Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Roberto Souto da Silva

Prevalência da mutação do gene HFE em pacientes com porfiria cutânea tardia do Hospital Universitário Pedro Ernesto- UERJ

Rio de Janeiro

2013

Roberto Souto da Silva

Prevalência da mutação do gene HFE em pacientes com porfiria cutânea tardia do Hospital Universitário Pedro Ernesto- UERJ

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

Orientadora: Prof.ª Dra. Sueli Coelho da Silva Carneiro

Rio de Janeiro

2013

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

S586 Silva, Roberto Souto.

Prevalência da mutação do gene HFE em pacientes com porfiria cutânea tardia do Hospital Universitário Pedro Ernesto- UERJ / Renato Souto Silva – 2013.
84 f.

Orientador: Sueli Coelho da Silva Carneiro.

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Dermatologia - Teses. 2. Genes – Teses. 3. Hemacromatose. Porfiria cutânea tardia. 5. Transtornos de fotossensibilidade. 6. Hemina. I. Carneiro, Sueli Coelho da Silva. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 616.5

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

_____ _____
Assinatura Data

Roberto Souto da Silva

Prevalência da mutação do gene HFE em pacientes com porfiria cutânea tardia do Hospital Universitário Pedro Ernesto- UERJ

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

Aprovada em 01 de novembro de 2013.

Orientadora:

Prof.ª Dra. Sueli Coelho da Silva Carneiro
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Banca Examinadora:

_____

Prof. Dr. Rogério Lopes Rufino Alves
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

_____

Prof.ª Dra. Sandra Maria Barbosa Durães
Universidade Federal Fluminense

_____

Prof. Dr. João Carlos Macedo Fonseca
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Rio de Janeiro
2013

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e irmão pelo incentivo durante minha formação profissional.

À minha esposa Livia pela paciência e apoio total.

Ao professor João Carlos Macedo Fonseca pela colaboração, dedicação, apoio e amizade.

À professora Sueli Coelho da Silva Carneiro pelo incentivo e colaboração constante na elaboração da dissertação.

À toda equipe do Laboratório de Histocompatibilidade e Criopreservação da UERJ, coordenado pelo Prof. Luiz Cristóvão Porto.

Ao professor e amigo Rafael Curvo pela amizade, paciência, dedicação e principalmente, pela ajuda essencial na avaliação genética do projeto de dissertação.

À equipe de enfermagem do Serviço de Dermatologia do Hupe, em especial a enfermeira Vanessa pela ajuda na avaliação dos pacientes.

À todos os colegas e amigos do Serviço de Dermatologia do Hospital Universitário Pedro Ernesto que contribuíram de forma direta ou indireta para realização deste trabalho.

Aos pacientes e a todos aqueles que nos permitiram a realização deste trabalho.

RESUMO

SILVA, Roberto Souto. **Prevalência da mutação do gene hfe em pacientes com porfiria cutânea tardia do Hospital Universitário Pedro Ernesto- UERJ**. 2013. 84 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

A Porfiria Cutânea Tardia (PCT) é uma desordem dermatológica, caracterizada por fotossensibilidade induzida pela circulação de porfirinas que se depositam na pele. Tanto a forma familial como a esporádica são desordens dependentes do acúmulo de ferro. A presença da mutação do gene da Hemocromatose (HFE) é um importante fator de risco para o acúmulo de ferro e pouco se sabe sobre sua prevalência na população brasileira. Da mesma forma, existem poucos relatos a respeito da associação entre mutação do gene HFE e Porfiria Cutânea Tardia. No presente trabalho descrevemos as frequências dos principais alelos e genótipos do gene da Hemocromatose *HFE1* em uma coorte de 25 pacientes brasileiros atendidos no HUPE, com Porfiria Cutânea Tardia, durante o período de janeiro 1990 à dezembro 2012, realizando uma correlação da presença desta mutação com a sobrecarga de ferro neste grupo de pacientes. Neste estudo foi utilizado um grupo controle da população fluminense pareado por idade, sexo e grupo étnico informado, para comparar com os dados avaliados dos pacientes com PCT. A pesquisa das mutações genéticas C282Y e H63D do gene da hemocromatose ocorreu através de técnicas de PCR tempo real e e os resultados ratificados por sequenciamento de Sanger. Dos resultados encontrados, não ocorreram diferenças estatísticas significativas nas frequências alélicas e genotípicas das mutações C282Y e H63D entre a coorte com PCT e a população controle. Entretanto, há um forte indício da participação da mutação H63D em um paciente homozigoto, para desenvolvimento da doença, conforme observado na literatura. Dos ensaios bioquímicos, os níveis de ferritina encontrados entre os pacientes portadores de PCT com a mutação H63D foram maiores que os indivíduos sem a mutação.

