



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**

**Centro Biomédico**

**Faculdade de Ciências Médicas**

**Isabella Brasil Succi**

**Análise de polimorfismos nos genes *CP*, *CYBRD1*, *HAMP* e *SLC40A1*  
nos pacientes com porfiria cutânea tardia**

Rio de Janeiro

2017

Isabella Brasil Succi

**Análise de polimorfismos nos genes *CP*, *CYBRD1*, *HAMP* e *SLC40A1* nos  
pacientes com porfiria cutânea tardia**

Tese apresentada, como requisito parcial para  
obtenção do título de Doutor, ao Programa de  
Pós-Graduação em Ciências Médicas, da  
Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Macedo Fonseca

Coorientador: Prof. Dr. Luís Cristóvão de Moraes Sobrino Pôrto

Rio de Janeiro

2017

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

S942 Succi, Isabella Brasil

Análise de polimorfismos nos genes CP, CYBRD1, HAMP e SLC40A1 nos pacientes com porfiria cutânea tardia/ Isabella Brasil Succi – 2017.

84 f.

Orientador: João Carlos Macedo Fonseca

Coorientador: Luís Cristóvão de Moraes Sobrino Pôrto

Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Ciências Médicas.

1. Dermatologia – Teses. 2. Porfiria cutânea tardia. I. Fonseca, João Carlos Macedo. II. Pôrto, Luís Cristóvão de Moraes Sobrino III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

CDU 616.5

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

---

Assinatura

---

Data

Isabella Brasil Succi

**Análise de polimorfismos nos genes *CP*, *CYBRD1*, *HAMP* e *SLC40A1* nos  
pacientes com porfiria cutânea tardia**

Tese apresentada, como requisito parcial  
para obtenção do título de Doutor, ao  
Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Médicas, da Universidade do Estado do  
Rio de Janeiro.

Aprovada em 02 de maio de 2017.

Coorientador : Prof. Dr. Luís Cristóvão de Moraes Sobrino Pôrto  
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Banca Examinadora:

---

Prof. Dr. João Carlos Macedo Fonseca (Orientador)  
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

---

Prof. Dr. Denizar Vianna Araújo  
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

---

Profa. Dra. Maria de Fátima Guimarães Scotelaro Alves  
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

---

Prof. Dr. João Carlos Regazzi Avelleira  
Hospital Federal da Lagoa - MS

---

Profa. Dra. Sandra Maria Barbosa Durães  
Universidade Federal Fluminense

Rio de Janeiro

2017

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais, Isabel e Ernesto, orientadores de uma vida inteira, sempre prontos para dar o que preciso receber. Ao meu marido, Marcelo, por voar sempre ao meu lado em busca da melhor versão. Ao meu eterno Luppy, companheiro nas madrugadas de estudo.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador, Prof. Dr. João Carlos Macedo Fonseca, por tornar meu doutorado possível, ensinando-me calma e tranquilidade, confiando que tudo já deu certo.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Luís Cristóvão Pôrto, exemplo de comprometimento e responsabilidade com o seu trabalho, com a instituição e com as pessoas.

À toda equipe do HLA, Raphael Curvo, Juliana Motta, Ronald Costa Neto, Patrícia Domingues, Adriana Nascimento, por toda paciência com minha ansiedade e pelo carinho e dedicação ao projeto.

Aos pacientes pela compreensão e confiança.

À minha madrinha, Heloisa Brasil, coorientadora da minha vida, pelo carinho e presença constantes.

À minha avó, Nilza Succi, torcedora incansável para o sucesso deste projeto.

Não é o mais forte que sobrevive. Nem o mais inteligente. Mas o que melhor se adapta às mudanças.

*Charles Darwin*

## RESUMO

SUCCI, Isabella Brasil. **Análise dos polimorfismos dos genes *CP*, *CYBRD1*, *HAMP* e *SLC40A1* nos pacientes com porfiria cutânea tardia**. 2017. 84 f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2017.

A porfiria cutânea tardia (PCT) é a mais frequente de todas as porfirias e a de maior interesse dermatológico. Resulta da redução da atividade da enzima uroporfirinogênio descarboxilase (UROD). Sua etiologia não está completamente elucidada, sendo necessários fatores ambientais e genéticos para a expressão clínica da doença. A sobrecarga de ferro tem sido comumente encontrada nos pacientes com PCT. A razão exata pela qual o ferro se acumula nestes pacientes é desconhecida. Há uma evidência crescente de que a siderose hepática é o ponto crítico na patogênese da PCT. Assim, nosso objetivo foi avaliar a presença dos polimorfismos nos genes *CP*, *CYBRD1*, *HAMP* e *SLC40A1*, responsáveis pela regulação do ferro, nos pacientes portadores de PCT. Como nossa população é uma das mais heterogêneas, visto que poucos países no mundo passaram por uma miscigenação tão intensa quanto o Brasil, o que pode levar a importantes implicações na predisposição às doenças; também avaliamos a ancestralidade genética destes pacientes. Foram incluídos 30 pacientes residentes do Rio de Janeiro, com diagnóstico clínico, laboratorial e/ou histopatológico de porfiria cutânea tardia esporádica. Analisamos a ancestralidade genética destes pacientes através de 46 marcadores informativos de ancestralidade – INDELS. A genotipagem foi realizada através da PCR em tempo real, utilizando-se sonda TaqMan® de uso comercial. A reação da PCR foi realizada com auxílio do termociclador ABI StepOnePlus Real-Time PCR System através da análise de discriminação alélica. Houve um predomínio significativo da ancestralidade europeia na amostra (70,2%), com pequena contribuição das raízes africana e ameríndia, 20,1% e 9,7% respectivamente. Não foi observada nenhuma associação entre os polimorfismos estudados e as raízes ancestrais genéticas. O alelo G do gene *CP* foi mais frequente entre os pacientes. As frequências dos genótipos GG e AG foram maiores no grupo com PCT do que nos indivíduos saudáveis. No gene *SLC40A1*, houve frequências maiores do alelo C em indivíduos saudáveis. Os genótipos CC e CT foram mais frequentes nos controles. De acordo com este estudo, a presença do alelo G (gene *CP*) parece predispor os portadores para o desenvolvimento da PCT. Em contrapartida, a presença de um único alelo C (gene *SLC40A1*) parece já conferir proteção contra PCT, visto que ambos os genótipos CC e CT foram mais frequentes nos controles.

Palavras-chave: Porfiria cutânea tardia. Genética. Características da População.

## ABSTRACT

SUCCI, Isabella Brasil. **Analysis of polymorphisms of the *CP*, *CYBRD1*, *HAMP* and *SLC40A1* genes in patients with porphyria cutanea tarda.** 2017. 84 f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2017.

Porphyria cutanea tarda (PCT) is the most common type of porphyria and of greatest dermatological interest. It occurs due to deficiency of uroporphyrinogen decarboxylase (UROD) activity. Its etiology is not completely understood, clinical expression depends on both genetic and acquired factors. Iron overload has been commonly found in PCT patients. The exact reason why the iron accumulates in these patients is unknown. There is increasing evidence that hepatic siderosis is the critical point in PCT pathogenesis. We aimed to evaluate the role of polymorphisms in *CP*, *CYBRD1*, *HAMP* and *SLC40A1* genes that affects iron homeostasis in PCT patients. Because the Brazilian population is heterogeneous (with African and Amerindian contributions), we also investigate the genetic ancestry of these patients. The 30 patients from Rio de Janeiro included in the study had been diagnosed with sporadic PCT based on clinical and laboratory results. Analysis of the genetic ancestry of PCT patients were obtained through 46 ancestry informative markers - INDELS. Alleles were discriminated using the ABI StepOnePlus Real-Time PCR System using TaqMan Assays, according to the manufacturer's instructions. The results obtained through genetic ancestry revealed prevalent European ancestry (70.2%). African and Amerindian ethnicities were less common: 20.1% and 9.7%, respectively. Our Statistical analysis revealed no relationships among genotype, allele frequency, and genetic ancestry. The G allele of the *CP* gene was more common among patients. The frequencies of the GG and AG genotypes were higher in the PCT group than in healthy individuals. We also found higher frequencies of the C allele of *SLC40A1* in controls compared with PCT patients. The CC and CT genotypes were more frequent in healthy individuals. Our data highlight a possible role for the *CP* gene in predicting PCT. The present analysis shows a higher frequency of the G variant in these patients. Regarding the *SLC40A1*, the presence of a C allele could protect against iron overload. A single C allele might be sufficient to protect against the disease.

Keywords: Porphyria cutanea tarda. Genomics. Population Characteristics.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Molécula do heme.....	16
Figura 2 - Biossíntese do heme.....	18
Figura 3 - Anel pirrólico.....	19
Figura 4 - Anel tetrapirrólico.....	20
Quadro 1 - Drogas que devem ser evitadas nos pacientes com porfiria cutânea tardia.	24
Figura 5 - Absorção do ferro nos hepatócitos.....	41
Quadro 2 - Valores da ferritina.....	43
Figura 6 - Esquema do metabolismo do ferro no enterócito e macrófago.....	44
Figura 7 - Esquema da molécula do DNA.....	49

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALA	ácido amino-levulínico
ALAS	ácido amino-levulínico sintetase
CP	ceruloplasmina
CPH	coproporfiria hereditária
CYBRD1	citocromo b redutase 1
DMT-1	proteína transportadora de metal divalente
HAMP	peptídeo antimicrobiano hepcidina
HCB	hexaclorobenzeno
HCV	vírus da hepatite C
HIV	vírus da imunodeficiência humana
HUPE	Hospital Universitário Pedro Ernesto
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
NTBI	ferro não ligado à transferrina
PAI	porfiria aguda intermitente
PBG	porfobilinogênio
PCT	porfiria cutânea tardia
PEC	porfiria eritropoiética congênita
PHE	porfiria hepatoeritropoiética
PPE	protoporfiria eritropoiética
PV	porfiria variegata
SLC40A1	soluto carreador familiar 40 membro 1
SNP	polimorfismo de nucleotídeo único
Tf	transferrina
TfR	receptor de transferrina
UERJ	Universidade do Estado do Rio De Janeiro
UROD	uroporfirinogênio descarboxilase

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
1	<b>OBJETIVOS</b> .....	14
2	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	15
2.1	<b>Porfirias</b> .....	15
2.2	<b>Biossíntese do Heme</b> .....	16
2.3	<b>Classificação das porfirias</b> .....	22
2.3.1	<u>Porfirias Agudas</u> .....	22
2.3.1.1	Porfiria Aguda Intermitente.....	26
2.3.1.2	Porfiria Variegata.....	26
2.3.1.3	Coproporfiria Hereditária.....	27
2.3.2	<u>Porfirias Cutâneas</u> .....	28
2.3.2.1	Protoporfiria Eritropoiética.....	28
2.3.2.2	Porfiria Eritropoiética Congênita.....	29
2.4	<b>Porfiria Cutânea Tardia</b> .....	30
2.5	<b>Metabolismo do ferro</b> .....	39
2.6	<b>Análise Genética</b> .....	45
2.6.1	<u>Gene HAMP</u> .....	45
2.6.2	<u>Gene SLC40A1</u> .....	46
2.6.3	<u>Gene CYBRD1</u> .....	47
2.6.4	<u>Gene CP</u> .....	48
2.6.5	<u>Princípios básicos da genética</u> .....	48
2.7	<b>Ancestralidade</b> .....	50
3	<b>METODOLOGIA</b> .....	53
3.1	<b>Casuística</b> .....	53
3.2	<b>Métodos</b> .....	54
3.2.1	<u>Coleta e processamento das amostras</u> .....	54
3.2.2	<u>Extração do DNA</u> .....	54
3.2.3	<u>Análise da ancestralidade genética</u> .....	55
3.2.4	<u>Técnica de avaliação dos polimorfismos</u> .....	55
3.3	<b>Análise estatística</b> .....	56
4	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	57

<b>CONCLUSÃO</b> .....	58
<b>SUGESTÕES</b> .....	59
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	60
<b>APÊNDICE A</b> – Termo de consentimento livre e esclarecido .....	69
<b>APÊNDICE B</b> – Artigo aprovado para publicação .....	71
<b>APÊNDICE C</b> – Manuscrito submetido para publicação.....	77

## INTRODUÇÃO

As porfirias são doenças metabólicas raras, que resultam da deficiência de uma enzima específica envolvida na biossíntese do heme. A porfiria cutânea tardia (PCT) é universal, é a mais freqüente de todas as porfirias e a de maior interesse dermatológico. Ela resulta de uma deficiência na enzima uroporfirinogênio-descarboxilase (UROD).

Em 75% dos casos esta deficiência é adquirida (PCT esporádica) e restrita aos hepatócitos e em 20% o defeito enzimático é herdado (PCT familiar), associado a uma mutação, e está presente em todos os tecidos.

Ambos os tipos necessitam de fatores desencadeantes para expressar clinicamente a doença. Numerosos agentes e condições são conhecidas por contribuir para o desenvolvimento da PCT, incluindo álcool, estrógenos, excesso de ferro e infecções virais (hepatite C e HIV). Há uma associação quase universal entre a PCT e concentrações elevadas de ferro hepático.

A sobrecarga de ferro tem sido comumente encontrada nos pacientes com PCT. A razão exata pela qual o ferro se acumula nestes pacientes é desconhecida, mas a maioria apresenta evidências laboratoriais de excesso de ferro, como o ferro sérico e ferritina em concentrações elevadas ou na faixa normal superior, confirmando o importante papel do ferro na patogênese da doença.

A sobrecarga de ferro hepático acompanha a PCT clínica em praticamente todos os casos. A causa para esta sobrecarga parece ser heterogênea. Achados clínicos e experimentais sugerem que há um processo reversível ferro-dependente que seria responsável pela inativação da UROD. (1)

Há uma evidência crescente de que a siderose hepática é o ponto crítico na patogênese da PCT e que os outros fatores, de alguma forma, intensifica a habilidade do ferro em atacar o sítio catalítico da UROD. (1)

Desta forma, iremos analisar os possíveis polimorfismos nos genes *CP*, *CYBRD1*, *HAMP* e *SLC40A*, implicados no metabolismo do ferro, nos pacientes com PCT.

Até o momento, não existe nenhum estudo na população brasileira relacionando o impacto destes polimorfismos nestes genes reguladores do metabolismo do ferro em pacientes com PCT.

Como nossa população é uma das mais heterogêneas, visto que poucos países no mundo passaram por uma miscigenação tão intensa quanto o Brasil, nosso trabalho visa contribuir para o entendimento da diversidade genotípica da PCT na nossa população,

proporcionando um diagnóstico cada vez mais preciso, com adequada orientação aos portadores e um manejo terapêutico mais rápido e adequado da doença.

## 1 OBJETIVOS

### **Principal**

Avaliar a presença dos polimorfismos nos genes responsáveis pela regulação do ferro: CP (rs17838832), CYBRD1 (rs868106), HAMP (rs10421768) e SLC40A1 (rs13015236 e rs11568351) nos pacientes portadores de porfiria cutânea tardia.

### **Secundários**

Avaliar a ancestralidade genética dos pacientes portadores de porfiria cutânea tardia a partir de marcadores indicativos de ancestralidade (AIM - painel de 46 InDel) .

Comparar a prevalência destes polimorfismos nos pacientes portadores de porfiria cutânea tardia com um grupo controle pareado por idade, sexo e ancestralidade genética.

Associar a ancestralidade genética dos pacientes portadores de porfiria cutânea tardia com os dados obtidos na avaliação dos polimorfismos estudados.

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 Porfirias

O primeiro relato de um paciente apresentando porfiria surgiu no século XIX, quando Schultz descreveu um homem de 33 anos com história de fotossensibilidade cutânea desde a infância, acompanhada de urina avermelhada (2).

Em 1911, Günther estabeleceu a primeira classificação das porfirias, reconhecendo-as como doenças metabólicas hereditárias caracterizadas pela excreção aumentada de porfirinas. Os termos “porfiria intermitente aguda” e “porfiria cutânea tardia” foram introduzidos em 1937 (2).

As porfirias correspondem a um grupo de desordens metabólicas raras, clínica e geneticamente heterogêneo, que resultam de um defeito enzimático, causando acúmulo do substrato, na biossíntese do heme (3,4,5,6). Cada tipo de porfiria resulta de uma alteração enzimática específica em uma das oito vias da biossíntese do heme (7,8).

A doença ocorre em todas as raças e ambos os sexos. Embora algumas formas apareçam durante a infância, outras variantes não costumam estar presentes até a puberdade ou idade adulta. A prevalência varia de 0,5 a 10 por 100.000 indivíduos (2).

Do ponto de vista bioquímico, as diferentes porfirias são caracterizadas por padrões particulares de acúmulo e excreção de porfirinas e/ou seus precursores. Estas porfirinas excretadas são os substratos da enzima deficiente (3,4, 5,6).

As porfirinas são substâncias intermediárias na biossíntese do heme, e quando presentes em quantidades excessivas, exercem efeitos tóxicos que são responsáveis pelos sinais e sintomas cutâneos e neurológicos. As propriedades fototóxicas das porfirinas são responsáveis pelas características cutâneas da doença (3,4, 5,6).

Atualmente, costuma se classificar as porfirias em formas agudas e não-agudas (cutâneas), enfatizando assim a presença ou ausência de surtos neurológicos agudos potencialmente fatais (2).

## 2.2 Biossíntese do heme

O heme (Figura 1) é um constituinte celular essencial para uma grande variedade de processos metabólicos, principalmente devido à sua capacidade única de ligação e transporte do oxigênio (hemoglobina e mioglobina), facilitar o transporte de elétrons (citocromos) e para atividades de oxidase como o citocromo P450 (4,5).

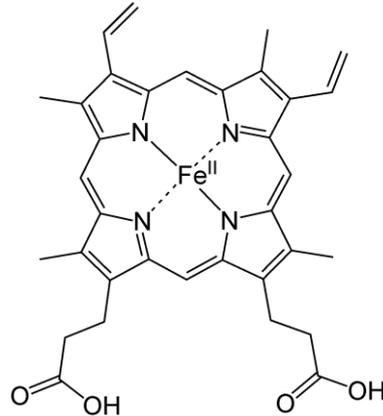


Figura 1: Molécula do heme.

Embora o heme seja sintetizado em todas as células nucleadas, a maioria é produzida nas células eritropoiéticas (responsável por 85% da síntese do heme diária) para síntese da hemoglobina, e o restante no parênquima hepático para a síntese dos citocromos (9,10).

Várias destas hemoproteínas possuem um rápido *turnover* (minutos a horas), necessitando continuamente de altas taxas da síntese do heme. Um exemplo disto ocorre no citocromo P450, uma importante enzima hepática envolvida com a detoxificação e metabolismo das drogas, possuindo uma meia-vida de 90 a 180 minutos (3,4,5).

Assim, nos seres humanos, a síntese diária do heme e das porfirinas ocorre em quantidade suficiente para suprir as necessidades metabólicas do organismo. O controle da síntese do heme é tão preciso que, em circunstâncias normais, somente pequenas quantidades dos precursores estão presentes no plasma, hemácias, urina e fezes (3,4,5).

A biossíntese do heme compreende oito passos enzimáticos para a conversão da glicina e succinil-coenzima A em heme, sendo cada passo catalisado por uma enzima. A primeira (ácido aminolevulínico (ALA) sintetase) e as três últimas enzimas envolvidas (coproporfirinogênio oxidase, protoporfirinogênio oxidase e ferroquelatase) estão localizadas na mitocôndria, enquanto as quatro enzimas restantes (ALA desidratase, porfobilinogênio deaminase, uroporfirinogênio III sintetase e uroporfirinogênio descarboxilase), estão

localizadas no citosol (3,4,5,7, 11,12, 13,14,15).

