando sempre de afastar outras causas para estes sinais clínicos.
2. *Avaliar a saturação de transferrina (satT) colhida em jejum*, pois evita variações circadianas e pós-prandiais ²¹⁵. Suspeita-se de HH quando a saturação de transferrina é >50% na mulher pré-menopausa e >60% nos

homens ou mulheres pós-menopausa ²¹⁶. A satT frequentemente é maior que 80% e é a primeira manifestação da HH. A satT pode estar elevada em indivíduos jovens e que ainda apresentam ferritina normal ¹⁹². Na prática, exceto se houver uma síndrome inflamatória coexistente, uma satT normal exclui o diagnóstico de HH, mas sabemos que indivíduos homozigotos para C282Y podem apresentar satT <45% e não sabemos se apresentarão ou não sobrecarga de ferro ¹⁹². Para descartar inflamação subjacente, a proteína C reativa sérica pode auxiliar. Uma satT elevada não é específica para HH tipo 1, pois ela pode ser encontrada em outras formas de hemocromatose, pós-transfusão para anemia crônica ou na insuficiência hepática grave.

3. *Pesquisar as mutações HFE*. Se encontrarmos uma mutação homozigota para C282Y ou heterozigoto composto C282Y/H63D, o diagnóstico de HH tipo 1 é confirmado, mas devemos lembrar da baixa frequência destas mutações entre a população brasileira. Se as mutações HFE são negativas, pode ser necessário fazer outros testes genéticos específicos para afastar as outras mutações associadas a hemocromatose (S65C, Q283P, hemojuvelina, hepcidina, receptor de transferrina 2 e ferroportina) ²¹⁴.
4. *Quantificar a sobrecarga de ferro*. Isso pode ser feito por meio da avaliação do nível de ferritina plasmática. Na ausência de outras causas potenciais de sobrecarga de ferro, um nível de ferritina > 200 µg/L para mulheres pré-menopausa ou 300 µg/L para homens e mulheres pós-menopausa é sugestivo de HH ²¹⁶. Na HH, existe uma correlação estreita entre o nível da ferritinemia e o grau de excesso de ferro. O excesso de ferro pode ser: leve (< 500 µg/L), médio (500-1000 µg/L) ou intenso (> 1000 µg/L). Quando a ferritina está acima de 1000 µg/L as complicações clínicas se tornam mais prováveis. Biopsia hepática deve ser considerada quando os pacientes têm um nível de ferritina sérica > 1000 ng/mL e aumento de enzimas hepáticas ^{192,217}. Devemos lembrar que a ferritina é um reagente de fase aguda e está aumentada em várias doenças infecciosas e inflamatórias, portanto não pode ser utilizada

quando há doenças associadas que podem alterar esta interpretação, como p. ex. na hepatite alcoólica, esteatohepatite não alcoólica, hepatite C, na artrite reumatoide e doenças neoplásicas como linfoma ¹⁹². Nestes casos podemos utilizar a ressonância nuclear magnética (RNM) do fígado para quantificar a concentração de ferro hepático. A RNM é um método não invasivo que apresenta um alto grau de sensibilidade e especificidade para a medição da concentração de ferro, além de fornecer informações sobre o grau de fibrose ²¹⁸. A biópsia hepática também pode ajudar a quantificar e observar a distribuição do ferro (hepatócito x macrófago), além de dar informações sobre outras alterações que podem estar associadas, como esteatose hepática, esteatohepatite não alcoólica e hepatite alcoólica.

5. *Ver a graduação clínica da doença (grau 0 a 4), pesquisando as manifestações clínicas e a lesão de órgãos alvo.*

Atualmente, devido à pesquisa das mutações, a biópsia hepática e o IFH perderam sua importância no diagnóstico de HH ¹⁹². Para detectar a homozigose para C282Y, a satT (> 50%) tem uma sensibilidade de apenas 0,52 e especificidade de 0,908 e os níveis de ferritina (> 200 mg/L em mulheres e 250 mg/L em homens) têm uma sensibilidade de 0,70 e uma especificidade de 0,803 ²¹⁹. A genotipagem tem a vantagem de fornecer um resultado definitivo independentemente da sobrecarga de ferro, da ingestão na dieta e da lesão tecidual e tem uma sensibilidade maior que 99% ²¹⁶. Medições sequenciais da ferritina e da saturação de transferrina podem ser necessárias durante um período de vários anos para monitorar ou confirmar a expressão ou não da HH nos adultos jovens homozigotos para C282Y ^{220,221}.

Homozigotos para C282Y com HH que apresentam idade <40 anos, ferritina sérica <1000 ng/mL, ausência de hepatomegalia e ausência de alterações das enzimas hepáticas não apresentam fibrose hepática. Portanto, nestes pacientes não é necessária biópsia hepática e o tratamento com flebotomia pode ser iniciado ¹⁹². Ver algoritmo descrito na **Figura 8**.

FONTE: Modificado de Clark P *et al.*²¹⁷ e Bacon *et al.*²²⁴

Nota: HH = hemocromatose hereditária; ALT = alanina transaminase; AST=aspartato transaminase; TS = tipo selvagem.

Figura 8 - Algoritmo para avaliar se um indivíduo tem hemocromatose hereditária

Quanto ao tratamento da HH, a flebotomia é o tratamento de escolha para reduzir a sobrecarga de ferro. O paciente deve ser orientado a evitar o consumo de grandes quantidades de vitamina C, pois o ácido ascórbico pode aumentar a absorção intestinal de ferro e facilitar a liberação do ferro de áreas de armazenamento, o que tem sido responsável por casos raros de insuficiência cardíaca letal. O tratamento com a infusão subcutânea de desferroxamina (Desferal®), quelante de ferro, é indicada apenas quando

há contraindicações para a flebotomia (impossibilidade técnica devido ao estado das veias, hipotensão, anemia associada ou insuficiência cardíaca)^{217,222}. A flebotomia deve ser iniciada no grau 2 da classificação fenotípica de HH, quando os níveis de ferritina sérica são altos²¹⁴.

Inicialmente se realizam as flebotomias semanalmente, embora sua frequência possa ser adaptada de acordo com os níveis iniciais de ferritina e com a tolerância do paciente. A tolerância à flebotomia é avaliada com base na pressão arterial do indivíduo a cada retirada de sangue. O volume de sangue a ser retirado deve ser adaptado ao peso corporal: 7 mL/kg de peso corporal, não superior a 550 mL por vez. O objetivo é atingir uma ferritinemia ≤ 50 $\mu\text{g/L}$, sem deficiência de ferro ou anemia. Uma flebotomia remove cerca de 250 mg de ferro; a remoção de 8 a 25 unidades de sangue (450-500 mL) é geralmente suficiente para normalizar a ferritina sérica²¹⁷. Acompanha-se a ferritina sérica mensalmente enquanto os níveis de ferritina permanecerem acima dos limites superiores do normal (300 $\mu\text{g/L}$ em homens, 200 $\mu\text{g/L}$ em mulheres). Depois disso, medimos a ferritina a cada duas sessões de flebotomia. Paramos a flebotomia quando os valores de hemoglobina atingem < 11 g/dL. Devemos, portanto, verificar a hemoglobina logo antes da flebotomia. Na manutenção, visamos manter a ferritina ≤ 50 $\mu\text{g/L}$, realizando flebotomias a cada 1 a 4 meses, de acordo com as necessidades do paciente. As flebotomias baseiam-se nos níveis de ferritina, pois estes refletem a quantidade de ferro armazenado. A saturação da transferrina (satT) pode flutuar e não reflete a quantidade de ferro no corpo; enquanto a satT permanecer abaixo do limiar de 75% o ferro não é tóxico para o organismo²¹⁴. Deve-se dosar a ferritina 6 meses após cessar as flebotomias para estimar o risco de reacumular o ferro e personalizar o tratamento de manutenção²²³.

Após algumas semanas de tratamento com flebotomia, a saúde geral do indivíduo melhora, as transaminases voltam ao normal e a hiperpigmentação diminui. As artralgias podem desaparecer, mas o paciente deve estar ciente que isso nem sempre acontece, podendo até piorar durante a fase inicial de flebotomias. No grau 4 da doença algumas

manifestações da doença podem ser irreversíveis, apesar da diminuição do ferro, como o *diabetes mellitus* e o risco de carcinoma hepatocelular ²¹⁴. A cirrose não reverte com a remoção do ferro e o desenvolvimento da insuficiência hepática é uma indicação para se considerar o transplante de fígado. No entanto, a sobrevida nos pacientes transplantados com HH é menor do que naqueles transplantados com outras doenças de fígado. A maioria dos óbitos ocorre no período pós-operatório por complicações cardíacas ou relacionadas a infecção ²¹⁵. Uma revisão atual e ampla do tratamento da HH está no artigo de Adams e Barton ²²³, onde discorrem sobre outros tratamentos que diminuem sobrecarga de ferro, como a eritrocitoferese, os quelantes orais (deferassirox e deferiprona), os inibidores de bomba de prótons (IBPs) e a dieta destes pacientes.

3.1.6.2.5 Diagnóstico diferencial de hemossiderose

O ferro pode acumular no fígado em uma grande variedade de condições (**Tabela 4**); clinicamente a mais importante é a hemocromatose hereditária (HH). A mera presença de ferro granular no fígado é chamada de 'Hemossiderose' — isso representa uma observação morfológica e não uma doença específica. O acúmulo de ferro no fígado (hemossiderose) pode ocorrer em: doenças congênitas (hemocromatose hereditária), condições associadas ao acúmulo de ferro nos macrófagos (transfusões de sangue, doenças hemolíticas, anemia de doença crônica, etc) e algumas hepatopatias (hepatite C, hepatite alcoólica, porfiria cutânea tardia, etc) ¹⁶⁰. Embora os mecanismos de sobrecarga de ferro permaneçam obscuros na maioria dos casos, em geral uma avaliação clínica completa e o exame histológico podem distinguir essas condições da HH; a análise bioquímica do ferro do tecido hepático ou a análise genotípica podem ser necessárias em casos ambíguos ¹⁶⁰.

Tabela 4 - Principais doenças com sobrecarga de ferro no fígado

➤ **Hemocromatose hereditária**

- Relacionados ao HFE (Hemocromatose hereditária- tipo 1)
 - C282Y/C282Y
 - C282Y/H63D
- Não relacionados ao HFE:
 - Hemocromatose não-HFE em adultos tipo 3
 - Hemocromatose não-HFE em adultos tipo 4
 - Hemocromatose juvenil tipos 2A
 - Hemocromatose juvenil tipos 2B

➤ **Hemossiderose adquirida secundária**

- Transfusão sanguínea
- Suplementação crônica de ferro
- Dieta rica em ferro
- Anemias crônicas
 - Talassemia major
 - Anemia sideroblástica
 - Anemias hemolíticas congênitas
 - Anemia aplástica
 - Aceruloplasminemia
 - Atransferrinemia
- Hemodiálise de longo prazo
- Síndrome metabólica com hiperferritinemia

➤ **Hemossiderose relacionada à doença hepática**

- Hemocromatose neonatal
 - Hepatite viral crônica B e C
 - Esteatose hepática crônica
 - Esteatohepatite alcoólica
 - Porfíria cutânea tardia
 - Diversas hemossideroses
-

FONTE: Bacon *et al.*¹⁹²; Batts *et al.*¹⁶⁰

3.1.6.2.5.1 *Hemocromatose não-HFE em adultos*

Entre os 5 a 10% de casos restantes em adultos com fenótipo de HH, surgem duas categorias principais. Mutações no receptor da transferrina 2 (RTf2) resulta em uma doença fenotipicamente semelhante à HH tipo 1, conhecida como HH "tipo 3"¹⁷¹. A mutação do gene ferroportina-1

(SCL40A1) no cromossomo 2q32 leva à HH 'tipo 4' ¹⁷¹. Nestes tipos de HH, o acúmulo de ferro ocorre predominantemente nas células reticuloendoteliais, tem anemia leve, saturação de transferrina baixa e as flebotomias não são benéficas ^{207,214}.

3.1.6.2.5.2 *Hemocromatose juvenil*

Formas juvenis de HH são mais raras do que as formas do adulto e se apresentam de duas formas, conhecidas como HH 'tipo 2A' e 'tipo 2B' ²⁰⁷. O tipo 2A reflete uma mutação no gene da hemojuvelina (HJV) no cromossomo 1q21. Ela é autossômica recessiva e tende a apresentar uma deposição de ferro cardíaca acentuada antes dos 30 anos com risco de insuficiência cardíaca e potencial hipogonadismo. Aparentemente a hemojuvelina funciona como um regulador da hepcidina ²²⁵. A HH juvenil tipo 2B resulta de uma mutação no gene da hepcidina (HAMP) no cromossomo 19q13. Ela é autossômica recessiva e fenotipicamente semelhante à HH HFE tipo 1 ²⁰⁷.

3.1.6.2.5.3 *Hemocromatose neonatal*

A hemocromatose neonatal não é herdada, não está relacionada às formas de HH juvenil e adulto e sua patogênese é desconhecida ²²⁶. A hemocromatose neonatal pode surgir no final do segundo ou terceiro trimestre de gestação com perda fetal, ou horas a semanas após o nascimento com insuficiência hepática aguda e, muitas vezes, insuficiência de múltiplos órgãos. Histologicamente, a deposição de ferro nos hepatócitos em vez das células de Kupfer é típica, com uma deposição de ferro em menor grau, ocorrendo também em outros órgãos não hepáticos ²²⁶.

3.1.6.2.5.4 *Doenças hematológicas*

Transfusões e distúrbios hemolíticos crônicos comumente levam a deposição de hemossiderina hepática. O ferro sanguíneo, secundário à

hemólise, tende a se acumular mais nas células de Kupfer e é facilmente distinguido do ferro hepatocelular da HH. A demonstração de hemólise por meio de exames laboratoriais é muito útil. A anemia da doença crônica também pode levar a deposição de ferro muito leve nas células de Kupfer, mas sem uma correlação clínica identificável ¹⁶⁰.

3.1.6.2.5.5 *Hemossiderose relacionada à cirrose*

O acúmulo de hemossiderina é bastante comum em qualquer tipo de cirrose. Ludwig *et al.* ⁷⁵ observaram hemossiderina em 145 de 449 (32,4%) fígados cirróticos e a quantificação de ferro hepático revelou uma maior concentração em 91 dos 449 (20,3%), sendo que em 38 casos (8,5%) o nível foi semelhante ao que ocorre na HH (índice de ferro hepático $\geq 1,9$). O ferro predominantemente hepatocelular, semelhante ao que se observa na HH, não é incomum; no entanto, no presente estudo considerou-se que HH representava apenas cinco dos 145 casos. Concluem que a cirrose em si causa hemossiderose e que índices de ferro hepático $\geq 1,9$ não podem ser interpretados como HH ⁷⁵. Nos casos ambíguos de cirrose com deposição de ferro a análise genética pode ser útil. A etiologia para a deposição de ferro permanece obscura, mas pacientes com cirrose biliar parecem ser menos propensos a acumular ferro (7 a 20%) do que pacientes com cirrose não biliar (22 a 67%) ⁷⁵. Concluindo, alguns casos de cirrose com deposição de ferro podem representar a penetração parcial do homozigoto ou o heterozigoto para a HH, mas a maioria tem a deposição de ferro como um fenômeno secundário, que pode ser predominantemente hepatocelular e pode ter índices $\geq 1,9$ ¹⁶⁰.

3.1.6.2.5.6 *Álcool*

A esteatohepatite alcoólica é uma das causas mais comuns (não hemocromatótica) de hemossiderose hepática e provém do aumento da absorção intestinal de ferro ²²⁷. As características histológicas incluem infiltração de gordura e graus variados de reação inflamatória. Em geral, o ferro hepático corado é leve, mas às vezes é suficiente para causar confusão com relação à HH. A medição da concentração de ferro hepático foi originalmente aplicada para fazer esta distinção, mas a maior parte da literatura sobre este tema foi publicada antes da descoberta do gene HFE ¹⁶⁰. Na doença alcoólica do fígado, a concentração de ferro hepática raramente excede duas a três vezes o limite superior do normal ²²⁸ e o índice de ferro hepático (IFH) geralmente é <1.9. Demonstrou-se que pacientes etilistas com sobrecarga intensa de ferro (por exemplo, concentração de ferro hepática > 5 vezes o normal) são homozigotos para a HH ⁸¹. O álcool atua em sinergia com o ferro agravando a lesão hepática e dando origem a cirrose mais precocemente do que seria esperado na HH somente com sobrecarga de ferro ^{81,229}.

3.1.6.2.5.7 *Hepatite Viral Crônica*

A hepatite viral crônica usualmente é acompanhada de hemossiderose hepática leve, geralmente muito menor do que a esperada na HH. Depósitos de hemossiderina podem estar presentes nas células de Kupfer, hepatócitos (com gradiente da zona 1 a 3) e/ou áreas portais ²³⁰. A depleção de ferro com flebotomia pode abaixar as transaminases séricas, diminuir a inflamação no fígado e retardar a progressão da fibrose hepática na hepatite C ²³¹. Mais da metade de todos os pacientes com VHC não respondem ao tratamento antiviral e nestes pacientes com infecção viral persistente a remoção de ferro é uma alternativa, que pode impedir a progressão da doença para insuficiência hepática ou complicações como carcinoma hepatocelular ²³¹. Ainda não está claro se a concentração de ferro

hepático permite prever a probabilidade de ocorrer a erradicação viral com o tratamento antiviral (interferon e ribavirina)²³².

3.1.6.2.5.8 *Porfiria Cutânea Tardia*

Há vários relatos na literatura que descrevem aumento da frequência das mutações no gene HFE dos pacientes com PCT^{1,57,89,108,110,146-148,197,233} (**Quadro 1**). Um dos primeiros relatos foi de Roberts *et al.*¹⁴⁶ em pacientes britânicos com PCT onde se observou aumento significativo da mutação C282Y: a mutação ocorreu em 44% (18 de 41) dos pacientes em comparação com 11% (11 de 101) do grupo controle (risco relativo 6.2, 95% IC 2.6–14.5, $p=0,00003$). Sete pacientes (17%) eram homozigotos. Demonstraram em seu trabalho que uma parte indeterminada de homozigotos para C82Y de ambos os sexos podem viver por 60 anos ou mais sem desenvolver hemocromatose evidente.

Na Alemanha^{197,234,235}, EUA^{57,60,89} e norte da França²³⁶ a frequência das mutações C282Y e H63D é maior nos pacientes com PCT em relação à população controle. Entretanto em um dos estudos feitos na Alemanha se observou uma frequência de 15,7% da mutação C282Y nos pacientes com PCT e 2,8% no grupo controle (indivíduos normais), mas neste estudo não se observou diferença na frequência da mutação H63D¹⁹⁷. No norte da França a frequência da mutação C282Y é maior do que no sul (15,2% versus 9%, respectivamente), provavelmente devido à maior influência da origem celta no norte^{110,236}. No sul da França encontraram associação da mutação C282Y com a PCT, mas não houve diferença estatística significativa para as mutações H63D e S65C¹¹⁰. O papel da mutação S65C parece não ser determinante na PCT, pois há estudos cuja prevalência não foi diferente entre os pacientes com PCT e o grupo controle^{110,237}.

No Reino Unido^{146,147}, Austrália¹⁰⁸ e São Paulo - Brasil²³⁸ a frequência da mutação C282Y é maior nos pacientes com PCT em relação à população controle e não houve diferença para a mutação H63D. O Reino Unido é o país onde há uma frequência maior do alelo da mutação C282Y

tanto na população controle (6 a 8,2%) quanto nos pacientes com PCT (30,5 a 36,9%)^{146,147}. Na Austrália observou-se que a mutação não possuía relação com os níveis de transferrina, ferritina ou com a positividade para o VHC¹⁰⁸.

Na Espanha observa-se que a frequência da mutação H63D é alta tanto na população controle quanto nos pacientes com PCT; a homozigose para a mutação H63D e a heterozigose composta foram os genótipos mais comuns relacionados à PCT e quando compararam os pacientes com PCT esporádica (Nº=69) e PCT familiar (Nº=19) encontraram associação significativa destas mutações somente na forma esporádica e não na familiar, embora o tamanho da amostra da forma familiar tenha sido pequena²³⁹. Ainda na Espanha, Toll *et al.*¹⁰⁹ encontraram uma associação da mutação C282Y na PCT, mas não para a mutação H63D e Castiella *et al.*¹⁸³ não encontraram diferença estatística significativa das mutações entre os dois grupos.

No Chile²⁴⁰, na Bulgária²⁴¹ e em um estudo na Espanha¹⁸³, não encontraram diferença estatística significativa para as mutações HFE entre os pacientes com PCT e população controle. No Chile também não houve diferença entre os pacientes com a forma esporádica e familiar²⁴⁰.

A França^{110,236}, Espanha^{183,239,242}, Itália²⁴³ e Brasil²³⁸ apresentam uma frequência alta da mutação H63D. A associação entre a mutação H63D e PCT tem sido descrita em estudos na região do mediterrâneo^{239,243}. Dois estudos na Itália mostram resultados contrários, provavelmente devido à variação étnica da população^{233, 243}. No centro-sul a frequência da mutação C282Y é maior nos pacientes com PCT em relação à população controle (8% versus 0%, respectivamente) e não há diferença para H63D entre os dois grupos²³³. No norte a frequência da mutação H63D é maior nos pacientes com PCT em relação à população controle (29,4% versus 12,9%, respectivamente) e não há diferença significativa para a mutação C282Y²⁴³. Como o VHC é frequente em pacientes italianos com PCT e é raro em pacientes com PCT do norte da Europa, Sampietro *et al.*²⁴³ examinaram um

grupo controle com hepatite C ativa e sem PCT para descartar uma possível associação entre a mutação de H63D e a infecção pelo VHC. A prevalência das mutações HFE deste grupo foi quase idêntica ao observado nos controles da população em geral, sugerindo que, o aumento da prevalência de H63D era, de fato, associado com a PCT. O papel da mutação H63D na hemocromatose ainda não foi esclarecido, pois ela é rara na hemocromatose clássica e frequente em indivíduos normais. Alguns autores sugerem que a H63D poderia ser um marcador polimórfico de outra mutação HFE diferente da C282Y ²⁴³.

Bulaj *et al.* ⁵⁷ não encontraram diferença significativa entre a frequência de VHC em pacientes com PCT e mutações HFE e aqueles com alelos TS (tipo selvagem), sugerindo que as mutações HFE não predispoem a infecções pelo VHC. Smith *et al.* ²⁴⁴ chegaram a uma conclusão semelhante com um estudo de 137 pacientes britânicos com infecções pelo VHC. No entanto, vários relatos confirmam que a infecção pelo VHC predispõe o desenvolvimento da PCT ⁵⁷. Cerca de 75% dos pacientes com PCT nos Estados Unidos, Itália, Espanha e França apresentam exposição ao VHC ^{89,90,102}; esta associação da PCT com o VHC é menos comum em pacientes do norte da Europa, Austrália e Nova Zelândia ^{108,245}.

A maioria dos pacientes com PCT apresenta siderose hepática e aumento dos depósitos de ferro do corpo com aumento dos níveis de ferro sérico e da ferritina ^{246,247}. A causa desta sobrecarga de ferro é desconhecida ²³⁶. Nos pacientes com PCT não é possível usar os níveis de ferro e de ferritina como um indício de hemocromatose. Além disso, a ferritina pode estar aumentada nas infecções virais (VHC e HIV) associadas à PCT. Do mesmo modo, o álcool também está associado ao aumento de ferro hepático em pacientes com PCT e este efeito está aumentado em homozigotos para a mutação HFE C282Y ⁵⁷. Há diversos autores que encontraram parâmetros maiores nos níveis de ferro dos pacientes com PCT e homozigotos para C282Y ou heterozigotos compostos C282Y/H63D ^{57,235,236}. Entretanto, um estudo alemão, com 190 casos de PCT, não demonstrou diferença entre o ferro sérico, o ferro hepático, a saturação da

transferrina e as enzimas hepáticas dos pacientes com ou sem as mutações do gene HFE ²³⁴. Também no centro-sul da Itália não se observou diferença no metabolismo do ferro e na intensidade da porfiria entre os dois grupos (com e sem a mutação C282Y), pois não houve diferenças no ferro sérico, ferritina, transferrina e nos níveis de porfirinas ²³³.

Smith *et al.* ²⁴⁴ encontraram discreto aumento nos depósitos de ferro e uma tendência maior à fibrose hepática nos indivíduos heterozigotos para C282Y e VHC; a cirrose foi encontrada com maior frequência nas pessoas com a mutação (40%) quando comparada com aquelas sem a mutação (8,7%) ($p=0.01$; *razões de chance*: 7,6 [1.9-31,2]).

A idade de início da PCT foi a mesma entre o grupo com ou sem a mutação C282Y ¹⁴⁶. Entretanto, Brady *et al.* ¹⁴⁷ observaram que a homozigose para a mutação C282Y estava associada a um início mais precoce das lesões cutâneas na PCT esporádica e familiar, sendo mais marcante na forma familiar. Outro achado destes autores foi que não encontraram uma associação com significância estatística entre a PCT esporádica e a heterozigose para C282Y nos descendentes do norte europeu ¹⁴⁷ apesar de outros trabalhos mostrarem esta associação, porém sempre mais fraca do que aquela encontrada para os homozigotos ^{89,108,146}.

Quadro 1 - Frequência das mutações C282Y e H63D e dos seus alelos nos pacientes com porfiria cutânea tardia e na população controle nos diferentes países

ESTUDO - AUTOR / ANO	PAÍS	POPULAÇÃO CONTROLE				Frequência dos alelos na população controle (%)		POPULAÇÃO COM PCT				Frequência dos alelos na PCT (%)		p-valor*
		Nº	C282Y	H63D	C282Y/H63D	C282Y	H63D	Nº	C282Y	H63D	C282Y/H63D	C282Y	H63D	
Tannapfel A, 2001 ²³⁴	Alemanha	115	3 (3%) +/- 0 +/+	12 (10%) +/- 0 +/+	0	1,3	5,2	190	53 (27,8%) +/- 22 (11,5%) +/+	82 (43%) +/- 3 (1,5%) +/+	18 (9%)	30,3	27,9	C282Y e H63D; p < 0,0001
Stölzel, 2003 ²³⁵	Alemanha	115	3 (3%) +/- 0 +/+	12 (10%) +/- 0 +/+	0	1,3	5,2	62	9 (15%) +/- 3 (5%) +/+	18 (29%) +/- 0 +/+	8 (13%)	18,5	20,9	C282Y e H63D; p < 0,0001
Frank, 2006 ¹⁹⁷	Alemanha	54	2 (3,7%) +/- 0 +/+	15 (27,7%) +/- 2 (3,7%) +/+	1 (1,9%)	3	19	51	7 (13,7%) +/- 4 (7,8%) +/+	17 (33,3%) +/- 2 (3,9%) +/+	1 (2%)	16	22	C282Y, p < 0,0013; H63D p=0,6083
Roberts, 1997 ¹⁴⁶	Reino Unido	101	6 (6%) +/- 1 (1%) +/+	22 (22%) +/- 3 (3%) +/+	4 (4%)	5,94	15,8	41	8 (20%) +/- 7 (17%) +/+	9 (22%) +/- 1 (2%) +/+	3 (7%)	30,5	17,1	C282Y, p < 0,0001; H63D, p=0,8592
Brady, 2000 ¹⁴⁷	Reino Unido	10566	1342 (12,7%) +/- 72 (0,7%) +/+	2488 (23,6%) +/- 246 (2,3%) +/+	253 (2,4%)	8,2	15,3	84	15 (17,9%) +/- 20 (23,8%) +/+	16 (19%) +/- 1 (1,2%) +/+	7 (8,3%)	36,9	14,9	C282Y, p<0,0001; H63D, p=1,0000
Stuart, 1998 ¹⁰⁸	Austrália	Outros estudos	11,5% +/- 0,67% +/+	Sem diferença				27	4 (15%) +/- 3 (11%) +/+	5 (19%) +/- 2 (7%) +/+	5 (19%)	27,8	25,9	p < 0,001 para C282Y(+/- e +/-). Usaram a população controle de outros estudos.
Bonkovsky, 1998 ⁸⁹	América do Norte							26	6 (23%) +/- 5 (19%) +/+	6 (23%) +/- 2 (8%) +/+	0	30,8	19,2	Não tem população controle
Bulaj, 2000 ¹²²	EUA	56	7 (13%) +/- 0 +/+	10 (18%) +/- 1 (2%) +/+	0	6,2	10,7	87	13 (15%) +/- 17 (19%) +/+	13 (15%) +/- 6 (7%) +/+	6 (7%)	30,5	17,8	C282Y, p<0,0001; H63D, p=0,1271
Egger, 2002 ⁶⁰	EUA							34	3 (9%) +/- 3 (9%) +/+	9 (26%) +/- 3 (9%) +/+	4 (12%)	19,1	27,9	Não tem população controle
Skowron, 2001 ²³⁶	França							56	9 (16%) +/- 0 +/+	18 (32,1%) +/- 4 (7,1%) +/+	8 (14,2%)	15,2	30,4	Não tem população controle

Nota: * Calculamos o p-valor levando em conta a frequência dos alelos em cada estudo; Nº = Número de pacientes; PCTs=porfiria cutânea tardia esporádica; PCTf=porfiria cutânea tardia familiar.