Palavras-Chave: Gene. Hemocromatose. Porfiria cutânea tardia.

ABSTRACT

SILVA. R.S. **Prevalence of HFE gene mutation in patients with porphyria cutanea tarda University Hospital Pedro Ernesto-UERJ**. 2013. 84 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

Porphyria cutanea tarda (PCT) is a dermatological disorder characterized by photosensitivity induced by circulating porphyrins being deposited on the skin. Both the familial form, as sporadic disorders are dependent on the accumulation of iron. Although the cause of this excess hepatic iron is still unknown, the presence of the mutation of the hemochromatosis gene (HFE) is an important risk factor for iron accumulation. Likewise, little is known about the association between HFE gene mutation and porphyria cutanea tarda. In this paper we describe the main frequencies of genotypes and alleles of the gene for hemochromatosis HFE1 in a cohort of 25 patients treated at a dermatology outpatient clinic with Porphyria Cutaneous Late during the period of 1990-2012, performing a correlation with the presence of this mutation and iron overload in these patients. This study used a control group matched for age, sex and ethnic group reported, to compare with the data evaluated in patients with PCT. The research of genetic mutations C282Y and H63D mutations of the hemochromatosis gene occurred through real-time PCR results and ratified by Sanger sequencing. Results found no statistically significant differences in allele and genotype frequencies of the C282Y and H63D between the PCT cohort and population control. However, there is a strong indication of the participation of the H63D mutation in a patient homozygous for disease development, as noted in the literature. Of biochemical analysis, ferritin levels found among patients with PCT with the H63D mutation were higher than those without the mutation.

Keywords: Gene. Hemochromatosis. Porphyria cutanea tarda.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Molécula de porfirina formada por 4 anéis pirrólicos 14
Figura 2 - Molécula do heme 15
Figura 3 - Biossíntese do heme 17
Figura 4 - Enzimas na biossíntese do heme e as doenças relacionadas 19
Quadro 1 - Fatores que contribuem para lesões cutâneas 20
Figura 5 - Mecanismo de lesão tecidual 21
Figura 6 - Bolha subepidérmica com infiltrado inflamatório discreto e fenômeno do festonamento 33
Figura 7 - Pele lesada demonstrando imunofluorescência homogênea, intensa e contínua na junção dermoepidérmica e na parede dos vasos 34
Figura 8 - Teste com lâmpada de Wood positivo na urina 35
Figura 9 - Ação da hepacidina no metabolismo do ferro 46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores normais das porfirinas e precursores no seres humanos. 16
Tabela 2 - Herança e principais alterações bioquímicas nas porfirias 16
Tabela 3 - Classificação das porfirias 22
Tabela 4 - Conduta no tratamento da PCT 42
Tabela 5 - Classificação das hemocromatoses 44
Tabela 6 - Valores de ferro em indivíduos normais e com hemocromatose hereditária 44
Tabela 7 - Distribuição de 25 pacientes portadores de PCT quanto a idade, sexo e quadro clínico 50
Tabela 8 - Iniciadores utilizados para diferenciação alélica 52
Tabela 9 - Reagentes utilizados para PCR Tempo Real 53
Tabela 10 - Condições de termociclagem para discriminaçãoo alélica 53
Tabela 11 - Iniciadores utilizados para o ensaio do sequenciamento 54
Tabela 12 - Reagentes utilizados para amplificação 54
Tabela 13 - Condições de termociclagem para amplificação 54
Tabela 14 - Reagentes utilizados no sequenciamento 55
Tabela 15 - Condições de termociclagem para reação de sequenciamento 56
Tabela 16 - Determinação dos genótipos pela razão dos *Cycle Thresholds* (CT) para posição Aa63 ..... 59 59
Tabela 17 - Determinação dos genótipos pela razão dos *Cycle Thresholds* (CT) para posição Aa282 60
Tabela 18 - Frequência dos genótipos e alelos da posição Aa63 61
Tabela 19 - Relação das mutações e níveis de ferritina sérica 62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PCT	Porfiria Cutânea Tardia
HFE	Hemocromatose
URO	Uroporfirina
COPRO	Coproporfirina
GGT	Gama Glutamil-Transferase
TGP	Transaminase Glutâmico-Piruvica
TGO	Transaminase Glutâmico-Oxalacética
Fe+2	Ferro Sérico
HFE	Gene da Hemocromatose
HCV	Vírus Hepatite tipo C
HIV	Vírus Imunodeficiência Humana Adquirida
ALA	Ácido delta aminolevulínico
PBG	Porfobilinogênio
PAS	Periodic Acid-Schiff