O heme começa a ser sintetizado na mitocôndria da célula com moléculas únicas de glicina e succinil coenzima A que são conjugadas para formarem o ácido aminolevulínico (ALA) (FIGURA 2) (4,5).

O ALA sintetase (ALAS) é a primeira enzima na via da biosíntese do heme, o qual é sintetizado por dois genes diferentes: o ALAS1 (no fígado e outros tecidos, localizado no cromossomo 3) e o ALAS2 (no tecido eritróide, localizado no cromossomo X) (17). O ALAS1 é regulado pela produção de heme e o ALAS2 pela disponibilidade de ferro (17, 18,19).

O papel da ALA sintetase é combinar glicina e succinil-coenzima A para formar ácido aminolevulínico (ALA), o primeiro substrato da via na matriz mitocondrial.

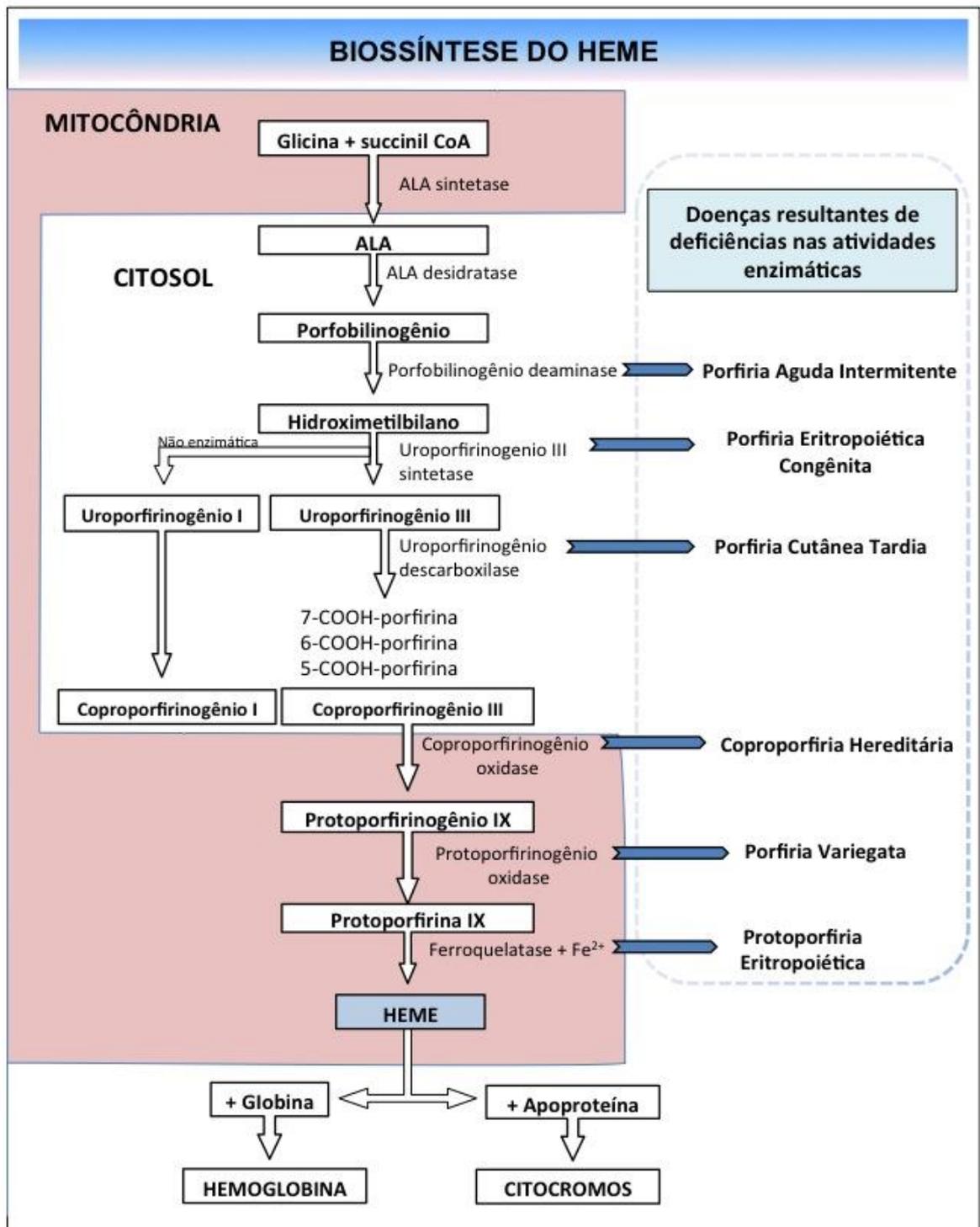


Figura 2: Biossíntese do heme. Adaptação da figura exibida na página 641 do livro: Bologna JL, Jorizzo JL, Rapini RP. Dermatology. 2ed. Mosby Elsevier; 2008 (2).

Nas mitocôndrias, o heme é sintetizado a partir de compostos bioquímicos simples (glicina e succinil-coenzima A) que são condensados pela ALA sintetase para formar o ácido aminolevulínico (ALA), sendo posteriormente exportado para o citosol (11, 12, 20).

Uma vez no citosol, a ALA desidratase é a responsável pela síntese do anel pirrólico, o porfobilinogênio (PBG) (Figura 3), que é constituído por quatro átomos de carbono e um átomo de nitrogênio.

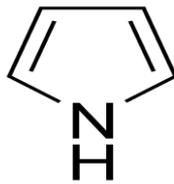


Figura 3: Anel pirrólico

A seguir, quatro moléculas de PBG são montadas pela PBG desaminase para formar um composto tetrapirrólico, o hidroximetilbilano. O anel tetrapirrólico (Figura 4) é uma estrutura molecular biologicamente importante, encontrada na clorofila, heme e vitamina B12. A porfirina é um tipo especial de tetrapirrol em que quatro anéis pirrólicos são ligados por pontes de metenil em uma grande estrutura de anel.

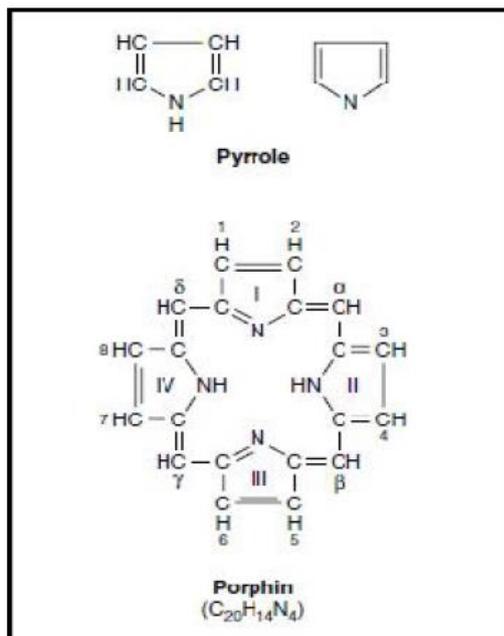


Figura 4: Anel tetrapirrólico

Neste ponto do processo, o hidroximetilbilano pode ser convertido para uroporfirinogênio III (isômero assimétrico do uroporfirinogênio) pela ação da uroporfirinogênio III sintetase ou formar o uroporfirinogênio I (isômero simétrico) na ausência da enzima (20).

A enzima citosólica uroporfirinogênio descarboxilase (UROD) atua sobre o uroporfirinogênio (isômero I ou III), mas somente o isômero III pode ser posteriormente convertido em heme (21). Assim, o uroporfirinogênio III é progressivamente descarboxilado gerando compostos hepta, hexa, penta e posteriormente o composto tetracarboxilado, o coproporfirinogênio III, e quatro moléculas de dióxido de carbono.

O coproporfirinogênio III é depois transportado a partir do citosol para a mitocôndria, onde pela ação da coproporfirinogênio oxidase é transformado em protoporfirinogênio IX.

No penúltimo passo da biossíntese do heme, o protoporfirinogênio IX é oxidado pela protoporfirinogênio oxidase para formar a protoporfirina IX (o primeiro composto aromático e fluorescente neste processo biossintético).

E por fim, o ferro é cataliticamente inserido na protoporfirina IX pela ferroquelatase, para formar o heme. Posteriormente, o heme será transportado da mitocôndria para o citosol, onde ficará disponível para se combinar com apoproteínas citosólicas para formar as hemoproteínas (20).

Continuando o ciclo, o heme formado atua no fígado como regulador da ALA1 sintetase (a primeira enzima do processo), exercendo um papel regulatório no fígado via retroalimentação negativa.

A descarboxilação do uroporfirinogênio para coproporfirinogênio, e daí para protoporfirinogênio, diminui a solubilidade em água, de modo que o uroporfirinogênio só é excretado através dos rins, enquanto o protoporfirinogênio e a protoporfirina hidrofóbicos são exclusivamente excretados na bile. O coproporfirinogênio é excretado por ambas as vias (11,12).

O acúmulo de substâncias hidrossolúveis (uro e coproporfirinogênio) é responsável pelas bolhas, como vemos na maioria das porfirias cutâneas (porfiria cutânea tardia, porfiria variegata e coproporfiria hereditária). Em contraste, o acúmulo de protoporfirinas lipofílicas leva a uma sensação de queimação cutânea imediatamente após a exposição a luz UV, acompanhada de eritema e edema, como visto na protoporfiria eritropoiética (2).

## 2.3 Classificação das porfirias

As porfirias foram previamente classificadas em hepáticas ou eritropoiéticas de acordo com o órgão no qual se acumulam as porfirinas ou seus precursores (os precursores do heme). Entretanto, esta divisão não é de valor clínico. A classificação das porfirias que causam surtos agudos neuroviscerais e/ou aquelas que causam a doença da pele baseada na apresentação clínica, está diretamente relacionada a uma estratégia biológica diagnóstica simples e mais prática do que as outras classificações (3,11).

Desta forma, usaremos esta classificação para as seis porfirias mais comuns:

a) Somente surtos agudos;

- Porfiria Aguda Intermitente (PAI);

b) Surtos agudos e doença cutânea;

- Porfiria Variegata (PV);

- Coproporfiria Hereditária (CPH);

c) Somente doença cutânea;

- Protoporfiria Eritropoiética (PPE)

- Porfiria Eritropoiética Congênita (PEC)

- Porfiria Cutânea Tardia (PCT)

### 2.3.1 Porfirias agudas

Este grupo inclui três porfirias autossômicas dominantes, PAI, CPH, PV. A PAI é a mais comum, seguida pela PV (2,6,10).

São doenças agudas e potencialmente fatais, muitas vezes desencadeadas pelo uso de drogas e hormônios, que são metabolizados pelo citocromo P450. Caracteriza-se por uma

reação neurotóxica aguda. A prevalência da porfiria aguda na Europa é 1-2/100 000 habitantes (22).

Pessoas com porfirias agudas, como a porfiria aguda intermitente, a porfiria variegata e a coproporfiria-hereditária, podem apresentar-se com uma crise súbita com risco de vida. Esses surtos são raros, porque a penetrância é baixa e eles são difíceis de diagnosticar porque não são específicos.

Os surtos agudos acontecem em todas as porfirias agudas. Lesões na pele nunca se desenvolvem na porfiria aguda intermitente (pois os substratos são precursores da porfirina não-fototóxicos), mas podem ser a única manifestação clínica em alguns pacientes com porfiria variegata (60% dos pacientes), e raramente (5%) podem se desenvolver em pacientes com coproporfiria hereditária (7).

As crises agudas são cinco vezes mais comum em mulheres, com pico de ocorrência na terceira década, sendo muito raros antes da puberdade e após a menopausa. A maioria dos pacientes tem um ou alguns surtos e, em seguida, se recuperam totalmente para o resto de sua vida. Menos de 10% desenvolvem surtos agudos recorrentes (22, 23,24).

Os surtos agudos podem ser precipitados por uma variedade de fatores externos, tais como: drogas, principalmente porfirinogênicas (QUADRO 1), e o ciclo menstrual, com surtos recorrentes ocorrendo na fase lútea tardia. Álcool, cannabis, estresse, infecções (crônicas ou recorrentes) e diminuição no consumo de calorias (dieta ou jejum), também podem desencadear as crises (2,22, 25, 26,27).

Quadro 1 Drogas que devem ser evitadas nos pacientes com porfiria aguda. (28)

Aminoglutetimida
Barbitúricos
Carbamazepina
Cloranfenicol
Clemastina
Clonidina
Clotrimoxazol
Danazol
Dapsona
Hidralazina
Dimenidrinato
Dipirona
Derivados do Ergot
Eritromicina
Etansilato
Etossuximida
Etomidato
Griseofulvina
Cetoconazol (oral)
Meprobamato
Metisergida
Metildopa
Orfenadrina
Ácido nalidíxico
Fenitoína
Oxcarbazepina
Progestágenos
Fenilbutazona
Pirazolona
Primidona
Tolbutamida
Pirazinamida
Sulfonamidas

Os surtos de porfiria começam com uma fase prodrômica, incluindo pequenas alterações comportamentais, tais como ansiedade, agitação, e insônia (29, 30). A gravidade das crises agudas varia de dor abdominal leve, por vezes acompanhada de vômitos e constipação, até surtos muito graves com paralisia bulbar e paralisia respiratória. As crises agudas não duram mais do que uma ou duas semanas (22).

Dor abdominal é o sintoma mais frequente, geralmente é mal localizada e persistente, mas pode ser em cólicas (10). Pode estar localizada em qualquer quadrante, ou mesmo nas costas, nádegas e coxas, e exigir analgesia com grandes quantidades de opiáceos (22).

A neuropatia motora, ocorre em 5-10% dos casos, e normalmente ocorre quando drogas porfirinogênicas foram administradas inadvertidamente durante a crise aguda em desenvolvimento (22). A recuperação da paralisia é gradual e, em alguns casos, incompleta, com seqüelas principalmente nos braços e pernas (3). Paralisia respiratória é a causa mais comum de morte.

Confusão, comportamento anormal, agitação e alucinações ocorrem em até 50% dos surtos. A porfiria não está relacionada a qualquer doença psiquiátrica crônica, com exceção de ansiedade generalizada (22).

As crises agudas resultam da produção hepática de uma substância neurotóxica, presumivelmente ALA (um análogo de ácido  $\gamma$ -aminobutírico) e/ou PBG que podem interagir com o ácido  $\gamma$ -aminobutírico ou nos receptores de glutamato (10).

Durante os surtos agudos, a PBG está significativamente aumentada na PAI, CPH e PV, não estando em qualquer outra condição médica (10). O achado diagnóstico é o aumento da excreção urinária de PBG. A concentração normal de PBG urinário exclui um surto de porfiria aguda (31,32). Com a constatação de uma superexcreção de porfobilinogênio (>10 vezes o limite superior), o tratamento pode ser iniciado imediatamente (3).

O diagnóstico precoce e preciso combinado com o aconselhamento e tratamento eficiente reduzem consideravelmente as taxas de mortalidade nas porfirias agudas (3). Os surtos agudos da porfiria estão associados a uma taxa de mortalidade significativa (acima de 5%). Uma vez que o diagnóstico tenha sido feito, a prevenção de drogas indutoras da crise aguda é essencial para evitar a exacerbação (22).

O tratamento de suporte dos sintomas sistêmicos inclui analgésicos, sedativos e antieméticos, além de uma gestão cuidadosa do equilíbrio de fluidos com hidratação e correção da hiponatremia (22).

Os tratamentos específicos são a hematina intravenosa ou heme arginato que já substituíram os carboidratos como o tratamento de escolha. Essas drogas suprimem a

atividade hepática da ALA sintase e assim reduzem o ALA e o acúmulo de PBG. O heme arginato é mais eficaz quando administrado mais cedo durante um surto, aumentando a importância do diagnóstico precoce (22).

As preparações de heme tem a desvantagem de serem muito instáveis, e tromboflebite pode ocorrer como um efeito colateral. Entretanto, o arginato de heme não induz alterações significativas na coagulação ou fibrinólise, sendo a ocorrência de efeitos colaterais bem reduzida (2).

#### 2.3.1.1 Porfiria intermitente aguda (PAI)

A PAI é uma doença hereditária, autossômica dominante, que resulta de uma deficiência da atividade da enzima porfobilinogênio deaminase.

Em todo o mundo, com exceção do Chile e da África do Sul, a PAI é o tipo mais frequente de porfiria aguda.

Costuma surgir após a puberdade com surtos porfíricos agudos. Durante estas crises podem ser detectados níveis urinários elevados dos precursores da porfirina (ALA e PBG). Não apresenta fotossensibilidade ou acometimento cutâneo. Ocorre um leve predomínio do sexo feminino ( 1,5-2,0:1,0) nos pacientes afetados (2).

#### 2.3.1.2 Porfiria variegata (PV)

A PV é caracterizada por uma deficiência autossômica dominante da protoporfirinogênio oxidase. A apresentação clínica é variável, com sintomas cutâneos e neuropsiquiátricos que podem surgir separados ou simultaneamente.

Clinicamente, os achados cutâneos da porfiria variegata não podem ser diferenciados daqueles encontrados na porfiria cutânea tardia. Do mesmo modo, os surtos agudos observados são idênticos àqueles vistos na PAI.

Assim como na PAI, níveis urinários elevados de ALA e PBG são encontrados durante os surtos agudos. Entretanto, durante os períodos de remissão, estes níveis encontram-se dentro da normalidade. Nas fezes, as concentrações de protoporfirina

costumam ser mais altas do que as de coproporfirina. Esta anormalidade pode ser detectada inclusive nos períodos de remissão entre as crises (2).

### 2.3.1.3 Coproporfiria hereditária (CPH)

Trata-se de uma doença autossômica dominante muito rara, caracterizada pela deficiência da enzima coproporfirinogênio oxidase. Os sintomas são parecidos com aqueles encontrados na porfiria variegata. Porém, diferentemente desta, as concentrações de coproporfirina nas fezes são mais altas do que as de protoporfirinas.

Os pacientes com PV e CPH devem evitar a exposição a radiação UV, fazendo uso de bloqueadores solares e roupas com proteção. Ao contrário do que ocorre na PCT, a flebotomia parece não ser benéfica (2).

## 2.3.2 Porfirias cutâneas

### 2.3.2.1 Protoporfiria Eritropoiética (PPE)

A PPE resulta de uma deficiência parcial da última enzima da via biossintética do heme, a ferroquelatase. Parece ser herdada como uma doença autossômica dominante, mas herança recessiva também tem sido descrita. Recentemente, foi demonstrada que a manifestação da doença, em cerca de 2% dos pacientes, foi causada por uma mutação de ganho de função no ácido aminolevulínico sintetase 2, específico do eritróide, sendo denominada protoporfiria dominante ligada ao X (16).

Inicia-se na infância, nos primeiros anos de vida, caracterizada por episódios agudos de fotossensibilidade, incluindo queimação, dor e prurido na pele, particularmente do dorso da mão e do rosto, que podem ocorrer imediatamente após à exposição solar.

Estes sintomas são seguidos de edema, eritema, lesões urticariformes e, menos comumente, de púrpuras. Na evolução, pode apresentar espessamento céreo e enrugamento da pele do dorso das articulações das mãos, pequenas cicatrizes superficiais circulares no rosto e sulcos radiais em torno dos lábios (pseudo-rágades). Os sintomas frequentemente melhoram e os níveis de porfirina caem durante a gravidez (34, 35, 36,37).

Evidências bioquímicas de disfunção hepática podem ser identificadas em 10-20% dos pacientes. Em cerca de 2%, uma insuficiência hepática colestática rapidamente progressiva e irreversível se desenvolve (33, 38,39). A incidência de colelitíase na PPE é de cerca de 20% (16).