Quadro 1 (continuação) - Frequência das mutações C282Y e H63D e dos seus alelos nos pacientes com porfiria cutânea tardia e na população controle nos diferentes países

ESTUDO - AUTOR / ANO	PAÍS	POPULAÇÃO CONTROLE				Frequência dos alelos na população controle (%)		POPULAÇÃO COM PCT				Frequência dos alelos na PCT (%)		p-valor*
		Nº	C282Y	H63D	C282Y/H63D	C282Y	H63D	Nº	C282Y	H63D	C282Y/H63D	C282Y	H63D	
Chiavérini C, 2003 ¹¹⁰	Sul da França	58	1 (1,72%) +/- 0 +/-	11 (18,9%) +/- 2 (3,4%) +/-	0	0,9	12,9	33	5 (15%) +/- 0 +/-	15 (45,5%) +/- 2 (6%) +/-	1 (3%)	9	30,3	C282Y, $p < 0,0097$; H63D, $p = 0,0060$
Rossmann-Ringdahl, 2005 ²⁴⁸	Suécia							58	7 (12%) +/- 8 (14%) +/-	11 (19%) +/- 1 (1,7%) +/-	6 (10%)	25	16	Não tem população controle
Toll, 2006 ²⁴²	Espanha							65	11 (16,9%) +/- 0 +/-	28 (43%) +/- 7 (10,7%) +/-	3 (21,6%)	10,7	34,6	Não tem população controle
Enriquez de Salamanca, 1999 ²³⁹	Espanha	50	2 (4%) +/- 0 +/-	14 (28%) +/- 2 (4%) +/-	0	2	18	69 PCTs	4 (5,8%) +/- 3 (4,3%) +/-	20 (28,9%) +/- 10 (14,5%) +/-	5 (7,2%)	10,8	32,6	PCTs - C282Y $p = 0,0095$; H63D $p = 0,0119$
								19 PCTf	1 (5,2%) +/- 0 +/-	4 (21%) +/- 0 +/-	2 (10,5%)	7,9	15,8	PCTf - C282Y $p = 0,1281$; H63D $p = 1,0000$
Castiella, 2010 ¹⁸³	Espanha (Bascos - norte)	116	8 (6,9%) +/- 0 +/-	45 (38,79%) +/- 9 (7,76%) +/-	4 (3,45%)	5,2	28,9	54	2 (3,7%) +/- 0 +/-	21 (38,9%) +/- 6 (11,1%) +/-	4 (7,4%)	5,5	34,3	C282Y, $p = 1,0000$; H63D, $p = 0,3155$
Sampietro, 1998 ²⁴³	Norte da Itália	128	2 (1,5%) +/- 0 +/-	29 (22,6%) +/- 2 (1,5%) +/-	0	0,7	12,9	68	2 (2,9%) +/- 0 +/-	29 (42,6%) +/- 5 (7,3%) +/-	1 (1,5%)	2,2	29,4	C282Y, $p = 0,3464$; H63D, $p = 0,0001$
D'Amato, 1998 ²³³	Itália (Centro-Sul)	50	0 +/- 0 +/-	14 (28%) +/- 1 (2%) +/-	0	0	16	50	4 (8%) +/- 1 (2%) +/-	10 (20%) +/- 1 (2%) +/-	2 (4%)	8	14	C282Y, $p = 0,0068$; H63D, $p = 0,8433$
Martinelli, 2000 ²³⁸	São Paulo	278				4	31,1	23	4 (17,4%) +/- 0 +/-	7 (30,4%) +/- 1 (4,3%) +/-	1 (4,3%)	10,8	21,7	C282Y, $p = 0,02$; H63D, $p = 1,0000$
Ivanova, 1999 ²⁴¹	Bulgaria	100	0 +/- 0 +/-	23 (23%) +/- 0 +/-	0	0	11,5	48	0 +/- 0 +/-	10 (20,8%) +/- 0 +/-	1 (2,1%)	1,04	11,45	C282Y, $p = 0,3243$; H63D, $p = 1,0000$
Wolff, 2006 ²⁴⁰	Chile	178 (H63D) / 82 (C282Y)	2/82 (2,4%) +/- 0 +/-	38/178 (21,3%) +/- 3/178 (1,7%) +/-	0	1,2	12,36	20	2 (10%) +/- 0 +/-	5 (25%) +/- 1 (5%) +/-	1 (5%)	7,5	20	C282Y, $p = 0,0527$; H63D, $p = 0,2128$

Nota: * Calculamos o p-valor levando em conta a frequência dos alelos em cada estudo; Nº = Número de pacientes; PCTs=porfiria cutânea tardia esporádica; PCTf=porfiria cutânea tardia familiar.

3.1.7 *Tratamento da Porfiria Cutânea Tardia*

O tratamento para os três tipos de PCT é o mesmo ²¹. Inicialmente devemos afastar os fatores precipitantes (álcool, estrógenos e exposição aos hidrocarbonetos halogenados) ⁶⁰, investigar e tratar as infecções virais (HIV e VHC), além de averiguar doenças associadas (carcinoma hepático, hemocromatose, *diabetes mellitus*, lupus eritematoso, etc). As alterações cutâneas e bioquímicas podem melhorar apenas evitando os fatores precipitantes, sem qualquer tratamento específico ²⁴⁹. A utilidade do filtro solar para evitar a formação de bolhas na PCT é superestimada, pois a maioria dos pacientes na Europa Central mostra exacerbações das bolhas após o verão, ou seja, um longo período após a exposição solar ²¹. Com a excreção de porfirina de aproximadamente 600-800 µg/dia, as manifestações cutâneas desaparecerem mesmo sem qualquer proteção ao sol ^{21,249}.

Os principais tratamentos usados são a flebotomia e/ou a cloroquina. A flebotomia foi introduzida por Ippen em 1961 e consiste na remoção de 500 mL de sangue em intervalos de uma ou duas semanas até atingir hemoglobina de 10 g/dL ou ferro sérico de 50 a 60 µg/dL ²⁵⁰. Geralmente, precisam-se remover cinco a seis unidades de sangue (500 mL) antes de iniciar alguma regressão dos sintomas ²⁵¹. Para atingir remissão com flebotomia, geralmente retira-se de 2,5 L a 7 L de sangue no total ²⁵². O efeito da flebotomia parece ser a redução da sobrecarga de ferro.

A cloroquina (antimalárico) foi sugerida por London ²⁵³ em 1957, que usou dose de 500 mg por dia, mas esta dose provou ser muito hepatotóxica e atualmente usam-se doses baixas, que vão de 125 a 250 mg, duas vezes por semana, sem efeitos colaterais de importância ²⁵⁴⁻²⁵⁹. A cloroquina na dosagem antimalárica provoca uma reação hepatotóxica severa associada a uroporfirinúria maciça e fotossensibilização, mas raramente este é o primeiro sinal de que o indivíduo apresenta a PCT ²⁶⁰. No passado utilizou-se cloroquina em altas doses (250 mg, uma vez ao dia, por sete dias),

precedida de uma a três flebotomias, mas esta forma de tratamento leva a efeitos colaterais como aumento das enzimas hepáticas e sintomas influenza-símile. Estes efeitos colaterais eram maiores nos pacientes que apresentavam grandes aumentos de porfirinas ou de enzimas hepáticas antes do tratamento e não apresentou relação com a presença das mutações para HH ²⁴⁸

A administração da cloroquina (na dose usual) é seguida por aumento na excreção de porfirinas policarboxiladas na urina ²⁶¹ e discreto aumento das transaminases hepáticas no início do tratamento ²⁶². Entretanto, a morfologia hepática continua intacta e a cloroquina não agrava a lesão hepática ^{262,263}. No acompanhamento de longo prazo, não houve aumento da taxa de cirrose hepática ou de câncer hepático nos pacientes que receberam cloroquina, provavelmente porque a cloroquina exerce uma ação protetora no fígado, que resulta de sua atividade anti-inflamatória ²⁶⁴. Não há risco de retinopatia na dosagem utilizada, porém recomenda-se exame oftalmológico antes do início do tratamento com cloroquina para afastar alterações prévias de retina, mas não há necessidade de um acompanhamento oftalmológico regular ^{21,255}. Em 307 pacientes acompanhados entre 1969 e 1981 não se observou toxicidade ocular em nenhum caso com a dosagem de 250mg duas vezes por semana ²⁵⁵. As bolhas e a fragilidade cutânea melhoram em aproximadamente 6 meses e a excreção de porfirinas normaliza-se em 6 a 15 meses ^{256,257,259,262}. Em alguns casos o tratamento com cloroquina pode ser mais longo e perdurar por até cinco anos para atingir a remissão bioquímica ²⁵⁵. Recomenda-se que o tratamento não seja descontinuado até a remissão bioquímica ²⁵⁷. O período de remissão geralmente tem duração de 17 a 24 meses ^{257,259}.

O tratamento com cloroquina também reduz os níveis de ferro sérico ^{258,265}, mas há várias hipóteses para explicar o mecanismo de ação da cloroquina:

1. Forma complexos com as porfirinas, que são solúveis em água e são removidos dos hepatócitos por exocitose aumentando a excreção das

porfirinas na urina ^{262,266,267}, ou seja, estimula a exocitose de porfirinas ²⁶⁸.

2. Reduz a concentração intracelular de porfirinas aumentando sua permeabilidade através da membrana celular ²⁶⁹. Influencia diretamente (de forma inespecífica) a permeabilidade das membranas, principalmente da membrana vacuolar ²⁷⁰.
3. Atua reduzindo a atividade da ALA sintetase, que está aumentada na PCT. Isto provavelmente ocorre através da sua interação com os grupos sulfidríla da enzima. Esta é a enzima chave que regula a biossíntese do heme, havendo assim uma inibição parcial da síntese de porfirinas ²⁷¹. A cloroquina tem um efeito porfirinostático inibindo a formação de porfirinas ^{262,266,269}.
4. Quela o ferro do hepatócito sendo eliminado posteriormente ²⁵⁴. A cloroquina diminui a sobrecarga de ferro ²⁵⁸. Em um estudo com 138 pacientes com PCT tratados com cloroquina observou-se diminuição da concentração de ferro sérico, da saturação transferrina e da siderose hepática, bem como aumento crescente do nível de transferrina. Todavia, a remoção de ferro não pode ser considerada o único mecanismo de ação da cloroquina no tratamento da PCT porque não há correlação estatística entre o grau de siderose hepática com a porfirinúria e a remissão da PCT acontece apesar da persistência da siderose hepática ²⁵⁸.
5. Reduz significativamente a incorporação do ferro nos macrófagos do fígado, baço e alvéolos em ratos, e esta diminuição do teor de ferro diminuiu a resposta oxidativa da célula ²⁶⁵.
6. É uma base fraca que eleva o pH ácido das organelas celulares prejudicando a liberação do ferro do complexo receptor transferrina–transferrina ²³⁵. As mutações da proteína HFE aparentemente modulam a função do receptor transferrina–transferrina a favor da deposição de ferro intracelular, um processo ao qual a cloroquina possivelmente se opõe ²³⁵.

7. A cloroquina acumula-se em vários tecidos, inclusive no fígado e na pele e, nesta última, ela absorve a luz UV (UVB e UVA) impedindo o eritema induzido pela UV ^{258,272}.
8. Outros efeitos sobre o mecanismo de ação da cloroquina, mas não tão estudados na PCT são ²⁷²: a) Cloroquina é uma base fraca lipofílica, que se acumula nos lisossomos (lisossomotrópica), elevando seu pH de 4 para 6, resultando na inibição de proteases ácidas e redução da proteólise, que por sua vez leva à redução do processamento intracelular, da glicosilação proteica e da secreção de proteínas. Já foram observadas diminuição da quimiotaxia, fagocitose e da produção de superóxidos pelos neutrófilos; b) Células apresentadoras de antígenos como monócitos, macrófagos e células dendríticas apresentam os antígenos exógenos (de origem extracelular) aos linfócitos T CD4 associados às moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe II. A cloroquina interfere na digestão dos antígenos e na sua apresentação às células T CD4 via MHC classe II; c) Reduz a produção de citocinas (fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina-1 beta (IL-1 β) e IL-6) pelos macrófagos e monócitos; d) Inibe a ativação dos receptores 'Toll-like' (TLR), que são receptores celulares para produtos microbianos e que induzem respostas inflamatórias através da ativação do sistema imune inato; e) É antagonista da prostaglandina, secundária à inibição da fosfolipase A₂; f) Prejudica a reciclagem dos receptores e o seu transporte pelas membranas.

A flebotomia associada à cloroquina é empregada quando a resposta for inadequada a qualquer tratamento isolado; inclusive a associação de cloroquina e flebotomia leva a uma remissão mais rápida da PCT ²⁷³. A hidroxicloroquina também já foi usada (200 mg duas vezes por semana), mas o período de remissão foi mais curto do que com a cloroquina ^{33,274}. Cainelli *et al.* ²⁷⁵ compararam a hidroxicloroquina com a flebotomia e observaram que a primeira foi mais efetiva para diminuir as porfirinas; além disso observaram que a melhora da lesão hepática foi menor no grupo com hidroxicloroquina, mas isto não pode ser atribuído à hidroxicloroquina devido

à interferência de fatores precipitantes associados, como hepatite, etilismo, etc. Na literatura são sugeridos outros tratamentos como: a desferroxamina, quelante de ferro ²⁷⁶; a eritropoietina combinada ou não com a flebotomia, para os casos com anemia e insuficiência renal crônica concomitante ⁷¹; e a talidomida (dose de 300 mg por dia por uma semana e depois 200 mg por dia por três semanas) levando a uma remissão rápida, mas sem mudanças nos níveis de ferro ²⁷⁷.

Sabe-se que os pacientes com o VHC respondem menos ao tratamento com interferon (α -IFN) quando a ferritina sérica e a concentração de ferro hepático estão elevados ¹⁰⁴. Remoção de ferro por flebotomia pode ter efeitos benéficos em alguns pacientes com hepatite C e esteatohepatite não alcoólica ⁵⁹. Alguns autores recomendam que a flebotomia seja realizada antes de iniciar o tratamento antiviral com α -IFN ²¹. O tratamento com α -IFN pode ser útil em situações raras onde a flebotomia falhou no tratamento da PCT ⁹⁶.

Na PCT 'verdadeira' associada à IRC com hemodiálise prolongada, quando a hemoglobina está menor que 8 g/dL, podemos utilizar somente a eritropoietina em baixas doses (20 a 50 UI/kg), três vezes por semana, após a diálise para estimular a eritrogênese e assim mobilizar os estoques de ferro ⁷¹. Se a hemoglobina estiver ≥ 10 g/dL podemos usar somente a flebotomia. Quando os tratamentos isolados falham, podemos utilizar a eritropoietina em altas doses (>150 UI/kg) associada à flebotomia de pequenos volumes (100 mL por semana) e depois de atingir a remissão podemos continuar com a eritropoietina ⁷¹.

3.1.7.1 *Monitoramento*

Nos pacientes com PCT mais idosos etilistas crônicos e/ou com VHC recomenda-se biópsia de fígado para avaliar o prognóstico ²¹. Em qualquer tratamento da PCT é necessário um acompanhamento por um longo período de todos os pacientes, para prevenir as recidivas (dosando a excreção de porfirinas urinárias) e supervisionar a doença hepática coexistente ³³. A

excreção das porfirinas urinárias reflete claramente o conteúdo de porfirina hepática. O monitoramento do tratamento pela análise das porfirinas urinárias é altamente confiável; a porfirinúria antecede a manifestação dermatológica, permitindo a introdução precoce de medidas preventivas e terapêuticas. Recomenda-se a análise das porfirinas urinárias a cada três meses durante o tratamento²⁷⁸; após a remissão completa, o monitoramento laboratorial é recomendado uma vez por ano²¹. Recidivas podem ocorrer em cerca de um terço dos pacientes, mesmo sem fatores precipitantes óbvios^{21,279}. A recidiva geralmente ocorre dentro de três anos²⁷⁹.

4 MÉTODOS

4.1 TIPO DE ESTUDO E ANÁLISE ESTATÍSTICA

O delineamento do estudo foi não direcional e ambispectivo. Os dados foram obtidos de forma longitudinal. Foram aplicadas medidas para a análise da frequência das mutações (C282Y e H63D) do gene HFE da hemocromatose hereditária (HH) na população em estudo, com intervalo de confiança de 95%, separando em etilismo, *diabetes mellitus*, hepatite C (VHC), hepatite B (VHB) e vírus da imunodeficiência humana (HIV). Também verificamos se existia associação entre as mutações (C282Y e H63D) e as variáveis listadas anteriormente através do ‘teste exato de Fisher’. Para a descrição dos resultados foi usada a planilha Excel® (Microsoft®). Utilizamos o teste Wilcoxon para comparar as variáveis bioquímicas, tanto ao longo do tempo, como para ver se existia relação entre estas com VHC. O nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$).

4.2 CASUÍSTICA

Foram avaliados 60 pacientes em acompanhamento no Ambulatório de Fotobiologia (ADEE 3101) da Divisão de Dermatologia do HCFMUSP durante o período de oito anos (2003 a 2011) deste estudo. Todos os pacientes em seguimento no ambulatório têm um protocolo manuscrito para acompanhamento dos exames. Incluímos na avaliação a ingestão de álcool, compostos estrogênicos ou suplemento de ferro, exposição a hidrocarbonetos halogenados, antecedentes de hepatite ou HIV e manifestações clínicas semelhantes na família.

Estudamos a frequência dos alelos das mutações C282Y e H63D nos pacientes com PCT e estes resultados foram comparadas com a frequência

dos alelos obtida de outro estudo realizado também em São Paulo (HCFMUSP) com 395 doadores de sangue por Pereira *et al.*²⁸⁰ em 2001. Verificou-se a relação dos alelos H63D e C282Y com os diferentes fatores precipitantes. Analisou-se a relação das mutações HFE com o perfil de ferro e as enzimas hepáticas; verificando a relação do genótipo com os resultados antes e depois do tratamento com difosfato de cloroquina (250 mg, 2 vezes por semana). Os resultados dos níveis de ferro e enzimas hepáticas também foram analisados nos pacientes de PCT com e sem hepatite C (antes e depois do tratamento com cloroquina).

Os exames laboratoriais realizados foram: hemograma completo, enzimas hepáticas [alanina transaminase (ALT), aspartato transaminase (AST), gama-glutamil transpeptidase (GGT), perfil de ferro (ferro sérico, saturação de transferrina, ferritina, capacidade de ligação de ferro), fosfatase alcalina sérica, bilirrubina sérica, fator antinúcleo (FAN), alfafetoproteína, glicemia de jejum e, se necessário, teste de tolerância à glicose (GTT) oral. Sorologias para as hepatites (B e C) e para o vírus da imunodeficiência humana (HIV) são realizadas de rotina nos pacientes com diagnóstico de PCT.

Exames de “*screening*” com a lâmpada de Wood foram utilizados para detectar a presença de porfirinas na urina, fezes e eritrócitos (Métodos de Rimington e de Rimington-Doyle)²⁸¹. As porfirinas urinárias foram quantificadas pelo método CLAE (*Cromatografia Líquida de Alta Eficiência*) nas amostras de urina de 24 horas. As porfirinas plasmáticas foram quantificadas pelo método CLAE na amostra de sangue de um paciente com IRC e anúrico. (Exame realizado pelo *Quest Diagnostics Nichols Institute* em intercâmbio com Albert Einstein Medicina Diagnóstica).

Foram aplicados critérios de inclusão e exclusão.

- Critérios de Inclusão

Foram incluídos todos os pacientes com diagnóstico de PCT. O diagnóstico baseou-se nas manifestações clínicas, no exame de “*screening*” com a lâmpada de Wood (positivo na urina e fezes e negativo no sangue), no

aumento da concentração de uroporfirina na urina de 24 horas (com a relação URO:COPRO $\geq$ 3:1), na histopatologia e na imunofluorescência direta (IFD). Nesta amostragem não foi possível diferenciar os tipos de PCT (Tipo I, II e III).

- Critérios de Exclusão

Foram excluídos: 1. Pacientes com predomínio de COPRO na urina (relação URO/COPRO na urina $<$ 3:1), porque nestes não é possível afastar a porfiria variegata; 2. Casos cuja amostra de sangue não forneceu DNA de qualidade para a genotipagem; e 3. Pacientes que não aceitaram o termo de consentimento livre e esclarecido (**Anexo A**).

4.3 ASPECTOS ÉTICOS

Todos os pacientes em seguimento no ambulatório, independentemente do tipo de tratamento a que foram submetidos, e que preenchiam os critérios de inclusão foram convocados para coleta de sangue para a pesquisa das mutações. Todos os pacientes receberam explicações verbais e escritas e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). O TCLE foi aprovado pela Comissão de Ética do Departamento de Dermatologia da FMUSP e pela Comissão para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da FMUSP (CAPPesq) (**Anexo B**). O presente estudo foi considerado de risco mínimo para o paciente, por envolver apenas uma punção venosa para coleta da amostra de sangue para pesquisa das mutações HFE.

4.4 COLETA DE DADOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS

Os pacientes tiveram 10 mL de sangue coletado para pesquisa das mutações da hemocromatose (C282Y e H63D). Para obtenção dos dados clínicos e laboratoriais utilizamos o protocolo manuscrito (**Anexo C**) e os resultados disponíveis no computador pelo HCLAB.

4.5 CARACTERIZAÇÃO DOS PARÂMETROS COLETADOS

A idade foi considerada em anos completos, relacionada ao momento do diagnóstico. As etnias consideradas foram: eurobrasileiro, afrobrasileiro, mistura de etnias e asiático. As comorbidades registradas foram: condições crônicas (como *diabetes mellitus*, etilismo, carcinoma hepático, etc.), tratamento com estrógenos e infecções por vírus (hepatite B, hepatite C e HIV). Foi considerada sobrecarga bioquímica de ferro sempre que os valores registrados estivessem em níveis acima dos limites superiores aos valores de referência estabelecidos pela rotina da Divisão de Laboratório Central HCFMUSP. O paciente foi considerado diabético se a glicemia de jejum estivesse acima de 110 mg/mL ou se a glicemia pós-prandial após 120 minutos atingisse níveis ≥ 200 mg/mL. A redução das porfirinas totais na urina de 24 horas para parâmetros normais foi considerada remissão bioquímica (valores de referência estabelecidos pela rotina da Divisão de Laboratório Central HC-FMUSP: mulheres < 159 µg/24h e homens < 199 µg/24h).

4.6 PESQUISA DAS MUTAÇÕES NO GENE *HFE*

4.6.1 Infraestrutura

A pesquisa das mutações foi realizada no Laboratório de Imunopatologia da esquistossomose – Laboratório de gastroenterologia e hepatologia tropical - (LIM 07 - Disciplina de Gastroenterologia Clínica - **Anexo D**) com o equipamento *7300 Real Time PCR System ABI PRISM™* (Applied Biosystem, EUA).

4.6.2 Extração e Análise do DNA Genômico

Foram coletadas de cada paciente amostra de 10 mL de sangue de veia periférica em tubo com EDTA. Extraíu-se o DNA genômico leucocitário pelo método modificado de Chomczynski e Sacchi ²⁸². Inicialmente centrifuga-se a amostra (tubo com EDTA) a 2.000 rpm por 10min e depois separa-se as frações plasma e *buffy coat* em tubos distintos e enumerados. Em um tubo de microcentrífuga, pipeta-se 300 µl de solução de fenol e isoticianato de guanidina, Brazol® (LGC, Brasil) para 100 µl de *buffy coat*. O Brazol® provoca a lise das membranas celulares liberando o DNA. Esta suspensão é homogeneizada em vórtex por 2 min; adiciona-se 50 µl de clorofórmio (*Merck*, Alemanha) gelado. Centrifuga-se os tubos durante 10 min a 10.000 rpm e a 4 °C. Após a centrifugação, observa-se a formação de três fases: a mais inferior fenólica (proteínas), a fase intermediária (DNA) e a superior aquosa (RNA). Para precipitação do DNA transfere-se o sobrenadante total, contendo a fase intermediária, para um novo tubo de microcentrífuga contendo 300 µl de etanol PA gelado. Homogeneiza-se por 2 min em vórtex e são centrifugados por 15 min a 13.200 rpm e a 4 °C. Remove-se o sobrenadante por aspiração, cuidando para não aspirar o

pellet (DNA precipitado) e acrescenta-se 1.000 µl de etanol absoluto gelado (*Merck*, Alemanha) ao DNA precipitado. Centrifuga-se por 10 min a 10.000 rpm e a 4°C. Despreza-se o sobrenadante e deixa-se secar a amostra no microtubo. O DNA sedimentado no fundo do tubo é ressuspendido com 100 µl água DEPC tratada estéril.

A quantificação final da concentração de DNA é obtida através da leitura em espectrofotômetro Nanodrop™ ND-1000 pela absorbância em luz ultravioleta a 260 nm, e o grau de pureza do DNA é avaliado e determinado pela relação 260/A280 nm, e são utilizados os DNAs cuja relação é $\geq 1,8$. As amostras de DNA são armazenadas na geladeira a 2-8 °C e estão prontas para serem utilizadas em reações de amplificação.

4.6.3 Pesquisa de Mutações C282Y e H63D pela Técnica de Reação de Polimerização em Cadeia em Tempo Real (PCR-RT)

A PCR é um método usado para a amplificação de sequências específicas do DNA “in vitro”, usando o processo de replicação natural do DNA. O PCR em tempo real (PCR-RT) é uma técnica que detecta os produtos do PCR (amplicons) à medida que vão sendo sintetizados na reação. A localização da sequência alvo é feita pelos iniciadores ou *primers*, que são oligonucleotídeos com 20-24 bases, seletivos para localizar um único sítio no genoma. Cada fita nova de DNA que se forma a partir dos *primers* serve como molde para a síntese de uma nova fita e assim ocorre aumento exponencial do número de novas fitas. O PCR em tempo real (PCR-RT) é uma técnica que detecta os produtos do PCR (amplicons) à medida que vão sendo sintetizados na reação.