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	12
1	**FUNDAMENTOS TEÓRICOS**	14
1.1	**As Porfirias**	14
1.1.1	Aspectos Gerais	14
1.1.2	Metabolismo do heme	17
1.1.3	Fisiopatologia das lesões cutâneas	19
1.1.4	Classificação das porfirias	21
1.2	**Porfiria Cutânea Tardia**	24
1.2.1	Aspectos gerais	24
1.2.2	Etiopatogenia	24
1.2.3	Genética	29
1.2.4	Diagnóstico clínico	29
1.2.5	Diagnóstico laboratorial	32
1.2.6	Diagnóstico diferencial	37
1.2.7	Tratamento	38
1.3	**Mutação do gene da hemocromatose**	43
1.3.1	PCT e associação com hemocromatose	43
1.3.2	Novas associações genéticas para PCT	46
2	**OBJETIVOS**	48
2.1	**Objetivo geral**	48
2.2	**Objetivos específicos**	48
3	**MÉTODOS**	49
3.1	**Desenho do estudo**	49
3.2	**Técnica de avaliação da mutação do gene**	50
3.2.1	Coleta e processamento das amostras	50
3.2.2	Extração do DNA	51
3.2.3	Análise do DNA extraído	52
3.3	**Grupo de comparação**	56
3.4	**Técnica de análise estatística**	57
4	**RESULTADOS**	58
5	**DISCUSSÃO**	63

CONCLUSÕES 68
SUGESTÕES 69
REFERÊNCIAS 70
ANEXO A - Questionário clínico 77
ANEXO B - Termo de consentimento Livre e Esclarecido 80
ANEXO C - Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa 84

INTRODUÇÃO

As porfirias constituem um grupo de doenças metabólicas derivadas de deficiências de enzimas responsáveis por cada etapa da síntese do heme, gerando acúmulo excessivo de porfirinas e seus precursores.

A Porfiria Cutânea Tardia é a mais freqüente das porfirias. Pode ser adquirida (esporádica) ou hereditária (familial). Decorre da deficiência da enzima uroporfirinogênio-descarbixilase, que necessita de fatores desencadeantes como o etilismo, o estrogênio, hepatite C e sobrecarga de ferro para expressar clinicamente a doença. Clinicamente estes pacientes se caracterizam por fotossensibilidade induzida pela circulação de porfirinas que se depositam na pele, e podem apresentar erupções vesicobolhosas, fragilidade cutânea, cicatrizes atróficas, milia, hipertricose e hiperpigmentação.[1,2]