O diagnóstico da PPE baseia-se no grande aumento das concentrações de protoporfirina livre nos eritrócitos (40). Sessenta por cento dos pacientes tem aumento da protoporfirina fecal, entretanto isto não é muito útil para o diagnóstico pela falta de especificidade. Como a protoporfirina é estritamente lipofílica, a excreção de porfirina na urina não aumenta (40).

Diagnóstico diferencial deve ser feito com as reações fototóxicas à droga, hidroa vaciniforme, urticária solar e outros tipos de porfiria. Clinicamente, o diagnóstico é baseado na fotossensibilidade com a característica reação inflamatória dolorosa (16).

A proteção à luz solar é de extrema importância na protoporfiria eritropoiética. Roupas especiais, protetores solares tópicos, opacos, podem melhorar a fotointolerância. A

dihidroxiacetona que induz a formação de pigmento marrom no extrato córneo tem sido usada em alguns pacientes com PPE (41,42).

O betacaroteno oral é o tratamento mais utilizado, principalmente durante a primavera e verão. O efeito máximo pode não ocorrer até 1 a 2 meses do início do tratamento (35).

Recentemente, o alfamelanotide (um análogo do hormônio  $\alpha$ -melanócito-estimulante, que induz a formação de melanina epidérmica) tem mostrado efeito benéfico nos pacientes com PPE (43).

### 2.3.2.2. Porfíria eritropoiética congênita (PEC)

A porfíria eritropoiética congênita (doença de Günther) é uma doença hereditária, autossômica recessiva, que resulta de uma deficiência da atividade da enzima uroporfirinogênio III sintetase (6).

A sua ausência é de considerável importância biológica, porque somente o isômero III do uroporfirinogênio pode formar o heme. Reações não-enzimáticas resultam com produção de grandes quantidades de isômeros tipo I (uroporfirina I e coproporfirina I) que acumulam nas células eritróides e depois, gradualmente, vão para o plasma (6).

A doença se manifesta nos primeiros meses de vida, com fotossensibilidade cutânea, associada a urina rósea ou amarronzada. A fototerapia para icterícia neonatal pode desencadear as lesões (6).

Manifestações cutâneas incluem fragilidade cutânea, vesículas e bolhas, muitas vezes complicadas por infecção secundária, cicatrização lenta e mutilante. Isso pode levar a perda dos tecidos acrais, tais como ponta do nariz, orelhas, e dedos, tornando esta forma a mais mutilante das porfirias (44).

Um espessamento pseudoesclerodermóide difuso da pele exposta frequentemente se desenvolve de forma gradual, com microstomia e alterações tipo esclerodactilia (45).

Áreas de hipo e hiperpigmentação irregulares podem ocorrer, assim como alopecias cicatriciais no couro cabeludo; hipertricose, especialmente nos braços, têmporas e região malar (6).

Alterações oculares (blefarite, ceratoconjuntivite, ectrópio cicatricial e alopecia cicatricial dos cílios e sobrancelhas) podem ser observadas no curso da doença (45).

Eritrodonτία é um achado comum observado tanto nos dentes decíduos quanto nos permanentes (44).

Achados sistêmicos incluem anemia hemolítica e hepatoesplenomegalia. Alterações esqueléticas tais como osteólise e calcificações são frequentes (45).

Bioquimicamente, a deficiência enzimática do uroporfirinogênio III sintetase resulta no acúmulo em todos os tecidos do isômero tipo I das porfirinas. Eritrócitos e urina contêm grandes quantidades de uro e coproporfirinas I, assim como elevados níveis de coproporfirina I são encontrados nas fezes (6).

O diagnóstico diferencial se faz com as outras porfirias, xeroderma pigmentoso, epidermólise bolhosa e outras buloses.

O tratamento é preventivo e sintomático. A proteção solar é crucial, assim como os cuidados com a pele, o menor trauma deve ser evitado e as infecções bacterianas devem ser tratadas imediatamente.

Desde 1991, o transplante de medula óssea alogênico tem se mostrado eficaz em crianças dependentes de transfusão, sendo reconhecido como o tratamento de escolha na PEC grave (6).

#### 2.4 Porfíria cutânea tardia (PCT)

A porfíria cutânea tardia (PCT) é a mais comum das porfirias em todo o mundo e resulta da deficiência hereditária ou adquirida da enzima uroporfirinogênio descarboxilase (UROD) (2, 6, 34, 46, 47,48).

A prevalência é de aproximadamente 1:10000. A doença predominava nos homens, mas hoje com o uso disseminado dos anticoncepcionais orais a incidência tende a ser igual em ambos os sexos (49, 50).

A PCT é classificada em dois subtipos: adquirida ou esporádica (PCT tipo I) e hereditária ou familiar (PCT tipo II). Cerca de 75% dos pacientes apresentam a variante esporádica (o tipo I) na qual a deficiência da enzima é adquirida e restrita aos hepatócitos. O restante dos pacientes, apresenta a variante familiar (tipo II), doença em que a deficiência da enzima é hereditária, presente em todos os tecidos e associada a uma mutação genética na UROD (49, 51).

É importante enfatizar que nem todo paciente com uma história familiar positiva para PCT terá o tipo II da doença. Alguns pacientes tem sido descritos como tendo um ou mais parentes com PCT, mas apresentam atividade da UROD normal nos eritrócitos. Esta categoria tem sido designada como PCT tipo III (52,53).

No tipo I da PCT, a deficiência enzimática encontra-se somente no fígado, talvez pela presença de defeitos genéticos diferentes restritos ao fígado, ou pela exposição à substâncias químicas que inibem seletivamente a enzima hepática mas não a eritrocítica. Algumas destas substâncias (ex: álcool e estrogênio) podem provocar PCT somente em alguns indivíduos e já outras (ex: hexaclorobenzeno) causam PCT em praticamente todos os indivíduos expostos (54).

A porfiria tóxica, na qual hidrocarbonetos aromáticos halogenados inibem a enzima, é rara e afeta principalmente os trabalhadores que manipulam herbicidas. A grande epidemia de porfiria tóxica na década de 1950 na Turquia foi causada pelo hexaclorobenzeno (HCB) adicionado como um fungicida a sementes de trigo (6).

As manifestações clínicas foram semelhantes as da PCT desencadeada pelo álcool e estrogênios. Este surto de PCT na Turquia, causado pela ingestão de HCB, indicou que a doença pode ocorrer em indivíduos não-predispostos geneticamente (34).

A penetrância clínica da PCT tipo II, herdada de forma autossômica dominante, é relativamente baixa (aproximadamente 20%), por isso a maioria dos indivíduos que herdaram o defeito enzimático não manifesta a doença. Isto sugere que fatores genéticos ou não-genéticos adicionais são necessários para a expressão clínica da doença (1, 5, 47, 55, 56,57).

Pacientes com PCT Tipo I (ou esporádica) não apresentam mutações na uroporfirinogênio-descarboxilase (UROD) e, quando assintomáticos, a atividade da enzima é normal sistemicamente (10).

Pacientes com PCT tipo II (ou familiar) são heterozigotos para mutações UROD e pacientes assintomáticos tem aproximadamente atividade enzimática em 50% do normal sistemicamente, ou seja, a atividade da UROD nos eritrócitos é, geralmente, cerca de metade do normal na PCT tipo II e normal na PCT tipo I (10,20).

A atividade da enzima metade do normal em pacientes do tipo II é um fator predisponente importante, mas não é suficiente por si só para causar PCT sintomática. Outros fatores genéticos e ambientais contribuem para a suscetibilidade em ambos os tipos de PCT I e II (10).

Para os sintomas clínicos da PCT se manifestarem em ambos os tipos (I e II), a atividade da UROD hepática deve estar reduzida em  $< 20\%$  do normal. Assim, os

investigadores procuraram um inibidor que reduzisse a atividade da enzima hepática nos pacientes sintomáticos com PCT tipo I e II. Recentemente, o uroporfometano, uma forma oxidada de uroporfirinogênio, o substrato da UROD, foi demonstrado ser o inibidor da enzima (1).

Esta oxidação do uroporfirinogênio em inibidor é ferro dependente no fígado. Assim sendo, o inibidor é gerado no fígado por espécies reativas de oxigênio, na presença de ferro, enfatizando a importância da sobrecarga do ferro como um fator causal e alvo terapêutico (1,59, 60,61,62).

A porfíria hepatoeritropoiética (PHE) é a forma homozigótica da PCT familiar, está associada com mais de 90% de redução na atividade da UROD. Geralmente causa uma doença grave, clinicamente semelhante a PEC, com fotossensibilidade durante a infância, causando dor imediata sobre pele exposta ao sol, bolhas e cicatrizes mutiladoras da face e dedos. Hipertricose proeminente, dentes fluorescentes, envolvimento mutilante das falanges distais e dos olhos também podem ocorrer (62,63).

#### a) FATORES QUE CONTRIBUEM PARA O DESENVOLVIMENTO DA PCT;

A porfíria cutânea tardia é, essencialmente, uma doença do fígado com efeitos secundários na pele (6), em que os sintomas desenvolvem-se quando há uma diminuição da atividade da uroporfirinogênio descarboxilase hepática (3).

Múltiplos fatores de susceptibilidade, além das mutações hereditárias na UROD em PCT tipo II, parecem atuar sinergicamente para causar o estresse oxidativo e a sobrecarga de ferro necessária para gerar o inibidor e provocar a expressão clínica (59, 60,61).

Os fatores de risco que contribuem para a inativação ou inibição desta enzima são o abuso do álcool, os estrogênios, a hepatite C, infecção pelo HIV e a hemocromatose genética (64, 65,66,67,68,69).

Os mesmos fatores de risco contribuem tanto para uma inativação parcial hepática da uroporfirinogênio descarboxilase na porfíria cutânea tardia esporádica, assim como para uma inativação grave no subtipo familiar (64).

O vírus da hepatite C crônica e abuso de álcool provocam a queda da produção de hepcidina nos hepatócitos, levando a um aumento da absorção intestinal de ferro. O aumento

do ferro hepático e o estresse oxidativo conduzem à formação do inibidor da enzima UROD e à oxidação de porfirinogênios em porfirinas (1,61).

A sobrecarga do ferro hepático acompanha a clínica da PCT em praticamente todos os casos. O aumento dos níveis de ferro plasmático é encontrado em, pelo menos, 60% dos pacientes, confirmando o importante papel do ferro na patogênese da PCT (51).

A importância do excesso de ferro hepático é destacada pelo aumento da prevalência da hemocromatose (HFE) nos pacientes com PCT (10). Foi encontrado um aumento na frequência da mutação C282Y no gene HFE da hemocromatose em pacientes ingleses com PCT esporádica (34).

Esta mutação é responsável em grande parte pela sobrecarga do ferro em populações descendentes de europeus. Homozigose para esta mutação aumenta o risco de desenvolvimento de PCT em 60 vezes e também parece estar associada a um início precoce das lesões cutâneas em ambas as variantes esporádica e familiar da PCT. Uma segunda mutação no gene HFE, H63D, também pode estar associada a PCT em algumas populações (2,34,69).

O álcool mostrou-se indutor da ALA sintetase hepática nos pacientes com PCT. Porém, inibe a atividade de outras enzimas da biossíntese do heme, incluindo ferroquelatase, ALA desidratase, e a UROD dos eritrócitos em indivíduos saudáveis (após ingestão aguda de álcool ou no alcoolismo crônico) (34).

O alcoolismo crônico também aumenta a absorção do ferro da dieta, o que talvez possa estar relacionado com mutações herdadas associadas a hemocromatose (34).

Álcool e estrogênio podem desencadear surtos agudos na PAI, PV e CPH, assim como pode exacerbar a PCT, embora os surtos agudos não ocorram na PCT. O mecanismo pelo qual o estrogênio desencadeia a PCT ainda não está elucidado (34).

A hemodiálise predispõe a PCT (71), apesar desta doença ser menos comum na insuficiência renal do que a pseudoporfiria, a análise da porfirina fecal diferencia estes transtornos. O vírus da imunodeficiência humana (HIV), predispõe à PCT (71), uma associação que pode ser devido a co-infecção com o vírus da hepatite C (72). As porfirinas acumuladas são cancerígenas para o fígado, assim a PCT confere um risco adicional para o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular (6).

## b) APRESENTAÇÃO CLÍNICA;

A PCT esporádica geralmente se apresenta na meia-idade, enquanto a forma familiar pode ocorrer em indivíduos mais jovens (48). Quase todos os pacientes notam fotossensibilidade com aumento da fragilidade na pele exposta à luz, particularmente no dorso das mãos e antebraços, sendo este talvez o aspecto mais específico. A maioria dos pacientes apresentam bolhas, que ao se romperem surgem crostas que se resolvem ao longo de várias semanas, podendo resultar em cicatrizes atróficas, milia e muitas vezes hiper ou hipopigmentação (48).

Hiperpigmentação e hipertricose facial, particularmente nas têmporas e malares, são queixas principalmente das mulheres. A hipertricose melhora lentamente após a depleção dos estoques excessivos de ferro (34). Áreas de alopecia cicatricial devido à resolução de bolhas no couro cabeludo podem estar presentes (48).

Placas esclerodermóides podem se desenvolver tanto nas áreas fotoexpostas como nas áreas cobertas e são indistinguíveis histologicamente da verdadeira esclerodermia. Acredita-se que elas apareçam como resultado da indução do colágeno pela uroporfirina I (75).

Sintomas cutâneos apresentam variações sazonais, mostrando maior intensidade no verão e na primavera do que em outras estações do ano (3). Características neurológicas estão ausentes (10).

### c) HISTOPATOLOGIA;

O achado histopatológico característico é uma bolha subepidérmica, com “festionamento” das papilas dérmicas (papilas muito bem preservadas projetando-se para dentro da bolha) (34). O infiltrado inflamatório é mínimo ou está ausente. Há deposição de material hialino, PAS positivo, diastase resistente dentro e em torno dos vasos sanguíneos da derme superior (6).

A imunofluorescência direta revela depósitos de IgG e C3 ao redor dos vasos da derme papilar e reação menos intensa na junção dermo-epidérmica (34). Estas alterações são mais evidentes nas áreas fotoexpostas, em pacientes com doença ativa, com excreção de porfirinas urinárias aumentadas, e costumam diminuir após o tratamento adequado.

Independente destes achados, deve ser enfatizado que o exame histopatológico não contribui substancialmente para confirmar o diagnóstico de PCT. Assim, não é essencial realizar uma biopsia cutânea na suspeita de porfiria visto que há testes laboratoriais não-

invasivos e porque o trauma deve ser evitado pela cicatrização deficiente característica das porfirias cutâneas (34).

#### d) DIAGNÓSTICO LABORATORIAL;

Os principais achados laboratoriais na PCT são (34,56):

- aumento da excreção urinária de uroporfirinogênio;
- isômero I>III;
- aumento da excreção fecal de isocoproporfirinogênio.

Os pacientes com PCT excretam grandes quantidades de uroporfirina (octo-carboxilada) na urina, assim como porfirinas hepta, hexa e penta carboxiladas.

Na PCT, a deficiência de UROD hepática resulta no acúmulo de porfirinogênio III penta carboxilado, e este é usado como substrato pela enzima coproporfirinogênio oxidase, dando origem a dihidroisocoproporfirinogênio (tipo III), que é então oxidada à isocoproporfirinogênio.

Isto resulta no aumento característico deste componente nas fezes destes pacientes, cujo achado é exclusivo da PCT. A razão entre uroporfirinogênio e coproporfirinogênio na urina é útil para diferenciar a PCT da PV. Na PCT, a razão uro:copro é >3:1 e na PV <1:1.

A uroporfirina (octo-carboxilada) e as porfirinas hepta-carboxiladas são as porfirinas urinárias predominantes nos pacientes com PCT (mais de 90% do total de porfirinas).

O padrão de excreção das porfirinas urinárias é uma mistura de isômeros tipo I e III. A uroporfirinogênio é aproximadamente 60% do tipo I e 40% do tipo III. Já as porfirinas hepta e hexa carboxiladas são em sua maioria (>90%) do tipo III. Enquanto as porfirinas penta e tetra carboxiladas tem 50% de cada isômero.

As porfirinas do plasma também estão aumentadas, o que é útil para o rastreio. Os perfis de excreção podem se tornar normais após longo prazo de remissão (3,10).

Quase todos os pacientes com PCT apresentam estoques de ferro aumentados no corpo, manifestando-se com aumento do ferro sérico, ferritina e/ou níveis de ferro hepático elevados (34).

A sobrecarga de ferro hepático é um achado quase universal na porfiria cutânea tardia. Graus variáveis de disfunção hepática são frequentes nestes pacientes, especialmente em associação com a ingestão excessiva de álcool (3).

Biópsias de fígado frequentemente mostram siderose, que pode ser, em parte, resultante da alteração na expressão da hepcidina (HAMP), independente do genótipo HFE (76).

A frequência de câncer hepático é maior nos pacientes com porfiria cutânea tardia e cirrose do que naqueles somente com cirrose (77,78).

#### e) TRATAMENTO;

O tratamento inclui fotoproteção e eliminação dos fatores de risco tais como álcool, estrogênio e tratamento das infecções virais (HIV, HCV) (34, 56), como também diminuição dos estoques de ferro do organismo (6). O uso de protetores solares opacos e sempre que possível, uso de roupas com proteção UV, são fundamentais para diminuir os sintomas da pele na porfiria cutânea tardia (3).

A descontinuação do uso de estrogênio, por mais de 2 anos, pode induzir remissão da PCT. No entanto, a abstenção do álcool ou o tratamento da hepatite C com interferon- $\alpha$ , nem sempre induz a remissão, mas todos os pacientes devem ser aconselhados a abster-se de álcool ou terapia com estrogênio para evitar a exacerbação da doença (6).

Além de eliminar os fatores desencadeantes, na maioria dos pacientes, pode ser necessário outros tratamentos que podem consistir em repetidas flebotomias, antimaláricos orais ou a combinação de ambos. Também tem sido descritos tratamentos com quelantes do ferro e colestiramina oral (34).

A flebotomia ainda é o tratamento de escolha para PCT. É eficaz porque depleta os estoques excessivos de ferro característicos da doença, eliminando a sobrecarga de ferro hepático, restaurando, assim, a atividade normal da enzima (34).

Na flebotomia em torno de 500 ml de sangue são retirados semanalmente ou a cada duas semanas, até os níveis de hemoglobina alcançarem 10-12g/dL ou até o ferro sérico abaixar para 50-60 $\mu$ g/dL e diminuir a saturação da transferrina para <16%. Alguns acreditam que a flebotomia deva ser continuada até a ferritina sérica atingir o limite inferior da normalidade ( 25ng/mL ou  $\mu$ g/L) (34).

Estes níveis de ferritina podem ser alcançado depois de 5 ou 6 flebotomias, no entanto, os pacientes com PCT e hemocromatose podem necessitar de um maior número de flebotomias (10).

A excreção de porfirinas continua a diminuir mesmo após a flebotomia ser descontinuada. Em mais de 90% dos pacientes tratados regularmente com flebotomia, a excreção de uroporfirinogênio urinário atingiu níveis normais após 5-12 meses (34).

As bolhas são o primeiro sinal a desaparecer (34), geralmente se resolvem dentro de 2-3 meses, a fragilidade cutânea dentro de 6-9 meses, e as concentrações de porfirinas geralmente se normalizam dentro de um ano ou mais, e neste ponto o tratamento deve ser interrompido. Hipertricose e lesões esclerodermóides respondem mais lentamente ao longo dos anos após o tratamento ser interrompido (6).

A duração da remissão induzida pela flebotomia varia muito, desde 6 meses até mais de 10 anos. Recaídas em 1 ano ocorrem em 10-20% dos pacientes (34).