A pesquisa das mutações C282Y e H63D foram realizadas pela técnica de PCR-RT utilizando o equipamento 7300 Real Time PCR System ABI PRISM™ (*Applied Biosystem*, EUA). Utiliza-se o sistema de detecção

Taqman[®] *SNP Genotyping Assays* (*Applied Biosystems, EUA*), onde os *primers* e as sondas marcadas com substâncias fluorescentes, no nosso caso FAM[™] e VIC[®], pareiam na região alvo do DNA, permitindo a identificação dos diferentes alelos.

Os polimorfismos pesquisados, C282Y e H63D, alvos das sondas junto com seus respectivos *primers* estão disponíveis comercialmente, conforme o inventário do fabricante (**Tabela 5**).

Tabela 5 - Descrição das mutações HFE (C282Y e H63D), sua localização e sequência de *primers* e sondas TaqMan

Mutação	Substituição Posição	Localização	Sequência <i>Primers</i> e sondas Sistema TaqMan
C282Y	G/A 845	26201120	F: CTGGGGAAGAGCAGAGATATACGT G/A R: CCAGGTGGAGCACCCAGGCCTGGAT
H63D	C/G 347	26199158	F: TGACCAGCTGTTCGTGTTCTATGAT C/G R: ATGAGAGTCGCCGTGTGGAGCCCCG

A reação de PCR-RT é preparada utilizando-se TaqMAN[®] Universal PCR Master Mix (12,5 µL), 40X TaqMAN[®] SNP Genotyping Assay Mix* (2,5 µL), DNA 10ng (2 µL) e água DEPC tratada (8,0 µL), com volume final de 25 µL. Dilui-se com tampão TE, composto por 10 mM Tris-HCL, 1 mM EDTA, pH 8,0 e água livre de DNA. A termociclagem ocorre nas seguintes condições: 10 min a 95°C, 45 ciclos de 15 s a 92°C e 1 min a 60°C, em um equipamento 7300 Real Time PCR System ABI PRISM[™] (*Applied Biosystem, EUA*).

O processo de amplificação ocorre em 3 fases, que no conjunto se designa como um ciclo:

1ª fase – Desnaturação: Aquece-se o DNA para separar as duas cadeias de DNA (95°C). Os dois filamentos ou cadeias de DNA são mantidos juntos por ligações de hidrogénio que, por serem

relativamente fracas, quebram-se a altas temperaturas, ao passo que as ligações entre as moléculas de fosfato e desoxirribose, por serem ligações covalentes mais fortes, permanecem intactas.

2ª fase – Hibridização: Na temperatura de 60 °C, os *primers* marcam as extremidades da sequência alvo. Os *primers* são curtas sequências sintéticas de nucleotídeos com 20 a 30 bases. Na reação de PCR são incluídos dois primers, um para cada cadeia simples de DNA que foi produzida durante a fase de desnaturação. O início da sequência do DNA alvo é marcado pelos *primers* que se ligam (hibridizam) à sequência complementar.

3ª fase – Extensão: Após a ligação dos *primers* às sequências complementares de DNA, a DNA polimerase replica a cadeia de DNA. O processo de síntese é iniciado numa região com cadeia dupla (onde estão ligados os *primers*), incorporando os nucleotídeos complementares à sequência alvo. A extensão inicia-se sempre na extremidade 3' do *primer*, criando uma cadeia dupla a partir de cada uma das cadeias simples.

O método utiliza um sistema fluorescente para detectar a luz oriunda da reação de amplificação. Utiliza-se a atividade da 5'-exonuclease da Taq DNA polimerase em sondas marcadas com corantes fluorescentes (TaqMan). Essas sondas, específicas para o segmento gênico que se deseja amplificar, apresentam um fluorocromo (VIC® dye ou FAM™ dye), na extremidade 5' da sonda, capaz de absorver a energia luminosa emitida pelo equipamento e dissipá-la na forma de luz e calor, em comprimento de onda diferente do original (**Figura 9**). Entretanto, na sua posição nativa, toda a luz emitida por esse fluorocromo é absorvida por um *quencher* (Q) presente na extremidade 3' da sonda, que não deixa com que a energia luminosa usada para excitar a sonda chegue em quantidade suficiente para excitar o primeiro fluorocromo. Dessa forma, o sistema óptico do equipamento não é capaz de detectar fluorescência no tubo de reação. Por outro lado, se a reação for capaz de gerar produtos (amplicons), a sonda irá hibridizar-se com o alvo

gerado e ficará exposta à atividade da Taq polimerase. Quando o *primer* hibridiza na região 5', a sonda também o faz no meio da sequência. À medida que a Taq polimerase avança sintetizando a fita nova, ela vai degradando a sonda à sua frente, liberando o fluorocromo (VIC® dye ou FAM™ dye) da sonda e permitindo que absorva energia e emita luz. Como consequência a sonda será degradada e o fluorocromo ficará distante do *quencher*, que não será capaz de absorver a luz emitida (**Figura 9**).

FONTE: Figura de Allelic Discrimination Getting Started Guide for 7300/7500/7500 Fast Real-Time PCR System - Applied Biosystems

Figura 9 - Princípio da reação de polimerização em cadeia em tempo real (PCR-RT). Uma sonda de fita simples com dois fluorocromos é adicionada à reação de PCR. O fluorocromo V ou F (VIC® dye ou FAM™ dye) precisa permanecer próximo de Q (*quencher*) para atenuar sua fluorescência. A enzima Taq-DNA polimerase (AmpliTaQ Gold® DNA Polymerase) separa os dois fluorocromos à medida que cliva a sonda para sintetizar a nova fita de DNA. O fluorocromo V ou F recém-liberado da sonda emite então uma luz com comprimento de onda característico

O equipamento utiliza um feixe de laser para a excitação dos fluorocromos e a fluorescência produzida pela amostra é detectada pelo sistema, que traça um gráfico com a absorção obtida após cada ciclo de PCR (**Figura 10**). O gráfico obtido com os resultados das mutações de alguns pacientes deste estudo estão nos **Anexos E e F**.

FONTE: Figura de Allelic Discrimination Getting Started Guide for 7300/7500/7500 Fast Real-Time PCR System - Applied Biosystems

Figura 10 - Ilustração do gráfico obtido com a técnica de reação de polimerização em cadeia em tempo real (PCR-RT) utilizando o equipamento 7300 Real Time PCR System ABI PRISM™, (Applied Biosystem, EUA)

5 RESULTADOS

O grupo de pacientes com PCT era constituído de 16 mulheres (26,7%) e 44 homens (73,3%) com a idade de início da PCT variando entre 22 e 71 anos (média de 44,63 anos / mediana de 45 anos) para mulheres e entre 25 e 67 anos (média de 44,70 anos / mediana de 43,5 anos) para homens. O genótipo não interferiu na idade de início da PCT. A maioria dos pacientes (72%) apresentava mistura de etnias, ou seja, a maioria era de cor parda e não foi possível obter informações detalhadas dos seus ancestrais.

Gráfico 1 - Distribuição dos pacientes pela etnia

Os fatores precipitantes considerados foram o etilismo, ingestão de estrógenos, hepatite B (VHB), hepatite C (VHC), HIV, histórico familiar de PCT e diagnóstico de hemocromatose hereditária (HH) (considerando a manifestação clínica e/ou a presença das mutações C282Y/C282Y ou C282Y/H63D). A maioria dos pacientes (68,3%) apresentava dois ou mais fatores precipitantes coexistentes; 31,7% com apenas um fator e 8,3%, quatro fatores. Distribuição do número de fatores precipitantes coexistentes estão no **Gráfico 2**.

Gráfico 2 - Distribuição do número de fatores precipitantes coexistentes

A coexistência de fatores precipitantes nos 60 pacientes está descrita na **Tabela 6**. Etilismo crônico estava presente em 71,7% (43 de 60) pacientes e 48,8% (21 de 43) destes apresentavam VHC. Etilismo social foi referido por 10 pacientes de 60 (16,7%).

O anti-VHC estava positivo em 41,7% (25 de 60) dos pacientes, sendo que destes, 84% (21 de 25) estava associado a etilismo e 20% (5 de 25) apresentava anti-VHC e anti-HIV positivo. A hepatite C estava associada a etilismo social em 16% (4 de 25). Doze pacientes (12 de 25) com anti-VHC positivo tiveram o diagnóstico confirmado por PCR. Quanto ao genótipo do VHC, apenas nove pacientes apresentavam a genotipagem no sistema HCMED: dois genótipo '1a', quatro '1b' e três '3a'.

O anti-HIV era positivo em 15,3% (9 de 59) dos pacientes; todos os pacientes apresentavam etilismo crônico associado e cinco destes também apresentavam anti-VHC associado.

Quanto à sorologia para hepatite B, 32,2% (19 de 59) apresentava anti-HBc total positivo, mas nenhum apresentava AgHBs positivo; destes 52,6% (10 de 19) apresentava anti-VHC associado.

A manifestação clínica ou fenotípica da hemocromatose foi o único fator precipitante em uma paciente; apresentava o diagnóstico prévio de HH apesar de ser somente heterozigota para H63D. Dois irmãos tiveram o diagnóstico de HH somente após a pesquisa das mutações HFE (um homem C282Y/C282Y e uma mulher C282Y/H63D). Outra paciente heterozigota composta (C282Y/H63D) está em investigação para observar se há manifestação clínica da hemocromatose.

Tabela 6 - Associação dos fatores precipitantes nos 60 pacientes com porfiria cutânea tardia

FATOR PRECIPITANTE	Nº PACIENTES	% PACIENTES
Etilismo + VHC	9	15,0%
Etilismo	8	13,3%
Etilismo + VHC + HBV	7	11,7%
Etilismo + VHB + AF	4	6,7%
Etilismo + VHC + HBV + HIV	3	5,0%
Etilismo + HIV	3	5,0%
Etilismo + AF	3	5,0%
VHC	3	5,0%
Estrógenos	3	5,0%
Antecedentes familiares de PCT (AF)	3	5,0%
Etilismo + VHC + HIV	2	3,3%
AF + HH	2	3,3%
Etilismo + HBV	1	1,7%
Etilismo + HIV + AF	1	1,7%
Etilismo + Estrógenos + AF	1	1,7%
Etilismo + Estrógenos + HBV + AF	1	1,7%
VHC + HBV	1	1,7%
Estrógenos + HBV	1	1,7%
Estrógenos + AF	1	1,7%
Estrógenos + AF + HBV + HH	1	1,7%
Hemocromatose hereditária (HH)	1	1,7%
Etilismo social (?)	1	1,7%
TOTAL	60	100,0%

Nota: VHC = Sorologia positiva para hepatite C; VHB = Sorologia positiva para hepatite B; AF = Antecedentes familiares de PCT; HIV = Sorologia positiva para o vírus HIV; HH = hemocromatose hereditária (com genótipos C282Y/C282Y ou C282Y/H63D ou fenótipo clínico de HH).

Apenas o histórico de antecedentes familiares de PCT foi investigado; não foi possível neste estudo fazer a dosagem da atividade enzimática da UROD no eritrócito ou pesquisar as mutações do gene UROD nestes pacientes. Antecedentes familiares de PCT estava presente em 28,3% (17 de 60) dos pacientes. Entre estes casos: 17,6% (3 de 17) apresentava apenas histórico familiar sem nenhum outro fator precipitante; 58,8% (10 de 17) apresentava etilismo, 17,6% (3 de 17) hemocromatose hereditária e 23,5% (4 de 17) ingestão de estrógenos. Todos os casos com histórico familiar eram negativos para hepatite C.

O tabagismo estava presente em 32 de 57 pacientes (56,1%), todavia se é ou não um fator precipitante ainda é controverso.

Dos 18 pacientes que apresentavam apenas um fator precipitante isolado: 44,4% (8 de 18) era etilista crônico, 16,7% (3 de 18) apresentava VHC, 16,7% (3 de 18) usava estrógenos, 16,7% (3 de 18) relatava histórico familiar de PCT e 5,6% (1 de 18) exibia manifestação clínica de HH.

Considerando separadamente as 16 mulheres deste estudo (**Tabela 7**), 50% (8 de 16) tiveram a PCT desencadeada por estrógenos, sendo que em 50% (4 de 8) destas pacientes este era o principal fator precipitante. Quanto às outras quatro pacientes com PCT desencadeada por estrógeno: uma apresentava histórico familiar de PCT, uma era heterozigota composta para a mutação HFE (C282Y/H63D) e apresentava antecedentes familiares e duas apresentavam etilismo crônico e histórico familiar associado. Ainda entre as mulheres, em 25% (4 de 16) a hepatite C foi o principal fator precipitante (três destas referiam etilismo social). Uma mulher apresentava diagnóstico fenotípico prévio de HH e este era o único fator precipitante. Histórico familiar de PCT estava presente em 37,5% (6 de 16) das mulheres, destas uma apresentava apenas a história familiar como fator precipitante e outra apresentava mutação HFE (C282Y/H63D) associado ao histórico familiar. Por fim, uma paciente referia apenas etilismo social; é provável que neste caso a paciente tenha negado a condição de etilista crônica, um fato comum entre as mulheres.

Tabela 7 - Frequência dos fatores precipitantes nas 16 mulheres com porfiria cutânea tardia

FATORES PRECIPITANTES	Nº PACIENTES	% PACIENTES
Estrógeno	3	18,8%
VHC	3	18,8%
VHC + VHB	1	6,3%
Estrógeno + AF	1	6,3%
Estrógeno + etilismo + AF	1	6,3%
Estrógeno + etilismo + AF + VHB	1	6,3%
Estrógeno + AF + VHB + HH	1	6,3%
Estrógeno + VHB	1	6,3%
AF + HH	1	6,3%
AF	1	6,3%
Sem fat. Precipitantes (Etilismo social)	1	6,3%
HH	1	6,3%
TOTAL	16	100%

Nota: VHC: Sorologia positiva para hepatite C; VHB: Sorologia positiva para hepatite B; AF: Antecedentes familiares de PCT; HIV: Sorologia positiva para o vírus HIV; HH: hemocromatose hereditária.

As respectivas frequências e intervalos de confiança para cada fator precipitante ou doença associada estão descritas na **Tabela 8**.

Tabela 8 - Frequência de cada fator precipitante ou doença associada e seu respectivo intervalo de confiança

Fator precipitante ou Doença associada	Nº	Estimativa	IC (95%)	
			Limite Inf	Limite Sup
Etilista	43	71,70%	58,60%	82,50%
Hepatite C - VHC	25	41,70%	29,10%	55,10%
Hepatite B - VHB	19	31,67%	20,26%	44,96%
Antecedentes Familiares	17	28,33%	17,45%	41,44%
HIV	9	15,30%	7,20%	27,00%
<i>Diabetes mellitus</i>	9	15,00%	7,10%	26,60%
Estrógeno (só ♀) ¹	8	50,00%	24,70%	75,30%
Hemocromatose hereditária ²	4	6,67%	1,85%	16,20%
Carcinoma Hepático	2	3,33%	0,41%	11,53%

Nota: ♀: sexo feminino; IC: Intervalo de confiança;

¹ No grupo há 16 pacientes do sexo feminino; ² Pacientes com manifestação clínica da HH (hemocromatose hereditária) ou mutação HFE (C282Y/C282Y ou H63D/C282Y).

Para observar a contribuição de cada fator precipitante e sua frequência na população estudada, observar a representação no **Gráfico 3**.

Nota: VHC: vírus da hepatite C; VHB: vírus da hepatite B; AF: antecedentes familiares; HIV: vírus da imunodeficiência humana; HH: hemocromatose hereditária; ♀ - No grupo há 16 pacientes do sexo feminino; ¹ Pacientes que apresentam pelo menos um alelo das mutações C282Y ou H63D; ² Dois pacientes são heterozigotos compostos portanto entram nos pacientes com C282Y e H63D.

Gráfico 3 - Frequência de cada fator precipitante (% de pacientes)

Em relação às doenças associadas, dois pacientes homens (Nº 27 e 58) apresentavam diagnóstico de carcinoma hepatocelular (CHC), o primeiro tinha 60 anos de idade e desenvolveu CHC após 32 anos de doença; apresentou várias recaídas devido ao fato de não parar de consumir bebida alcoólica e os fatores precipitantes coexistentes eram: etilismo, anti-VHC positivo e anti-HBc total positivo. O segundo paciente teve o diagnóstico de CHC aos 56 anos de idade, após 15 anos de doença e os fatores precipitantes neste paciente eram iguais ao anterior.

Diabetes mellitus (DM) estava presente em 15% (9 de 60) dos pacientes, sendo que um dos pacientes tinha este diagnóstico prévio ao de hemocromatose. Os três pacientes com o genótipo para hemocromatose (um C282Y/C282Y e dois C282Y/H63D) não apresentavam DM.

FAN era positivo em 28,3% (17 de 60) pacientes: sete anti-VHC positivos (quatro com etilismo associado) e sete eram etilistas (quatro só etilismo, dois HIV e uma associação com estrógeno), dois tinham apenas histórico familiar de PCT e um apenas a ingestão de estrógenos. Nenhum caso de lúpus eritematoso foi identificado.

A pesquisa das mutações C282Y e H63D no gene HFE para a hemocromatose hereditária (HH) foi realizada nos 60 pacientes. O genótipo mais frequente foi o genótipo tipo selvagem (TS/TS) em 25 pacientes (41,7%), seguido pelo heterozigoto para H63D (H63D/TS) em 21 (35%), o heterozigoto para C282Y (C282Y/TS) em seis (10%), o homozigoto para H63D (H63D/H63D) em cinco (8,3%), o heterozigoto composto (C282Y/H63D) em dois pacientes (3,3%) e homozigoto para C282Y (C282Y/C282Y) em um paciente (1,7%). A frequência de cada genótipo está descrita na **Tabela 9**.

Tabela 9 - Frequência de cada genótipo e dos alelos C282Y e H63D nos 60 pacientes com porfiria cutânea tardia e frequência dos alelos C282Y e H63D nos 395 indivíduos da população controle

Mutações	Nº de Pacientes	% Pacientes
Genótipo		
C282Y / TS	6	10
C282Y / C282Y	1	1,7
H63D / TS	21	35
H63D / H63D	5	8,3
C282Y/H63D	2	3,3
TS/TS	25	41,7
Nº Total de pacientes	60	100
Alelos na PCT		
C282Y	10/120 alelos	8,3
H63D	33/120 alelos	27,5
Alelos População Controle ²⁸⁰		
C282Y	14/790 alelos	1,77%
H63D	111/790 alelos	14,05%

Nota: TS = Tipo selvagem

No nosso estudo a frequência do alelo C282Y foi de 8,3% e a frequência do alelo H63D foi de 27,5%. Para comparar estes achados com uma população controle, utilizou-se um estudo ²⁸⁰ realizado com 395 pessoas normais recrutadas do banco de sangue deste mesmo hospital (HCFMUSP) para obter a frequência dos alelos na população controle. A frequência de C282Y foi significativamente mais elevada nos pacientes com PCT em relação à população controle (8,3% versus 1,77%; odds ratio 5,02; IC [95%] = [4,1%; 14,8%], $p=0,0001$). A frequência de H63D também foi significativamente maior nos pacientes com PCT em relação à população controle (27,5% versus 14,05%; odds ratio 2,32; IC [95%] = [19,7%; 36,4%], $p=0,0004$) (**Tabela 9**). No **Gráfico 4** observamos a distribuição da frequência dos genótipos e do número de alelos C282Y e H63D dos pacientes com PCT.

Gráfico 4 - Distribuição da frequência dos genótipos e do número de alelos C282Y e H63D na população em estudo com porfiria cutânea tardia

Os fatores precipitantes foram relacionados com a presença ou não de sorologia positiva para VHC (**Tabela 10**). Não houve associação de etilismo, estrógenos, VHB, HIV, mutações HFE ou HH com sorologia positiva para o VHC. Observamos nesta tabela que a única associação estatisticamente significativa ($p < 0.05$) foi VHC com antecedentes familiares (AF) para PCT, ou seja, há uma maior frequência (proporção) de pacientes com antecedentes familiares (AF) de PCT sem VHC (48,57%) em relação a com VHC (0,00%). Esta associação ocorreu por não haver nenhum caso de AF no grupo com VHC.

Tabela 10 - Fatores precipitantes relacionados com a presença ou não de sorologia positiva para o vírus da hepatite C (VHC)

Fatores precipitantes	Pacientes testados	Pacientes com o fator precipitante	Pacientes com VHC n=25	Pacientes sem VHC n=35	p-valor
Etilismo	60	43 (71,7%)	21 (84,00%)	22 (62,85%)	0,0886
Sexo Feminino	60	16 (26,7%)	4 (16,00%)	12 (34,29%)	0,1457
Estrógenos ♀	16	8 (50%)	0 (0%)	8 (66,67%)	0,0769
VHC	60	25 (41,70%)			---
VHB	60	19 (31,67%)	11 (44%)	8 (22,86%)	0,0987
HIV	59	9 (15,25%)	5 (20,83%)	4 (11,43%)	0,464
AF	60	17 (28,3%)	0 (0%)	17 (48,57%)	<0,0001
Risco para HH ¹	60	4 (6,67%)	0 (0%)	4 (11,42%)	0,1333
Mutações HFE ²	60	35 (58,3%)	13 (52%)	22 (62,85%)	0,4365
C282Y ^{3,4}	60	9 (15%)	3 (12%)	6 (17,14%)	0,7222
H63D ^{3,4}	60	28 (46,7%)	10 (40%)	18 (51,42%)	0,4386

♀: sexo feminino; VHC: vírus da hepatite C; VHB: vírus da hepatite B; HIV: vírus da imunodeficiência humana; AF: antecedentes familiares de PCT; HH: hemocromatose hereditária.

NOTA: ¹ Pacientes com manifestação fenotípica de hemocromatose (HH) ou genótipo com maior risco de HH (C282Y/C282Y e C282Y/H63D)

² Total de pacientes com pelo menos um dos alelos (C282Y ou H63D)

³ Pacientes apresentam pelo menos um alelo da mutação C282Y e H63D;

⁴ Pacientes heterozigotos compostos ingressam nos pacientes com C282Y e H63D

Ao analisar se os fatores precipitantes (VHC, HIV, etilismo e estrógeno) estavam associados à presença dos alelos, não houve associação com a presença do alelo C282Y ou H63D (**Tabela 11**). Os pacientes com *diabetes mellitus* apresentaram tendência a ter uma maior frequência do alelo H63D do que os pacientes sem diabetes (44,4% versus 23,5%; p -valor=0,0834), já para o alelo C282Y não houve essa diferença. Os pacientes com antecedentes familiares de PCT apresentaram tendência a uma maior frequência dos alelos C282Y e H63D, mas não foi estatisticamente significativa (p -valor = 0,1440 para C282Y; p -valor = 0,2514 para H63D).

Tabela 11 - Associação dos fatores precipitantes e doenças associadas com a presença do alelo C282Y e H63D

Fator precipitante / Doença associada		% com alelo C282Y	p -valor	% com alelo H63D	p -valor
VHC	Com	6,0%	0,5189	22,0%	0,4042
	Sem	10,0%		30,0%	
HIV	Com	5,5%	>0,9999	11,1%	0,1487
	Sem	8,8%		30,0%	
Etilista	Com	6,9%	0,4665	22,1%	0,1074
	Sem	11,8%		38,2%	
Estrógeno	Com	6,3%	>0,9999	43,8%	>0,9999
	Sem	6,3%		43,8%	
Diabetes	Com	5,6%	>0,9999	44,4%	0,0834
	Sem	8,8%		23,5%	
AF	Com	14,7%	0,1440	35,3%	0,2514
	Sem	5,8%		23,3%	

NOTA: VHC: vírus da hepatite C; HIV: vírus da imunodeficiência humana; AF: antecedentes familiares de PCT.

Os parâmetros bioquímicos avaliados foram o perfil de ferro (ferro sérico, ferritina e saturação de transferrina (satT)) e as enzimas hepáticas. Estes parâmetros foram distribuídos segundo o genótipo na **Tabela 12**. Analisando esta tabela observa-se que os níveis de ferro sérico e ferritina foram mais altos nos pacientes heterozigotos compostos (C282Y/H63D) em relação aos demais genótipos. A saturação de transferrina foi maior no paciente homozigoto para C282Y (satT=89%), seguido do heterozigoto composto (satT=70,61±10,76%) e homozigoto para H63D (63,14±19,32%), sugerindo que este parâmetro possa ser importante para suspeitar da associação com as mutações nos pacientes com PCT. Ainda na **Tabela 12**, não se observou diferença entre os genótipos em relação às enzimas hepáticas.

Tabela 12 - Perfil de ferro (ferro sérico, ferritina, saturação de transferrina) e enzimas hepáticas (AST, ALT e GGT) segundo o genótipo HFE do paciente (média $\pm$ desvio padrão) em 60 pacientes

Genótipo	Nº	%	Nº	Ferro sérico x LSN	Nº	Ferritina x LSN	Nº	Saturação de transferrina (%)	Nº	AST sérico x LSN	Nº	ALT sérico x LSN	Nº	GGT sérico x LSN
C282Y/TS	6	10	6	0,93 $\pm$ 0,38	6	2,25 $\pm$ 0,95	6	52,68 $\pm$ 19,41	6	2,61 $\pm$ 1,49	6	2,84 $\pm$ 1,30	6	4,55 $\pm$ 3,41
C282Y/C282Y	1	1,7	1	1,13	1	1,45	1	89	1	0,44	1	0,45	1	0,86
H63D/TS	21	35	17	1,05 $\pm$ 0,39	17	1,94 $\pm$ 1,26	16	51,48 $\pm$ 20,24	20	2,15 $\pm$ 1,24	20	2,13 $\pm$ 1,21	19	4,05 $\pm$ 3,18
H63D/H63D	5	8,3	5	1,12 $\pm$ 0,09	5	2,15 $\pm$ 1,21	5	63,14 $\pm$ 19,32	5	1,93 $\pm$ 0,98	5	1,61 $\pm$ 0,94	5	2,06 $\pm$ 0,56
C282Y/H63D	2	3,3	2	1,25 $\pm$ 0,01	2	3,17 $\pm$ 1,53	2	70,61 $\pm$ 10,76	2	1,65 $\pm$ 0,83	2	2,79 $\pm$ 1,98	2	2,29 $\pm$ 2,8
TS/TS	25	41,7	23	0,89 $\pm$ 0,25	23	2,10 $\pm$ 1,62	22	46,53 $\pm$ 13,28	25	1,93 $\pm$ 0,96	25	1,96 $\pm$ 1,12	25	3,60 $\pm$ 2,81

Nota: Nº de pacientes testados; % de pacientes; LSN, Limite superior do normal; LSN Ferro sérico: 158 μ g/dL (homem) e 145 μ g/dL (mulher); LSN Ferritina: 400 ng/dL (homem) e 150 ng/dL (mulher); Saturação de Transferrina (satT) normal: 20 a 40%.

Na **Tabela 13**, ao comparar os parâmetros bioquímicos dos pacientes com e sem VHC, observa-se que os níveis de ferro estão mais baixos nos pacientes com VHC, mas sem uma diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos. Seria esperado um aumento maior da ferritina nos pacientes com VHC; provavelmente o que está interferindo neste achado é o fato de haver no grupo sem VHC, quatro pacientes HIV positivo e quatro pacientes com mutações HFE, que são patologias que também contribuem para o aumento dos níveis de ferritina. Já as enzimas hepáticas estão mais elevadas nos pacientes com VHC associada ($p < 0,05$).