Em alguns pacientes a flebotomia não está recomendada pela presença de anemia, doença cardiopulmonar ou infecção pelo HIV. Nestes casos, o tratamento com baixas doses de antimaláricos, cloroquina e hidroxicloroquina, (34) pode ser uma alternativa útil por mobilizarem as porfirinas em excesso a partir do fígado e promoverem a sua excreção (10).

Doses diárias de cloroquina podem causar uma hepatite aguda potencialmente grave, mas a cloroquina numa dose baixa de 125 mg (6) ou 250 mg (79, 80) tomado duas vezes por semana é seguro e eficaz.

O resultado dos testes de função hepática e níveis de porfirina urinária são monitorados de 3/3 meses, e a medicação é continuada até o nível de uroporfirinogênio urinário estar menor do que 100µg/24h. Para isto costuma ser necessário 6 a 12 meses de tratamento (34).

Hidroxicloroquina (200 mg duas vezes por semana) pode ser usada mas a duração da remissão é mais curta do que com a cloroquina (6). A cloroquina é geralmente menos eficaz em pacientes com hemocromatose. Remissão com cloroquina em baixas doses dura geralmente 17-24 meses (79).

Estudos comparando estas duas possibilidades terapêuticas sugeriram que são igualmente eficazes, entretanto recaídas mais rápidas ocorreram em pacientes tratados com hidroxicloroquina (34).

O tratamento que combina flebotomia com cloroquina pode reduzir a gravidade da hepatotoxicidade em resposta à cloroquina e também acelerar a remissão da doença.

Avaliação oftalmológica pré-tratamento e a cada 6 meses deve ser realizada nos pacientes em uso de antimaláricos (34).

A eritropoietina mobiliza o ferro hepático para a hemoglobina e é o tratamento de escolha para PCT na insuficiência renal, em que os doentes estão muito anêmicos para flebotomia e não podem excretar cloroquina (81).

Para detectar recaídas, e por causa da elevada taxa de doença hepática, concentrações plasmáticas e urinárias de porfirina, metabolismo do ferro (ferro sérico e ferritina) e função hepática devem ser avaliados anualmente (3).

Recentes avanços na nossa compreensão destas doenças incluem o reconhecimento de sua heterogeneidade genética e as variantes da doença, melhora no diagnóstico molecular, na correlação do genótipo com fenótipo, e nos tratamentos atuais e experimentais.

## 2.5 Metabolismo do ferro

O ferro é essencial para o transporte de oxigênio, síntese de DNA e para gerar energia celular. Nos mamíferos, participa da formação de diversas proteínas como hemoglobina nos eritroblastos, da mioglobina nos músculos e dos citocromos no fígado (82).

É utilizado pelo organismo sendo obtido através de duas fontes principais: dieta e da reciclagem de hemácias senescentes. Nossa dieta costuma conter 13 a 18 mg de ferro, dos quais somente 1 a 2 mg serão absorvidos na forma inorgânica ou orgânica (forma heme) (83).

A maior parte do ferro inorgânico apresenta-se na forma férrica ( $\text{Fe}^{+3}$ ) e é encontrada nos vegetais e cereais. Já o ferro heme corresponde a 1/3 do total de ferro da dieta e é proveniente da quebra da hemoglobina e mioglobina contidas na carne vermelha. Ovos e laticínios fornecem menores quantidades deste tipo de ferro, que é melhor absorvido do que a forma inorgânica (84).

No organismo, a maior parte deste metal está associada à molécula de hemoglobina assim, a fagocitose e a degradação das hemácias senescentes representa uma fonte importante. Essa quantidade reciclada é suficiente para manter a necessidade diária de ferro para a eritropoiese (85).

Os macrófagos do baço e da medula óssea e, em menor parte, células de Küpffer no fígado reconhecem modificações bioquímicas na membrana das hemácias senescentes. Estas modificações sinalizam para que o macrófago elimine estas células. O  $\text{Fe}^{+2}$  pode ser estocado no próprio macrófago na forma de ferritina ou ser exportado pela ferroportina. (83).

A quantidade de ferro absorvida é regulada pela necessidade do organismo. Quando há maior demanda, há uma maior expressão das proteínas envolvidas neste processo, como a proteína transportadora de metal divalente (DMT-1) e a ferroportina (FPT) (83).

Para a DMT-1 exercer sua função, o ferro da dieta, que está na forma férrica ( $\text{Fe}^{+3}$ ), precisa ser convertido para ferro ferroso ( $\text{Fe}^{+2}$ ) pela enzima redutase citocromo b duodenal, CYBRD1 (ou Dcytb) (86).

Um indivíduo adulto tem no seu organismo de 4 a 5 g de ferro, sendo que cerca de 2,5 g na forma de hemoglobina (84,85). O ferro é essencial para o corpo, mas extremamente tóxico quando presente em quantidades excessivas. A sobrecarga de ferro induz lesões de órgãos como fígado, coração, pâncreas (podendo causar intolerância à glicose e diabetes mellitus), tireoide, e do sistema nervoso central (87).

A principal causa deste tipo de dano nos órgãos é devido à produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ROS), na presença de excesso de ferro. Entre as ROS, o radical hidroxila é a fração mais tóxica e tem como alvo hidratos de carbono, proteínas e ácidos nucleicos (82,85, 87).

Como o ferro livre é extremamente tóxico para as células, o corpo tem certos mecanismos de defesa com os quais ligam o ferro a vários compartimentos dos tecidos. No soro, o ferro é geralmente ligado a transferrina (Tf) (87).

Desta forma, o ferro é transportado no plasma pela transferrina. A Tf é uma glicoproteína sintetizada e secretada pelo fígado, além da retina, testículos e cérebro (88). Além de solubilizar o ferro, a Tf atenua sua reatividade e facilita sua liberação para as células.

Para o ferro ser transportado pela transferrina, deve estar na forma férrica ( $\text{Fe}^{+3}$ ). A responsável pela oxidação da forma ferrosa ( $\text{Fe}^{+2}$ ) para a forma férrica ( $\text{Fe}^{+3}$ ) é a ceruloplasmina (83).

Em condições normais, a transferrina tem a capacidade de transportar até 12 mg de ferro. Essa capacidade raramente é utilizada e, em geral, 3 mg de ferro circulam ligado à Tf, ou seja, em torno de 30% da Tf está saturada com o ferro (89).

Após o ferro intra-celular ser liberado na circulação através da ferroportina, o  $\text{Fe}^{+2}$  será oxidado e o  $\text{Fe}^{+3}$  transportado pela transferrina até os locais onde será reutilizado, predominantemente medula óssea, onde participará da eritropoiese (87, 90).

No entanto, quando a capacidade de ligação da Tf ao ferro é saturada, o que ocorre num estado de sobrecarga (91), o ferro pode circular livremente pelo soro na forma não ligada à Tf (NTBI- *non-transferrin-bound iron*), que é facilmente internalizada pela célula, contribuindo para o dano celular (91,92).

Quando ligado à Tf, a internalização do ferro é iniciada pela ligação desse complexo (ferro-transferrina) a um receptor específico (TfR) presente na superfície da maioria das células (89). A afinidade do TfR à Tf parece ser determinada pela proteína produzida pelo gene da hemocromatose, HFE, também presente na membrana plasmática dos eritroblastos (83).

Ao contrário do ferro ligado à Tf, a absorção celular de NTBI não é dependente do TfR e, portanto, o ferro resultante é distribuído de forma difusa ao longo dos órgãos, independente da presença do TfR. Neste caso, o NTBI aparece na circulação e é recolhido para dentro da célula por meio de moléculas, tais como DMT1 e ZIP14 nos hepatócitos (Figura 5) (93).

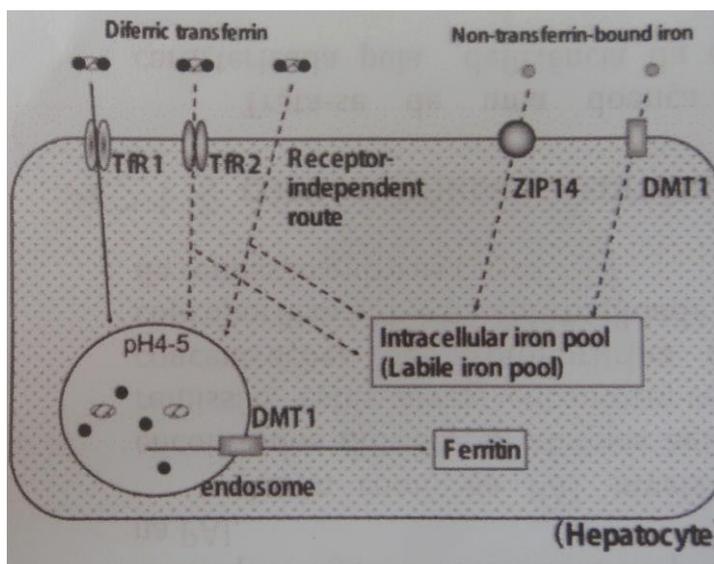


Figura 5: Absorção do ferro nos hepatócitos (88)

O receptor de transferrina 1 (TfR1) é um receptor funcional altamente expresso nos eritroblastos, mas menos nos hepatócitos. A via através do TfR1 é clássica e bem elucidada (87).

Quando o Fe-Tf do soro se liga ao TfR1, o complexo Fe-Tf-TfR1 é internalizado por endocitose, e o ferro é liberado dentro do endossomo quando o pH endossomal é ácido. O complexo apotransferrina-TfR1 resultante é então levado de volta para a superfície da célula, e em seguida a apotransferrina é liberada para ser reutilizada (87).

O ferro no endossoma atravessa a membrana da vesícula e alcança o citoplasma (85). A proteína DMT-1 é essencial para que ocorra este efluxo do ferro para o citoplasma (94).

Um outro membro da família de TfR é o TfR2, bastante semelhante ao TfR1 descrito anteriormente, mas que se expressa predominantemente (83,94) na superfície dos hepatócitos e possui um mecanismo semelhante de reciclagem, (88) mas sua atividade de captação do ferro, diferentemente do TfR1, é menor. O TfR2 tem uma afinidade de ligação muito baixa (cerca de 25 vezes menor) pela Tf diférrica (95). Mutações no TfR2 têm sido descritas em pacientes com hemocromatose hereditária (96).

Uma vez dentro das células, o ferro será estocado na forma de ferritina e hemossiderina, embora uma pequena quantidade seja encontrada no sangue como ferritina sérica. O fígado é o principal órgão de armazenamento de ferro, com a maior capacidade de

seqüestrar o excesso de ferro. Mas este estoque ocorre também no baço e medula óssea (83,87,94).

A apoferritina é a proteína livre do ferro. A apoferritina contendo o núcleo férrico constitui a ferritina, a forma solúvel de armazenamento. Assim, a ferritina contém e mantém os átomos de ferro que poderiam formar agregados de precipitados tóxicos (83,94).

A hemossiderina corresponde à proteína insolúvel. É produzida pela digestão fagocítica da hematina encontrada na maioria dos tecidos, especialmente fígado, baço e medula óssea, sob a forma de grânulos muito maiores do que as moléculas de ferritina, com teor mais elevado de ferro (83).

A ferritina sérica é usada rotineiramente na prática clínica para estimar as reservas de ferro do corpo (87, 97). No entanto, a ferritina no soro pode ser afetada por necrose hepatocelular, inflamação, infecção aguda e crônica e ingestão de álcool, o que pode aumentar a sua concentração desproporcionalmente em relação à quantidade de sobrecarga de ferro (94). Mas é evidente que valores de ferritina inferiores a 12 µg/L são geralmente representativos de deficiência de ferro no organismo (Quadro 2) (87).

Quadro 2 Valores da ferritina (87)

- <input type="checkbox"/> Valores <b>normais</b> de concentração de ferritina sérica:
<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> Masculino: <b>10-220</b> µg / L <input checked="" type="checkbox"/> Feminino: <b>10-85</b> µg / L
- <input type="checkbox"/> Valores entre <b>250-500</b> µg / L :
<input checked="" type="checkbox"/> malignidades, dano hepático crônico, inflamação crônica, leve sobrecarga de ferro
- <input type="checkbox"/> Valores entre <b>500-1000</b> µg / L :
<input checked="" type="checkbox"/> estágio inicial da sobrecarga de ferro, eritropoiese ineficaz (ex: talassemia)
- Valores entre <b>1000-5000</b> µg / L :
<input checked="" type="checkbox"/> sobrecarga de ferro, doença de Still, síndrome hemofagocítica
- Valores entre <b>&gt; 5000</b> µg / L :
<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> sobrecarga de ferro (hemocromatose)

A transferrina sérica não costuma ser considerada um marcador sensível do estado do ferro em si, mas é combinada com o ferro sérico para calcular a saturação de transferrina (97).

A saturação da transferrina não é um índice quantitativo de sobrecarga de ferro, mas pode representar um índice qualitativo de alteração da homeostase do ferro caracterizada pelo aumento da absorção intestinal de ferro e liberação de ferro de macrófagos e células de armazenamento (98).

Nosso organismo não possui vias de excreção ativa de ferro, um mecanismo específico para eliminar o excesso absorvido ou acumulado após a reciclagem do ferro pelos macrófagos (94), de modo que uma carga contínua de ferro superior a 1-2 mg /dia irá resultar em sobrecarga (87).

Normalmente, o ferro é eliminado pelas secreções corpóreas, descamação das células intestinais e epidermais ou sangramento menstrual. Assim, o controle do equilíbrio do ferro requer uma comunicação entre os locais de absorção, utilização e estoque (94).

Esta comunicação é feita pela hepcidina, um hormônio circulante que exerce um papel regulatório fundamental na homeostase do ferro. É um regulador negativo do metabolismo do ferro (83).

A ferroportina é o receptor da hepcidina, a interação hepcidina-ferroportina controla os níveis de ferro nos enterócitos duodenais, hepatócitos e macrófagos (94).

Quando a hepcidina forma um complexo com a ferroportina leva à degradação desta última. No enterócito, o ferro não é transportado para o exterior da célula, sendo a absorção

inibida. No macrófago, o ferro fica acumulado no seu interior, diminuindo o ferro disponível para a eritropoiese (Figura 6) (83,94).

A ferroportina é a responsável pelo efluxo do ferro da célula para o plasma (83). Mutações que inativam a ferroportina prejudicam a absorção e levam ao acúmulo do ferro no enterócito e macrófago (94).

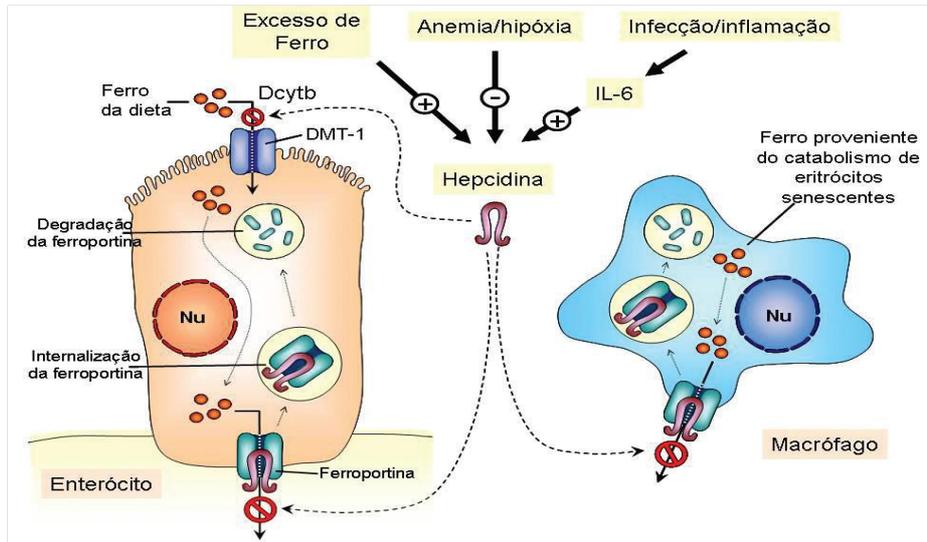


Figura 6 Esquema do metabolismo do ferro no enterócito e macrófago.(83)

Há mais de 50 anos temos conhecimento sobre os fatores básicos relacionados às doenças genéticas com sobrecarga de ferro, mas foi somente nas últimas décadas que houve um grande avanço nas investigações genéticas e moleculares dos aspectos envolvidos com os processos de aquisição, estoque e regulação do ferro.

Estes estudos têm possibilitado um melhor entendimento sobre a fisiopatologia de diversas doenças, que cursam tanto com a sobrecarga como com a deficiência de ferro. No entanto, muito ainda há para ser esclarecido e com o relato constante de novas informações, espera-se que esses conhecimentos, além de auxiliarem no entendimento de mecanismos envolvidos no metabolismo do ferro, possam ser revertidos em novas propostas terapêuticas.

## 2.6 Análise genética

A siderose hepática é comum em pacientes com porfiria cutânea tardia. Mutações no gene da hemocromatose hereditária (HFE) explicam o excesso de ferro em aproximadamente 20% dos pacientes com PCT, sugerindo que o restante ocorra como resultado de outros fatores genéticos e ambientais associados (64,68, 99).

Mutações que acontecem em qualquer um dos genes que codificam componentes desta rede reguladora do metabolismo do ferro, ou que contribuem para facilitar seu transporte através do epitélio intestinal, têm o potencial para alterar a carga de ferro no organismo (97).

Extensa investigação sobre a base molecular das doenças de sobrecarga do ferro proporcionou novos conhecimentos sobre a complexidade do metabolismo do ferro e vias celulares relacionadas (100). Assim, investigamos o possível envolvimento dos genes que afetam a homeostase do ferro, incluindo CP, SLC40A1, HAMP e CYBRD1, em indivíduos com teste negativo ou que eram heterozigotos para a mutação C282Y do HFE .

### 2.6.1 GENE HAMP (Peptídeo Antimicrobiano Hepsidina)

A hepcidina é o principal regulador da absorção de ferro no ser humano. É considerada um regulador negativo por inibir o efluxo do ferro da célula ligando-se ao canal de exportação do ferro (ferroportina), induzindo a sua internalização e degradação (101).

A hepcidina é codificada pelo gene HAMP, localizado no braço longo do cromossomo 19q13 (79,102). É sintetizada principalmente no fígado (87, 103) e liberada na circulação. Havendo sobrecarga de ferro ou inflamação, a síntese de hepcidina no fígado é estimulada, inibindo a absorção do ferro intestinal e a liberação do ferro dos macrófagos, restabelecendo o equilíbrio do ferro (87). A anemia e a hipoxemia reduzem a sua expressão (104,105).

Outros fatores implicados na regulação da hepcidina são o álcool, a hepatite C e o estrogênio. Vários grupos têm relatado a diminuição da expressão de HAMP nestes casos, levando à sobrecarga de ferro hepático (106).

A hepcidina age sobre o intestino delgado para limitar a absorção de ferro, e a maioria das doenças que se apresentam com excesso de ferro compartilham uma característica comum, de níveis inadequadamente baixos de hepcidina (107).

A expressão da hepcidina hepática em doentes com PCT está significativamente reduzida, levando ao aumento das exportações de ferro pelos enterócitos e macrófagos (79). A siderose resultante é necessária para gerar o inibidor da UROD, responsável pela expressão do fenótipo PCT (1).

Estes dados indicam que a siderose associada a PCT provavelmente decorre do HAMP desregulado (79), levando a uma deficiência de hepcidina, e consequentemente o excesso de ferroportina, causando uma liberação exagerada de ferro dos enterócitos e macrófagos com contínua absorção intestinal e acúmulo de ferro nos tecidos parenquimais.

#### 2.6.2 Gene SLC40A1 (Soluta carreador familiar 40 membro 1)

O gene está localizado no cromossomo 2q32 e codifica a proteína ferroportina. A ferroportina é outro fator importante no metabolismo do ferro, pois é responsável pela exportação unidirecional de ferro a partir das células para estruturas extracelulares. Nos enterócitos, exporta ferro através da membrana basolateral e, em seguida, para o plasma. E também regula o fluxo de ferro do interior dos macrófagos para o meio extracelular (108).

É o único mecanismo de efluxo de ferro da célula para o plasma (83). Mutações que inativam a ferroportina levam ao acúmulo do ferro no enterócito e macrófago (102).

A ferroportina é regulada diretamente pela hepcidina, a interação hepcidina-ferroportina controla os níveis de ferro nos enterócitos duodenais, hepatócitos e macrófagos (109). A hepcidina se liga a ferroportina causando a sua internalização (110).

Até onde sabemos, já foram descritos dois tipos de mutações no SLC40A1 com efeitos sobre a função de proteínas que conduzem à sobrecarga de ferro (111). Uma delas envolve a perda da sua capacidade para exportar ferro, provocada por um defeito na localização da proteína sobre a superfície da célula. Isto causa subsequente sequestro de ferro, principalmente nos macrófagos, resultando em doença da ferroportina típica, com baixa saturação de transferrina e precoce sobrecarga de ferro nas células de Küpffer (108).

No outro tipo, a mutação não altera a atividade intrínseca da ferroportina, mas confere-lhe resistência à inibição pela hepcidina e, assim, aumenta a absorção intestinal do

ferro, causando uma elevada saturação de transferrina e sobrecarga de ferro precoce no hepatócito semelhante ao que ocorre na hemocromatose hereditária clássica (108).

As mutações que costumam prejudicar a liberação de ferro dos macrófagos, resultam em inadequado fornecimento de ferro para a medula óssea, o que por sua vez, aumenta a absorção de ferro (112).

### 2.6.3 Gene CYBRD1 (Citocromo B Redutase 1)

Localizado no cromossomo 2q31, este gene codifica a proteína citocromo b redutase 1 que possui uma atividade ferro redutase, contribuindo para a absorção de ferro (113,100). A CYBRD1, também denominada DCYTB (*duodenal cytochrome B*), está presente na borda em escova dos enterócitos duodenais.

É responsável por reduzir o ferro da dieta que encontra-se na forma férrica ( $\text{Fe}^{+3}$ ) para a forma ferrosa ( $\text{Fe}^{+2}$ ), facilitando o transporte deste metal para dentro das células da mucosa intestinal.

Uma alta atividade da CYBRD1 resulta no aumento dos valores de ferro disponível para o transporte para a mucosa epitelial do intestino e, por sua vez, ao aumento da absorção de ferro e de saturação de transferrina (102).

Estudos demonstraram uma associação entre ferritina sérica e CYBRD1. Uma menor expressão deste gene, leva a uma menor absorção de ferro pelo intestino, protegendo, portanto, contra a sobrecarga de ferro (102).

Em outro estudo com pacientes africanos apresentando sobrecarga de ferro não relacionada ao gene da hemocromatose (HFE), foi demonstrado o possível envolvimento dos genes SLC40A1 e CYBRD1, sendo observadas duas novas mutações neste último (102). Isto realça a importância do estudo do gene CYBRD1 nas doenças que se apresentam com sobrecarga de ferro, como a PCT (100).

#### 2.6.4 Gene CP (Ceruloplasmina)

O gene CP, localizado no cromossomo 3q23-24, codifica a proteína ceruloplasmina. Esta enzima é essencial para a homeostase do ferro, pois é responsável pela oxidação do ferro na forma ferrosa ( $\text{Fe}^{+2}$ ) para a forma férrica ( $\text{Fe}^{+3}$ ), visto que a transferrina possui afinidade apenas pela forma férrica (94).

Estudos demonstraram a existência de uma complexa interação entre os genes CP e HFE em ratos transgênicos, sugerindo que o CP é um gene modificador da hemocromatose hereditária – HFE (102). A diminuição do nível sérico de transferrina é uma observação comum na hemocromatose hereditária e é geralmente considerada secundária à sobrecarga de ferro hepática (114).

Indivíduos com deficiência hereditária de ceruloplasmina apresentam acúmulo de ferro na maioria dos tecidos, sugerindo que a ceruloplasmina seja importante para a liberação normal do ferro celular, causando hiperferritinemia quando ocorre mutação no gene.

Parece razoável supor que os fatores genéticos podem influenciar a saturação de transferrina, aumentando assim a deposição de ferro e armazenamento (115), contribuindo para a sobrecarga de ferro observada nos pacientes com PCT.

#### 2.6.5 Princípios básicos da genética

O termo gene foi cunhado por Johansen em 1909, quando também estabeleceu a distinção entre os termos *genótipo*, significando a constituição gênica, e *fenótipo*, significando a manifestação do gene.

O gene corresponde a um trecho da molécula do DNA. O DNA é composto por nucleotídeos. Cada nucleotídeo é constituído por uma base nitrogenada, uma pentose e um fosfato. A dupla hélice apresenta, em cada filamento, uma alternância de pentose e fosfato, ficando as bases nitrogenadas voltadas para dentro.

Os filamentos têm polaridade inversa, isto é, um é 5'-3' em um sentido, e o outro, 3'-5' no outro sentido. A pentose do DNA é a desoxirribose, e as bases nitrogenadas são classificadas em purinas e pirimidinas. As purinas são a adenina e a guanina, enquanto as pirimidinas são a citosina e a timina. As bases de um filamento se pareiam com as do outro

por meio de pontes de hidrogênio, sempre uma timina com uma adenina (duas pontes) e uma citosina com uma guanina (três pontes) (116).

Todo o DNA de nossas células encontra-se estruturado em cromossomos. Cromossomos homólogos são aqueles que apresentam genes para as mesmas características nas mesmas posições. Os genes alelos são genes que ocupam a mesma posição (*locus*) nos cromossomos homólogos e são representados por letras.

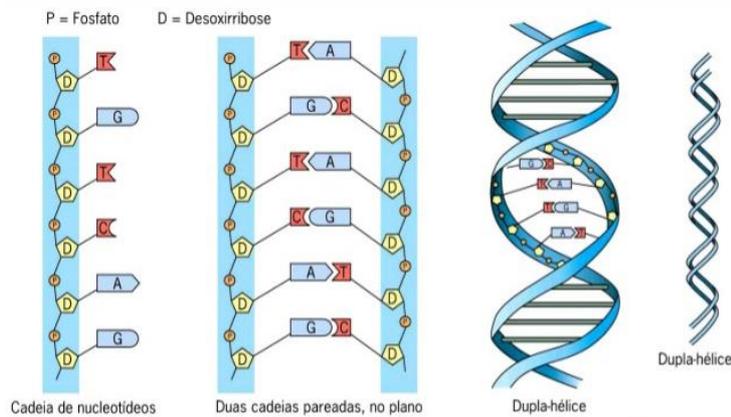


Figura 7 - Esquema da molécula de DNA.

O polimorfismo é considerado como uma variação genética que pode ocorrer numa sequência de DNA, encontrada em pelo menos 1% da população. As formas mais comuns de polimorfismos genéticos são: deleções, mutações e substituições de base única.

Polimorfismos de nucleotídeo único (SNP - Single Nucleotide Polymorphisms) é uma variação na sequência de DNA que afeta somente uma base (adenina, timina, citosina ou guanina). Estas variações devem ocorrer em no mínimo 1% de uma determinada população para ser considerada como um SNP. Se, por outro lado, a frequência de uma variação for inferior a 1%, a mesma será considerada simplesmente uma mutação.

Polimorfismos de inserção/deleção (indels) são variações de comprimento geradas por inserção ou deleção de um ou mais nucleotídeos em uma sequência de DNA.

## 2.7 Ancestralidade

O Brasil é hoje o quinto país mais populoso do mundo, possuindo mais de 206 milhões de habitantes. Nossa população foi composta principalmente por três etnias: o branco europeu, o negro africano e o indígena nativo, resultando numa miscigenação que marcou profundamente o país tanto do ponto de vista demográfico quanto cultural (117).

A distribuição da população segundo cor ou raça reflete os processos migratórios ao longo da história. Em 1500, quando chegaram os primeiros portugueses, o território onde está hoje o Brasil era habitado apenas por tribos indígenas.

Com a colonização, além dos portugueses, a população nativa teve contato com espanhóis e franceses. Mais tarde, negros africanos foram trazidos para trabalhar como escravos nas lavouras de cana-de-açúcar e na mineração. Estima-se que entre 1781 e 1855, cerca de dois milhões de negros ingressaram no País na condição de escravo.

Como consequência, a população brasileira é uma das mais heterogêneas do mundo. Esta heterogeneidade da população brasileira apresenta uma dificuldade adicional na farmacogenética e pesquisa genética clínica, particularmente na concepção da associação de estudos caso-controle, em que a presença de estratificação entre os grupos caso e controle pode produzir resultados confusos levando a conclusões errôneas (118).

As estatísticas mais recentes do IBGE apontam o predomínio de pessoas que se autodeclararam de cor branca – 45,5% da população (92,4 milhões). Embora, na primeira década do século 21, a distribuição populacional tenha mudado no que diz respeito à caracterização por cor ou raça: houve um aumento do número de brasileiros que se autodeclararam pretos ou pardos (117).

Estudos recentes têm demonstrado apenas uma fraca correlação entre a pigmentação da pele ou etnia autodeclarada e ascendência genética, determinada por meio de marcadores de DNA (119, 120,121). Portanto, é necessária uma avaliação precisa da ascendência genética de um indivíduo para controlar a estratificação em estudos de associação genética entre populações miscigenadas.

Os marcadores informativos de ascendência (AIMS) apresentam marcada diferença nas frequências alélicas entre grupos geograficamente separados, provando ser especialmente

úteis para inferir a origem biogeográfica putativa dos indivíduos e estimar as proporções de ancestralidade dos indivíduos e das populações miscigenadas (122, 123,124).

Os marcadores informativos de ancestralidade (AIMs) apresentam uma vantagem substancial sobre as características físicas visto que são constantes por toda vida. Estes marcadores são poderosas ferramentas para inferir a composição genética em populações miscigenadas. Os AIMs também são melhores que a avaliação da sequência mitocondrial, pois esta última sozinha não determina a etnia de uma pessoa pois se relaciona exclusivamente com a herança materna (125,126).

Os marcadores informativos de ancestralidade apresentam elevada divergência nas frequências alélicas entre populações com diferentes ancestralidades ou geograficamente distantes. No campo da genética populacional, os AIMs são particularmente úteis para inferir a origem de indivíduos, estimar proporções de ancestralidade em populações miscigenadas, e analisar a estrutura dessas populações. Adicionalmente, podem ajudar a compreender dinâmicas migratórias e eventos de colonização. Na genética clínica e medicina genômica avaliam risco e/ou predisposição a doenças e respostas a tratamentos de acordo com a etnia pré-estabelecida.

A adequada inferência da ancestralidade genética de uma amostra está dependente da existência de populações de referência adequadas para cada componente ancestral em estudo. Idealmente, essas bases de dados de referência têm um grande catálogo de marcadores genotipados num grupo alargado de populações representativas da distribuição da variabilidade genética em todo o globo, o que irá permitir subseqüentes análises direcionadas aos objetivos dos diferentes estudos.

Desta forma, um sistema multiplex constituído por 46 marcadores informativos de ancestralidade foi testado com representantes europeus, africanos, asiáticos e ameríndios e mostrou excelente discriminação, representando uma valiosa ferramenta para estudos de ancestralidade etnogeográfica (124).

Considerando os registros históricos de uma contribuição essencialmente tri-híbrida de ameríndios, europeus e africanos para a formação da atual população brasileira, estudos recentes utilizando AIMs autossômicos confirmaram uma herança essencialmente tri-híbrida e mostraram uma ascendência européia predominante para a maioria das populações brasileiras.

O estudo da ancestralidade genética realizado por *Manta et al* (127) em indivíduos do Rio de Janeiro evidenciou uma população global de ascendência predominantemente europeia (55,2%), com menor proporção africana (31,1%) e indígena (13,7%).

A frequência de inúmeros polimorfismos varia amplamente entre as populações. Esta heterogeneidade e miscigenação tem implicações importantes no perfil protéico herdado das doenças, enfatizando a importância de se avaliar a ancestralidade em estudos envolvendo doenças genéticas.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Casuística

Estudo transversal, do tipo série de casos, sendo incluídos por alocação consecutiva 30 pacientes (13 mulheres e 16 homens, com idade entre 19 e 74 anos) e que receberam o diagnóstico de Porfiria Cutânea Tardia, comprovado através de exame clínico, laboratorial e/ou histopatológico, no período de 2011 a 2014, do ambulatório de Dermatologia Geral do Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE).

Todos os pacientes leram e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Apêndice A). O protocolo deste estudo foi aprovado sob o número CAAE: 17620613.0.0000.5259; parecer número: 402.867.

Foram coletadas amostras de sangue para pesquisa dos polimorfismos nos genes CP, CYBRD1, HAMP e SLC40A1 realizada no Laboratório de Histocompatibilidade e Criopreservação da UERJ (HLA- UERJ) localizado na Policlínica Piquet Carneiro. A avaliação da ancestralidade foi realizada pelo Laboratório de Diagnósticos por DNA da UERJ.

A frequência dos alelos da mutação C282Y no gene HFE nos pacientes com PCT foram obtidas através do estudo realizado também no HLA/UERJ por Souto em 2013, sendo considerados negativos para a respectiva mutação (128).

Comparamos as frequências encontradas nos pacientes portadores de PCT com um painel com 107 indivíduos saudáveis da população do Rio de Janeiro, constituído por doadores voluntários do banco de medula óssea do HemoRio-RJ, pareado por idade, sexo e ancestralidade genética. Trata-se de um grupo de indivíduos aparentemente normais, não submetidos qualquer tipo de seleção.

## 3.2 Métodos

### 3.2.1 Coleta e Processamento das Amostras

Coleta de sangue foi realizada em tubo com anticoagulante EDTA devidamente identificado, e prontamente encaminhado para o laboratório HLA. Após o registro no laboratório a tubo foi encaminhado para área técnica e centrifugado a 1.500rpm por 10 minutos para separação de fases. Com o auxílio de uma pipeta Pasteur foram transferidos para microtubos as frações de plasma e papa de leucócitos, em seguida as amostras foram destinadas à extração ou congeladas à -80°C para posterior extração.

### 3.2.2 Extração do DNA

As amostras de sangue foram extraídas utilizando o *QIAamp DNA Blood Kit* segundo informações do fabricante. Com as amostras descongeladas foram transferidos para um novo microtubo identificado 200,0µl de amostra de sangue e adicionados 20,0µl da QIAGEN Protease, homogeneizados cuidadosamente com a pipeta. Em seguida adicionados 200,0µl do tampão AL com carreador (50,0pg/µl) e homogeneizado em agitador por 15 segundos para lise celular e incubação a 56°C por 10 minutos.

Após centrifugação breve foram adicionados 200,0µl de etanol P.A. às amostras e novamente os microtubos foram homogeneizados em vortex brevemente centrifugados. O volume foi integralmente transferido para a coluna de sílica com o tubo coletor e centrifugados a 8000rpm por 1 minuto, a coluna transferida para um novo tubo coletor adicionado 500,0µl de tampão AW1 e centrifugados a 8000rpm por 1 minuto.

Novamente a coluna transferida foi para um novo tubo coletor adicionado 500,0µl de tampão AW2 e centrifugados a 13.000rpm por 3 minutos. No final dessa etapa, a coluna de sílica então foi transferida para microtubo de coleta identificado e adicionados 100,0µl de tampão AE à coluna, incubado a temperatura ambiente por 5 minutos.

Após centrifugado por 8000rpm por um minuto para recuperação do DNA, a coluna então foi descartada e o microtubo devidamente armazenado. A análise qualitativa e quantitativa do extraído foi aferida em eletroforese de gel de agarose 0,8% (p/v) e visualizado com SYBR<sup>®</sup> Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, EUA) em ultravioleta 500 nm.

### 3.2.3 Análise da Ancestralidade Genética

Um painel de 46 marcadores informativos de ancestralidade - INDELS, cujas frequências alélicas apresentam diferenças significativas entre europeus, africanos e nativos americanos, foi genotipado em um único PCR multiplex seguido por eletroforese capilar, de acordo com o protocolo descrito por Pereira et al (124). Fragmentos amplificados marcados com corante foram separados e detectados pelo sequenciador automático ABI 3500 (Life Technologies). As amostras foram genotipadas usando o programa GeneMapper v.4.1 (Life Technologies). A nomenclatura dos alelos está de acordo com Pereira et al (124). Para testar a estrutura das populações e estimar proporções de ancestralidade foi utilizado o programa STRUCTURE v2.3.3. Este programa consiste num método Bayesiano de agrupamento ou clustering genético baseado em diferentes modelos, em que é assumida a existência de K clusters ou populações sendo os indivíduos agrupados com base no seu genótipo, considerando que cada população é caracterizada por um conjunto de frequências alélicas ancestrais em cada locus (129).

Neste estudo, considerando a formação histórica da população brasileira, presumimos uma contribuição essencialmente tri-híbrida de americanos nativos, europeus e africanos (ex, K=3) para a formação genética atual da população brasileira.

Para cada corrida foram aplicados 100.000 passos de burn-in seguidos de 100.000 interações de Markov Chain Monte Carlo (MCMC). Foi aplicado o modelo default “admixture model” e as frequências alélicas foram correlacionadas e atualizadas usando somente indivíduos com POPFLAG=1 (neste caso, as amostras HGDP-CEPH foram usadas como referência).

### 3.2.4 Técnica de avaliação dos polimorfismos

A genotipagem dos genes CYBRD1 (rs868106), CP (rs17838832), SLC40A1 (rs13015236 e rs11568351) e HAMP (rs10421768) foi realizada através da PCR em tempo real, utilizando-se sonda TaqMan® de uso comercial (ABI assay; Applied Biosystems) marcadas com os fluoróforos VIC e FAM, sendo C\_8823190\_1 para rs868106, C\_32610841\_10 para rs17838832, C\_2108649\_10 para rs13015236, C\_2108647\_10 para rs11568351 e C\_2604942\_10 para rs10421768. Resumidamente, a reação foi realizada em um volume final de 10 ul, contendo 40 ng de DNA genômico, Taqman SNP Genotyping

Assays 40X e Taqman Genotyping Master Mix, de acordo com as instruções do fabricante. Inicialmente as amostras foram submetidas a uma etapa de leitura pré-PCR a 60°C por 30 segundos, seguida pela etapa de desnaturação a 95°C durante 10 minutos. Em seguida foram submetidas a etapa de amplificação que consistia em 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto, para anelamento do primer e extensão dos fragmentos.

Após a amplificação dos fragmentos de DNA, as amostras foram submetidas a etapa final de leitura pós-PCR a 60°C durante 30 segundos. A reação da PCR foi realizada com auxílio do termociclador ABI StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA) através da análise de discriminação alélica.

### 3.3 Análise estatística

Os resultados da distribuição dos pacientes segundo a ancestralidade genética foram analisados por meio de estatística descritiva dos percentuais obtidos, para tanto, utilizou-se o software Excel 2007.

As frequências alélicas e genotípicas foram estimadas utilizando o teste exato de Fisher, adequado para pequenas amostras, e/ou análise de qui-quadrado ( $X^2$ ). Considerou-se como significativo o resultado do teste cujo p-valor fosse inferior a 0,05. Para tanto, utilizou-se o software Epi Info.