Tabela 13 - Comparação entre os parâmetros bioquímicos (perfil de ferro e enzimas hepáticas) dos pacientes com e sem o vírus da hepatite C (VHC) associada

Parâmetros	Nº	Com VHC	Nº	Sem VHC	<i>p-valor</i>
Ferro sérico x LSN	18	0,93 ± 0,33	30	1,02 ± 0,32	0,463
Ferritina x LSN	18	1,94 ± 1,33	29	2,11 ± 1,33	0,702
Saturação de Transferrina (SatT) %	17	46,28 ± 17,28	28	54,77 ± 17,71	0,058
AST sérico x LSN	20	2,57 ± 1,43	32	1,73 ± 0,82	0,034
ALT sérico x LSN	20	2,52 ± 1,46	32	1,81 ± 1,03	0,032
GGT sérico x LSN	20	4,12 ± 2,14	32	2,91 ± 2,91	0,015

NOTA: Nº de pacientes; LSN: limite superior do normal; ALT: alanina transaminase; AST: aspartato transaminase e GGT: gama-glutamil transpeptidase.

A maioria dos pacientes, 51 de 60 pacientes (85%), foi tratada somente com difosfato de cloroquina. Seis pacientes receberam flebotomia associada à cloroquina, dois realizaram somente flebotomia e um paciente, que apresentava insuficiência renal crônica foi tratado com eritropoietina e microflebotomias (retirada de 50 a 100 mL de sangue uma vez por semana). Os pacientes receberam inicialmente 250mg de cloroquina duas vezes por semana. A medicação era suspensa quando o paciente atingia a remissão bioquímica, porém frequentemente foi necessário manter uma dose baixa de cloroquina (125 ou 250 mg/semana) para manter a remissão bioquímica. Considerou-se que a remissão bioquímica foi alcançada quando as porfirinas totais na urina de 24 horas estavam abaixo de 159 µg/24hs para mulheres e de 199 µg/24hs para homens.

O tempo necessário para atingir a remissão bioquímica com a cloroquina variou de quatro a 104 meses em 34 pacientes (tempo médio de $24,8 \pm 20,1$ meses e mediana de 18,5 meses). O paciente cujo tratamento durou 104 meses não entrava em remissão bioquímica devido ao consumo de bebida alcoólica. Seis pacientes receberam flebotomia associada à cloroquina; o tempo necessário para atingir remissão bioquímica nestes pacientes variou de 17 a 39 meses (tempo médio de $29,3 \pm 9,1$ meses e mediana de 32 meses). Dos pacientes que receberam flebotomia associado à cloroquina, três apresentavam genótipo 'tipo selvagem' TS/TS e três o genótipo H63D/TS. A flebotomia não teve relação com a presença das mutações, exceto no caso de uma paciente (H63D/TS) que apresentava o diagnóstico clínico prévio de hemocromatose hereditária. Dois pacientes foram tratados exclusivamente com flebotomia, um (Nº 14) devido a problema prévio de retina e outro (Nº 38) devido à queixa de mal-estar geral quando tomava cloroquina; os dois entraram em remissão com quatro e nove meses, respectivamente. Dez pacientes estavam em tratamento e ainda não haviam alcançado a remissão bioquímica. Sete pacientes perderam seguimento.

Na evolução alguns pacientes (Nº. 5, 13, 21, 49, 50 e 54) apresentavam recidiva quando voltavam a consumir bebida alcoólica,

mesmo na vigência de cloroquina. Quatro pacientes que haviam atingido a remissão bioquímica, não a mantinham por muito tempo após a suspensão da cloroquina: dois pacientes (Nº 12 e 33) apresentavam histórico familiar de PCT, uma paciente apenas VHC (Nº 35) e um paciente VHC e HIV associados (Nº 47). Um dos pacientes (Nº 36) com HIV (sem VHC) recebeu cloroquina por um período prolongado (76 meses), porque quando entrava em remissão bioquímica e a cloroquina era suspensa ele voltava a aumentar as porfirinas urinárias (porfirinas totais = 463 / urina 24h); mantinha a remissão com 125mg 2x/sem, mas atualmente está sem cloroquina e sem recidiva desde 06/2007.

No acompanhamento dos pacientes, nenhum efeito hepatotóxico ou alteração ocular (no exame de fundo de olho), resultante do tratamento com cloroquina, foi identificado.

Na **Tabela 14** comparamos os parâmetros bioquímicos dos mesmos pacientes (dados pareados) antes e depois do tratamento e que receberam somente cloroquina. Nesta tabela observamos: 1. Os níveis de ferro (ferro sérico, ferritina e saturação de transferrina) diminuíram de forma significativa com o tratamento ($p < 0,05$) e 2. As enzimas hepáticas (AST, ALT) diminuem para níveis normais na maioria dos pacientes e a GGT diminui significativamente ($p < 0,0001$), mas está ainda um pouco aumentado em relação ao LSN (média: LSN = $2,28 \pm 4,75$).

Tabela 14 - Comparação dos parâmetros bioquímicos de todos os pacientes que receberam somente cloroquina (antes e depois do tratamento)

	Nº	Antes do tratamento	Após o tratamento	<i>p-valor</i>
Ferro sérico x LSN	33	$0,97 \pm 0,31$	$0,87 \pm 0,29$	0,007289
Ferritina x LSN	32	$2,04 \pm 1,43$	$1,43 \pm 1,26$	0,000666
Saturação de Transferrina (SatT) %	31	$52,75 \pm 19,16$	$47,14 \pm 17,42$	0,0084
AST sérico x LSN	36	$1,94 \pm 0,90$	$0,94 \pm 0,43$	<0,0001
ALT sérico x LSN	36	$2,03 \pm 1,17$	$0,87 \pm 0,73$	<0,0001
GGT sérico x LSN	35	$3,13 \pm 2,79$	$2,28 \pm 4,75$	<0,0001

NOTA: Nº de pacientes; LSN: limite superior do normal; ALT: alanina transaminase; AST: aspartato transaminase e GGT: gama-glutamil transpeptidase.

A **Tabela 15** exibe os parâmetros bioquímicos, antes e após o tratamento, relacionando-os com a presença ou não do VHC. Levou-se em consideração apenas os pacientes com dados pareados, ou seja, com os parâmetros antes e depois do tratamento com cloroquina. Depois do tratamento, os pacientes com VHC não apresentaram diminuição da ferritina e a diminuição dos níveis de ferro sérico e da saturação de transferrina não foi estatisticamente significativa. Já no grupo sem VHC houve uma diminuição significativa do ferro sérico, saturação de transferrina e da ferritina ($p < 0,05$). Quanto às enzimas hepáticas (AST e ALT), inicialmente estavam mais elevadas nos pacientes com VHC, mas após o tratamento diminuíram significativamente ($p < 0,05$) nos dois grupos (com e sem VHC). A GGT diminuiu significativamente no grupo sem VHC ($p = 0,001$), mas não no grupo com VHC ($p = 0,074$).

Tabela 15 - Parâmetros bioquímicos, antes e depois do tratamento com cloroquina, relacionando-os com a presença ou não do vírus da hepatite C (VHC)

Parâmetros	Nº	Antes do tratamento	Depois do tratamento	p-valor
COM VHC				
Ferro sérico x LSN	10	$0,93 \pm 0,37$	$0,85 \pm 0,38$	0,285
Ferritina x LSN	9	$1,72 \pm 1,36$	$1,76 \pm 1,77$	0,678
SatT %	10	$48,18 \pm 21,70$	$44,04 \pm 20,50$	0,114
AST sérico x LSN	11	$2,43 \pm 1,06$	$1,22 \pm 0,55$	0,003
ALT sérico x LSN	11	$2,54 \pm 1,40$	$1,29 \pm 0,92$	0,003
GGT sérico x LSN	10	$3,46 \pm 1,96$	$2,71 \pm 2,60$	0,074
SEM VHC				
Ferro sérico x LSN	23	$0,98 \pm 0,29$	$0,88 \pm 0,25$	0,022
Ferritina x LSN	23	$2,17 \pm 1,47$	$1,30 \pm 1,01$	$<0,001$
SatT %	21	$54,92 \pm 17,98$	$48,62 \pm 16,10$	0,027
AST sérico x LSN	25	$1,73 \pm 0,75$	$0,82 \pm 0,30$	$<0,001$
ALT sérico x LSN	25	$1,80 \pm 1,01$	$0,68 \pm 0,56$	$<0,001$
GGT sérico x LSN	24	$3,00 \pm 3,08$	$2,11 \pm 5,42$	0,001

NOTA: Nº de pacientes; LSN: limite superior do normal; SatT%: saturação de transferrina; ALT: alanina transaminase; AST: aspartato transaminase e GGT: gama-glutamil transpeptidase.

Na **Tabela 16** estão descritos os parâmetros bioquímicos (antes e depois do tratamento com cloroquina) de acordo com o genótipo do paciente. Verifica-se que no geral houve uma diminuição nos níveis de ferro sérico para níveis normais, mas sem significância estatística devido ao pequeno número de casos. Observa-se que o genótipo H63D/TS e TS/TS apresentam valores iniciais do ferro sérico mais baixo e este tende a normalizar após o tratamento. Em relação aos níveis de ferritina, os genótipos que apresentaram uma diferença estatística maior antes e depois do tratamento foram os genótipos H63D/TS e TS/TS. Apesar dos genótipos C282Y/C282Y e C282Y/H63D não mostrarem uma diferença estatística, devido ao pequeno número de casos, eles apresentaram a normalização dos níveis de ferritina. O paciente C282Y/C282Y não apresentou diminuição da saturação de transferrina, mas a ferritina e o ferro sérico deste paciente normalizaram após o tratamento. Os pacientes heterozigotos compostos (C282Y/H63D) e C282Y/TS também mantiveram a saturação de transferrina aumentada após o tratamento. No caso das enzimas hepáticas (AST e ALT), houve no geral uma diminuição ou normalização das enzimas hepáticas, mas estatisticamente significativa ($p < 0,05$) apenas para os genótipos H63D/TS e TS/TS. Quanto ao GGT houve uma diminuição na maioria, mas estatisticamente significativa apenas para o genótipo TS/TS. No genótipo H63D/TS houve aumento, isto se deve ao paciente N° 46, que teve aumento do GGT de 10 para 27 x LSN.

Tabela 16 - Parâmetros bioquímicos (média $\pm$ desvio padrão) dos mesmos pacientes, antes e depois do tratamento com cloroquina de acordo com o genótipo

Genótipo	Nº	Antes do tratamento	Depois do tratamento	<i>p</i> -valor
Ferro sérico x LSN				
C282Y / TS	3	1,07 $\pm$ 0,36	1,02 $\pm$ 0,35	0,285
C282Y / C282Y	1	1,13	0,96	---
H63D / TS	11	0,97 $\pm$ 0,35	0,92 $\pm$ 0,29	0,504
H63D / H63D	3	1,11 $\pm$ 0,11	0,71 $\pm$ 0,18	0,109
C282Y/H63D	2	1,25 $\pm$ 0,01	0,95 $\pm$ 0,16	0,180
TS/TS	13	0,86 $\pm$ 0,31	0,81 $\pm$ 0,33	0,367
Ferritina x LSN				
C282Y / TS	3	1,84 $\pm$ 1,0	1,16 $\pm$ 0,23	0,109
C282Y / C282Y	1	1,45	0,87	---
H63D / TS	10	1,96 $\pm$ 1,30	1,48 $\pm$ 1,65	0,093
H63D / H63D	3	1,86 $\pm$ 1,20	1,36 $\pm$ 1,29	0,285
C282Y/H63D	2	3,17 $\pm$ 1,53	0,90 $\pm$ 0,03	0,180
TS/TS	13	2,06 $\pm$ 1,78	1,59 $\pm$ 1,28	0,055
Saturação de Transferrina (%)				
C282Y / TS	2	68,20 $\pm$ 25,98	67,75 $\pm$ 15,79	0,655
C282Y / C282Y	1	89	76,77	---
H63D / TS	10	52,07 $\pm$ 20,47	48,71 $\pm$ 17,71	0,203
H63D / H63D	3	54,19 $\pm$ 3,78	34,10 $\pm$ 2,85	0,109
C282Y/H63D	2	70,61 $\pm$ 10,76	57,74 $\pm$ 18,45	0,180
TS/TS	13	45,02 $\pm$ 16,34	41,87 $\pm$ 15,36	0,221
AST sérico x LSN				
C282Y / TS	3	2,48 $\pm$ 0,86	0,93 $\pm$ 0,17	0,109
C282Y / C282Y	1	0,44	---	---
H63D / TS	12	2,14 $\pm$ 1,06	1,15 $\pm$ 0,55	0,002
H63D / H63D	3	1,65 $\pm$ 0,48	0,71 $\pm$ 0,06	0,109
C282Y/H63D	2	1,65 $\pm$ 0,83	0,55 $\pm$ 0,14	0,180
TS/TS	16	1,79 $\pm$ 0,86	0,89 $\pm$ 0,37	0,001
ALT sérico x LSN				
C282Y / TS	3	3,30 $\pm$ 1,23	0,73 $\pm$ 0,14	0,109
C282Y / C282Y	1	0,45	---	---
H63D / TS	12	1,97 $\pm$ 1,10	1,18 $\pm$ 1,03	0,003
H63D / H63D	3	1,28 $\pm$ 0,34	0,58 $\pm$ 0,15	0,109
C282Y/H63D	2	2,79 $\pm$ 1,98	0,52 $\pm$ 0,32	0,180
TS/TS	16	1,88 $\pm$ 1,14	0,75 $\pm$ 0,58	<0,001
GGT sérico x LSN				
C282Y / TS	3	4,51 $\pm$ 4,29	1,49 $\pm$ 0,72	0,109
C282Y / C282Y	1	0,86	---	---
H63D / TS	13	3,33 $\pm$ 2,91	4,16 $\pm$ 7,82	0,308
H63D / H63D	3	1,79 $\pm$ 0,56	0,85 $\pm$ 0,57	0,285
C282Y/H63D	2	2,29 $\pm$ 2,28	0,89 $\pm$ 0,73	0,180
TS/TS	14	3,07 $\pm$ 2,87	1,40 $\pm$ 1,36	0,001

NOTA: Nº de pacientes testados; % de pacientes; LSN, Limite superior do Normal. Ferro sérico: LSN para homens 158 μ g/dL e LSN para mulheres 145 μ g/dL. Ferritina LSN para mulheres 150 ng/dL; Ferritina LSN para homens 400 ng/dL. Saturação de Transferrina normal = 20 a 40%.

6 DISCUSSÃO

Neste estudo a PCT predominou nos homens (73,3%) e não houve diferença na idade em que se iniciou a doença nos homens e nas mulheres (média da idade foi $44,68 \pm 11,29$ anos e mediana 44 anos). A mistura de etnias foi predominante na maioria dos pacientes (72%). Quanto aos fatores precipitantes, 68,3% apresentavam dois ou mais fatores precipitantes coexistentes. O etilismo crônico foi relatado por 71,7% dos pacientes, a grande maioria por homens (41 de 43 pacientes). Esta proporção pode ser maior se levarmos em conta que os pacientes que referiam etilismo social (16,7%) estavam negando sua condição de etilista crônico. O etilismo há muito tempo é reconhecido como um importante fator precipitante de PCT²⁸³; ele age em sinergismo com outros fatores em indivíduos predispostos⁵⁸. Alguns autores acreditam que o etilismo crônico talvez esteja associado à herança de mutações da hemocromatose, como a mutação C282Y, que predomina em países onde o álcool é o fator precipitante mais comum de PCT²⁴⁷. Todavia no nosso estudo não houve associação do etilismo com a presença de nenhum dos alelos, inclusive a proporção de pacientes com o alelo C282Y e o alelo H63D é maior entre os não-etilistas, mas esta diferença não teve significância estatística.

O anti-VHC estava positivo em 41,7% dos pacientes e a maioria destes (21 de 25 pacientes) apresentavam etilismo associado. O papel patogênico do VHC no desencadeamento da PCT é relatado desde 1992⁶¹ e uma prevalência elevada de infecção pelo VHC em casos de PCT já foi confirmada por vários estudos de diversos países⁶⁶. A prevalência de anticorpos anti-VHC varia de 8 a 91% na literatura e está relacionada à endemicidade na população^{1,57}. Uma meta-análise de 50 estudos feita por Gisbert *et al.*⁶⁶ encontrou uma prevalência média calculada do VHC de 47% entre 2.167 pacientes com PCT. A maioria dos pacientes com o VHC foi exposta ao vírus antes da expressão clínica e diagnóstico de PCT⁸⁹⁻⁹¹, entretanto a maioria dos nossos pacientes com VHC (15 de 25 pacientes),

ou seja, 60% teve o diagnóstico da infecção após o surgimento da PCT, sugerindo que esta pode ser a primeira manifestação da infecção pelo VHC, daí a necessidade de investigar VHC em todos os pacientes com PCT, como já foi relatado na literatura ³³. O antecedente de etilismo na maioria dos pacientes já os coloca em risco de desenvolver PCT, independentemente da presença ou não de VHC. A maioria dos pacientes apresenta mais de um fator de risco para o desenvolvimento da PCT, frequentemente VHC e álcool, principalmente em homens ³³. Sugere-se que o aumento da prevalência do VHC pode estar relacionado ao aumento do consumo de álcool, devido ao fato da positividade para anti-VHC ter sido relatada em até 25% dos pacientes etilistas crônicos ⁹². No entanto, nosso estudo, assim como outros ⁹⁰, não demonstrou associação do VHC com etilismo. Não observamos associação significativa do VHC com ingestão de estrógenos, VHB, HIV, sexo feminino ou com a presença de pelo menos um dos alelos para mutações HFE. Nenhum dos pacientes com antecedentes familiares de PCT apresentava VHC. A maioria dos indivíduos com hepatite C não desenvolve PCT; evidentemente certos indivíduos estão predispostos a desenvolver a deficiência da UROD ^{66,89,97}. Entre os nove pacientes dos quais obtivemos o genótipo do VHC, predominou o subtipo 1b (quatro casos), seguido pelo 3a (três casos) e 1a (dois casos). Há estudos que não encontraram associação do genótipo do VHC com a PCT ³⁷, mas outros sugerem que o subtipo 1b estaria mais relacionado à PCT ^{90,102}.

Na literatura foi descrito um pequeno aumento da prevalência de hepatite B nos pacientes com PCT, mas não há muitos estudos comprovando essa associação. Navas *et al.* ⁶², detectaram anticorpos contra VHB em 91% dos pacientes, mas em apenas 41% dos pacientes o genoma viral do VHB foi detectado. Nossos pacientes apresentavam sorologia positiva para hepatite B, ou seja, anti-HBc e anti-HBs positivos em 32,2% dos casos, mas todos com o antígeno (AgHBs) negativo. A prevalência está um pouco aumentada nos pacientes com PCT, se considerarmos a estimativa do Ministério da Saúde de que no Brasil, pelo menos 15% da população já esteve em contato com o vírus da hepatite B e um estudo de

soroprevalência da hepatite B realizado em quatro capitais brasileiras mostrou uma taxa geral de 7,9% de anti-HBc positivo e 1% da população apresentava doença crônica relacionada a este vírus ²⁸⁴.

A associação do vírus da imunodeficiência humana (HIV) ocorreu em 15,3% dos pacientes (9 de 59). O diagnóstico de HIV foi prévio ao de PCT em seis casos e foi concomitante em três casos; daí o fato de se recomendar sempre a sorologia para HIV nos pacientes com PCT. Todos os nossos pacientes apresentavam etilismo associado e cinco também apresentavam anti-VHC positivo. Na literatura, geralmente outros fatores precipitantes também estão associados ao HIV, como etilismo, hepatite B e hepatite C ¹²¹. Não se pode concluir que o HIV isoladamente contribua para o desenvolvimento da PCT.

O aumento da incidência nas mulheres foi atribuído à ingestão de estrógenos e ao aumento do consumo de álcool pelas mulheres nas últimas décadas ⁵. Entre as 16 mulheres os contraceptivos orais tiveram um papel importante em 50% (oito de 16 pacientes) e se observou consumo de álcool em duas pacientes. Vários estudos demonstram que o uso de estrógenos, como contraceptivos ou para reposição hormonal pós-menopausa, pode desencadear a PCT ²⁸⁵ e que geralmente é o único fator precipitante em mais de 25% das mulheres com PCT ⁵⁷. Semelhante à literatura, 25% das pacientes (quatro de 16) do sexo feminino apresentavam o estrógeno como o único fator precipitante. As outras quatro pacientes apresentavam também história familiar de PCT, sendo que uma delas ainda era heterozigota composta para as mutações HFE (C282Y/H63D). A associação com histórico familiar de PCT reforça a ideia de que o estrógeno atuaria inibindo a UROD que já se encontra geneticamente diminuída ³⁹.

No nosso estudo não verificamos se o paciente apresentava deficiência da UROD eritrocitária ou as mutações para UROD, ou seja, não foi possível diferenciar a PCT familiar (tipo II) da forma esporádica (tipo I). Encontramos um histórico familiar de PCT em 28,3% dos pacientes. Esta frequência é semelhante àquela encontrada em outros estudos ^{6,57}. A

frequência de PCT familiar varia de 20 a 29% em diferentes populações da América do Norte e Europa ^{6,57}, mas um estudo no Chile encontrou uma frequência de 50% de PCT familiar ²⁴⁰. Entretanto a melhor forma de identificar estes casos é através do estudo das mutações da UROD, pois há casos que podem apresentar a atividade de UROD dentro dos limites normais e exibir mutação na UROD. Há ainda os casos de PCT tipo III que apresentam história familiar, mas sem alteração na atividade da UROD eritrocitária. Nossos pacientes com história familiar podem ter a PCT tipo II ou III. Bulaj *et al.* ⁵⁷ relatam que a deficiência hereditária da UROD não alterava as características clínicas e demográficas da PCT, ou seja, os mesmos fatores precipitantes (excesso de ferro, álcool, VHC e estrógenos) contribuía para a expressão clínica de ambos os tipos de PCT (familiar ou esporádico), portanto é improvável que isto tenha afetado os nossos resultados.

Nosso principal objetivo foi avaliar a frequência das mutações C282Y e H63D no gene HFE dos pacientes brasileiros com PCT. A PCT é uma doença ferro-dependente onde a sobrecarga de ferro está presente em 60 a 70% dos pacientes ^{41,246}. A saturação de transferrina e a ferritina estão aumentadas na PCT de forma semelhante nos pacientes com ou sem as mutações HFE ¹⁰⁸. Como o perfil de ferro está sempre alterado nos pacientes com PCT, mesmo naqueles sem a hemocromatose hereditária, a pesquisa das mutações HFE é importante ⁵⁷.

Há estudos que relatam a frequência dos alelos C282Y e H63D na população brasileira normal. A prevalência da mutação C282Y entre indivíduos saudáveis brasileiros (frequência de portadores do alelo C282Y: 0,29 a 4,30%) é menor do que o observado entre os europeus, o que pode ser explicado pelas diferentes composições étnicas da população. ^{163,200,201,280,286,287} A mutação H63D tem uma prevalência alta entre brasileiros saudáveis (frequência de portadores do alelo H63D: 9,54 a 33,6%); semelhante à observada entre os brancos europeus, particularmente entre os italianos e espanhóis ^{163,200,201,280,286-288}. Um estudo com 278 indivíduos no grupo controle relata uma prevalência dos portadores dos alelos C282Y e

H63D de 4% e 31,1%, respectivamente e a prevalência foi semelhante em 135 pacientes com hepatite C (4,4% para C282Y e 23,7% para H63D) ²⁸⁶. Outro estudo com 227 pessoas da população normal, feito por Agostinho *et al.* ¹⁶³, encontrou uma prevalência total de portadores para o alelo C282Y e H63D de 3,6% e 33,6%, respectivamente. Sendo que a frequência para as mutações foi maior entre os caucasianos (1,4% para C282Y e 16,3% para H63D) ¹⁶³. Nos afrobrasileiros e no grupo com mistura de etnias a frequência para C282Y foi igual (1,1%). Já a frequência de H63D foi mais baixa nos afrobrasileiros (7,5%) e intermediária no grupo com mistura de etnias (9,8%) ¹⁶³. Nosso estudo utilizou como referência para a população controle o estudo de Pereira *et al.* ²⁸⁰, realizado também neste hospital (HCFMUSP) com 395 doadores de sangue em 2001. Eles encontraram uma frequência variável dos alelos C282Y e H63D entre os diferentes grupos étnicos no Brasil (eurobrasileiros, afrodescendentes e com mistura de etnias). A frequência das mutações HFE foi maior entre os eurobrasileiros (3,7% para C282Y; 20,3% para H63D). A frequência nos afrobrasileiros foi a mais baixa (0,5% para C282Y; 6,4% para H63D) e no grupo com mistura de etnias a frequência foi intermediária (0,7% para C282Y; 13% para H63D). Quanto à frequência total dos alelos nesta população controle, encontramos $14/790 = 1,77\%$ IC[95%]=[0,97%;2,96%] para C282Y e $111/790 = 14,05\%$ IC[95%]=[11,7%;16,67%] para H63D. Esta distribuição da frequência dos alelos para HFE dá suporte à origem europeia das mutações. A prevalência de C282Y é mais baixa no Brasil em relação ao norte da Europa, já a prevalência da H63D é semelhante ²⁸⁰.

Leone *et al.* ¹⁶³ no Equador não encontraram nenhum caso com a mutação C282Y, semelhante ao que foi publicado entre os índios brasileiros e nas populações asiáticas ²⁸⁹, confirmando a baixa prevalência da mutação C282Y nas populações não anglo-célticas, mas encontraram uma frequência maior da mutação S65C do que as relatadas nas populações caucasianas ²⁹⁰. Em Portugal, um estudo feito por Cardoso *et al.* ²⁹¹ com uma amostra estratificada randomizada com 640 indivíduos da população normal, demonstrou a existência de diferenças regionais significativas na frequência

da mutação C282Y entre o norte e sul do país, já a mutação H63D mostrou uma frequência homogênea em todo o país. A frequência alélica da mutação C282Y observada no norte (0.058) foi semelhante à frequência alélica relatada em países do norte da Europa, em contraste com a frequência no sul (0,009), que foi semelhante ao relatado na Itália. A frequência alélica da mutação H63D observada neste estudo ($0,15 \pm 0,20$) está entre as mais altas relatadas na Europa, contudo frequências semelhantes já foram observadas na Espanha²⁸⁸, sendo a maior frequência relatada nos bascos (0.30), que habitam o norte da Espanha e sudoeste da França. Os resultados encontrados nos doadores de sangue em São Paulo são muito próximos aos encontrados na população italiana^{292,293} e portuguesa²⁹¹, o que pode ser devido à imigração observada no estado de São Paulo²⁰⁰.