#### **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os resultados e discussão serão apresentados através de um artigo aceito para publicação nos Anais Brasileiros de Dermatologia e de um manuscrito submetido à revista *Journal of Investigative Dermatology*, encontrando-se no apêndices B e C.

## CONCLUSÕES

O alelo G no rs17838832 do gene CP foi mais frequente entre os pacientes com PCT comparado com os controles. As frequências dos genótipos GG e AG foram maiores no grupo com PCT do que nos indivíduos saudáveis.

Encontramos frequências maiores do alelo C no rs13015236 do gene SLC40A1 em indivíduos saudáveis quando comparados com os pacientes. Os genótipos CC e CT foram mais frequentes nos controles.

De acordo com nosso estudo, a presença do alelo G (gene CP) parece predispor os portadores para o desenvolvimento da PCT. Em contrapartida, a presença de um único alelo C (gene SLC40A1) parece já conferir proteção contra PCT, visto que ambos os genótipos CC e CT foram mais frequentes nos controles.

As frequências alélicas e genóticas dos seguintes polimorfismos analisados: rs868106 no gene CYBRD1, rs11568351 no gene SLC40A1 e rs10421768 no gene HAMP, foram similares nos pacientes e nos controles.

Houve um predomínio significativo da ancestralidade europeia (70,2%) e pequena contribuição das raízes africana e ameríndia (20,1% e 9,7% respectivamente) nos pacientes com PCT.

Nossas análises estatísticas não revelaram nenhuma associação entre os polimorfismos estudados e as raízes ancestrais genéticas.

## SUGESTÕES

Aumentar a casuística através da organização de estudos multicêntricos para ampliar o conhecimento do possível papel destes genes na homeostase do ferro em pacientes com PCT.

De acordo com os resultados encontrados neste estudo, novas investigações sobre o gene CP devem ser incentivadas.

Estudar outros genes reguladores do metabolismo do ferro que possam contribuir para o desencadeamento da PCT.

## REFERÊNCIAS

- 1- Phillips JD, Bergonia HA, Reilly CA, *et al.* A porphomethene inhibitor of uroporphyrinogen decarboxylase causes porphyria cutanea tarda. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104 (12): 5079-5084.
- 2- Frank J, Gutiérrez P. Porphyria. In: Bologna J, Jorizzo j, Rapini R. *Dermatology*. 2<sup>nd</sup> ed. Oxford, UK: Mosby Elsevier; 2008: 641-652.
- 3- Puy H, Gouya L, Deybach JC. Porphyrias. *Lancet* 2010; 375:924-937.
- 4 - Whatley SD, Mason NG, Woolf JR, *et al.* Diagnostic strategies for autosomal dominant acute porphyrias: Retrospective analysis of 467 unrelated patients referred for mutational analysis of the HMBS, CPOX, or PPOX gene. *Clin Chem* 2009; 55(7): 1406-1414.
- 5 - Sassa S, Kappas A. Molecular aspects of the inherited porphyrias. *J Intern Med J Intern Med* 2000; 247(2):169-178.
- 6 - Sarkany RPE. The cutaneous porphyrias. In: Burns T, Breathnach S, Cox N, Griffiths C. *Rook's Textbook of Dermatology*. 8<sup>th</sup> ed. Oxford, UK; 2010:59.1-59.21.
- 7- Anderson KE, Bishop DF, Desnick RJ. Disorders of heme biosynthesis: X-linked sideroblastic anemias and the porphyrias. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, *et al*, eds. *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*. New York, NY: McGraw-Hill; 2001:2991-3062.
- 8- Moore MR, McColl KM, Rimington C, Goldberg A. Disorders of porphyrin metabolism. New York: Plenum Publishing Corporation, 1987.
- 9- Bishop DF, Henderson AS, Astrin KH. Human delta-aminolevulinate synthase: assignment of the housekeeping gene to 3p21 and the erythroid-specific gene to the X chromosome. *Genomics* 1990; 7: 207-214.
- 10- Balwani M, Desnick R. The porphyrias: advances in diagnosis and treatment. *Blood* 2012;120(23):4496-4504.
- 11- Elder GH. The cutaneous porphyrias. In: Hawk JLM, ed. *Photodermatology*. London: Arnold, 1999: 171–199.
- 12 - Del C, Battle AM. Tetrapyrrole biosynthesis. *Semin Dermatol* 1986; 5: 70–87.
- 13 - Anderson KE, Bloomer JR, Bonkovsky HL, *et al.* Recommendations for the diagnosis and treatment of the acute porphyrias. *Ann Intern Med*. 2005;142(6):439-450.
- 14 - Desnick RJ, Astrin KH. Inherited porphyrias. In: Rimoin DL, Connor M, Pyeritz RE, *et al*, eds. *Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics* (5<sup>th</sup> ed). Edinburgh, United Kingdom: Churchill-Livingstone; 2007:2331- 2358.

- 15 - Layer G, Reichelt J, Jahn D, Heinz DW. Structure and function of enzymes in heme biosynthesis. *Protein Sci.* 2010;19(6):1137- 1161.
- 16 - Lecha M, Puy H, and Deybach JC. Erythropoietic protoporphyria. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 2009; 4:19.
- 17 - Fraser DJ, Podvinec M, Kaufmann MR, Meyer UA. Drugs mediate the transcriptional activation of the 5-aminolevulinic acid synthase (ALAS1) gene via the chicken xenobiotic-sensing nuclear receptor (CXR). *J Biol Chem* 2002; 277: 34717–34726.
- 18 - Thunell S. Outside the box: genomic approach to acute porphyria. *Physiol Res* 2006; 55 (suppl 2): 43–66.
- 19 - Smith SJ, Cox TM. Translational control of erythroid delta-aminolevulinic acid synthase in immature human erythroid cells by heme. *Cell Mol Biol (Noisy-legrand)* 1997; 43: 103–114.
- 20- Lambrecht RW, Thapar M, Bonkovsky HL. Genetic aspects of porphyria cutanea tarda. *Semin Liver Dis* 2007; 27:99-108.
- 21 - Ibrahim NG, Friedland ML, Levere RD. Heme metabolism in erythroid and hepatic cells. *Prog Hematol* 1983; 13:75-130
- 22 - Elder GH, Hift RJ, Meissner PN. The acute porphyrias. *Lancet* 1997; 349: 1613-1617.
- 23 - Bylesjo I, Wikberg A, Andersson C. Clinical aspects of acute intermittent porphyria in northern Sweden: a population-based study. *Scand J Clin Lab Invest* 2009; 69: 612-618.
- 24 - Andersson C, Innala E, Backstrom T. Acute intermittent porphyria in women: clinical expression, use and experience of exogenous sex hormones. A population-based study in northern Sweden. *J Intern Med* 2003; 254: 176-183.
- 25 - Thunell S, Pomp E, Brun A. Guide to drug porphyrogenicity prediction and drug prescription in the acute porphyrias. *Br J Clin Pharmacol* 2007; 64(5): 668-679.
- 26 - Crimlisk HL. The little imitator–porphyria: A neuropsychiatric disorder. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1997; 62:319.
- 27 - Moore MR, Hift RJ. Drugs in the acute porphyria-toxicogenetic diseases. *Cell Mol Biol (Noisy- le-grand)* 1997; 43:89.
- 28- European porphyria network. Treatment. Disponível em: [www.porphyrria-europe.com](http://www.porphyrria-europe.com). Acesso em: 10 jun. 2013.
- 29 - Mustajoki P, Nordmann Y. Early administration of heme arginate for acute porphyric attacks. *Arch Intern Med* 1993; 153: 2004-2008.
- 30 - Crimlisk HL. The little imitator–porphyria: a neuropsychiatric disorder. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1997; 62: 319–328.
- 31 - Deacon AC, Elder GH. ACP Best Practice No 165: front line tests for the investigation of

suspected porphyria. *J Clin Pathol* 2001; 54: 500-507.

32 - Deacon A. The porphyrias and their investigation. *CPD Bull Clin Biochem* 1999; 1:122-126.

33 - Murphy GM. Diagnosis and management of the erythropoietic porphyrias. *Dermatol Ther* 2003; 16:57-64.

34 - Bickers DR, Frank J. The porphyrias. In: Freedberg IM, Eisen AZ, Wolff K, et al. *Fitzpatrick's Dermatology in Medicine*. 6th ed. New York, NY: McGraw-Hill; 2003:1435-1466.

35- Holme SA, Anstey AV, Finlay AY *et al.* Erythropoietic protoporphyria in the U.K.: clinical features and effect on quality of life. *Br J Dermatol* 2006; 155: 574-581.

36- Deleo VA, Poh-Fitzpatrick M, Mathews-Roth M, Harber LC. Erythropoietic protoporphyria. Ten years experience. *Am J Med* 1976; 60: 8-22.

37-Poh-Fitzpatrick MB. Human protoporphyria: reduced cutaneous photosensitivity and lower erythrocyte porphyrin levels during pregnancy. *J Am Acad Dermatol* 1997; 36: 40-43.

38- Schneider-Yin X, Gouya L, Meier-Weinand A, *et al.* New insights into the pathogenesis of erythropoietic protoporphyria and their impact on patient care. *Eur J Pediatr* 2000; 159:719-725.

39- Doss MO, Frank M. Hepatobiliary implications and complications in protoporphyria, a 20-year study. *Clin Biochem* 1989; 22: 223-229.

40 – Cox TM. Erythropoietic protoporphyria. *J Inherit Metab Dis* 1997; 20: 258-269.

41 – Minder EI, Schneider-Yin X, Steurer J, Bachmann LM. A systematic review of treatment options for dermal photosensitivity in erythropoietic protoporphyria. *Cell Mol Biol* 2009; 55: 84-97.

42 - Johnson JA. Durable protection against long-wavelength UV-A radiation and blue light. *Arch Dermatol* 1992; 128: 409.

43 - Harms J, Lautenschlager S, Minder CE, Minder EI. An alphamelanocyte-stimulating hormone analogue in erythropoietic protoporphyria. *N Engl J Med* 2009; 360(3): 306-307.

44 - Tsai SF, Bishop DF, Desnick RJ. Human uroporphyrinogen III synthase: Molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of a full-length cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85(19):7049-7053.

45 - Fritsch C, Bolsen K, Ruzicka T, Goerz G. Congenital erythropoietic porphyria. *J Am Acad Dermatol* 1997; 36: 594-610.

46 – Novis FD, Azulay DR. Porfirias. In: Azulay RD, Azulay DR. *Dermatologia*. 5a. ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan; 2011:526-531.

- 47- Fonseca, JCM; Porfíria Cutânea Tardia Sintomática: estudo dos antígenos HLA em 30 pacientes. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1995. Tese de Doutorado.
- 48- Fonseca, JCM; Porfíria Cutânea Tardia. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1988. Dissertação de Mestrado.
- 49- Sarkany RP. The management of porphyria cutanea tarda. *Clin Exp Dermatol* 2001; 26:225-232.
- 50- Grossman ME, Bickers DR, Poh-Fitzpatrick MB; *et al.* Porphyria cutanea tarda. Clinical features and laboratory findings in 40 patients. *Am J Med* 1979;67(2):277-286.
- 51 - Elder GH. Porphyria cutanea tarda. *Semin Liver Dis* 1998; 18: 67-75.
- 52- Held JL Erythrocyte uroporphyrinogen decarboxylase activity in porphyria cutanea tarda: A study of 40 consecutive patients. *J Invest Dermatol* 1989; 93:332.
- 53- Roberts AG Heterogeneity of familial porphyria cutanea tarda. *J Med Genet* 1988; 25:669.
- 54- Elder GH, Lee GB, Tovey JA: Decreased activity of hepatic uroporphyrinogen decarboxylase in sporadic porphyria cutanea tarda. *N Engl J Med* 1978; 299:274.
- 55 - Elder GH, Roberts AG. Uroporphyrinogen decarboxylase. *J Bioenerg Biomembr* 1995; 27(2): 207-214.
- 56- Jalil S, Grady JJ, Lee C, Anderson KE. Associations among behavior-related susceptibility factors in porphyria cutanea tarda. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2010; 8(3):297-302.
- 57 - Brady JJ, Jackson HA, Roberts AG, *et al.* Co-inheritance of mutations in the uroporphyrinogen decarboxylase and hemochromatosis genes accelerates the onset of porphyria cutanea tarda. *J Invest Dermatol* 2000; 115(5):868-874.
- 58 - Phillips JD, Parker TL, Schubert HL, *et al.* Functional consequences of naturally occurring mutations in human uroporphyrinogen decarboxylase. *Blood* 2001; 98(12): 3179-3185.
- 59- Egger NG, Goeger DE, Payne DA, *et al.* Porphyria cutanea tarda: multiplicity of risk factors including HFE mutations, hepatitis C, and inherited uroporphyrinogen decarboxylase deficiency. *Dig Dis Sci* 2002; 47(2):419-426.
- 60 - Wickliffe JK, Abdel-Rahman SZ, Lee C *et al.* CYP1A2\*1F and GSTM1 alleles are associated with susceptibility to porphyria cutanea tarda. *Mol Med* 2011;17(3):241-247.
- 61 - Ryan Caballes F, Sendi H, Bonkovsky HL. Hepatitis C, porphyria cutanea tarda and liver iron: an update. *Liver Int* 2012;32(6):880-893.
- 62 - Mascaro JM, Herrero C, Lecha M *et al.* Uroporphyrinogen-decarboxylase deficiencies: porphyria cutanea tarda and related conditions. *Semin Dermatol* 1986; 5: 115–124.

- 63 - Smith SG. Hepatoerythropoietic porphyria. *Semin Dermatol* 1986; 5: 125–137.
- 64 - Bulaj ZJ, Phillips JD, Ajioka RS, et al. Hemochromatosis genes and other factors contributing to the pathogenesis of porphyria cutanea tarda. *Blood* 2000; 95: 1565-1571.
- 65 - Gisbert JP, Garcia-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: 620-627.
- 66 - Fargion S, Piperno A, Cappellini MD, et al. Hepatitis C virus and porphyria cutanea tarda: evidence of a strong association. *Hepatology* 1992; 16: 1322-1326.
- 67 - Egger NG, Goeger DE, Payne DA, *et al.* Porphyria cutanea tarda: multiplicity of risk factors including HFE mutations, hepatitis C, and inherited uroporphyrinogen decarboxylase deficiency. *Dig Dis Sci* 2002; 47: 419-426.
- 68 - Roberts AG, Whatley SD, Morgan RR, *et al.* Increased frequency of the haemochromatosis Cys282Tyr mutation in sporadic porphyria cutanea tarda. *Lancet* 1997; 349: 321-323.
- 69 - Roberts AG, Whatley SD, Nicklin S, et al. The frequency of hemochromatosis-associated alleles is increased in British patients with sporadic porphyria cutanea tarda. *Hepatology* 1997; 25: 159-161.
- 70 - Mascaro JM, Herrero C, Lecha M *et al.* Uroporphyrinogen-decarboxylase deficiencies: porphyria cutanea tarda and related conditions. *Semin Dermatol* 1986; 5: 115-124.
- 71 - Blauvelt A, Ross Harris H, Hogan DJ *et al.* Porphyria cutanea tarda and human immunodeficiency virus infection. *Int J Dermatol* 1992; 31: 474-479.
- 72 - Castanet J, Lacour JP, Bodokh J *et al.* Porphyria cutanea tarda in association with human immunodeficiency virus infection: is it related to hepatitis C virus infection? *Arch Dermatol* 1994; 130: 664-665.
- 73 - Cram DL, Epstein JK, Tuffanelli DL. Lupus erythematosus and porphyria. *Arch Dermatol* 1973; 108: 779-784.
- 74 - Agarwal R, Peters TJ, Coombes RC, Vigushin DM. Tamoxifen-related porphyria cutanea tarda. *Med Oncol* 2002; 19: 121-123.
- 75 - Varigos G, Schiltz JR, Bickers DR. Uroporphyrin I stimulation of collagen bio- synthesis in human skin fibroblasts. A unique dark effect of porphyrin. *J Clin Invest* 1982; 69: 129-135.
- 76 - Ajioka RS, Phillips JD, Weiss RB, et al. Down-regulation of hepcidin in porphyria cutanea tarda. *Blood* 2008; 112: 4723-4728.
- 77 - Siersema PD, ten Kate FJ, Mulder PG, Wilson JH. Hepatocellular carcinoma in porphyria cutanea tarda: frequency and factors related to its occurrence. *Liver* 1992; 12:56-61.
- 78 - Gisbert JP, Garcia-Buey L, Alonso A, et al. Hepatocellular carcinoma risk in patients

with porphyria cutanea tarda. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004; 16: 689-692.

79 - 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: 164-175.

80 - Kordac V, Kotal JP, Kalab M. Agents affecting porphyrin formation and secretion: implications for porphyria cutanea tarda treatment. *Semin Hematol* 1989; 26: 16-23.

81 - Sarkell B, Patterson JW. Treatment of porphyria cutanea tarda of end-stage renal disease with erythropoietin. *J Am Acad Dermatol* 1993; 29: 499-500.

82 - Wijayanti N, Katz N, Immenschu. Biology of heme in health and disease. *Curr Med Chem*. 2004; 11(8):981-986.

83- Grotto HZW. Metabolismo do ferro: uma revisão sobre os principais mecanismos envolvidos em sua homeostase. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter* 2008; 30(5):390-397.

84 - Hoffbrand AV, Pettit FE, Moss PAH. *Essential Haematology*. 5th ed. Oxford (UK): Blackwell Publishing; c2006 chapter 3, Hypochromic anaemias and iron overload; p.28-43.

85 - Fairbanks VG, Beutler E. Iron metabolism. IN: Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TI, Seligsohn U, editors. *Williams-Hematology*. 6th ed. New York:Mcgraw-Hill; 2001. p.295-304.

86 - Andrews NC. A genetic view of iron homeostasis. *Semin hematol* 2002; 39(4):227-234.

87 - Kohgo Y, Ikuta K, Ohtake T, *et al*. Body iron metabolism and pathophysiology of iron overload. *Int J Hematol* 2008; 88:7-15.

88 - Worwood M. Serum transferrin receptor assays and their application. *Ann Clin Biochem* 2002; 39 (Pt3): 221-230.

89 - Ponka P, Beaumont C, Richardson DR. Function and regulation of transferrin and ferritin. *Semin Hematol* 1998; 35(1):35-54.

90- Chung J, Wessling-Resnick M. Molecular mechanisms and regulation of iron transport. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2003; 40(2):151-182.

91 - Cabantchik ZI, Breuer W, Zanninelli G, Cianciulli P. LPI-labile plasma iron in iron overload. *Best Pract Res Clin Haematol*.2005; 18:277-287.

92 - Breuer W, Hershko C, Cabantchik ZI. The importance of non-transferrin bound iron in disorders of iron metabolism. *Transfus Sci* 2000; 23:185-192.

93 - Liuzzi JP, Aydemir F, Nam H, *et al*. Zip14 (Slc39a14) mediates non-transferrin-bound iron uptake into cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006; 103:13612-13617.

94 - Grotto HZW. Fisiologia e metabolismo do ferro. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2010; 32(Supl. 2):8-17.