A população brasileira apresenta uma grande miscigenação étnica e a prevalência da HH na população é desconhecida. No Brasil, Bittencourt *et al.*²⁹⁴ analisaram o gene HFE em 15 pacientes com HH e encontraram 53% homozigotos para C282Y, 7% heterozigotos para C282Y, 7% heterozigotos para H63D e 33% sem mutação. Nenhum heterozigoto composto C282Y/H63D foi identificado. Posteriormente, Bittencourt *et al.*²⁹⁵ estudaram 19 pacientes com HH e, novamente, apenas 53% apresentava mutações HFE (nove homozigotos para C282Y e um heterozigoto composto para C282Y e H63D) e não encontraram outras mutações nos genes HFE, RTf2 ou SCL40A1 nos pacientes estudados. Portanto, um terço dos pacientes brasileiros com o fenótipo clássico de HH não apresenta as mutações HFE ou outras mutações que atualmente são associadas à doença em caucasianos, sugerindo que haja outras mutações desconhecidas nos genes descritos ou em outros genes envolvidos na homeostase de ferro²⁹⁵. Cançado *et al.*²⁰³, também encontraram resultados semelhantes. Ferreira *et al.*²⁰⁶ estudaram 1955 pacientes brasileiros com suspeita clínica de HH e as frequências dos alelos mutantes C282Y e H63D foram de 0,079 e 0,196, respectivamente. Este trabalho teve importância na determinação do perfil genético da população acometida pela HH no Brasil. Bueno *et al.*²⁰⁰ estudaram os genótipos de 8 pacientes com HH e 148 indivíduos normais

doadores de sangue. A frequência dos genótipos nos doadores foi: 2,7% para C282Y/TS; 18,3% para H63D/TS; 1,3% para H63D/H63D; 0,7% para H63D/S65C e 1,3% para S65C/TS. A mutação C282Y foi encontrada apenas em caucasianos e a H63D foi observada em caucasianos e afrodescendentes. Cinco dos oito pacientes com HH (62,5%) apresentaram alterações no gene HFE: três (37,5%) foram homozigotos para a mutação C282Y (C282Y/C282Y), um (12,5%) heterozigoto composto (C282Y/H63D) e um (12,5%) heterozigoto para a mutação C282Y (C282Y/TS). Três pacientes não apresentavam mutações HFE. Estes achados também condizem com os relatos da Itália, onde aproximadamente um terço dos pacientes com HH não apresenta mutações para C282Y ou H63D ^{292,293}. Outro estudo não encontrou a mutação C282Y em cinco afro-americanos com HH, sendo que apenas um era heterozigoto para H63D ²⁹⁶. Isto corrobora com a afirmação de que os pacientes afro-americanos têm uma frequência das mutações HFE significativamente inferior em relação aos caucasianos; a HH provavelmente se deve a uma mutação em outro gene não-HFE ou a uma mutação ainda não identificada no gene HFE ²⁹⁶. A diferença dos genótipos encontrados no Brasil pode ser explicada pela miscigenação étnica brasileira, com migração predominante do sul da Europa e uma alta influência dos afrodescendentes e ameríndios, cujas populações apresentam baixa frequência destas mutações ²⁰⁰. Como outros estudos brasileiros não encontraram a mutação S65C entre os pacientes com sobrecarga de ferro ^{202,203} e a prevalência desta mutação é baixa na população saudável ^{200,201} não achamos relevante a pesquisa destas mutações nos pacientes do nosso estudo.

Ellervik *et al.* ²⁹⁷ conduziram uma metanálise da associação das mutações da HH com várias doenças; esta análise foi composta de 202 estudos, dos quais 60 estudavam a associação com a PCT. A associação de todos os genótipos da HH com a PCT mostrou uma relação dose-resposta, a C282Y/C282Y apresentava um risco maior (*odds ratio* = 48; IC 24-95) e a H63D/TS um risco menor (*odds ratio* = 1,7; IC 1,0-3,1) de desenvolver PCT. Como já foi dito, há relatos na literatura que descrevem aumento da

frequência das mutações no gene HFE dos pacientes com PCT (**Quadro 1**). Entretanto, somente um estudo brasileiro ²³⁸ pesquisou a associação das mutações da hemocromatose (C282Y e H63D) na PCT. No total de 23 pacientes com PCT encontraram quatro pacientes com a mutação C282Y (17,4%) e sete pacientes com a mutação H63D (30,4%). A maioria era heterozigota para a mutação, havia apenas um homozigoto para H63D, um heterozigoto composto (C282Y/H63D) e nenhum homozigoto para C282Y. No grupo controle com 278 indivíduos observaram a mutação C282Y em 4% e a mutação H63D em 31,1%. Comparando os dois grupos observaram uma diferença estatística entre os dois grupos para a mutação C282Y (OR=5,1, 95% IC 1,5-17,6, $p = 0,02$), mas não para a mutação H63D (OR=1, 95% IC 0,4-2,4, $p = 1$) ²³⁸. No nosso estudo, a frequência das duas mutações foi significativamente mais elevada nos pacientes com PCT em relação à população controle: C282Y = (8,3% versus 1,77%, *odds ratio* 5,02, IC [95%] = [4,1%; 14,8%], $p=0,0001$) e H63D (27,5% versus 14,05, *odds ratio* 2,32, IC [95%] = [19,7%; 36,4%], $p=0,0004$). O genótipo TS/TS, ou seja, a ausência da mutação foi o mais frequente, com 41,7%. Entre os pacientes com a mutação, o genótipo H63D/TS foi o mais frequente com 35%, seguido pelo C282Y/TS com 10%. Cinco pacientes (8,3%) eram homozigotos para H63D, dois pacientes eram heterozigotos compostos (3,3%) e um paciente era homozigoto para C282Y (1,7%). Podemos concluir que as mutações HFE aumentam a susceptibilidade do indivíduo desenvolver PCT; o acúmulo de ferro precipitaria a manifestação da PCT nos indivíduos que já são predispostos. No nosso estudo não foi observada a associação dos fatores precipitantes (VHC, HIV, etilismo e estrogênio) com a presença dos alelos C282Y e H63D. Os pacientes com antecedentes familiares de PCT apresentaram tendência a uma maior frequência dos alelos C282Y e H63D, mas não foi estatisticamente significativa (p -valor = 0,1440 para C282Y; p -valor = 0,2514 para H63D). Podemos afirmar que é possível que a herança dos alelos da hemocromatose possa contribuir em parte com a PCT familiar ou tipo III. O alelo H63D estava aumentado entre os pacientes com *diabetes mellitus* ($p=0,0834$), mas para o alelo C282Y não houve essa diferença. Este

achado pode ser devido ao fato da mutação H63D apresentar uma prevalência alta entre a população normal no Brasil, mas contribui com a ideia de que a associação de *diabetes mellitus* com PCT seria decorrente da associação com as mutações da HH como afirmam alguns autores ¹⁵⁰.

A HH apresenta poucos sinais ou sintomas específicos que alertam o médico ²⁹⁸. Os sintomas são inespecíficos (p.ex. artralgia, fraqueza e fadiga) e não ajudam a suspeitar da HH ²⁹⁹. Os sintomas geralmente se desenvolvem no paciente depois dos 40 anos, no momento em que deposição de ferro nos órgãos pode ter causado danos irreversíveis nos tecidos, como cirrose, carcinoma hepatocelular, artrite, hipogonadismo, *diabetes mellitus* e cardiomiopatia ³⁰⁰. Uma paciente com diagnóstico clínico prévio de HH apresentava somente este fator precipitante para PCT, apesar de heterozigota para H63D. Provavelmente outras mutações desconhecidas, relacionadas com a hemocromatose, podem contribuir para o desencadeamento da PCT, pois um terço dos pacientes ^{203,295} com hemocromatose no Brasil não apresentam as mutações HFE. O paciente homozigoto para C282Y se beneficiou deste trabalho, pois o diagnóstico de HH só foi possível devido ao estudo das mutações. Ele manifestava sintomas inespecíficos como fadiga e queixa de impotência, mas não apresentava *diabetes mellitus*. A irmã dele era heterozigota composta; estes dois pacientes não apresentavam nenhum outro fator precipitante exceto as mutações para HFE e história familiar. Estes três pacientes indicam que as mutações HFE ou a manifestação clínica de HH podem contribuir isoladamente para o desencadeamento da PCT, independentemente da presença de outros fatores precipitantes. Com a descoberta do gene HFE, foi possível identificar o risco 'potencial' de desenvolver sobrecarga de ferro, mas nem todos os homozigotos desenvolverão sobrecarga de ferro ou HH e não é possível prever o grau de expressão fenotípica. A expressão fenotípica da HH é maior nos pacientes homozigotos para C282Y e heterozigotos composto. Estima-se que 40,0% a 70,0% dos indivíduos homozigotos para C282Y desenvolverão alguma evidência laboratorial de sobrecarga de ferro sem complicações clínicas e que, pelo menos, 50,0%

dos homens e 25,0% das mulheres com este genótipo desenvolverão complicações clínicas secundárias à sobrecarga de ferro ²⁰³. Um a 11% dos heterozigotos compostos manifestarão a HH clinicamente ²⁰⁶. Nos casos H63D/H63D, 80% são clinicamente normais e 20% desenvolve sobrecarga de ferro, que é quase duas vezes a percentagem encontrada nos indivíduos com HFE TS/TS ¹⁷⁷. A mutação H63D está associada a aumento dos depósitos de ferro e também a uma forma mais branda da HH, revelando uma penetrância incompleta ¹⁸².

No nosso estudo observou-se que os níveis de ferro sérico e ferritina foram mais altos nos pacientes heterozigotos compostos (C282Y/H63D) em relação aos demais genótipos. A saturação de transferrina foi maior no paciente homozigoto para C282Y (satT=89%), seguido do heterozigoto composto (satT=70,61±10,76%) e o homozigoto para H63D (63,14±19,32%), sugerindo que este parâmetro possa ser importante para suspeitar da associação com as mutações nos pacientes com PCT. Quanto às enzimas hepáticas não houve diferença entre os genótipos.

A maioria dos nossos pacientes (85%) foi tratada com cloroquina. O tempo médio necessário para atingir a remissão bioquímica com a cloroquina foi de 24,8 ± 20,1 meses (mediana de 18,5 meses). Alguns pacientes não evoluíram para remissão bioquímica devido à persistência do consumo de bebida alcoólica. No paciente com insuficiência renal crônica a cloroquina é totalmente contraindicada; este foi tratado com eritropoietina e microflebotomias (retirada de 50 a 100 mL de sangue uma vez por semana).

Ao compararmos o perfil de ferro (ferro sérico, ferritina e saturação de transferrina) e as enzimas hepáticas (AST, ALT, GGT) de todos os pacientes que receberam cloroquina, observamos que ambos diminuíram de forma significativa com o tratamento ($p < 0,05$).

Alguns autores sugerem que no paciente com PCT e heterozigoto para uma mutação do gene HFE, a flebotomia deve ser o tratamento de primeira escolha, pois é mais efetiva para diminuir os níveis de ferro do que a cloroquina ²³⁵. Outros autores afirmam que a flebotomia melhora a

evolução clínica da hepatite C ⁵⁷. Ao associar os parâmetros bioquímicos com a presença ou não do VHC (antes e depois do tratamento com cloroquina), os níveis de ferro antes do tratamento eram mais baixos nos pacientes com VHC. Seria esperado o contrário, ou seja, um maior aumento pelo menos da ferritina no grupo com VHC; provavelmente o que está interferindo neste achado é o fato de haver no grupo sem VHC, quatro pacientes HIV positivo e quatro pacientes com mutações para HH, patologias estas que também contribuem para o aumento dos níveis de ferritina. Depois do tratamento, os pacientes com VHC não apresentaram diminuição da ferritina e a diminuição dos níveis de ferro sérico e da saturação de transferrina não foi estatisticamente significativa, mas no grupo sem VHC houve uma diminuição significativa do ferro sérico, saturação de transferrina e da ferritina ($p < 0,05$). Isto nos leva a deduzir, que a cloroquina é mais efetiva na diminuição dos níveis de ferro no grupo sem VHC. Quanto às enzimas hepáticas (AST e ALT), inicialmente estavam mais elevadas nos pacientes com VHC, mas após o tratamento diminuíram significativamente ($p < 0,05$) nos dois grupos (com e sem VHC). A GGT diminuiu significativamente no grupo sem VHC ($p = 0,001$), mas não no grupo com VHC ($p = 0,074$). Podemos concluir que a cloroquina age igualmente nos dois grupos diminuindo as enzimas hepáticas.

Ao observar como o perfil de ferro e as enzimas hepáticas se comportaram em relação ao genótipo verificamos que no geral houve uma diminuição nos parâmetros de ferro, mas sem significância estatística devido ao pequeno número de casos para alguns genótipos, ou seja, não podemos afirmar se essa diferença não foi somente ao acaso. Os genótipos TS/TS e H63D/TS apresentavam o ferro sérico antes do tratamento mais baixo em relação aos demais genótipos, e este tende a normalizar depois do tratamento. Os genótipos TS/TS e H63D/TS também apresentaram uma diferença estatística maior antes e depois de tratamento em relação à ferritina. Os pacientes C282Y/C282Y, C282Y/H63D e C282Y/TS não apresentaram diminuição da saturação de transferrina. Os dois pacientes (C282Y/H63D) e um paciente C282Y/C282Y normalizaram o ferro sérico e a

ferritina após o tratamento. As enzimas hepáticas (TGO e TGP) normalizaram ou diminuíram significativamente para todos os genótipos, mas foi uma diminuição estatisticamente significativa apenas para os genótipos H63D/TS e TS/TS.

Se a flebotomia remover o excesso de ferro antes do desenvolvimento de cirrose ou diabetes, os pacientes com HH têm uma sobrevida normal em comparação aos controles sem sobrecarga de ferro; pacientes com cirrose devido a HH têm uma sobrevida mais curta e um alto risco de carcinoma hepatocelular mesmo depois da depleção do ferro ¹⁸⁵. No entanto, o tratamento com cloroquina também reduz os níveis de ferro sérico ^{258,265} e é um tratamento menos invasivo, efetivo, seguro, de baixo custo e que consome menos tempo que a flebotomia ²⁵⁶. O tratamento com cloroquina pode ter outros benefícios. Como vários relatos demonstram que a sobrecarga de ferro predispõe a uma série de infecções, principalmente quando o ferro afeta o sistema reticuloendotelial (SRE), a cloroquina pode desempenhar um papel na prevenção destas infecções, limitando a disponibilidade do ferro ao microrganismo ²⁶⁵. A cloroquina inibe a multiplicação intracelular da *Legionella pneumophila* ³⁰¹ e do *Histoplasma capsulatum* ³⁰², inibe o crescimento do *Mycobacterium tuberculosis* em monócitos humanos ³⁰³, aumenta a resistência ao *Cryptococcus neoformans in vivo* ³⁰⁴ (este efeito não parece ser mediado pela restrição de ferro ³⁰⁵) e, finalmente, inibe o HIV-1 *in vitro* e *in vivo*, através da inibição das modificações postranscricionais do vírus ³⁰⁶⁻³⁰⁸. Além disso, já foi demonstrado que o acúmulo de ferro das células aumenta a transcrição do HIV-1 ³⁰⁹. Como ocorre a associação da PCT com a infecção pelo HIV podemos ter benefícios adicionais com o uso da cloroquina, tais como: sua atividade antirretroviral, seu efeito inibidor sobre vários patógenos oportunistas, a inibição da síntese de várias citocinas pro-inflamatórias (que podem desempenhar um papel patogênico na progressão da infecção pelo HIV) e a restrição do acúmulo de ferro tissular (que desempenha um papel negativo na infecção pelo HIV) ³¹⁰. Outros mecanismos de ação da cloroquina que podem favorecer seu uso na hepatite C associada à PCT

são: 1. A cloroquina aumenta os linfócitos T CD8+ durante a vacinação para o VHB. Na presença de cloroquina há uma melhora na apresentação dos antígenos virais solúveis (derivados do VHB, VHC e HIV) pelas células dendríticas aos linfócitos CD8+ específicos, o que se deve à redução na acidificação do sistema endocítico e consequente aumento da exportação dos antígenos solúveis endocíticos para o citoplasma ³¹¹. 2. A cloroquina inibe a proteólise autofágica celular envolvida na replicação do replicon do VHC, fornecendo dessa forma uma nova opção terapêutica contra a hepatite C crônica ³¹². Contudo, resta saber se a cloroquina em doses baixas (como é usada na PCT) teria esses efeitos benéficos *in vivo* nas infecções associadas (HIV e/ou VHC).

Malina *et al.* ²⁵⁶ observaram que no tratamento com cloroquina a recidiva era mais precoce do que com flebotomia. Já Kostler *et al.* ²⁵⁸ não observaram vantagens decisivas da flebotomia em comparação com cloroquina, mesmo com relação aos depósitos de ferro. A decisão terapêutica entre flebotomia e cloroquina é empírica e não existe nenhuma estratégia de consenso para a escolha de qualquer um dos tratamentos na PCT. Além disso, há poucos trabalhos abordando as implicações clínicas das mutações HFE nos pacientes com PCT tratados com cloroquina.

Stölzel *et al.* ²³⁵, em um estudo retrospectivo observaram a resposta à cloroquina como monoterapia em um grupo de 62 pacientes com PCT e genótipo HFE estabelecido. O tempo médio de tratamento foi 16 meses e observaram que o heterozigoto C282Y, o heterozigoto composto e o HFE TS/TS (tipo selvagem) mostraram uma boa resposta ao uso de cloroquina com remissão sustentada das lesões cutâneas, diminuição das enzimas hepáticas e redução da excreção de porfirinas urinárias. No entanto, os marcadores de ferro sérico diminuíram após o tratamento com cloroquina apenas nos pacientes com o HFE tipo selvagem. Por outro lado, homozigotos para C282Y (3 de 62 pacientes) não apresentaram qualquer melhora e não se beneficiaram com o uso da cloroquina.

Outro estudo retrospectivo foi realizado por Toll *et al.*²⁴², onde analisaram retrospectivamente 65 pacientes com PCT esporádico. Quarenta pacientes (grupo A) tinham recebido somente difosfato de cloroquina (250 mg, duas vezes por semana) e tinham conseguido remissão clínica e bioquímica em menos de 6 meses. Vinte e cinco pacientes (grupo B) também receberam só a cloroquina inicialmente (pelo menos 6 meses), mas devido à falta de resposta receberam flebotomias (400 mL semanalmente por uma média de 1 mês e meio) para obter a remissão bioquímica. O objetivo deste estudo foi avaliar uma possível correlação entre a resposta terapêutica e as mutações HFE, mutações C282Y e H63D. Dos 65 pacientes, 28 eram heterozigotos (43%) e 7 homozigotos (10,7%) para H63D. A prevalência da mutação H63D foi semelhante nos dois grupos de regimes terapêuticos (grupo A: 57,5%; grupo B: 48%, $p = 0,45$). A mutação C282Y estava presente em heterozigose em 11 dos 65 pacientes (16,9%) e nenhum dos pacientes era homozigotos para esta mutação. Oito destes 11 pacientes com mutação C282Y (73%) estavam no grupo B, ou seja, tinham recebido flebotomias além da cloroquina para alcançar uma resposta clínica e bioquímica. Apenas 17 de 54 (31,5%) pacientes sem a mutação C282Y tinham recebido flebotomias. Ao comparar os dois grupos, encontraram aumento da mutação C282Y em pacientes do grupo B (8/25; 32%) em comparação com o grupo A (3/40; 7,5%, $p = 0,016$). Três pacientes eram heterozigotos compostos (C282Y/H63D), dois do grupo A e um do grupo B. Observaram, portanto, que os pacientes com PCT e heterozigose para C282Y não responderam tão bem à cloroquina; e a flebotomia teve que ser associada para obter uma resposta completa. No entanto, este estudo foi retrospectivo e limitado, pelo fato da resposta terapêutica ter sido avaliada após um período curto de tratamento (seis meses).

Os estudos de Stölzel *et al.*²³⁵ e Toll *et al.*²⁴² mostram uma ligação entre a mutação HFE C282Y (em homozigose ou heterozigose) e uma resposta deficiente à cloroquina e estes autores concluem que a flebotomia deveria ser a terapia de primeira escolha nestes pacientes. Outro fato importante para levar em consideração é que a hepatite crônica pelo VHC

pode apresentar benefício adicional com a redução dos níveis de ferro, pois esta diminui a inflamação hepática e melhora a resposta ao tratamento da hepatite C com interferon³¹³⁻³¹⁵.

Valls *et al.*²⁵⁹ observaram 53 pacientes com PCT tratados com cloroquina (250 mg, duas vezes por semana) por um período médio de 8 meses, sendo que 50 atingiram remissão bioquímica. A recidiva ocorreu em 22 pacientes; estes pacientes apresentavam valores basais maiores das aminotransferases, da gamaglobulina e da uroporfirina urinária, além do tempo necessário para remissão mais longo. Depois do término do tratamento, a probabilidade de recidiva foi de 12% (95%; IC: 5-27%) em um ano e de 49% (95%; IC: 34-67%) em três anos. O tempo para atingir a remissão foi o único fator **preditivo** independente para a recidiva (*Hazard ratio* = 1.2, 95% IC: 1.05-1.21, $p < 0.01$). Entre nossos pacientes, a maioria que apresentou recidiva foi por voltarem a beber bebida alcoólica; alguns apresentaram recidiva com pequenas quantidades de bebida alcoólica (etilismo social). Outro fator que deve ser levado em conta e pode explicar a recidiva é a presença das mutações HFE levando o indivíduo a acumular ferro novamente e consequentemente conduzindo-o à recidiva da PCT. O paciente com as mutações HFE ou com diagnóstico clínico de HH deverá ser acompanhado periodicamente assim como aqueles com a PCT familiar, pois estes pacientes apresentam um risco permanente de recidiva. Quando observamos aumento dos níveis de ferro acompanhado de elevação das porfirinas urinárias, voltamos a tratar o paciente com cloroquina ou flebotomia antes da recidiva clínica da PCT.

Levando em consideração nossos achados e os da literatura conclui-se que o tratamento do paciente com PCT deve ser individualizado. A escolha entre flebotomia ou cloroquina deve embasar-se principalmente nas seguintes variáveis: sobrecarga importante de ferro associada ao VHC, HIV associado, genótipo homozigoto para C282Y ou heterozigoto composto, anemia crônica, cardiopatia, insuficiência renal crônica, etc. Este estudo comprova que o genótipo HFE do indivíduo deve ser pesquisado e interfere de forma significativa na decisão de qual tratamento escolher. Essa decisão

era empírica, mas hoje devemos levar em conta as diferentes características clínicas e as doenças associadas, lembrando-nos das condições socioeconômicas do indivíduo. Ao decidir que tratamento indicar ao paciente, devemos sempre considerar o princípio *primum non nocere*. A cloroquina, nos pacientes sem as mutações HFE, fornece excelentes resultados com um mínimo de efeitos colaterais e tem uma grande vantagem em nosso país devido ao seu baixo custo. O indivíduo não falta no seu trabalho e não precisa se locomover ao hospital com frequência, porque muitas vezes ele não tem recursos para o transporte. No entanto, não são todos os pacientes que são beneficiados pelo tratamento com cloroquina; a flebotomia é a melhor opção terapêutica nos pacientes que apresentam uma grande sobrecarga de ferro associado a mutações HFE ou, em alguns casos, associado à hepatite C. Estes se beneficiam mais da flebotomia porque diminui os níveis de ferro de uma forma mais efetiva e traz benefícios adicionais, como melhora da resposta ao tratamento antiviral na hepatite C, diminuição do risco de progressão para cirrose ou de desenvolver câncer hepático (ver tratamento). O reconhecimento da associação da HH e a PCT e um diagnóstico precoce do homozigoto para as mutações do gene HFE permitem que o dermatologista reduza a mortalidade e morbidade do paciente ¹⁴⁸. Mehrany *et al.* ¹⁴⁸ estudaram a associação destas mutações na PCT e em 5 de 8 pacientes (63%) o diagnóstico de HH ou da mutação do gene HFE havia sido feito inicialmente pelo dermatologista. O dermatologista pode desempenhar um papel chave no diagnóstico precoce da HH subclínica em pacientes com PCT, pois esta pode ser um marcador cutâneo para as mutações do gene HFE.

7 CONCLUSÕES

Considerando os resultados obtidos, podemos concluir o exposto abaixo:

1. As frequências dos alelos das mutações foram significativamente mais elevadas nos pacientes com PCT para C282Y (8,3% versus 1,77%, odds ratio 5,02, IC [95%] = [4,1%; 14,8%], $p=0,0001$) e H63D (27,5% versus 14,05, odds ratio 2,32, IC [95%] = [19,7%; 36,4%], $p=0,0004$) em relação à população controle.
2. Não houve associação dos alelos C282Y ou H63D com os fatores precipitantes (VHC, HIV, etilismo e estrógeno).
3. As mutações HFE e a expressão clínica da hemocromatose hereditária podem contribuir isoladamente para o desencadeamento da PCT, independentemente da presença de outros fatores precipitantes; o que torna a pesquisa das mutações HFE um exame necessário nos pacientes com PCT. A PCT pode ser considerada um marcador cutâneo para a hemocromatose e o dermatologista pode auxiliar no diagnóstico e tratamento precoce da doença.
4. Ocorre a diminuição dos níveis de ferro sérico e da ferritina, mas os níveis de saturação de transferrina dos pacientes homozigotos para C282Y, dos heterozigotos compostos (C282Y/H63D) e dos heterozigotos para C282Y (C282Y/TS) não diminuem de forma significativa com a cloroquina apesar da remissão bioquímica da PCT. A flebotomia é o tratamento de primeira escolha para a redução dos depósitos de ferro nestes pacientes; tratando deste modo a porfiria cutânea tardia e a hemocromatose.

5. Na falta da pesquisa das mutações HFE, devemos suspeitar da possibilidade do indivíduo apresentar as mutações quando a saturação de transferrina antes do tratamento for muito alta ou manter-se elevada mesmo após a remissão bioquímica.
6. A porfiria cutânea tardia predominou no sexo masculino (73,3%) e neste grupo predominou a ingestão de álcool como fator precipitante (95,3%). No sexo feminino o fator precipitante predominante foi o estímulo estrogênico (50%).
7. Ao comparar os parâmetros bioquímicos dos pacientes antes e depois do tratamento com cloroquina, independentemente do genótipo HFE ou da presença do VHC, observamos que os níveis de ferro (ferro sérico, ferritina e saturação de transferrina) e as enzimas hepáticas (AST, ALT) diminuíram de forma significativa ($p < 0,05$).
8. A hepatite C esteve presente em 41,7% dos pacientes com porfiria cutânea tardia (90,7% do sexo masculino e 9,3% do sexo feminino), e esteve associada à ingestão de álcool em 84% dos casos.
9. A associação da PCT com VHC dificulta a diminuição dos níveis de ferro no tratamento com cloroquina, pois o grupo com VHC não apresentou diminuição da ferritina e os níveis de ferro sérico e da saturação de transferrina não diminuíram de forma estatisticamente significativa. Já no grupo sem VHC houve uma diminuição significativa do ferro sérico, saturação de transferrina e da ferritina ($p < 0,05$). Em relação às enzimas hepáticas (AST e ALT), inicialmente estavam mais elevadas nos pacientes com VHC, mas após o tratamento diminuíram significativamente ($p < 0,05$) nos dois grupos. A GGT diminuiu significativamente no grupo sem VHC ($p = 0,001$), mas não no grupo com VHC ($p = 0,074$).

-
10. Individualizar o tratamento levando em consideração os diferentes fatores precipitantes e doenças associadas em cada paciente, ou seja, a escolha entre flebotomia ou cloroquina deve embasar-se nas variáveis: sobrecarga de ferro acentuada associada ao VHC, anti-HIV, genótipo HFE, intolerância à cloroquina, anemia crônica, insuficiência cardíaca, insuficiência renal crônica associada e por fim ausência de resposta ao tratamento isolado com cloroquina.

 11. Este estudo contribui para que a análise das mutações do gene HFE seja realizada em todos os pacientes com diagnóstico de PCT para identificar as pessoas com risco de hemocromatose e ajudar na decisão por qual tratamento optar.

8 ANEXOS

ANEXO A-1

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE:.....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº:..... SEXO : M F
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO:..... Nº:..... APTO:.....
BAIRRO:..... CIDADE:
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)
2. RESPONSÁVEL LEGAL
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M F
DATA NASCIMENTO.:/...../.....
ENDEREÇO:Nº APTO:
BAIRRO:.....CIDADE:
CEP: TELEFONE: DDD (.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. **TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA** → Porfíria cutânea tardia com mutações do gene da hemocromatose C282Y e H63D e análise retrospectiva do perfil de ferro em relação ao tratamento. Estudo de 50 casos.

Pesquisador responsável: Dr. Vitor Manoel Silva dos Reis (CRM 27767)

Pesquisadora executante: Dra Fatima Mendonça Jorge Vieira (CRM 79303)

Endereço: Departamento de Dermatologia, Prédio dos Ambulatórios (PAMB) do Hospital das Clínicas da FMUSP, Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 155, 5º. Andar, Bloco 2B, CEP: 05403-000, Tel.: (11) 3069-6398.

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO (x) RISCO MÉDIO
RISCO BAIXO RISCO MAIOR

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

3. DURAÇÃO DA PESQUISA: 2 anos.

4. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br.

ANEXO A-2 **HOSPITAL DAS CLÍNICAS**
DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

1. Justificativa e os objetivos da pesquisa: Você está sendo convidado a participar desta pesquisa por ter sido diagnosticado com porfiria cutânea tardia e o objetivo desta pesquisa é estudar se você tem uma doença chamada hemocromatose. A hemocromatose é uma doença genética que causa acúmulo de ferro no fígado e pode estar associada a porfiria. O diagnóstico pode ser feito através de uma amostra de sangue.

2. Procedimentos que serão utilizados e propósitos: Para participar desta pesquisa é necessário colher 10mL de sangue (quantidade pequena que não prejudica o organismo), de uma só vez, através da punção de uma veia do antebraço. O sangue é para extração de DNA e identificar se você apresenta as mutações da hemocromatose. As informações referentes a outros exames de sangue (dosagem de ferro) e de urina (porfirinas) normalmente solicitados durante seu tratamento poderão ser utilizados neste estudo.

3. Desconfortos e riscos esperados: O desconforto é a dor da picada da agulha para a coleta do exame de sangue e, eventualmente, um hematoma (mancha roxa) no local da picada.

4. Benefícios que poderão ser obtidos: O estudo contribui para melhorar o conhecimento das causas da porfiria cutânea tardia e quando se descobre a hemocromatose em fases iniciais pode ser feito um tratamento, que retira o excesso de ferro depositado no fígado, pois o excesso de ferro pode afetar o funcionamento do fígado.

5. Procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo: Não se aplica.

6. Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de qualquer dúvida. O principal investigador é o Dr. Vitor Manoel Silva dos Reis, que pode ser encontrado no endereço: Prédio dos Ambulatórios (PAMB) do Hospital das Clínicas da FMUSP, Departamento de Dermatologia, Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 155, 5º. Andar, CEP: 05403-000, Tel.: (11) 3069-6398.

7. Você é livre para decidir se quer ou não participar da pesquisa. Caso não queira participar, nós garantimos que seu tratamento neste Hospital será o mesmo.

8. Você tem direito de confidencialidade – Caso deseje participar, nós guardaremos segredo de sua identidade.

9. Você tem direito de ser mantido atualizado sobre os resultados da pesquisa que sejam do conhecimento dos médicos pesquisadores.

ANEXO A-3

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

10. Despesas e compensações: Sua participação é isenta de despesas e também não há compensação financeira relacionada à sua participação.

11. Os dados e o sangue coletado poderão permanecer guardados para futuras pesquisas seguindo sempre os preceitos de ética reconhecido nesta instituição e internacionalmente.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo **“Porfiria cutânea tardia com mutações do gene da hemocromatose C282Y e H63D e análise retrospectiva do perfil de ferro em relação ao tratamento. Estudo de 50 casos.”** Eu discuti com o Dr. Vitor Manoel Silva dos Reis sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário, dentro das condições de atendimento oferecido por este hospital. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

_____ Data ____/____/____
Assinatura do paciente / representante legal

_____ Data ____/____/____
Assinatura da testemunha
RG: _____

(para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

_____ Data ____/____/____
Dr. Vitor Manoel Silva dos Reis
Responsável pelo estudo

ANEXO B. Aprovação do Projeto pela CAPPesq

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 28/04/2010, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0984/09**, intitulado: **"PORFIRIA CUTÂNEA TARDIA COM MUTAÇÕES DO GENE DA HEMOCROMATOSE C282Y E H63D E ANÁLISE RETROSPECTIVA DO PERFIL DE FERRO EM RELAÇÃO AO TRATAMENTO. ESTUDO DE 50 CASOS."** apresentado pelo Departamento de **DERMATOLOGIA**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Vitor Manoel Silva dos Reis**

Pesquisador (a) Executante: **Fatima Mendonça Jorge Vieira**

CAPPesq, 29 de Abril de 2010

Prof. Dr. Eduardo Massad
Presidente da Comissão de
Ética para Análise de Projetos
de Pesquisa

ANEXO C-1. Modelo do protocolo manuscrito de cada paciente.**FOTOBIOLOGIA – DEPARTAMENTO DE DERMATOLOGIA DO**
HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FMUSP

NOME: _____

REG HC: _____ SEXO: _____ PROFISSÃO: _____

DATA NASCIMENTO: ____ / ____ / ____ IDADE: ____.

ENDEREÇO: _____

_____ N°. _____ APT.: _____ BAIRRO: _____

CIDADE: _____ EST.: _____ CEP: _____ - ____.

TEL.: (____) _____ (RES) / (____) _____ (COM).

DATA DA PRIMEIRA CONSULTA: ____ / ____ / ____.

QD: _____ HÁ _____.

ED DE ENTRADA: (BOLHAS / FRAGILIDADE CUTÂNEA / HIPERTRICOSE /
HIPERPIGMENTAÇÃO / ALTERAÇÕES ESCLERODERMIFORMES / CALCIFICAÇÕES
DISTRÓFICAS ?) →

ANTECEDENTES PESSOAIS (Doenças prévias ou associadas):

ANTECEDENTES FAMILIARES: (Familiares com os mesmos sintomas?)

ANEXO C-2**HISTÓRIA PREGRESSA (HPMA):**

• MEDICAÇÕES EM USO? _____

• ETILISMO? _____

• TABAGISTA? _____

• EXPOSIÇÃO A ORGANOFOBOSFORADOS? _____

(2-4-DICLOROFENOL, 2,4,5-TRICLOROFENOL E HEXACLOROBENZENO)

• TRATAMENTO HORMONAL (Mulheres)? _____

• TERAPIA COM FERRO? _____

• TRANSFUSÃO SANGUÍNEA PRÉVIA? _____

• HEPATITE? _____

• HOBBY? _____

DIAGNÓSTICO: _____

MEDICAÇÃO / TRATAMENTO: _____

DATA INÍCIO DO TRATAMENTO: ____ / ____ / ____ .

EVOLUÇÃO: _____

ANEXO C-3 - EXAMES INICIAIS / EVOLUÇÃO

DATA	__ / __ / __	__ / __ / __	__ / __ / __
EXAMES			
Anátomo-patológico – N°. Local da biópsia? Lesão ou pele são? Diagnóstico: PAS?			
Imunofluorescência direta – N°. Local da biópsia? Lesão ou pele são? Fluorescência: - Distribuição (Contínua, granular ou homogênea) - Intensidade (Intensa, moderada, ou fraca) ZMB: • Anti-IgG ----- • Anti-IgM----- • Anti-IgA----- • Anti-C3 ----- Perivascular: • Anti-IgG ----- • Anti-IgM----- • Anti-IgA----- • Anti-C3 -----	ZMB: Perivascular: (+) / (-) (+) / (-) (+) / (-) (+) / (-) (+) / (-) (+) / (-) (+) / (-) (+) / (-) (+) / (-)	ZMB: Perivascular: (+) / (-) (+) / (-) (+) / (-) (+) / (-) (+) / (-) (+) / (-) (+) / (-) (+) / (-) (+) / (-)	ZMB: Perivascular: (+) / (-) (+) / (-) (+) / (-) (+) / (-) (+) / (-) (+) / (-) (+) / (-) (+) / (-) (+) / (-)
Imunomapeamento N°.: Local biópsia: Lado da fluorescência? • PB180 • Laminina • Colágeno IV • Colágeno VII Nível clivagem →			
ESTÁ NA VIGÊNCIA DE QUAL TRATAMENTO? Dose? Há quanto tempo?			

ANEXO C-4 – EXAMES INICIAIS / EVOLUÇÃO

DATA EXAMES	__ / __ / __	__ / __ / __	__ / __ / __
PORFIRINAS URINA 24HS Porfirinas totais _____ Uroporfirina <50 mg _____ Heptaporfirina _____ Hexaporfirina _____ Pentaporfirina _____ Coproporfirinas _____	→ → → → → →	→ → → → → →	→ → → → → →
PORFIRINAS NO SANGUE (Não disponível)			
PORFIRINAS NAS FEZES (Não disponível)			
Teste “screening” lâmpada de Wood – URINA	☐ Fraca ☐ Moderada ☐ Intensa	☐ Fraca ☐ Moderada ☐ Intensa	☐ Fraca ☐ Moderada ☐ Intensa
Teste “screening” lâmpada de Wood – FEZES	☐ Fraca ☐ Moderada ☐ Intensa	☐ Fraca ☐ Moderada ☐ Intensa	☐ Fraca ☐ Moderada ☐ Intensa
Teste “screening” lâmpada de Wood – SANGUE	☐ Fraca ☐ Moderada ☐ Intensa	☐ Fraca ☐ Moderada ☐ Intensa	☐ Fraca ☐ Moderada ☐ Intensa
HEPATITE C			
HEPATITE B: Anti-HBc total Anti-HBs AgHBs			
HEPATITE A (IgG / IgM)			
ANTI-HIV (1 e 2)			
FAN			

ANEXO C-5 – EXAMES INICIAIS / EVOLUÇÃO

EXAMES	DATA __ / __ / __	DATA __ / __ / __	DATA __ / __ / __
GLICEMIA			
GTT (Teste tolerância à glicose)			
HEMOGRAMA			
Hemoglobina -----	→	→	→
Hematócrito -----	→	→	→
Leucócitos -----	→	→	→
Neutrófilos (%)-----	→	→	→
Eosinófilos (%)-----	→	→	→
Linfócitos (%)-----	→	→	→
Plaquetas -----	→	→	→
DHL			
Ferritina			
Ferro sérico			
Saturação de Ferro			
Cap. ligação Ferro			
Uréia			
Creatinina			
Fosfatase Alcalina			
Bilirrubina total	→	→	→
Bilirrubina direta	→	→	→
Bilirrubina Indireta	→	→	→
TGO / AST			
TGP / ALT			
GGT			

ANEXO C-6 – EXAMES INICIAIS / EVOLUÇÃO

DATA	__ / __ / __	__ / __ / __	__ / __ / __
Coagulograma TP	→	→	→
TT	→	→	→
TTPA	→	→	→
Eletroforese/Proteína			
Proteínas totais			
Albumina			
Gamaglobulina			
Alfa 1 / Alfa 2 / beta			
Alfa-fetoproteína (<10ng/ml)	__ / __ / __	__ / __ / __	__ / __ / __
	__ / __ / __	__ / __ / __	__ / __ / __
USG Abdomen			
Exame fundo de olho	__ / __ / __	__ / __ / __	__ / __ / __

ANEXO D. Carta de Concordância do Departamento de Gastroenterologia

São Paulo, 26 de Novembro de 2009

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq
Relativo ao protocolo de pesquisa 0984/09

Exmo. Presidente,
Prof. Dr. Eduardo Massad

Informo-lhe que pertenço ao Departamento de Gastroenterologia da FMUSP - Disciplina de Gastroenterologia Clínica - e que minha linha de pesquisa relaciona-se às doenças auto-imunes e metabólicas do fígado. Sou Pesquisador Associado do Laboratório de Imunopatologia da Esquistossomose – LIM 06 – onde são realizadas as pesquisas de auto-anticorpos e das mutações dos genes HFE (hemocromatose hereditária) e ATP7B (Doença de Wilson).

Aceito participar do trabalho “Porfiria cutânea tardia com mutações do gene da hemocromatose C282Y e H63D e análise retrospectiva do perfil de ferro em relação ao tratamento: estudo de 50 casos” e nossa contribuição será a realização da pesquisa das mutações do gene HFE envolvidas na hemocromatose hereditária em portadores de porfiria cutânea tardia, e a análise das características clínicas, bioquímicas e histológicas dos pacientes que apresentarem comprometimento hepático.

Atenciosamente,

Eduardo Luiz Rachid Cançado

Professor Associado do Departamento de Gastroenterologia da FMUSP

ANEXO E - Gráfico obtido com técnica de PCR-RT utilizando o equipamento *7300 Real Time PCR System ABI PRISM™*, (Applied Biosystem, EUA) para as mutações C282Y.

◆ TS/TS ▲ C282Y/TS ● C282Y/C282Y

ANEXO F - Gráfico obtido com técnica de PCR-RT utilizando o equipamento *7300 Real Time PCR System ABI PRISM™*, (Applied Biosystem, EUA) para as mutações H63D.

9 REFERÊNCIAS

1. Teubner A, Richter M, Schuppan D, Köstler E, Stölzel U. Hepatitis C, hemochromatosis and porphyria cutanea tarda. *Dtsch Med Wochenschr.* 2006;131(13):691-5.
2. Berk PD. An editor's look-back. *Hepatology.* 2006;43(Suppl.1):S13-30.
3. Siersema PD, Rademakers LHPM, Cleton MI, Kate FJW, et al The difference in liver pathology between sporadic and familial form of porphyria cutanea tarda: the role of iron. *J Hepatol.* 1995;23:259-67.
4. Grossman ME, Bickers DR, Poh-Fitzpatrick MB, Deleo VA, Harber LC. Porphyria cutanea tarda – Clinical features and laboratory findings in 40 patients. *Am J Med.* 1979;67:277-86.
5. Bygum A, Christiansen L, Petersen NE, Hørder M, Thomsen K, Brandrup F. Familial and sporadic porphyria cutanea tarda: clinical, biochemical and genetic features with emphasis on iron status. *Acta Derm Venereol.* 2003;83(2):115-20.
6. Elder GH. Porphyria cutanea tarda. *Semin Liver Dis.* 1998;18(1):67-75.
7. Elder GH, Urquhart AJ, de Salamanca RE, Munoz JJ, Bonkovsky HL. Immuno-reactive uroporphyrinogen decarboxylase in the liver in porphyria cutanea tarda. *Lancet.* 1985;2:229-33.
8. Elder GH, Roberts AG, de Salamanca RE. Genetics and pathogenesis of human uroporphyrinogen decarboxylase defects. *Clin Biochem.* 1989; 22:163-8.
9. Elder GH, Roberts AG. Uroporphyrinogen decarboxylase. *J Bioenerg Biomembr.* 1995;27:207-14.
10. Garey JR, Franklin KF, Brown DA, Harrison LM, Metcalf KM, Kushner JP. Analysis of uroporphyrinogen decarboxylase complementary DNAs in sporadic porphyria cutanea tarda. *Gastroenterology.* 1993;105:165-9.
11. De Verneuil H, Aitkne G, Nordmann Y. Familial and sporadic porphyria cutanea tarda: Two different diseases. *Hum Genet.* 1978;44:145-51.

12. Held JL, Sassa S, Kappas A, Harber LC. Erythrocyte uroporphyrinogen decarboxylase activity in porphyria cutanea tarda: a study of 40 consecutive patients. *J Invest Dermatol.* 1989;93:332-4.
13. Roberts AG, Elder GH, Newcomb RG, de Salamanca RE, Munzo JJ. Heterogeneity of familial porphyria cutanea tarda. *J Med Genet.* 1988;25:669-76.
14. D'Alessandro Gandolfo L, Griso D, Macri A, Biolcati G, Topi GC. Familial porphyria cutanea tarda with normal erythrocytic urodecarboxylase an exception to the rule. *Dermatológica.* 1989;178:206-8.
15. Cripps DJ, Peters HA, Gocmen A, Dogramici I. Porphyria turcica due to hexachlorobenzene: a 20 to 30 year follow-up study on 204 patients. *Br J Dermatol.* 1984;111:413-22.
16. Gocmen A, Peters HA, Cripps DJ, Bryan GT, Morrios CR. Hexachlorobenzene episode in Turkey. *Biomed Environ Sci.* 1989;2:36-43.
17. Altomare G, Capella GL. Occupational porphyria cutanea tarda due to exposure to symmetrical triazine herbicides. *Eur J Dermatol.* 1995;5:66-8.
18. Manzione NC, Wolkoff AW, Sassa S. Development of porphyria cutanea tarda after treatment with cyclophosphamide. *Gastroenterology.* 1988;95(4):1119-22.
19. Malina L, Michalíková H, Hussarová L. Porphyria cutanea tarda after antineoplastic drugs. *Cas Lek Cesk.* 1999;138(17):536-8. (Resumo)
20. Millar JW. Rifampicin-induced porphyria cutanea tarda. *Br J Dis Chest.* 1980;74(4):405-8.
21. Köstler E, Wollina U. Therapy of porphyria cutanea tarda. *Expert Opin Pharmacother.* 2005;6:377-83.
22. Bruguera M. Liver involvement in porphyria. *Sem Dermatol.* 1986;5:178-85.
23. Cortes JM, Oliva H, Paradinas EJ, Fernandes-Guio C. The pathology of the liver in porphyria cutanea tarda. *Histopathology.* 1980;4:471-85.

24. Lefkowitz JH, Grossman ME. Hepatic pathology in porphyria cutanea tarda. *Liver*. 1983;3:19-29.
25. Sweeney GD. Porphyria cutanea tarda, or the uroporphyrinogen decarboxylase deficiency diseases. *Clin Biochem*. 1986;19:3-14.
26. Fakan F, Chlumska A. Demonstration of needle-shaped hepatic inclusions in porphyria cutanea tarda using the ferric ferricyanide reduction test. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*. 1987;411(4):365-8.
27. Magnus IA. Appendix II - Clinical Screening tests for excess porphyrins. In: *Dermatological Photobiology. Clinical and Experimental Aspects*. London: Blackwell Scientific Publications; 1976. p. 253-255.
28. Miller V, Malina L. High-performance liquid chromatographic analysis of biologically important porphyrins. *J Chromatogr*. 1978;145:290-4.
29. Lim CK, Peters TJ. Urine and faecal porphyrin profiles by reversed-phase high-performance liquid chromatography in the porphyrias. *Clin Chim Acta*. 1984;139:55-63.
30. Thunell S, Harper P: Porphyrins, porphyrin metabolism, porphyrias. III. Diagnosis, care and monitoring in porphyria cutanea tarda - Suggestions for a handling programme. *Scand J Clin Lab Invest*. 2000;60:561-79.
31. Bickers DR, Frank J. The porphyrias. In: Fitzpatrick TB, Freedberg IM, Eisen AZ, Wolff K, Austen KF, Goldsmith LA, Katz SI, eds. *Dermatology in general medicine*, edition 6. New York: McGraw Hill; 2003. p. 1435-66.
32. To-Figueras J, Ozalla D, Mateu CH. Long-standing changes in the urinary profile of porphyrin isomers after clinical remission of porphyria cutanea tarda. *Ann Clin Lab Sci*. 2003;33(3):251-6.
33. Sarkany RPE. The management of porphyria cutanea tarda. *Clin Exp Dermatol*. 2001;26:225-32.
34. Cordova KB, Oberg TJ, Malik M, Robinson-Bostom L. Dermatologic conditions seen in end-stage renal disease. *Semin Dial*. 2009;22(1):45-55.
35. Rich MW. Porphyria cutanea tarda. Don't forget to look at the urine. *Postgrad Med*. 1999;105(4) (www.postgradmed.com/issues/1999).

36. Elder GH. The cutaneous porphyrias. In: Hawk JLM, Arnold. Photodermatology. New York: Oxford University Press Inc; 1999. p.171-97.
37. Cribier B, Petiau P, Keller F, Schmitt C, Vetter D, Heid E, Grosshans E. Porphyria cutanea tarda and hepatitis C viral infection. A clinical and virologic study. Arch Dermatol. 1995;131:801-4.
38. Vieira FMJ, Aoki V, Oliveira ZNP, Martins JEC. Estudo da imunofluorescência direta, imunomapeamento e microscopia ótica na porfiria cutânea tardia. An Bras Dermatol. 2010;85(6):827-37.
39. Sixel-Dietrich F, Doss M. Hereditary uroporphyrinogen-decarboxylase deficiency predisposing porphyria cutanea tarda (chronic hepatic porphyria) in females after oral contraceptive medication. Arch Dermatol Res. 1985;278(1):13-6.
40. Kappas A, Sassa S, Galbraith RA, et al. The porphyrias. In: C. R. Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, et al. The Molecular and Metabolic Basis of Inherited Disease. 7th ed. New York: McGraw-Hill; 1995. p.2103-59.
41. Elder GH, Worwood M. Mutations in the hemochromatosis gene, porphyria cutanea tarda, and iron overload. Hepatology. 1998; 27(1):289-91.
42. Elder GH. Porphyria cutanea tarda: a multifactorial disease. Rec Adv Dermatol. 1990;8:55-69.
43. De Matteis F. Role of iron in the hydrogen peroxide-dependent oxidation of hexahydroporphyrins (porphyrinogens): a possible mechanism for the exacerbation by iron of hepatic uroporphyrin. Molecular Pharmacology. 1988;33:463-9.
44. Constantin D, Francis JE, Akhtar A, Clothier B, Smith AG. Uroporphyrin induced by 5-aminolevulinic acid in Ahrd SWR mice. Biochem Pharmacol. 1996;52:1407-13.
45. Phillips JD, Bergonia HA, Reilly CA, Franklin MR, Kushner JP. A porphomethene inhibitor of uroporphyrinogen decarboxylase causes porphyria cutanea tarda. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007;104(12): 5079-84.
46. Lambrecht RW, Bonkovsky HL. Hemochromatosis and porphyria. Semin Gastrointest Dis. 2002;13(2):109-19.

47. Lundvall O. The effect of phlebotomy therapy in porphyria cutanea tarda. Its relations to the phlebotomy-induced reduction of iron stores. *Acta Med Scand.* 1971;189:33-49.
48. Lundvall O. The effect of replenishment of iron stores after phlebotomy in porphyria cutanea tarda. *Acta Med Scand.* 1971;189:51-63.
49. Francis JE, Smith AG. Oxidation of uroporphyrinogens by hydroxyl radicals: evidence for nonporphyrin products as potential inhibitors of uroporphyrinogen decarboxylase. *Febs Lett.* 1988;233:311-4.
50. Lambrecht RW, Sinclair PR, Gorman N, Sinclair R. Uroporphyrinogen oxidation catalyzed by reconstituted cytochrome P450IA2. *Arch Biochem Biophys.* 1992;254:504-10.
51. Sinclair PR, Gorman N, Dalton T, Walton HS, Bement WJ, Sinclair JF, Smith AG, Nebert DW. Uroporphyrin produced in mice by iron and 5-aminolaevulinic does not occur in Cyp1a2 (-/-) null mutant mice. *Biochem J.* 1998;330:149-53.
52. Christiansen L, Bygum A, Jensen A, Thomsen K, Brandrup F, Hørder M, Petersen NE. Association between CYP1A2 polymorphism and susceptibility to porphyria cutanea tarda. *Hum Genet.* 2000;107:612-4.
53. Murphy GM. The cutaneous porphyrias: a review. *Br J Dermatol.* 1999;140:573-81.
54. Ferri C, Baicchi U, la Civita L, Greco F, Longombardo G, Mazzoni A, Careccia G, Bombardieri S, Pasero G, Zignego AL, et al. Hepatitis C virus-related autoimmunity in patients with porphyria cutanea tarda. *Eur J Clin Invest.* 1993;23:851-5.
55. Brudieux E, de Lédinghen V, Moran MJ, Fontanellas A, Oui B, Trimoulet P, Belleannée G, Piton A, Raymond JM, Doutre MS, Amouretti M, de Verneuil H, Couzigou P. Hepatic porphyrin concentration and uroporphyrinogen decarboxylase activity in hepatitis C virus infection. *J Viral Hepat.* 2001;8(1):41-7.
56. Bonkovsky HL, Lambrecht RW, Shan Y. Iron as a co-morbid factor in nonhemochromatotic liver disease. *Alcohol.* 2003;30:137-44.
57. Bulaj ZJ, Phillips JD, Ajioka RS, Franklin MR, Griffen LM, Guinee DJ, Edwards CQ, Kushner JP. Hemochromatosis genes and other factors contributing to the pathogenesis of porphyria cutanea tarda. *Blood.* 2000;95:1565-71.

58. Lundvall O, Weinfeld A, Lundin P. Iron storage in porphyria cutanea tarda. *Acta Med Scand*. 1970;188:37-53.
59. Wallace DF, Subramaniam VN. Co-factors in liver disease: The role of HFE-related hereditary hemochromatosis and iron. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1790:663-70.
60. Egger NG, Goeger DE, Payne DA, Miskovsky EP, Weinman AS, Anderson KE. Porphyria cutanea tarda: multiplicity of risk factors including HFE mutations, hepatitis C, and inherited uroporphyrinogen decarboxylase deficiency. *Dig Dis Sci*. 2002;47:419-26.
61. Fargion S, Piperno A, Cappellini MD, Sampietro M, Fracanzani AL, Romano R, Caldarelli R, Marcelli R, Vecchi L, Fiorelli G. Hepatitis C virus and porphyria cutanea tarda: evidence of a strong association. *Hepatology*. 1992;16:1322-6.
62. Navas S, Bosch O, Castillo I, Marriott E, Carreño V. Porphyria cutanea tarda and hepatitis C and B viruses infection: a retrospective study. *Hepatology*. 1995;21(2):279-84.
63. Roux M, Grange C, Durand DV, Levrat R. Porphyria cutanea tarda and hepatitis B and C virus infection. *Presse Med*. 1996;25(33):1589-91.
64. Malina L, Stránský J, Havlícková M, Zd'árský E. Chronic hepatic porphyria and hepatitis B and C virus infections. *Cas Lek Cesk*. 1998;137(18):561-4. (Resumo)
65. Stránský J, Malina L, Cieslarová B, Stríteský J, Půtová I, Horák J. Overt and hidden coinfection with hepatitis B and C viruses in chronic liver disease and porphyria cutanea tarda. *Acta Virol*. 2000;44(1):23-8.
66. Gisbert JP, Garcya-Buey L, Pajares JM, Moreno-Otero R. Prevalence of hepatitis C virus infection in porphyria cutanea tarda: systematic review and meta-analysis. *J Hepatol*. 2003;39(4):620-7.
67. Cohen PR. Porphyria Cutanea Tarda in Human Immunodeficiency Virus-Seropositive Men: Case Report And Literature Review. *J AIDS*. 1991;4:1112-7.
68. Nomura N, Zolla-Pazner S, Simberkoff M, Kim M, Sassa S, Lim HW. Abnormal serum porphyrin in patients with acquired immunodeficiency syndrome with or without hepatitis C virus infection. *Arch Dermatol*. 1996;132:906-10.

-
69. Enríquez de Salamanca R, Mingo D, Chinarro S, Muñoz JJ, Perpiñá J. Patterns of Porphyrin Excretion In Female Estrogen-Induced Porphyria Cutanea Tarda. *Arch Dermatol Res.* 1982;274:179-84.
 70. Gibson GE, McGinnity E, McGrath P, Carmody M, Walshe J, Donohoe J, O'Moore R, Murphy GM. Cutaneous abnormalities and metabolic disturbance of porphyrins in patients on maintenance haemodialysis. *Clin Exp Dermatol.* 1997;22(3):124-7.
 71. Shieh S, Cohen JL, Lim HW. Management of Porphyria Cutanea Tarda in the Setting of Chronic Renal Failure: A Case Report and Review. *J Am Acad Dermatol.* 2000;42,642-52.
 72. Wiley TE, McCarthy M, Breidi L, Layden TJ. Impact of alcohol on the histological and clinical progression of hepatitis C infection. *Hepatology.* 1998;28:805-9.
 73. Pessione F, Degos F, Marcellin P, Duchatelle V, Njapoum C, Martinot-Peignoux M, Degott C, Valla D, Erlinger S, Rueff B. Effect of alcohol consumption on serum hepatitis C virus RNA and histological lesions in chronic hepatitis C. *Hepatology.* 1998;27(6):1717-22.
 74. Schiff ER. Hepatitis C and alcohol. *Hepatology.* 1997;26(3 Suppl 1): 39S-42S.
 75. Ludwig J, Hashimoto E, Porayko MK, Moyer TP, Baldus WP. Hemosiderosis in cirrhosis: a study of 447 native livers. *Gastroenterology.* 1997;112(3):882-8.
 76. Valerio LG Jr, Parks T, Petersen DR. Alcohol mediates increases in hepatic and serum non heme iron stores in a rat model for alcohol-induced liver injury. *Alcohol Clin Exp Res.* 1996;20:1352-61.
 77. Fletcher LM, Halliday JW, Powell LW. Interrelationships of alcohol and iron in liver disease with particular reference to the iron-binding proteins, ferritin and transferrin. *J Gastroenterol Hepatol.* 1999;14:202-14.
 78. Harrison-Findik DD, Schafer D, Klein E, Timchenko NA, Kulaksiz H, Clemens D, Fein E, Andriopoulos B, Pantopoulos K, Gollan J. Alcohol metabolism-mediated oxidative stress down-regulates hepcidin transcription and leads to increased duodenal iron transporter expression. *J Biol Chem.* 2006;281(32):22974-82.