- 95- Kawabata H, Yang R, Hirama T, *et al.* Molecular cloning of transferrin receptor 2. A new member of the transferrin receptor-like family. *J Biol Chem* 1999; 274(30): 20826-20832.
- 96 - Roetto A, Daraio F, Alberti F *et al.* Hemochromatosis due to mutations in transferrin receptor 2. *Blood Cells Mol Dis* 2002; 29(3):465-470.
- 97 - Constantine C, Anderson GJ, Vulpe DC, *et al.* A novel association between a SNP in *CYBRD1* and serum ferritin levels in a cohort study of *HFE* Hereditary Haemochromatosis. *Br J Haematol* 2009; 147(1): 140-149.
- 98 - Cooper JM, Schapira AH. Friedreich's ataxia: coenzyme Q(10) and vitamin E therapy. *Mitochondrions* 2007; 7:S127-135.
- 99 - Elder GH, Worwood M. Mutations in the hemochromatosis gene, porphyria cutanea tarda, and iron overload. *Hepatology* 1998; 27:289-291.
- 100 - Zaahl MG, Merryweather-Clarke AT, Kotze MJ, *et al.* Analysis of genes implicated in iron regulation in individuals presenting with primary iron overload. *Hum Genet* 2004; 115(5): 409-417.
- 101 - Papanikolaou G, Tzilianos M, Christakis J *et al.* Heparin in iron overload disorders. *BLOOD* 2005; 105 (10):4103-4105.
- 102 - Pelucchi S, Mariani R, Calza S, *et al.* *CYBRD1* as a modifier gene that modulates iron phenotype in *HFE* p.C282Y homozygous patients. *Haematologica* 2012; 97(12): 1818-1825.
- 103 - Park CH, Valore EV, Waring AJ, Ganz T. Heparin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J Biol Chem* 2001; 276:7806-7810.
- 104 - Nemeth E, Valore EV, Territo M, *et al.* Heparin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute-phase protein. *Blood* 2003; 101:2461-2463.
- 105 - Nicolas G, Chauvet C, Viatte L, *et al.* The gene encoding the iron regulatory peptide heparin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. *J Clin Invest* 2002; 110: 1037-1044.
- 106 - Nishina S, Hino K, Korenaga M, *et al.* Hepatitis C virus-induced reactive oxygen species raise hepatic iron level in mice by reducing heparin transcription. *Gastroenterology* 2008; 134: 226-238.
- 107 - Ganz T. Iron homeostasis: fitting the puzzle pieces together. *Cell Metabolism* 2008; 7:288-290.
- 108 - Thanh A, Martinez P, Cunat S *et al.* Absence of Functional Mutations in the Ferroportin-encoding *SLC40A1* Gene in Porphyria Cutanea Tarda: A Series of 37 Cases from Southern France. *Acta Derm Venereol* 2011; 91:467.
- 109 - Jacolot S, Le Gac G, Scotet V, *et al.* *HAMP* as a modifier gene that increases the phenotypic expression of the *HFE* pC282Y homozygous genotype. *Blood* 2004; 103(7):2835-2840.

- 110 - Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, et al. Heparin regulates iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science* 2004; 306:2090-2093.
- 111 - De Domenico I, Ward DM, Musci G, Kaplan J. Iron overload due to mutations in ferroportin. *Haematologica* 2006; 91: 92-95.
- 112 - Fleming RE, Sly WS. Ferroprotein mutation in autosomal dominant hemochromatosis: loss of function, gain in understanding. *J Clin Invest* 2001; 108: 521-522.
- 113 - Latunde-Dada GO, Simpson RJ, McKie AT. Duodenal cytochrome B expression stimulates iron uptake by human intestinal epithelial cells. *Journal of Nutrition* 2008; 138:991-995.
- 114 - Morton AG, Tavill AS. The role of iron in the regulation of hepatic transferrin synthesis. *Br J Haematol.* 1977; 36(3): 383-394.
- 115 - Benyamin B, McRae AF, Zhu G, et al. Variants in TF and HFE explain approximately 40% of genetic variation in serum-transferrin levels. *Am J Hum Genet* 2009; 84(1):60-65.
- 116- Motta PA. *Genética humana*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1998, p.16-17.
- 117 - IBGE. População. Disponível em: <http://www.brasil.gov.br/sobre/o-brasil/estado-brasileiro/populacao>. Acesso em: 30/03/2017.
- 118 - Marchini J, Cardon LR, Phillips MS, Donnelly P. The effects of human population structure on large genetic association studies. *Nat Genet* 2004; 36:512-517.
- 119- Parra EJ, Kittles RA, Shriver MD. Implications of correlations between skin color and genetic ancestry for biomedical research. *Nat Genet* 2004; 36:S54-S60.
- 120- Leite TKM, Fonseca RMC, Franca NMD, *et al.* Genomic ancestry, self-reported “color” and quantitative measures of skin pigmentation in Brazilian admixed siblings. *PLoS One* 2011; 6: e27162.
- 121- Lins TC, Vieira RG, Abreu BS, *et al.* Genetic heterogeneity of self-reported ancestry groups in an admixed Brazilian population. *J Epidemiol* 2011; 21:240-245.
- 122- Shriver MD, Smith MW, Jin L, *et al.* Ethnic-affiliation estimation by use of population-specific DNA markers. *Am J Hum Genet* 1997; 60:957-964.
- 123- Halder I, Shriver M, Thomas M, *et al.* A panel of ancestry informative markers for estimating individual biogeographical ancestry and admixture from four continents: utility and applications. *Hum Mutat* 2008; 29:648-658.
- 124- Pereira R, Phillips C, Pinto N, *et al.* Straightforward inference of ancestry and admixture proportions through ancestry-informative insertion deletion multiplexing. *PLoS One* 2012; 7:e29684.

125- Cardena MMSG, Ribeiro-dos-Santos A, Santos S, *et al.* Assessment of the relationship between self-declared ethnicity, mitochondrial haplogroups and genomic ancestry in Brazilian individuals. PLoS ONE 2013; 8(4):e62005. doi: 10.1371/journal.pone.0062005.

126- Cavalcante LN, Stefano JT, Machado MV, *et al.* Genetic ancestry in non-alcoholic fatty liver disease patients from Brazil and Portugal. World J Hepatol 2015; 7(10):1433-1438. doi: 10.4254/wjh.v7.i10.1433.

127- Manta F S N, Pereira R, Caiafa A, *et al.* Analysis of genetic ancestry in the admixed Brazilian population from Rio de Janeiro using 46 autosomal ancestry-informative indel markers. Ann Hum Biol 2013; 40(1): 94-98.

128- Souto, R; Prevalência da mutação do gene HFE em pacientes com porfiria cutânea tardia do Hospital Universitário Pedro Ernesto- UERJ. Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2013. Dissertação de Mestrado.

129 - Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics 2000; 155: 945-959.

## APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



Universidade do Estado do Rio de Janeiro  
Hospital Universitário Pedro Ernesto  
Serviço de Dermatologia

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**TÍTULO:** Análise da mutação dos genes CP, CYBRD1, HAMP e SLC40A1 nos pacientes com porfiria cutânea tardia.

Pesquisadora: Dra. Isabella Brasil Succi

Orientador: Prof. João Carlos Macedo Fonseca

#### 1. PROPOSTA E SITUAÇÃO PROBLEMA:

Você, que já sabe que tem uma doença de pele conhecida como **Porfiria Cutânea Tardia**, que é uma doença que pode ter um componente genético, está sendo convidado a participar de um estudo clínico para avaliar o seu perfil genético relacionado à doença.

Será coletada uma amostra de sangue para a avaliação da presença da mutação dos genes CP, CYBRD1, HAMP e SLC40A1. Esta coleta será realizada no laboratório central do Hospital Universitário Pedro Ernesto, sem nenhum custo para você. Este procedimento é semelhante às outras coletas de sangue que você já deve ter feito outras vezes à pedido do seu médico, para realização de exames laboratoriais de rotina.

Este material coletado não ficará estocado, mas o seu perfil genético será armazenado em banco de dados e poderá, no futuro, ser utilizado para novas análises genéticas, quando você será novamente consultado para autorizar, assinando um novo termo de consentimento.

#### 2. PROCEDIMENTOS:

Se você concordar em participar deste estudo:

- Você responderá a um questionário padronizado contendo sua identificação, além de informações corretas sobre certas doenças que você tem ou teve.
- Você poderá desistir a qualquer momento de participar deste trabalho, sem que isso afete o seu acompanhamento no HUPE-UERJ.

#### 3. DESCONFORTOS E RISCOS:

**Questionário:** perguntas diretas e de fácil compreensão de aproximadamente 15 minutos de duração.

**Exame de sangue:** desconforto no local da coleta do sangue, com risco de sangramento e formação de hematoma no local.

#### 3. CUSTOS:

Os exames serão realizados no HUPE sem nenhum ônus para você. As despesas de passagem serão pagas pelo pesquisador responsável, quando você vier, especialmente, para participar da pesquisa.

#### 4. POSSÍVEIS BENEFÍCIOS:

Aumentar o entendimento dos mecanismos envolvidos na predisposição genética à doença. Comunicação e publicação de quaisquer que sejam os resultados à comunidade científica e revistas médicas, mantendo em sigilo o seu nome e seu endereço.

#### 5. CONFIDENCIALIDADE DOS DADOS:

- As informações e procedimentos nesta pesquisa respeitarão as normas éticas de privacidade e confidencialidade. Somente nós pesquisadores e você teremos acesso às suas informações e seus resultados, com a garantia do sigilo sobre todos os seus dados.
- Os dados deste estudo poderão ser discutidos com outros dermatologistas e os resultados poderão ser publicados, mas nenhuma identificação dos participantes será fornecida.

#### 6. SE VOCÊ TIVER ALGUMA DÚVIDA, O CONTATO DOS PESQUISADORES É:

Hospital Universitário Pedro Ernesto – HUPE/UERJ

Serviço de Dermatologia

Av. 28 de Setembro, Vila Isabel

Tel: 2868-8478

#### 7. CONSENTIMENTO:

Tendo recebido todos os esclarecimentos necessários e, resguardados os preceitos éticos que regulamentam este termo segundo a resolução CNS 196/96 do Ministério da Saúde, consinto em participar deste estudo.

Rio de Janeiro, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_\_\_.

---

Nome do voluntário (letra de forma)

---

Assinatura

---

Dra Isabella Brasil Succi  
CRM 52 78164-9

---

Dr. João Carlos Macedo Fonseca  
CRM 52 30641-2

**APÊNDICE B - Artigo aprovado para publicação nos Anais Brasileiros de Dermatologia  
(seção: Comunicação)**

**ANCESTRALIDADE GENÉTICA DE PACIENTES COM PORFIRIA CUTÂNEA  
TARDIA EM PAÍS MISCIGENADO: UM ESTUDO TRANSVERSAL (RIO DE JANEIRO-  
BRASIL)**

Succi IB<sup>1</sup>, Pôrto LCS<sup>2</sup>, Domingues PM<sup>3</sup>, Fonseca JCM<sup>1</sup>

1- Departamento de dermatologia, Hospital Universitário Pedro Ernesto - UERJ

2 - Laboratório de Histocompatibilidade e Criopreservação - UERJ.

3- Laboratório de Diagnóstico por DNA - UERJ

A porfiria cutânea tardia (PCT) é a mais frequente de todas as porfirias e a de maior interesse dermatológico. É classificada como uma porfiria hepática crônica, decorrente da redução da atividade da enzima uroporfirinogênio descarboxilase. Sua etiologia não está completamente elucidada, sendo necessários fatores ambientais e genéticos para a expressão clínica da doença (1,2).

Sabemos que a população mundial varia consideravelmente na sua predisposição para doenças. Porém, como a população brasileira passou por intenso processo de miscigenação, visto que recebeu contribuições de europeus, africanos e ameríndios, resultando num perfil genético bastante heterogêneo, pouco visto em outras partes do mundo (3, 4).

Devido a esta diversidade genética dos brasileiros, apesar de haver uma maior frequência de relatos de PCT em pacientes caucasianos, não sabemos o potencial papel da ancestralidade como um fator de risco independente associado a doença.

Atualmente a ancestralidade genética tem sido aplicada em diversos estudos populacionais e apresenta uma vantagem substancial sobre as características físicas visto que é constante por toda a vida (5).

Os marcadores informativos de ascendência (AIMs) apresentam marcada diferença nas frequências alélicas entre as populações parentais sendo especialmente útil para estimar as proporções ancestrais individuais. Em populações miscigenadas, são capazes de inferir a composição genética que pode resultar em importantes implicações no perfil proteico herdado das doenças (5, 6, 7).

Não encontramos dados disponíveis na literatura sobre a contribuição da ancestralidade em pacientes com PCT usando os AIMs. Até onde sabemos, este é o primeiro estudo que avalia a ancestralidade genética em portadores de porfiria cutânea tardia advindos de uma população miscigenada. Nosso interesse é investigar a influência das origens genéticas para aumentar o entendimento dos mecanismos envolvidos na predisposição à doença.

Foram incluídos 30 pacientes residentes do Rio de Janeiro, com diagnóstico clínico, laboratorial e/ou histopatológico de porfiria cutânea tardia esporádica, atendidos no Hospital Universitário Pedro Ernesto/UERJ no período de 2012 a 2014.

Todos os pacientes concordaram e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa sob o número CAAE: 17620613.0.0000.5259 e tiveram o sangue coletado para análise da ancestralidade genética. A ancestralidade genética individual foi determinada por AIMs.

Um painel de 46 marcadores informativos de ancestralidade - INDELS, cujas frequências alélicas apresentam diferenças significativas entre europeus, africanos e nativos americanos, foi genotipado em um único PCR multiplex seguido por eletroforese capilar, de acordo com o protocolo descrito por Pereira et al (8). Fragmentos amplificados marcados com corante foram separados e detectados pelo sequenciador automático ABI 3500 (Life Technologies). As amostras foram genotipadas usando o programa GeneMapper v.4.1 (Life Technologies). A nomenclatura dos alelos está de acordo com Pereira et al. (8).

Para testar a estrutura das populações e estimar proporções de ancestralidade foi utilizado o programa STRUCTURE v2.3.3. Neste estudo, considerando a formação histórica da população brasileira, presumimos uma contribuição essencialmente tri-híbrida de americanos nativos, europeus e africanos (ex, K=3) para a formação genética atual da população brasileira.

Os AIMs foram usados nos pacientes em estudo para estimar a proporção ancestral de origem africana, europeia e ameríndia. Os resultados da análise estão apresentados no quadro 1 e figura 1.

Quadro 1 - Resultado da ancestralidade genética dos 30 pacientes portadores de PCT

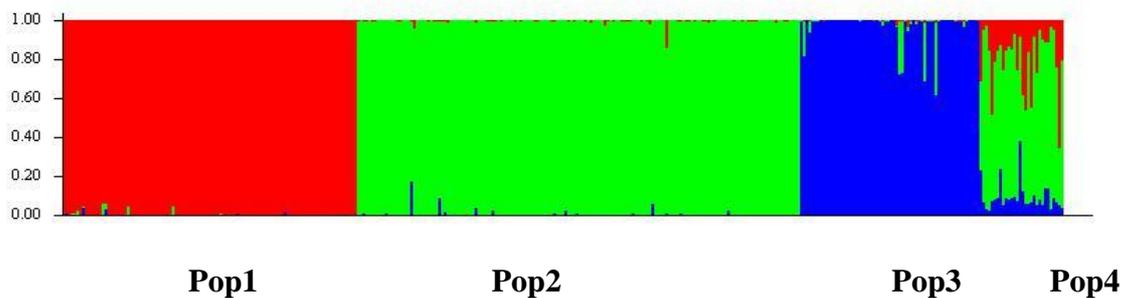
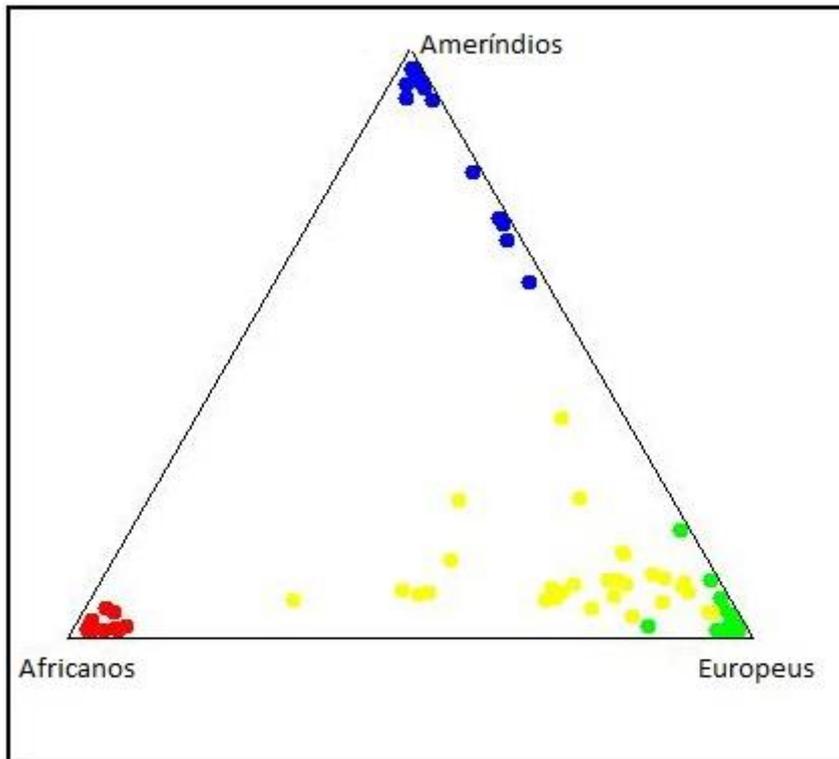
Amostras	% Africana	% Europeia	% Ameríndia
1	31,8%	45,8%	22,4%
2	5,1%	87,7%	7,2%
3	3,1%	93,7%	3,3%
4	16,2%	81,1%	2,7%
5	47,8%	44,7%	7,6%
6	21,7%	70,2%	8,2%
7	16,0%	74,6%	9,4%
8	13,2%	63,8%	23,0%
9	25,0%	69,3%	5,7%
10	15,8%	74,6%	9,6%
11	13,9%	77,8%	8,3%
12	14,9%	76,0%	9,1%
13	7,5%	82,8%	9,7%
14	25,8%	66,9%	7,3%

15	9,3%	53,9%	36,9%
16	38,0%	49,0%	13,0%
17	45,7%	47,7%	6,6%
18	16,4%	77,1%	6,5%
19	44,5%	47,6%	7,9%
20	8,6%	81,0%	10,4%
21	27,0%	67,5%	5,4%
22	5,5%	86,8%	7,7%
23	9,8%	84,6%	5,6%
24	11,6%	73,6%	14,8%
25	11,3%	74,2%	14,5%
26	3,4%	93,3%	3,3%
27	4,3%	87,1%	8,6%
28	24,0%	69,3%	6,7%
29	65,6%	29,1%	5,3%
30	20,6%	75,4%	4,0%

Figura 1 - Distribuição dos pacientes portadores de PCT em relação à mistura étnica com europeus, africanos e ameríndios.

Pop 1 : Africana / Pop 2 : Européia / Pop 3 : Ameríndia / Pop 4: Indivíduos analisados com porfíria

Pop	Grupos inferidos			Número de Indivíduos
	1	2	3	
1:	0.996	0.003	0.002	105
2:	0.002	0.994	0.004	158
3:	0.001	0.025	0.974	64
4:	0.198	0.707	0.095	30



Pop 1(vermelho) : Africana / Pop 2 (verde): Europeia / Pop 3 (azul): Ameríndia / Pop 4 (amarelo): Indivíduos analisados com porfíria

Calculamos o percentual médio dos 30 pacientes portadores de PCT, segundo a ancestralidade genética obtida através dos AIMS. Houve um predomínio significativo da ancestralidade europeia (70,2%) e pequena contribuição das raízes africana e ameríndia (20,1% e 9,7% respectivamente).

Analisando pela mediana, observamos que metade da amostra apresentou percentual de contribuição europeia maior que 74,4%. Para as ancestralidades africana e ameríndia, os valores foram 15,9% e 7,8% respectivamente.