79. Bridle K, Cheung TK, Murphy T, Walters M, Anderson G, Crawford DG, Fletcher LM. Hepsidin is down-regulated in alcoholic liver injury: implications for the pathogenesis of alcoholic liver disease. *Alcohol Clin Exp Res*. 2006;30(1):106-12.
80. Fargion S, Fracanzani AL, Piperno A, Braga M, D'Alba R, Ronchi G, Fiorelli G. Prognostic factors for hepatocellular carcinoma in genetic hemochromatosis. *Hepatology*. 1994;20(6):1426-31.
81. Adams PC, Agnew S. Alcoholism in hereditary hemochromatosis revisited; prevalence and clinical consequences among homozygous siblings. *Hepatology*. 1996;23:724-7.
82. Fletcher LM, Dixon JL, Purdie DM, Powell LW, Crawford DH. Excess alcohol greatly increases the prevalence of cirrhosis in hereditary hemochromatosis. *Gastroenterology*. 2002;122:81-9.
83. Scotet V, Mérour MC, Mercier AY, Chanu B, Le Faou T, Raguénes O, Le Gac G, Mura C, Noursbaum JB, Férec C. Hereditary hemochromatosis: effect of excessive alcohol consumption on disease expression in patients homozygous for the C282Y mutation. *Am J Epidemiol*. 2003;158(2):129-34.
84. Lauret E, Rodríguez M, González S, Linares A, López-Vázquez A, Martínez-Borra J, Rodrigo L, López-Larrea C. HFE gene mutations in alcoholic and virus-related cirrhotic patients with hepatocellular carcinoma. *Am J Gastroenterol*. 2002;97(4):1016-21.
85. Alter MJ, Kruszon-Moran D, Nainan OV, McQuillan GM, Gao F, Moyer LA, Kaslow RA, Margolis HS. The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1988 through 1994. *N Engl J Med*. 1999;341(8):556-62.
86. Wasley A, Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C: geographic differences and temporal trends. *Semin Liver Dis* 2000;20:1-16.
87. Bellentani S, Tiribelli C, Saccoccio G, Sodde M, Fratti N, De Martin C, et al. Prevalence of chronic liver disease in the general population of northern Italy: the Dionysos Study. *Hepatology*. 1994;20:1442-9.
88. Guadagnino V, Stroffolini T, Rapicetta M, Costantino A, Kondili LA, Menniti-Ippolito F, Caroleo B, Costa C, Griffo G, Loiacono L, Pisani V, Focà A, Piazza M. Prevalence, risk factors, and genotype distribution of hepatitis C virus infection in the general population: a community-based survey in southern Italy. *Hepatology*. 1997;26:1006-1011.

89. Bonkovsky HL, Poh-Fitzpatrick M, Pimstone N, Obando J, Di Bisceglie A, Tattre C, Tortorelli K, LeClair P, Mercurio MG, Lambrecht RW. Porphyrria cutanea tarda, hepatitis C, and HFE gene mutations in North America. *Hepatology*. 1998;27:1661-9.
90. Lamoril J, Andant C, Bogard C, Puy H, Gouya L, Pawlotsky JM, Da Silva V, Soulé JC, Deybach JC, Nordmann Y. Epidemiology of hepatitis C and G in sporadic and familial porphyria cutanea tarda. *Hepatology*. 1998;27:848-52.
91. DeCastro M, Sánchez J, Herrera JF, Cháves A, Durán R, García-Buey L, García-Monzón C, Sequí J, Moreno-Otero R. Hepatitis C virus antibodies and liver disease in patients with porphyria cutanea tarda. *Hepatology*. 1993;17:551-7.
92. Parés A, Barrera JM, Caballería J, Ercilla G, Bruguera M, Caballería L, Castillo R, Rodés J. Hepatitis C virus antibodies in chronic alcoholic patients: association with severity of liver injury. *Hepatology*. 1990;12:1295-9.
93. Siegel LB, Eber BB. Porphyrria cutanea tarda remission. *Ann Intern Med*. 1994;121:308-9.
94. Takikawa H, Yamazaki R, Shoji S, Miyake K, Yamanaka M. Normalization of urinary porphyrin level and disappearance of skin lesions after successful interferon therapy in a case of chronic hepatitis C complicated with porphyria cutanea tarda. *J Hepatol*. 1995;22:249-50.
95. Okano J, Horie Y, Kawasaki H, Kondo M. Interferon treatment of porphyria cutanea tarda associated with chronic hepatitis type C. *Hepatogastroenterology*. 1997;44:525-8.
96. Sheikh MY, Wright RA, Burruss JB. Dramatic resolution of skin lesions associated with porphyria cutanea tarda after interferon-alpha therapy in a case of chronic hepatitis C. *Dig Dis Sci*. 1998;43:529-33.
97. Cribier B, Rey D, Uhl G, Le Coz C, Hirth C, et al. Abnormal urinary coproporphyrin levels in patients infected by hepatitis C virus with or without HIV. *Arch Dermatol*. 1996;132:1448-52.

-
98. Furuta M, Kaito M, Gabazza E, Fujita N, Ishida S, Tamaki S, Ikeda R, Wakisawa S, Hayashi H, Watanabe S, Adachi Y. Ineffective interferon treatment of chronic hepatitis C-associated porphyria cutanea tarda, but with a transient decrease in HCV RNA levels. *J Gastroenterol*. 2000;35:60-2.
 99. Gibson PR, Grant J, Cronin V, Blake D, Ratnaik S. Effect of hepatobiliary disease, chronic hepatitis C and hepatitis B virus infections and interferon-alpha on porphyrin profiles in plasma, urine and faeces. *J Gastroenterol Hepatol*. 2000;15:192-201.
 100. Jessner W, Der-Petrossian M, Christiansen L, Maier H, Steindl-Munda P, Gangl A, et al. Porphyria cutanea tarda during interferon/ ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2002;36:1301-2.
 101. Rosenberg W. Mechanisms of immune escape in viral hepatitis. *Gut*. 1999;44(5):759-64.
 102. Sampietro M, Fracanzani AL, Corbetta N, Amato M, Mattioli M, Molteni V, Fiorelli G, Fargion S. High prevalence of hepatitis C virus type 1b in Italian patients with Porphyria cutanea tarda. *Ital J Gastroenterol Hepatol*. 1997;29(6):543-7.
 103. Fujita N, Sugimoto R, Takeo M, Urawa N, Mifuji R, Tanaka H, Kobayashi Y, Iwasa M, Watanabe S, Adachi Y, Kaito M. Hcpidin expression in the liver: relatively low level in patients with chronic hepatitis C. *Mol Med*. 2007;13(1-2):97-104.
 104. Bonkovsky HL. Therapy of hepatitis C: other options. *Hepatology*. 1997;26(suppl 1):143S-151S.
 105. Hézode C, Cazeneuve C, Coué O, Roudot-Thoraval F, Lonjon I, Bastie A, Duvoux C, Pawlotsky JM, Zafrani ES, Amselem S, Dhumeaux D. Liver iron accumulation in patients with chronic active hepatitis C: prevalence and role of hemochromatosis gene mutations and relationship with hepatic histological lesions. *J Hepatol*. 1999; 31(6):979-84.
 106. Thorburn D, Curry G, Spooner R, Spence E, Oien K, Halls D, Fox R, McCrudden EA, MacSween RN, Mills PR. The role of iron and haemochromatosis gene mutations in the progression of liver disease in chronic hepatitis C. *Gut*. 2002;50(2):248-52.

107. Lebray P, Zylberberg H, Hue S, Poulet B, Carnot F, Martin S, Chretien Y, Pol S, Caillat-Zuckman S, Bréchet C, Nalpas B. Influence of HFE gene polymorphism on the progression and treatment of chronic hepatitis C. *J Viral Hepat.* 2004;11(2):175-82.
108. Stuart KA, Busfield F, Jazwinska EC, Gibson P, Butterworth LA, Cooksley WG, Powell LW, Crawford DH. The C282Y mutation in the haemochromatosis gene (HFE) and hepatitis C virus infection are independent cofactors for porphyria cutanea tarda in Australian patients. *J Hepatol.* 1998;28(3):404-9.
109. Toll A, Celis R, Ozalla MD, Bruguera M, Herrero C, Ercilla MG. The prevalence of HFE C282Y gene mutation is increased in Spanish patients with porphyria cutanea tarda without hepatitis C virus infection. *JEADV.* 2006;20:1201-6.
110. Chiavérini C, Halimi G, Ouzan D, Halfon P, Ortonne JP, Lacour JP. Porphyria cutanea tarda, C282Y, H63D and S65C HFE gene mutations and hepatitis C infection: a study from southern France. *Dermatology.* 2003;206(3):212-6.
111. Bonkovsky HL, Barnard GF. The Porphyrias. *Curr Treat Options. Gastroenterol.* 2000;3:487-500.
112. Bonkovsky HL, Mehta S. Hepatitis C: a review and update. *J Am Acad Dermatol.* 2001;44:159-82.
113. Flamm S, Chopra S. Porphyria cutanea tarda and hepatitis C virus infection. *UpToDate.* 2002;10:1-4.
114. Kawamura Y, Akuta N, Sezaki H, Hosaka T, Someya T, Kobayashi M, Suzuki F, Suzuki Y, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kumada H. Determinants of serum ALT normalization after phlebotomy in patients with chronic hepatitis C infection. *J Gastroenterol.* 2005;40(9):901-6.
115. Kato J, Miyanishi K, Kobune M, Nakamura T, Takada K, Takimoto R, Kawano Y, Takahashi S, Takahashi M, Sato Y, Takayama T, Niitsu Y. Long-term phlebotomy with low-iron diet therapy lowers risk of development of hepatocellular carcinoma from chronic hepatitis C. *J Gastroenterol.* 2007;42(10):830-6.
116. Alexander J, Tung BY, Croghan A, Kowdley KV. Effect of iron depletion on serum markers of fibrogenesis, oxidative stress and serum liver enzymes in chronic hepatitis C: results of a pilot study. *Liver Int.* 2007;27(2):268-73.

-
117. Price L, Kowdley KV. The role of iron in the pathophysiology and treatment of chronic hepatitis C. *Can J Gastroenterol*. 2009;23(12): 822-8.
 118. Wissel PS, Sordillo P, Anderson KE, Sassa S, et al. Porphyria cutanea tarda associated with the acquired immune deficiency syndrome. *Am J Hematol*. 1987;25:107-13.
 119. McAlister F, McCleon K, Hamilton PG, Houston S. Human immunodeficiency virus infection and porphyria cutanea tarda: coexistence of risk factors or causative association? *Clin Infect Dis*. 1995;20:348-51.
 120. Castanet J, Lacour JP, Bodokh I, Bekri S, Ortonne JP. Porphyria cutanea tarda in association with human immunodeficiency virus infection: is it related to hepatitis C virus infection? *Arch Dermatol*. 1994;130:664-5.
 121. Mansourati FF, Stone VE, Mayer KH. Porphyria cutanea tarda and HIV/AIDS: a review of pathogenesis, clinical manifestations and management. *Int J STD AIDS*. 1999;10(1):51-6.
 122. Bulaj ZJ, Franklin MR, Phillips JD, Miller KL, Bergonia HA, Ajioka RS, Griffen LM, Guinee DJ, Edwards CQ, Kushner JP. Transdermal estrogen replacement therapy in postmenopausal women previously treated for porphyria cutanea tarda. *J Lab Clin Med*. 2000;136(6):482-8. (a)
 123. Levere RD. Stilbestrol-induced porphyria: Increase in hepatic δ -aminolevulinic acid synthetase. *Blood*. 1966;28(4):569-72.
 124. Rifkind AB, Gilette PN, Song CS, Kappas A. Induction of hepatic delta-aminolevulinic acid synthetase by oral contraceptive steroids. *J Clin Endocrinol Metab*. 1970;30:330-5.
 125. Haberman HF, Rosenberg F, Menon IA. Porphyria cutanea tarda: comparison of cases precipitated by alcohol and estrogens. *Can Med Assoc J*. 1975;113:653-5.
 126. Urbanek RW, Cohen DJ. Porphyria cutanea tarda: pregnancy versus estrogen effect. *J Am Acad Dermatol*. 1994;31(2 Pt 2):390-2.
 127. Stevens BR, Fleischer AB Jr, Piering F, Crosby DL. Porphyria cutanea tarda in the setting of renal failure: response to renal transplantation. *Arch Dermatol*. 1993;129:337-9.

128. Garcia Parrilla J, Ortega R, Pena ML, Rodicio JL, Salamanca RE, Olmos A, Elder GH. Porphyria cutanea tarda during maintenance haemodialysis. *Br Med J*. 1980;280:1358.
129. Siersema PD, de Rooij FW, Edixhoven-Bosdijk A, Weimar W, Wilson JHP. Heme synthesis in chronic renal failure: The effects of hemodialysis, peritoneal dialysis and erythropoietin treatment. *Nephron*. 1995;71:297-302. (b)
130. Gebril M, Weinkove C, Ead R, McDonald K, Morton R. Plasma porphyrins in chronic renal failure. *Nephron*. 1990;55:159-63.
131. Elder GH, Path MRC, Lee GB, Tovey JA. Decreased activity of hepatic uroporphyrinogen decarboxylase in sporadic porphyria cutanea tarda. *N Engl J Med*. 1978;299:274-8.
132. Poh-Fitzpatrick MB. Porphyria, pseudoporphyria, pseudo-pseudoporphyria...? *Arch Dermatol*. 1986;122:403-4.
133. Dabski C, Beutner EH. Studies of laminin and type IV collagen in blisters of porphyria cutanea tarda and drug-induced pseudoporphyria. *J Am Acad Dermatol*. 1991;25:28-32.
134. Hrabovsky SL, Elmetts CA. Pathogenesis, characteristics, diagnosis, and treatment of pseudoporphyria. *Curr Opin Dermatol*. 1996;3:105-10.
135. Ramsay CA. Drug induced pseudoporphyria. *J Rheumatol*. 1991;18:799-800.
136. Varma S, Lanigan SW. Pseudoporphyria caused by nabumetone. *Br J Dermatol*. 1998;138:549-50.
137. Gilchrist B, Rowe JW, Mihm MC Jr. Bullous dermatosis of hemodialysis. *Ann Intern Med*. 1975;83:480-3.
138. Korting GW. Über Porphyria-cutanea tarda-artige Hautveränderungen bei Langzeithämodialysepatienten. *Dermatologica*. 1975;150:58-61.
139. Anderson CD, Gibson IM, Rossi E. Actinic damage in the skin of patients on haemodialysis for chronic renal failure. *Photodermatol*. 1988;5:15-24.
140. Day RS, Eales L. Porphyrins in chronic renal failure. *Nephron* 1980; 26: 90-95.

141. Albitar S, Bourgeon B, Chuet C. Porphyrria cutanea tarda, hepatitis C infection, and iron overload in a patient on hemodialysis. *Am J Med.* 1999;106(2):266-7.
142. Clemmensen O, Thomsen K. Porphyrria Cutanea Tarda and Systemic Lupus Erythematosus. *Arch Dermatol.* 1982;118:160-2.
143. Fracanzani AL, Taioli E, Sampietro M, Fatta E, Bertelli C, Fiorelli G, Fargion S. Liver cancer risk is increased in patients with porphyria cutanea tarda in comparison to matched control patients with chronic liver disease. *J Hepatol.* 2001; 35(4):498-503.
144. Maier JM, Ungaro PC. Porphyrria cutanea tarda in association with multiple myeloma. *N C Med J.* 1984;45(10):638-9.
145. Granel B, Serratrice J, Bouabdallah R, Pache X, Weiller-Merli C, Swiader L, Aquaron R, Disdier P, Nordmann Y, Weiller PJ. Atypical porphyria cutanea tarda in a patient with chronic myelogenous leukemia. *Dermatology.* 2001;203(1):82-3.
146. Roberts AG, Whatley SD, Morgan RR, Worwood M, Elder GH. Increased frequency of the haemochromatosis Cys282Tyr mutation in sporadic porphyria cutanea tarda. *Lancet.* 1997;349(9048):321-3.
147. Brady JJ, Jackson HA, Roberts AG, Morgan RR, Whatley SD, Rowlands GL, Darby C, Shudell E, Watson R, Paiker J, Worwood MW, Elder GH. Co-inheritance of mutations in the uroporphyrinogen decarboxylase and hemochromatosis genes accelerates the onset of porphyria cutanea tarda. *J Invest Dermatol.* 2000;115(5):868-74.
148. Mehrany K, Drage LA, Brandhagen DJ, Pittelkow MR. Association of porphyria cutanea tarda with hereditary hemochromatosis. *J Am Acad Dermatol.* 2004;51(2):205-11.
149. Muñoz-Santos C, Guilabert A, Moreno N, Gimenez M, Darwich E, To-Figueras J, Herrero C. The association between porphyria cutanea tarda and diabetes mellitus: analysis of a long-term follow-up cohort. *Br J Dermatol.* 2011;165(3):486-91.
150. van Ginneken EE, Lutterman JA, Netten PM. Diabetes mellitus in connection with hereditary disease. *Ned Tijdschr Geneesk.* 1997; 141:1230-4.

151. Linet MS, Gridley G, Nyrén O, Møller J, Olsen JH, Keehn S, Adami HO, Fraumeni JF Jr. Primary liver cancer, other malignancies, and mortality risks following porphyria: a cohort study in Denmark and Sweden. *Am J Epidemiol.* 1999;149(11):1010-5.
152. Gisbert JP, García-Buey L, Alonso A, Rubio S, Hernández A, Pajares JM, García-Díez A, Moreno-Otero R. Hepatocellular carcinoma risk in patients with porphyria cutanea tarda. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2004;16:689-92.
153. Carrilho FJ, Kikuchi L, Branco F, Gonçalves CS, Mattos AA; Brazilian HCC Study Group. Clinical and epidemiological aspects of hepatocellular carcinoma in Brazil. *Clinics (Sao Paulo).* 2010;65(12):1285-90.
154. Bengtsson NO, Hardell L. Porphyrins, porphyrins and hepatocellular cancer. *Br J Cancer.* 1986;54:115-7.
155. Salata H, Cortes JM, Enriquez de Salamanca R, Oliva H, Castro A, Kusak E, Carreno V, Hernandez Guio C. Porphyrin cutanea tarda and hepatocellular carcinoma. Frequency of occurrence and related factors. *J Hepatol.* 1985;1(5):477-87.
156. Lim HW, Mascaro JM. The porphyrias and hepatocellular carcinoma. *Dermatol Clin.* 1995;13:135-42.
157. Moreno FJ, Santoyo J, Bondia JA, Suarez MA, Jimenez M, Fernandez JL et al. Hepatocellular carcinoma associated to porphyria cutanea tarda and hepatitis C virus infection without cirrhosis. *Rev Esp Enferm Dig.* 1998;90(1):48-50.
158. Siersema PD, ten Kate FJW, Mulder PGH, Wilson JHP. Hepatocellular carcinoma in porphyria cutanea tarda: frequency and factors related to its occurrence. *Liver.* 1992;12:56-61.
159. Feder JN, Gnirke A, Thomas W, Tsuchihashi Z, Ruddy DA, Basava A, Dormishian F, Domingo R Jr, Ellis MC, Fullan A, Hinton LM, Jones NL, Kimmel BE, Kronmal GS, Lauer P, Lee VK, Loeb DB, Mapa FA, McClelland E, Meyer NC, Mintier GA, Moeller N, Moore T, Morikang E, Prass CE, Quintana L, Starnes SM, Schatzman RC, Brunke KJ, Drayna DT, Risch NJ, Bacon BR, Wolff RK. A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary hemochromatosis. *Nat Genetics.* 1996;13:399-408.

-
160. Batts KP. Iron overload syndromes and the liver. *Mod Pathol*. 2007;20 (Suppl 1):S31-9.
 161. Bacon BR, Powell LW, Adams PC, Kresina TF, Hoofnagle JH. Molecular medicine and hemochromatosis: at the crossroads. *Gastroenterology*. 1999;116:193-207.
 162. Adams PC, Reboussin DM, Barton JC, McLaren CE, Eckfeldt JH, McLaren GD, Dawkins FW, Acton RT, Harris EL, Gordeuk VR, Leiendecker-Foster C, Speechley M, Snively BM, Holup JL, Thomson E, Sholinsky P. Hemochromatosis and Iron Overload Screening (HEIRS) Study Research Investigators. Hemochromatosis and iron-overload screening in a racially diverse population. *N Engl J Med*. 2005;352(17):1769-78.
 163. Agostinho MF, Arruda VR, Basseres DS, Bordin S, Soares MC, Menezes RC, Costa FF, Saad ST. Mutation analysis of the HFE gene in Brazilian populations. *Blood Cells Mol Dis*. 1999;25(5-6):324-7.
 164. Bonini-Domingos CR. Hemocromatose hereditária e as mutações no gene HFE. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2006;28(4):239-45.
 165. Yen AW, Fancher TI, Bowlus CL. Revisiting hereditary hemochromatosis: current concepts and progress. *Am J Med*. 2006;119:391-9.
 166. Muñoz M, Villar I, García-Erce JA. An update on iron physiology. *World J Gastroenterol*. 2009;15(37):4617-26.
 167. Wessling-Resnic M. Iron Imports III. Transfer of iron from the mucosa into circulation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006;290:G1–G6.
 168. Ganz T, Nemeth E. Iron Imports IV. Hepcidin and regulation of body iron metabolism. *Am J Physiol Gastrointestinal Liver Physiol*. 2006; 290:G199–G203.
 169. Atanasiu V, Manolescu B, Stoian I. Hepcidin--central regulator of iron metabolism. *Eur J Haematol*. 2007;78(1):1-10.
 170. Pietrangelo A, Trautwein C. Mechanisms of disease: the role of hepcidin in iron homeostasis—implications for hemochromatosis and other disorders. *Nat Clin Prac Gastroenterol Hepatol*. 2004;1:39-45.

171. Fleming RE, Britton RS, Waheed A, Sly WS, Bacon BR. Pathogenesis of hereditary hemochromatosis. *Clin Liver Dis.* 2004;8:755-73.
172. Waheed A, Parkkila S, Zhou XY, Tomatsu S, Tsuchihashi Z, Feder JN, Schatzman RC, Britton RS, Bacon BR, Sly WS. Hereditary hemochromatosis: Effects of C282Y and H63D mutations on association with b2-microglobulin, intracellular processing, and cell surface expression of the HFE protein in COS-7 cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997;94:12384-9.
173. Feder JN, Penny DM, Irrinki A, Lee VK, Lebron JA, Watson N, Tsuchihashi Z, Sigal E, Bjorkman PJ, Schatzman RC. The hemochromatosis gene product complexes with the transferrin receptor and lowers its affinity for ligand binding. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(4):1472-7.
174. Merryweather-Clarke AT, Pointon JJ, Jouanolle AM, Rochette J, Robson KJ. Geography of HFE C282Y and H63D mutations. *Genet Test.* 2000;4(2):183-98.
175. Fairbanks VF, Brandhagen DJ, Thibodeau SN, Snow K, Wollan PC. H63D is an haemochromatosis associated allele. *Gut.* 1998;43(3):441-2.
176. Brandhagen DJ, Fairbanks VF, Baldus WP, Smith CI, Kruckeberg KE, Schaid DJ, Thibodeau SN. Prevalence and clinical significance of HFE gene mutations in patients with iron overload. *Am J Gastroenterol.* 2000;95(10):2910-4.
177. de Diego C, Opazo S, Murga MJ, Martínez-Castro P. H63D homozygotes with hyperferritinaemia: Is this genotype, the primary cause of iron overload? *Eur J Haematol.* 2007 Jan;78(1):66-71. Epub 2006 Oct 17.
178. Aguilar-Martinez P, Bismuth M, Picot MC, Thelcide C, Pageaux GP, Blanc F, Blanc P, Schved JF, Larrey D. Variable phenotypic presentation of iron overload in H63D homozygotes: are genetic modifiers the cause? *Gut.* 2001;48(6):836-42.
179. Samarasena J, Winsor W, Lush R, Duggan P, Xie Y, Borgaonkar M. Individuals homozygous for the H63D mutation have significantly elevated iron indexes. *Dig Dis Sci.* 2006; 51: 803-7.

180. Sebastiani G, Wallace DF, Davies SE, Kulhalli V, Walker AP, Dooley JS. Fatty liver in H63D homozygotes with hyperferritinemia. *World J Gastroenterol*. 2006;12:1788–92.
181. de Diego C, Opazo S, Murga MJ, Martínez-Castro P. H63D homozygotes with hyperferritinaemia: Is this genotype, the primary cause of iron overload? *Eur J Haematol*. 2007;78(1):66-71.
182. Mura C, Ragueneas O. HFE mutations analysis in 711 hemochromatosis probands: evidence for S65C implication in mild form of hemochromatosis. *Blood*. 1999;93:2502–5.
183. Castiella A, Zapata E, de Juan MD, Otazua P, Fernandez J, Zubiaurre L, Arriola JA. Significance of H63D homozygosity in a Basque population with hemochromatosis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2010;25: 1295-8.
184. Deugnier YM, Guyader D, Crantock L, Lopez JM, Turlin B, Yaouanq J, Jouanolle H, Campion JP, Launois B, Halliday JW, et al. Primary liver cancer in genetic hemochromatosis: a clinical, pathogenetic study of 54 cases. *Gastroenterology*. 1993;104:228-34.
185. Niederau C, Fischer R, Pürschel A, Stremmel W, Häussinger D, Strohmeyer G. Long-term survival in patients with hereditary hemochromatosis. *Gastroenterology*. 1996;110(4):1107-19.
186. Ko C, Siddaiah N, Berger J, Gish R, Brandhagen D, Sterling RK, Cotler SJ, Fontana RJ, McCashland TM, Han SH, Gordon FD, Schilsky ML, Kowdley KV. Prevalence of hepatic iron overload and association with hepatocellular cancer in end-stage liver disease: results from the National Hemochromatosis Transplant Registry. *Liver Int*. 2007;27(10):1394-401.
187. Powell EE, Ali A, Clouston AD, Dixon JL, Lincoln DJ, Purdie DM, Fletcher LM, Powell LW, Jonsson JR. Steatosis is a cofactor in liver injury in hemochromatosis. *Am J Gastroenterol*. 2005;129:1937-43.
188. Axford JS. Rheumatic manifestations of haemochromatosis. *Baillieres Clin Rheumatol*. 1991;5(2):351-65.
189. Roetto A, Camaschella C. New insights into iron homeostasis thought the study of non-HFE hereditary haemochromatosis. *Best Practice Res Clin Haematol*. 2005;18:235-50.

190. Weinberg ED. Role of iron in osteoporosis. *Pediatr Endocrinol Rev.* 2008;6(Suppl 1):81-5.
191. Gerhard GS, Levin KA, Goldstein JP, Wojnar MM, Chorney MJ, Belchis DA. *Vibrio vulnificus* septicemia in a patient with the hemochromatosis HFE C282Y mutation. *Arch Pathol Lab Med.* 2001; 125(8):1107-9.
192. Bacon BR. Hemochromatosis: diagnosis and management. *Gastroenterology.* 2001;120(3):718-25.
193. Bodmer JG, Marsh SG, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Charron D, Dupont B, Erlich HA, Fauchet R, Mach B, Mayr WR, Parham P, Sasazuki T, Schreuder GM, Strominger JL, Svejgaard A, Terasaki PI. Nomenclature for factors of the HLA system, 1996. *Vox Sang.* 1997; 73(2):105-30.
194. Hanson EH, Imperatore G, Burke W. HFE gene and hereditary hemochromatosis: a HuGE review. *Human Genome Epidemiology. Am J Epidemiol.* 2001;154(3):193-206.
195. Pointon JJ, Wallace D, Merryweather-Clarke AT, Robson KJ. Uncommon mutations and polymorphisms in the hemochromatosis gene. *Genetic Test* 2000;4:151-61.
196. Gochee PA, Powell LW, Cullen DJ, Du Sart D, Rossi E, Olynyk JK. A population based study of the biochemical and clinical expression of the H63D hemochromatosis mutation. *Gastroenterology.* 2002;122: 646-51.
197. Frank J, Poblete-Gutiérrez P, Weiskirchen R, Gressner O, Merk HF, Lammert F. Hemochromatosis gene sequence deviations in German patients with porphyria cutanea tarda. *Physiol Res.* 2006;55 Suppl 2:S75-83.
198. Simonsen K, Dissing J, Rudbeck L, Schwartz M. Rapid and simple determination of hereditary haemochromatosis mutations by multiplex PCR-SSCP: detection of a new polymorphic mutation. *Ann Hum Genet.* 1999;63(Pt 3):193-7.
199. Beutler E, Felitti VJ, Ho NJ, Gelbart T. Commentary on HFE S65C variant is not associated with increased transferrin saturation in voluntary blood donors by Naveen Arya, Subrata Chakrabarti, Robert A. Hegele, Paul C. Adams. *Blood Cells Mol Dis.* 1999;25(5-6):358-60.

200. Bueno S, Duch CR, Figueiredo MS. Mutations in the HFE gene (C282Y, H63D, S65C) in a Brazilian population. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2006;28(4):293-5.
201. Oliveira TM, Souza FP, Jardim AC, Cordeiro JA, Pinho JR, Sitnik R, Estevão IF, Bonini-Domingos CR, Rahal P. HFE gene mutations in Brazilian thalassemic patients. *Braz J Med Biol Res*. 2006;39(12):1575-80.
202. Cançado RD, Guglielmi ACO, Vergueiro CSV, Rolim EG, Figueiredo MS, Chiattoni CS. Analysis of HFE gene mutations and HLA-A alleles in Brazilian patients with iron overload. *Sao Paulo Med J*. 2006;124(2):55-60.
203. Cançado RD, Guglielmi ACO, Vergueiro CSV, Rolim EG, Figueiredo MS, Chiattoni CS. Estudo das mutações C282Y, H63D e S65C do gene HFE em doentes brasileiros com sobrecarga de ferro. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2007;29(4):351-60.
204. Lebrón JA, Bennett MJ, Vaughn DE, Chirino AJ, Snow PM, Mintier GA, Feder JN, Bjorkman PJ. Crystal structure of the hemochromatosis protein HFE and characterization of its interaction with transferrin receptor. *Cell*. 1998;93(1):111-23.
205. Ayonrinde OT, Olynyk JK. Clinical expression of hemochromatosis gene (HFE) variants. *Hepatology*. 2007;46(4):960-2.
206. Ferreira ACS, Oliveira VC, Caxito FA, Gomes KB, Castro AM, Pardini VC. Prevalence of C282Y and H63D mutations in the HFE gene of Brazilian individuals with clinical suspicion of hereditary hemochromatosis. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2008;30(5):379-83.
207. Aquilar-Martinez P, Schved JF, Brissot P. The evaluation of hyperferritinemia: an updated strategy based on advances in detecting genetic abnormalities. *Am J Gastroenterol*. 2005;100:1185-94.
208. Levy JE, Montross LK, Andrews NC. Genes that modify the hemochromatosis phenotype in mice. *J Clin Invest*. 2000;105:1209-16.
209. Brissot P, Troadec MB, Loreal O. The clinical relevance of new insights in iron transport and metabolism. *Curr Haematol Rep*. 2004;3:107-15.
210. Waalen J, Nordestgaard BG, Beutler E. The penetrance of hereditary hemochromatosis. *Best Practice Res*. 2005; 18:203-20.

-
211. Beutler E, Felitti VJ, Koziol JA, Ho NJ, Gelbart T. Penetrance of 845G->A (282Y) HFE hereditary haemochromatosis mutation in the USA. *Lancet*. 2002;359:211-8.
 212. Bassett ML, Halliday JW, Powell LW. Value of hepatic iron measurements in early hemochromatosis and determination of the critical iron level associated with fibrosis. *Hepatology*. 1986;6:24-9.
 213. Burke W, Thomson E, Khoury MJ, McDonnell SM, Press N, Adams PC, Barton JC, Beutler E, Brittenham G, Buchanan A, Clayton EW, Cogswell ME, Meslin EM, Motulsky AG, Powell LW, Sigal E, Wilfond BS, Collins FS. Hereditary hemochromatosis: gene discovery and its implications for population-based screening. *JAMA*. 1998;280:172-8.
 214. Brissot P, de Bels F. Current approaches to the management of hemochromatosis. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2006:36-41.
 215. Tavill AS. American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, American Gastroenterological Association. Diagnosis and management of hemochromatosis. *Hepatology*. 2001;33:1321-8.
 216. Lyon E, Frank EL. Hereditary hemochromatosis since discovery of the HFE gene. *Clin Chem*. 2001;47:1147-56.
 217. Clark P, Britton LJ, Powell LW. The diagnosis and management of hereditary haemochromatosis. *Clin Biochem Rev*. 2010;31(1):3-8.
 218. Gandon Y, Olivie D, Guyader D, Aubé C, Oberti F, Sebillé V, Deugnier Y. Non-invasive assessment of hepatic iron stores by MRI. *Lancet*. 2004;363(9406):357-62.
 219. Beutler E, Felitti V, Gelbart T, Ho N. The effect of HFE genotypes on measurements of iron overload in patients attending a health appraisal clinic. *Ann Intern Med*. 2000;133:329-37.
 220. Waalen J, Felitti V, Gelbart T, Ho NJ, Beutler E. Prevalence of hemochromatosis-related symptoms among individuals with mutations in the HFE gene. *Mayo Clin Proc*. 2002;77(6):522-30.
 221. Olynyk JK, Hagan SE, Cullen DJ, Beilby J, Whittall DE. Evolution of untreated hereditary hemochromatosis in the Busselton population: A 17-year study. *Mayo Clin Proc* 2004;79:309-313.

-
222. Nielsen P, Fischer R, Buggisch P, Janka-Schaub G. Effective treatment of hereditary haemochromatosis with desferrioxamine in selected cases. *Br J Haematol*. 2003;123(5):952-3.
 223. Adams PC, Barton JC. How I treat hemochromatosis. *Blood*. 2010; 116(3): 317-25.
 224. Bacon BR, Olynyk JK, Brunt EM, Britton RS, Wolff RK. HFE genotype in patients with hemochromatosis and other liver diseases. *Ann Intern Med*. 1999;130:953-62.
 225. Celec P. Hemojuvelin: a supposed role in iron metabolism one year after its discovery. *J Mol*. 2005;83:521-525.
 226. Whittington PF. Fetal and infantile hemochromatosis. *Hepatology*. 2006;43:654-60.
 227. Duane P, Raja KB, Simpson RJ, Peters TJ. Intestinal iron absorption in chronic alcoholics. *Alcohol Alcoholism*. 1992;27:539-44.
 228. LeSage GD, Baldus WP, Fairbanks VF, Baggenstoss AH, McCall JT, Moore SB, Taswell HF, Gordon H. Hemochromatosis: genetic or alcohol-induced? *Gastroenterology*. 1983;84(6):1471-7.
 229. Irving MG, Halliday JW, Powell LW. Association between alcoholism and increased hepatic iron stores. *Alcohol Clin Exp Res*. 1988;12(1):7-13.
 230. Fabris C, Toniutto P, Scott CA, Falletti E, Avellini C, Del Forno M, Mattiuzzo M, Branca B, Pirisi M. Serum iron indices as a measure of iron deposits in chronic hepatitis C. *Clin Chim Acta*. 2001;304:49-55.
 231. Yano M, Hayashi H, Wakusawa S, Sanae F, Takikawa T, Shiono Y, Arao M, Ukai K, Ito H, Watanabe K, Yoshioka K. Long term effects of phlebotomy on biochemical and histological parameters of chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol*. 2002;97:133-7.
 232. Hofer H, Osterreicher C, Jessner W, et al. Hepatic iron concentration does not predict response to standard and pegylated-IFN/ribavirin therapy in patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol*. 2004;40:1018-22.

-
233. D'Amato M, Macrí A, Griso D, Biolcati G, Ameglio F. Are His63Asp or Cys282Tyr HFE mutations associated with porphyria cutanea tarda? Data of patients from central and southern Italy. *J Invest Dermatol*. 1998;111(6):1241-2.
234. Tannapfel A, Stölzel U, Köstler E, Melz S, Richter M, Keim V, Schuppan D, Wittekind C. C282Y and H63D mutation of the hemochromatosis gene in German porphyria cutanea tarda patients. *Virchows Arch*. 2001;439(1):1-5.
235. Stölzel U, Köstler E, Schuppan D, Richter M, Wollina U, Doss MO, Wittekind C, Tannapfel A. Hemochromatosis (HFE) gene mutations and response to chloroquine in porphyria cutanea tarda. *Arch Dermatol*. 2003;139:309-13.
236. Skowron F, Berard F, Grezard P, Wolf F, Morel Y, Perrot H. Role of the hemochromatosis gene in porphyria cutanea tarda. Prospective study of 56 cases. *Ann Dermatol Venereol*. 2001;128:600-4.
237. Dereure O, Aguilar-Martinez P, Bessis D, Perney P, Vallat C, Guillot B, Blanc F, Guilhou JJ. HFE mutations and transferrin receptor polymorphism analysis in porphyria cutanea tarda: a prospective study of 36 cases from southern France. *Br J Dermatol*. 2001;144(3):533-9.
238. Martinelli AL, Zago MA, Roselino AM, Filho AB, Villanova MG, Secaf M, Tavella MH, Ramalho LN, Zucoloto S, Franco RF. Porphyria cutanea tarda in Brazilian patients: association with hemochromatosis C282Y mutation and hepatitis C virus infection. *Am J Gastroenterol*. 2000;95(12):3516-21.
239. Enriquez de Salamanca R, Morales P, Castro MJ, Rojo R, González M, Arnaiz-Villena A. The most frequent HFE allele linked to porphyria cutanea tarda in mediterraneans is His63Asp. *Hepatology*. 1999;30: 819-20.
240. Wolff CF, Armas RM, Frank J, Poblete PG. Mutations of hemochromatosis gene in volunteer blood donors and Chilean porphyria cutanea tarda patients. *Medicina (B Aires)*. 2006;66(5):421-6.
241. Ivanova A, von Ahsen N, Adjarov D, Krastev Z, Oellerich M, Wieland E. C282 Y and H63D Mutations in the HFE Gene Are Not Associated With Porphyria Cutanea Tarda in Bulgaria. *Hepatology*. 1999; 30(6): 1531-2.

-
242. Toll A, Celis R, Ozalla MD, Ercilla MG, Herrero C. Haemochromatosis gene mutations and response to chloroquine in sporadic porphyria cutanea tarda. *Acta Derm Venereol*. 2006;86(3):279-80.
243. Sampietro M, Piperno A, Lupica L, Arosio C, Vergani A, Corbetta N, Malosio I, Mattioli M, Fracanzani AL, Cappellini MD, Fiorelli G, Fargion S. High prevalence of the His63Asp HFE mutation in Italian patients with porphyria cutanea tarda. *Hepatology*. 1998;27:181-4.
244. Smith BC, Gorve J, Guzail MA, Day CP, Daly AK, Burt AD, Bassendine MF. Heterozygosity for hereditary hemochromatosis is associated with more fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology*. 1998;27(6):1695-9.
245. Malina L, Stransky J, Zdarsky E. Geographical differences in prevalence of hepatitis C virus infection in PCT (porphyria cutanea tarda). *Br J Dermatol*. 1997;136:291-2.
246. Fargion S, Fracanzani AL, Romano R, Cappellini MD, Faré M, Mattioli M, Piperno A, Guido R, Gemino F. Genetic hemochromatosis in Italian patients with porphyria cutanea tarda: possible explanation for iron overload. *J Hepatol*. 1996;24(5):564-9.
247. Sampietro M, Fiorelli G, Fargion S. Iron overload in porphyria cutanea tarda. *Haematologica*. 1999;84(3):248-53.
248. Rossmann-Ringdahl I, Olsson R. Porphyria cutanea tarda: effects and risk factors for hepatotoxicity from high-dose chloroquine treatment. *Acta Derm Venereol*. 2007;87(5):401-5.
249. Topi GC, Amantea A, Griseo D. Recovery from porphyria cutanea tarda with no specific therapy other than avoidance of hepatic toxins. *Br J Dermatol*. 1984;111:75-82.
250. Mascaro JM, Herrero C. New reasons for an archaic treatment - Phlebotomy in Sporadic Porphyria Cutanea Tarda. *Arch Dermatol*. 2003;139:379-80.
251. Mathews-Roth MM. Treatment of cutaneous porphyrias. *Clin Dermatol*. 1998;16(2):295-8.
252. Sassa S. Modern diagnosis and management of the porphyrias. *Br J Haematol*. 2006 Nov;135(3):281-92. Epub 2006 Sep 4. Review.

-
253. London ID. Porphyria cutanea tarda: report of a case successfully treated with chloroquine. *Arch Dermatol*. 1957;57:801-3.
 254. Taljaard JJF, Shanley BC, Stewart-Wynne EG, Deppe WM, Joubert SM. Studies on low dose chloroquine therapy and the action of chloroquine in symptomatic porphyria. *Br J Dermatol*. 1972;87:261-9.
 255. Kordac V, Martásek P, Kaláb M, Semrádová M, Papezová R. Chloroquine in the treatment of porphyria cutanea tarda symptomatica. Twelve years of experience in 307 patients (author's transl). *Cas Lek Cesk*. 1981;120(40):1225-7. Czech.
 256. Malina L, Chlumsky J. A comparative study of the results of phlebotomy therapy and low-dose chloroquine treatment in porphyria cutanea tarda. *Acta Dermatovenereol (Stockh)*. 1981;61:346-50.
 257. Ashton RE, Hawk JLM, Magnus IA. Low-dose oral chloroquine in the treatment of porphyria cutanea tarda. *Br J Dermatol*. 1984;111:609-13.
 258. Köstler E, Pollack P, Seebacher C, Riedel H. Iron metabolism and chloroquine phosphate therapy in porphyria cutanea tarda. *Z Hautkr*. 1990;65:1030-2.
 259. Valls V, Ena J, Enriquez de Salamanca R. Low-dose oral chloroquine in patients with porphyria cutanea tarda and low-moderate iron overload. *J Dermatol Sci*. 1994;7:164-75.
 260. Liu AC. Hepatotoxic reaction to chloroquine phosphate in a patient with previously unrecognized porphyria cutanea tarda. *West J Med*. 1995;162:548-51.
 261. Freesemann A, Frank M, Sieg I, Doss MO. Treatment of porphyria cutanea tarda by the effect of chloroquine on the liver. *Skin Pharmacol*. 1995;8:156-61.
 262. Kordac V, Jirsa M, Kotal P, Kaláb M, Cervinka J, Kotyk A, Martásek P. Agents affecting porphyrin formation and secretion: implications for porphyria cutanea treatment. *Semin Hematol*. 1989;26(1):16-23.
 263. Chlumska A, Chlumska J, Malina L. Liver changes in porphyria cutanea tarda patients treated with chloroquine. *Br J Dermatol*. 1980;102:261-6.

-
264. Wollina U, Köstler E, Koch A, Riedel H, Stölzel U. Does chloroquine therapy of porphyria cutanea tarda influence liver pathology? *Int J Dermatol*. 2009;48:1250-3.
265. Legssyer R, Ward RJ, Crichton RR, Boelaert JR. Effect of chronic chloroquine administration on iron loading in the liver and reticuloendothelial system and on oxidative responses by the alveolar macrophages. *Biochem Pharmacol*. 1999; 57: 907-11.
266. Chinarro S, de Salamanca RE, Perpiñá J, Muñoz JJ, Peña ML. Studies on in vitro formation of complexes between porphyrins and chloroquine. *Biochem Int*. 1983;6(4):565-8.
267. Egger NG, Goeger DE, Anderson KE. Effects of chloroquine in hematoporphyrin-treated animals. *Chemico-Biological interactions*. 1996;102(2):69-78.
268. Kotal P, Kotyk A. Exocytosis as a possible mechanism for the secretion of coproporphyrin from a chloroquine-treated yeast. *Eur J Pharmacol*. 1988;18:155(3):301-3.
269. Kotal P, Vernerová J, Jirsa M, Kordac V. The influence of chloroquine on the formation of porphyrins by yeasts. *Int J Biochem*. 1984;16(10):1087-90.
270. Kotal P, Kotyk A, Jirsa M, Kordac V. Effect of chloroquine on membrane permeability in yeast--release of cellular coproporphyrin. *Int J Biochem*. 1988;20(5):539-42.
271. Goerz G, Bolsen K, Merk H. Influence of chloroquine on the porphyrin metabolism. *Arch Dermatol Res*. 1985;277(2):114-7.
272. Kalia S, Dutz JP. New concepts in antimalarial use and mode of action in dermatology. *Dermatologic Therapy*. 2007;20:160-74.
273. Seubert S, Seubert A, Stella AM, Guzman H, Batlle A. Results of treatment of porphyria cutanea tarda with bloodletting and chloroquine. *Z Hautkr*. 1990;65(3):223-5.
274. Malkinson FD, Levitt L. Hydorxychloroquine treatment of porphyria cutanea tarda. *Arch Dermatol*. 1980;116(10):1147-50.

-
275. Cainelli T, Di Padova C, Marchesi L, Gori G, Rovagnati P, Podenzani SA, Bessone E, Cantoni L. Hydorxychloroquine versus phlebotomy in treatment of porphyria cutanea tarda. *Br J Dermatol.* 1983;108:593-600.
276. Rocchi E, Gilbertini P, Cassanelli M. Iron removal therapy in porphyria cutanea tarda: Phlebotomy versus slow subcutaneous desferrioxamine infusion. *Br J Dermatol.* 1986;114:621-9.
277. Monastirli A, Georgiou S, Bolsen K, Pasmatzis E, Papapanagiotou A, Goerz G, Kalofoutis A, Merk HF, Tsambaos D. Treatment of porphyria cutanea tarda with oral thalidomide. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol.* 1999;12(6):305-11.
278. Gross U, Hoffmann GF, Doss MO. Erythropoietic and hepatic porphyrias. *J Inher Metab Dis.* 2000;23(7): 641-61.
279. Sarkany RPE. Making sense of the porphyrias. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2008;24:102-8.
280. Pereira AC, Mota GF, Krieger JE. Hemochromatosis gene variants in three different ethnic populations: effects of admixture for screening programs. *Hum Biol.* 2001;73(1):145-51.
281. Magnus IA. Appendix II - Clinical Screening tests for excess porphyrins. In: *Dermatological Photobiology. Clinical and Experimental Aspects.* London: Blackwell Scientific Publications; 1976. p. 253-255.
282. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987;162(1):156-9.
283. Brunsting LA, Mason HL, Aldrich RA. Adult form of chronic porphyria with cutaneous manifestations. Report of seventeen additional cases. *J Am Med Assoc.* 1951;146(13):1207-12.
284. Ferreira CT, Silveira TR. Hepatites virais: aspectos da epidemiologia e da prevenção. *Rev Bras Epidemiol.* 2004;7(4): 473-87 .
285. Roengk HH Jr, Gottlob ME. Estrogen-induced porphyria cutanea tarda. Report of three cases. *Arch Dermatol.* 1970;102(3):260-6.

286. Martinelli AL, Franco RF, Villanova MG, Figueiredo JF, Secaf M, Tavella MH, Ramalho LN, Zucoloto S, Zago MA. Are haemochromatosis mutations related to the severity of liver disease in hepatitis C virus infection? *Acta Haematol.* 1999;102(3):152-6.
287. Calado RT, Franco RF, Pazin-Filho A, Simões MV, Marin-Neto JA, Zago MA. HFE gene mutations in coronary atherothrombotic disease. *Braz J Med Biol Res.* 2000;33(3):301-6.
288. Merryweather-Clarke AT, Pointon JJ, Shearman JD, Robson KJ. Global prevalence of putative haemochromatosis mutations. *J Med Genet.* 1997;34(4):275-8.
289. Sohda T, Takeyama Y, Irie M, Kamimura S, Shijo H. Putative hemochromatosis gene mutations and alcoholic liver disease with iron overload in Japan. *Alcohol Clin Exp Res.* 1999;23(4 Suppl):21S-23S.
290. Leone PE, Giménez P, Collantes JC, Paz-y-Miño C. Analysis of HFE gene mutations (C282Y, H63D, and S65C) in the Ecuadorian population. *Ann Hematol.* 2005;84(2):103-5.
291. Cardoso CS, Oliveira P, Porto G, Oberkanins C, Mascarenhas M, Rodrigues P, Kury F, de Sousa M. Comparative study of the two more frequent HFE mutations (C282Y and H63D): significant different allelic frequencies between the North and South of Portugal. *Eur J Hum Genet.* 2001;9(11):843-8.
292. Carella M, D'Ambrosio L, Totaro A, Grifa A, Valentino MA, Piperno A, Girelli D, Roetto A, Franco B, Gasparini P, Camaschella C. Mutation analysis of the HLA H gene in Italian hemochromatosis patients. *Am J Hum Genet.* 1997;60: 828-32.
293. Piperno A, Sampietro M, Pietrangelo A, Arosio C, Lupica L, Montosi G, Vergani A, Fraquelli M, Girelli D, Pasquero P, Roetto A, Gasparini P, Fargion S, Conte D, Camaschella C. Heterogeneity of hemochromatosis in Italy. *Gastroenterology.* 1998;114:996-1002.
294. Bittencourt PL, Palácios SA, Couto CA, Cançado EL, Carrilho FJ, Laudanna AA, Kalil J, Gayotto LC, Goldberg AC. Analysis of HLA-A antigens and C282Y and H63D mutations of the HFE gene in Brazilian patients with hemochromatosis. *Braz J Med Biol Res.* 2002;35(3):329-35.

295. Bittencourt PL, Marin MLC, Couto CA, Cançado ELR, Carrilho FJ, Goldberg AC. Analysis of HFE And Non-HFE Gene Mutations in Brazilian Patients with Hemochromatosis. *Clinics (Sao Paulo)*. 2009; 64(9):837-41.
296. Monaghan KG, Rybicki BA, Shurafa M, Feldman GL. Mutation analysis of the HFE gene associated with hereditary hemochromatosis in African Americans. *Am J Hematol*. 1998;58:213-7.
297. Ellervik C, Birgens H, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG. Hemochromatosis genotypes and risk of 31 disease endpoints: meta-analyses including 66,000 cases and 226,000 controls. *Hepatology*. 2007;46(4):1071-80.
298. Balan V, Baldus W, Fairbanks V, Michels V, Burritt M, Klee G. Screening for hemochromatosis: a cost-effectiveness study based on 12,258 patients. *Gastroenterology*. 1994;107:453-9.
299. McDonnell SM, Preston BL, Jewell SA, Barton JC, Edwards CQ, Adams PC, et al. A survey of 2,851 patients with hemochromatosis: symptoms and response to treatment. *Am J Med*. 1999;106:619-24.
300. Seamark CJ, Hutchinson M. Controversy in primary care: should asymptomatic haemochromatosis be treated?. *BMJ*. 2000;320:1314-7.
301. Byrd TF, Horwitz MA. Chloroquine inhibits the intracellular multiplication of *Legionella pneumophila* by limiting the availability of iron. A potential new mechanism for the therapeutic effect of chloroquine against intracellular pathogens. *J Clin Invest*. 1991;88(1): 351-7.
302. Newman SL, Gootee L, Brunner G, Deepe GS Jr. Chloroquine induces human macrophage killing of *Histoplasma capsulatum* by limiting the availability of intracellular iron and is therapeutic in a murine model of histoplasmosis. *J Clin Invest*. 1994;93(4):1422-9.
303. Crowle AJ, May MH. Inhibition of tubercle bacilli in cultured human macrophages by chloroquine used alone and in combination with streptomycin, isoniazid, pyrazinamide, and two metabolites of vitamin D3. *Antimicrob Agents Chemother*. 1990;34(11):2217-22.

-
304. Mazzolla R, Barluzzi R, Brozzetti A, Boelaert JR, Luna T, Saleppico S, Bistoni F, Blasi E. Enhanced resistance to *Cryptococcus neoformans* infection induced by chloroquine in a murine model of meningoencephalitis. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997;41(4):802-7.
 305. Levitz SM, Harrison TS, Tabuni A, Liu X. Chloroquine reduces human mononuclear phagocytes to inhibit and kill *Cryptococcus neoformans* by a mechanism independent of iron deprivation. *J Clin Invest*. 1997;100:1640-6.
 306. Tsai WP, Nara PL, Kung HF, Oroszlan S. Inhibition of human immunodeficiency virus infectivity by chloroquine. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1990;6(4):481-9.
 307. Sperber K, Kalb TH, Stecher VJ, Banerjee R, Mayer L. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by hydroxychloroquine in T cells and monocytes. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1993;9(1):91-8.
 308. Chiang G, Sassaroli M, Louie M, Chen H, Stecher VJ, Sperber K. Inhibition of HIV-1 replication by hydroxychloroquine: mechanism of action and comparison with zidovudine. *Clin Ther*. 1996;18(6):1080-92.
 309. Boelaert JR, Weinberg GA and Weinberg ED, Altered iron metabolism in HIV infection: Mechanisms, possible consequences, and proposals for management. *Infect Agents Dis*. 1996;5:36-46.
 310. Boelaert JR, Piette J, Sperber K. The potential place of chloroquine in the treatment of HIV-1-infected patients. *J Clin Virol*. 2001;20(3):137-40.
 311. Accapezzato D, Visco V, Francavilla V, Molette C, Donato T, Paroli M, Mondelli MU, Doria M, Torrisi MR, Barnaba V. Chloroquine enhances human CD8+ T cell responses against soluble antigens in vivo. *J Exp Med*. 2005;202(6):817-28.
 312. Mizui T, Yamashina S, Tanida I, Takei Y, Ueno T, Sakamoto N, Ikejima K, Kitamura T, Enomoto N, Sakai T, Kominami E, Watanabe S. Inhibition of hepatitis C virus replication by chloroquine targeting virus-associated autophagy. *J Gastroenterol*. 2010;45(2):195-203.
 313. Bonkovsky HL, Banner BF, Rothman AL. Iron and chronic viral hepatitis. *Hepatology*. 1997;25:759-68.

314. Bonkovsky HL, Banner BF, Lambrecht RW, Rubin RB. Iron in liver diseases other than hemochromatosis. *Semin Liver Dis.* 1996;16:65-82.
315. Rubin RB, Barton AL, Banner BF, Bonkovsky HL. Iron and chronic viral hepatitis: emerging evidence for an important interaction. *Dig Dis.* 1995;13:223-38.