Este dado corrobora com o fato da maior parte dos estudos de grupos com PCT provêm de populações homogêneas, principalmente europeias, como Hungria, Suécia, Noruega etc. (2,9). A mutação C282Y no gene da hemocromatose hereditária, frequente em

descendentes de europeus, também foi observada em pacientes com PCT contribuindo para a sobrecarga de ferro (9).

Manta *et al* (10) avaliaram a proporção de mistura étnica em indivíduos nascidos no Rio de Janeiro usando marcadores autossômicos. Neste estudo foi observada uma influência predominantemente europeia (55,2%) com uma pequena contribuição das raízes africana (31,1%) e ameríndia (13,7%).

Comparando a ancestralidade genética apenas dos pacientes naturais do Rio de Janeiro (23 indivíduos) com o estudo realizado por Manta *et al* (10), observamos que 17 (73,91%) dos 23 pacientes apresentaram porcentagem de ancestralidade europeia acima da estimativa de 55,2% encontrada neste estudo. No caso da ancestralidade africana tivemos 5 (21,74%) pacientes com percentual acima da estimativa de Manta *et al* e para a ameríndia, esse percentual foi de 17,39% (4 pacientes) (teste de Qui-quadrado (P-valor): 0,000).

Em regiões com maior ancestralidade europeia, seria importante organizar uma rede de atendimento, incorporando exames diagnósticos específicos, aprimorando o tratamento, contemplando também a PCT.

Em resumo, na nossa amostra de pacientes com PCT advindos de uma população miscigenada, os dados da distribuição de acordo com a ancestralidade genética mostraram um predomínio significativo de contribuição da raiz europeia.

#### Referências:

- 1- Schulenburg-Brand D, Katugampola R, Anstey A V, Badminton M N. The cutaneous porphyrias. *Dermatol Clin*. 2014; 32: 369-384.
- 2- Horner M E, Alikhan A, Tintle S, Tortorelli S, Davis D M R, Hand J L. Cutaneous porphyrias part 1: epidemiology, pathogenesis, presentation, diagnosis and histopathology. *Int J Dermatol*. 2013; 52:1464-1480.
- 3 - Neto VVG, Santos RV. Biorrevelações: testes de ancestralidade genética em perspectiva antropológica comparada. *Horizontes Antropológicos*. 2011;35(17):227-255.
- 4 - Ramos BRA, D'Elia MPB, Amador MAT, Santos NPC, Santos SEB *et al*. Neither self-reported ethnicity nor declared family origin are reliable indicators of genomic ancestry. *Genetica*. 2016; 144:259-265. doi:10.1007/s10709-016-9894-1
- 5- Cardena MMSG, Ribeiro-dos-Santos A, Santos S, Mansur AJ, Pereira AC, et al.

Assessment of the relationship between self-declared ethnicity, mitochondrial haplogroups and genomic ancestry in Brazilian individuals. *PLoS ONE*. 2013; 8(4):e62005. doi: 10.1371/journal.pone.006200

6- Leite TKM, Fonseca RMC, França NMD, Parra EJ, Pereira RW. Genomic ancestry, self-reported “color” and quantitative measures of skin pigmentation in Brazilian admixed siblings. *PLoS One*. 2011; 6: e27162.

7- Cavalcante LN, Stefano JT, Machado MV, Mazo DF, Rabelo F, Sandes KA, Carrilho FJ, Cortez-Pinto H, Lyra AC, Oliveira CP. Genetic ancestry in non-alcoholic fatty liver disease patients from Brazil and Portugal. *World J Hepatol*. 2015; 7(10):1433-1438. doi: 10.4254/wjh.v7.i10.1433.

8- Pereira R, Phillips C, Pinto N, Santos C, Santos SEBd, Amorim A, Carracedo A', Gusma L. Straightforward inference of ancestry and admixture proportions through ancestry-informative insertion deletion multiplexing. *PLoS One*. 2012;7: e29684.10.1371/journal.pone.0029684

9- Nagy Z, Koszo' F, Par A, Emri G, Horkay I, Horanyi M, Karadi O, Rumi Jr., G, Morvay M, Varga V, Dobozy A, Mozsik G. Hemochromatosis (HFE) gene mutations and hepatitis C virus infection as risk factors for porphyria cutanea tarda in Hungarian patients. *Liver International*. 2004; 24: 16–20.

10 - Manta FSN, Pereira R, Caiafa A, Silva DA, Gusmão L, Carvalho EF. Analysis of genetic ancestry in the admixed Brazilian population from Rio de Janeiro using 46 autosomal ancestry-informative indel markers. *Ann Hum Biol*. 2013; 40(1): 94-98. doi: 10.3109/03014460.2012.742138.

**APÊNDICE C - Manuscrito submetido para publicação na revista Journal of Investigative Dermatology (Letter to the editor)**

SLC40A01 and CP Single-nucleotide Polymorphisms in Porphyria Cutanea Tarda Patients of Admixture Ancestry

Succi IB<sup>1</sup>, Pôrto LCS<sup>2</sup>, Silva DA<sup>3</sup>, Nascimento AP<sup>2</sup>, Neto RC<sup>2</sup>, Fonseca JCM<sup>1</sup>.

1- Dermatology department, Pedro Ernesto University Hospital, UERJ

2- HLA Laboratory, UERJ

3- DNA Diagnostic Laboratory, UERJ

Porphyria cutanea tarda (PCT) is a multifactorial disease: clinical expression depends on both genetic and acquired factors. However, these factors remain incompletely understood (Horner *et al*, 2013) (Puy *et al*, 2010) (Lambrecht *et al*, 2007). Few studies have examined the connection between PCT and the regulation of iron metabolism genes; most of these have emphasized the role of the *HFE* gene (Horner *et al*, 2013) (Balwani and Desnick, 2012). Recent studies on hereditary hemochromatosis have implicated the involvement of modifier genes (other than *HFE*) that affect iron homeostasis (Radio *et al*, 2015) (Hamdi-Rozé *et al*, 2016) (Faria *et al*, 2016), so we decided to evaluate the possible role of these genes in PCT. We selected 5 polymorphisms in *CYBRD1*, *CP*, *SLC40A1*, and *HAMP* genes to determine whether these polymorphisms can act as genetic modulators in patients with sporadic PCT who test negative for the C282Y mutation. This mutation is more frequent among northern European populations (Puy *et al*, 2010) (Balwani and Desnick, 2012) (Bulaj *et al*, 2000) (Elder and Worwood, 1998). Because the Brazilian population is heterogeneous (with African and Amerindian contributions) (Ramos *et al*, 2016), we also investigate the genetic ancestry of patients and controls to ensure suitable matching.

We analyzed DNA samples from 29 patients seen consecutively at Pedro Ernesto University Hospital in Rio de Janeiro, Brazil. All patients had been diagnosed with sporadic PCT based on clinical and laboratory results and were negative for the C282Y mutation of the *HFE* gene. The controls included healthy subjects (blood donors) with iron parameters within normal ranges, who were matched to the patient group in terms of geographical area and ethnic background. After receiving the signed written consent (approved by the Rio de Janeiro State University Ethics Committee), genomic DNA was isolated from peripheral blood leukocytes using a QIAamp DNA blood mini kit (Qiagen, Valencia, CA). The following single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in genes that play a significant role in iron homeostasis were investigated: *CYBRDI* (rs868106), *CP* (rs17838832), *SLC40A1* (rs13015236 and rs11568351), and *HAMP* (rs10421768). Alleles were discriminated using the ABI StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA) using TaqMan Assays, according to the manufacturer's instructions. Allele and genotype frequencies were estimated; statistical differences were tested for significance with Fisher's exact test and/or chi-squared analysis. Differences with  $P < 0.05$  were considered significant.

The results were compared with those of 107 healthy individuals matched for genetic ancestry, gender and age. Genetic ancestry was confirmed by ancestry informative markers (AIMs) as European, African, or Amerindian (Pereira *et al*, 2012). Analysis of PCT patients according to the results obtained through AIMs revealed prevalent European ancestry (70.2%). African and Amerindian ethnicities were less common: 20.1% and 9.7%, respectively (Figure 1).

The frequency of the TT genotype of rs13015236 in the *SLC40A1* gene was higher in PCT patients (44.8%) than in controls (20.6%) ( $p < 0.02$ ). The rs13015236 C allele of the *SLC40A1* gene was more frequent among healthy individuals (53.3%) compared with PCT patients (34.5%) ( $p < 0.01$ ). The rs17838832 G allele of the *CP* gene was more common

among PCT patients (14.3%) compared with controls (4.9%) ( $p < 0.05$ ). The frequencies of the GG and AG genotypes were higher in the PCT group (25.0%) than in healthy individuals (9.8%) ( $p < 0.04$ ). The genotype and allele frequencies of the three remaining polymorphisms analyzed (rs868106 in *CYBRDI*, rs11568351 in *SLC40A1*, and rs10421768 in *HAMP*) were similar in PCT patients and controls (table 1).

The rs17838832 G allele of the *CP* gene was more common among PCT patients (25%) compared with controls (9.8%) ( $p < 0.05$ ). The frequencies of the GG and AG genotypes were higher in the PCT group (25.0%) than in healthy individuals (9.8%) ( $p < 0.04$ ), indicating that these variants may predispose carriers to changes in iron homeostasis, which in turn could contribute to the development of PCT.

Panton *et al*, 2013, also reported a higher frequency of G allele of *CP* in South African black PCT patients. However, when Caucasian and “Coloured” PCT patients were compared with controls, there was no significant difference in the frequency of this allele. Different from Panton *et al*, we collected information related to genetic ancestry through AIMs. The results revealed that 70.2% of patients were of European ancestry. Even in those who declared themselves “black” or “racially mixed”, the percentage of European ancestry (69.6%) was greater than that of African (20.6%) or Amerindian (10.7%) roots.

Our Statistical analysis revealed no relationships among genotype, allele frequency, and genetic ancestry. Most of the participants (59.6%) in the study presented here were of European ancestry. In the study performed by Panton *et al*, 2013, the patients were classified according to the color of their skin (ethnoracial classification). This methodological discrepancy may explain the differences in the results obtained for both studies.

We also found higher frequencies of the rs13015236 C (G reverse) allele of *SLC40A1* in healthy individuals compared with PCT patients. Comparing our results regarding the SNP

mentioned above with those of Panton *et al*, 2013 yielded conflicting results who found a higher frequency of this allele among PCT patients. The CC and CT genotypes were more frequent in the controls, so these alleles may confer protection against PCT. A single C allele might be sufficient to protect against the disease. This allele may confer protection against PCT manifestations, since both CC and CT genotypes were more frequent in the controls ( $p < 0.03$ ). Thus, a single C allele might be sufficient to protect directly against the disease or to influence the regulation of biota and inflammation (Montalbetti *et al*, 2013) so indirectly in PCT development.

Recently, a polymorphic variant of glyceronephosphate O-acyltransferase (*GNPAT*) was shown to be a risk factor for familial PCT (Farrell *et al*, 2016). Further studies are necessary to evaluate the possible role of other genes as well as the interaction with genetic ancestry.

In brief, our data highlight a possible role for the rs17838832 SNP in *CP* in predicting PCT. The present analysis shows a higher frequency of the G (C reverse) variant in these patients. Regarding the rs13015236 SNP in *SLC40A1*, the presence of a C allele could protect against iron overload.

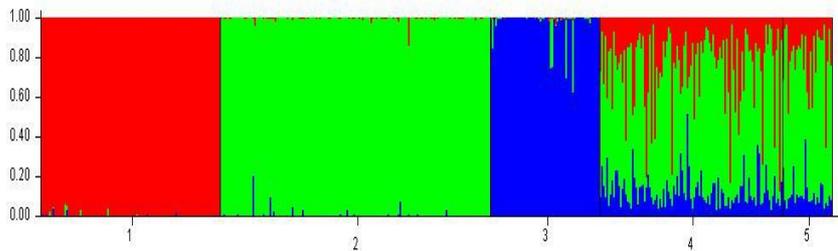
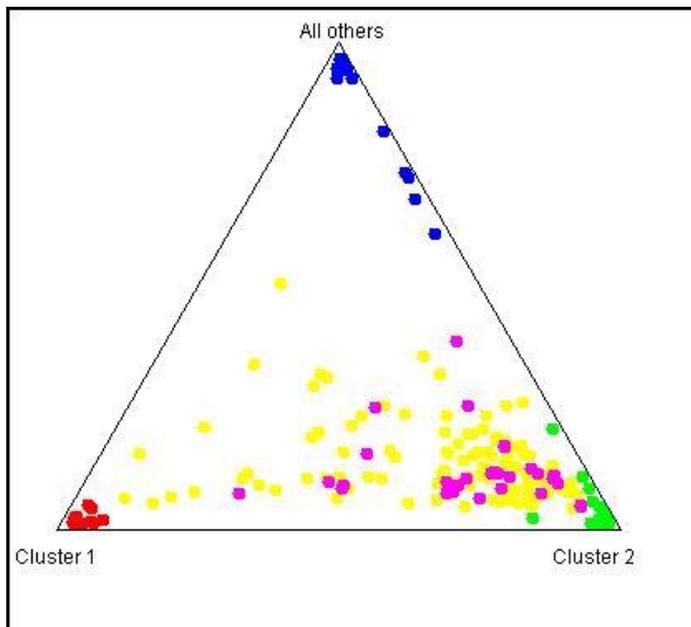
Table 1. Results of the polymorphisms in *SLC40A1*, *HAMP*, *CP* and *CYBRD1* genes.

	<b>CONTROLS</b>	<b>PCT PATIENTS</b>	<b>p- value</b>
Gender	53 male 54 female	16 male 13 female	
Age	19 - 62 (35.6)	19-74 (53.4)	
<b><i>SLC40A1</i> – rs13015236</b>			
CC	29 (21.10%)	4 (13.79%)	0.0243
CT	56 (52.34%)	12 (41.38%)	
TT	22 (20.56%)	13 (44.83%)	
C	114 (53.27%)	20 (34.48%)	0.0096
OR= 0.3186 CI (95%) = 0.1331-0.7786			
<b><i>SLC40A1</i> – rs11568351<sup>a</sup></b>			
CC	2 (1.89%)	0 (0.0%)	NS
CG	30 (28.30%)	6 (20.69%)	
GG	74 (69.81%)	23 (79.31%)	
G	178 (88.11%)	52 (89.65%)	NS
<b><i>HAMP</i> – rs10421768</b>			
AA	60 (56.07%)	19 (65.52%)	NS
AG	42 (39.25%)	8 (27.59%)	
GG	5 (4.67%)	2 (6.90%)	
A	162 (75.70%)	46 (79.31%)	NS
<b><i>CP</i> – rs17838832<sup>b</sup></b>			
AA	92 (90.20%)	21 (75%)	0.0352
AG	10 (9.80%)	6 (21.43%)	
GG	0 (0.0%)	1 (3.57%)	
G	10 (4.90%)	8 (14.28%)	0.0419
OR= 3.0667 CI (95%) = 0.9859-9.0386			
<b><i>CYBRD1</i> – rs868106<sup>a</sup></b>			
AA	19 (17.92%)	4 (13.79%)	NS
AG	47 (44.34%)	17 (58.62%)	
GG	40 (37.74%)	8 (27.59%)	
A	85 (40.09%)	25 (43.10%)	NS

a: 106 controls. b:102 controls and 28 PCT patients.

Figure 1: Genetic ancestry distribution of PCT patients and controls

Given Pop	Inferred Clusters			Number of Individuals
	1	2	3	
1:	0.996	0.002	0.002	105
2:	0.002	0.993	0.005	158
3:	0.001	0.022	0.976	64
4:	0.249	0.620	0.131	107
5:	0.205	0.683	0.113	29



Pop 1: Africans Pop 2: European Pop 3: Amerindians Pop 4: Controls Pop 5: PCT patients

Figure 1: Graphical representation of individual contributions generated by Structure software, assuming  $K=3$  populations.

(1) Tri-plot showing parental populations grouped at the corners and cases and controls in the center of the triangle according to their ancestors. Red circles represent African population, green European and blue Amerindian. Pink circles represent PCT patients and yellow circles represent control individuals.

(2) Bar plot showing the African (red-Pop 1), European (green-Pop 2) and Amerindian (blue-Pop 3) contributions. Each column represents an individual. The last two columns represent the controls (Pop 4) and PCT patients (Pop 5).

## REFERENCES

Balwani M, Desnick RJ. The porphyrias: advances in diagnosis and treatment. *Blood* 2012; 120(23):4496-4504.

Bulaj ZJ, Phillips JD, Ajioka RS, Franklin MR, Griffen LM, Guinee DJ et al. Hemochromatosis genes and other factors contributing to the pathogenesis of porphyria cutanea tarda. *Blood*. 2000; 95:1565-1571.

Elder GH, Worwood M. Mutations in the hemochromatosis gene, porphyria cutanea tarda, and iron overload. *Hepatology*. 1998; 27:289-291.

Faria R, Silva B, Silva C, Loureiro P, Queiroz A, Fraga S *et al*. Next-generation sequencing of hereditary hemochromatosis-related genes: Novel likely pathogenic variants found in the Portuguese population. *Blood Cells Mol. Dis.* 2016; 61:10-15.

Farrell CP, Overbey JR, Naik H, Nance D, McLaren GD, McLaren CE *et al*. The D519G polymorphism of glycerone phosphate O-acyltransferase is a risk factor for familial porphyria cutanea tarda. *PLoSOne* 2016; 11(9):e0163322.

Hamdi-Rozé H, Beaumont-Epinette MP, Ali ZB, Lan CL, Loustaud-Ratti V, Causse X *et al*. Rara HFE variants are the most frequent cause of hemochromatosis in non-C282Y homozygous patients with hemochromatosis. *AJH*. 2016; 91(12):1202-1205.

Horner ME, Alikhan A, Tintle S, Tortorelli S, Davis DMR, Hand JL. Cutaneous porphyrias, Part 1: epidemiology, pathogenesis, presentation, diagnosis and histopathology. *Int J Dermatol*. 2013; 52:1464-1480.

Lambrecht RW, Thapar M, Bonkovsky HL. Genetic aspects of porphyria cutanea tarda. *Semin Liver Dis* 2007; 27:99-108.

Montalbetti N, Simonin A, Kovacs G, Hediger MA. Mammalian iron transporters: Families SLC11 and SLC40. *Mol Aspects Med* 2013; 34(2-3): 270-287.

Panton NA, Strickland NJ, Hift RJ, Warnich L, Zaahl MG. Iron homeostasis in porphyria cutanea tarda: mutation analysis of promoter regions of CP, CYBRD1, HAMP and SLC40A1. *J Clin Pathol*. 2013; 66(2):160.

Pereira R, Phillips C, Pinto N, Santos C, dos Santos SEB, Amorim A *et al.* Straightforward inference of ancestry and admixture proportions through Ancestry-Informative Insertion Deletion multiplexing. PLoSOne 2012; 7(1):e29684 1-10.

Puy H, Gouya L, Deybach JC. Porphyrrias. Lancet 2010; 375:924-37.

Radio FC, Majore S, Aurizi C, Sorge F, Biolcati G, Bernabini S *et al.* Hereditary Hemochromatosis type 1 phenotype modifiers in Italian patients. The controversial role of variants in HAMP, BMP2, FTL and SLC40A1 genes. Blood cells Mol. Dis. 2015; 55:71-75.

Ramos BRA, D'Elia MPB, Amador MAT, Santos NP, Santos SE, da Cruz Castelli E *et al.* Neither self-reported ethnicity nor declared family origin are reliable indicators of genomic ancestry. Genetica. 2016; 144:259-265.