Tanto a forma familial como a esporádica, são desordens que possuem o acúmulo de ferro como possível fator desencadeante. Essa associação é sabida há décadas e, desta maneira, um dos principais tratamentos é a flebotomia, sendo uma forma de depuração da sobrecarga de ferro do organismo.[3]

Embora a causa desse excesso de ferro hepático ainda seja desconhecida, a relação entre Hemocromatose e Porfiria Cutânea tardia tem sido evidenciada na literatura.[3,4] Esses trabalhos enfatizam a presença da mutação do gene da Hemocromatose como importante fator de risco para o desenvolvimento da Porfiria Cutânea Tardia. [4]

O gene da hemocromatose (HFE1), assim como os demais genes e suas dinâmicas dentro das populações, apresenta variações nas frequências entre as etnias e geografias onde foi mais bem estudado. [5] A correlação de algumas mutações do gene HFE, H63D e C282Y, e a Porfiria Cutânea Tardia já está bem estabelecida com a população caucasiana europeia. [4,5,6] Contudo, são poucas as informações sobre as frequências e influencia dessas mutações em outras populações não europeias, como a população brasileira. Atualmente há na literatura apenas um trabalho relacionando a Porfiria Cutânea Tardia e mutações do gene HFE1 na população brasileira. [7]

Mediante uma melhor compreensão e esclarecimento da relação das mutações no gene HFE1 e a PCT desenvolvemos um ensaio de PCR tempo real para identificação das mutações H63D e C282Y de forma rápida e pouco onerosa.

Assim o utilizamos em uma coorte de 25 pacientes que atenderam aos critérios de inclusão do estudo e que frequentaram regularmente o ambulatório de Dermatologia Geral do Hospital Universitário Pedro Ernesto-UERJ, durante o período de janeiro 1990 a dezembro 2012, onde era realizado o “Projeto Porfiria” com pacientes bem documentados quanto a sua doença.

1 **FUNDAMENTOS TEÓRICOS**

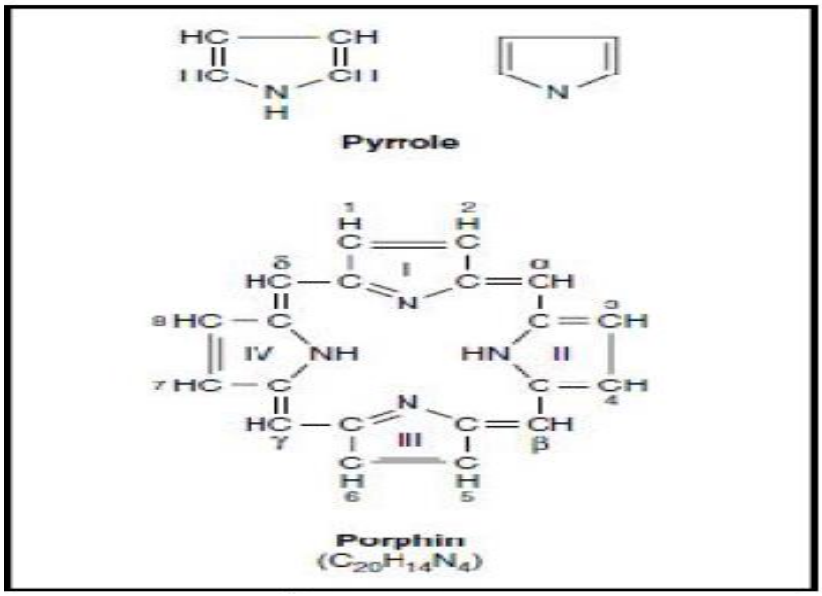
1.1 **As Porfirias**.

1.1.1 Aspectos Gerais

As porfirias são um grupo de distúrbios hereditários, onde são produzidas quantidades excessivas de porfirina. Decorre de defeitos de enzimas responsáveis pela via da biossíntese do heme, através de processos de condensação e descarboxilação.

Na natureza as porfirinas se apresentam em três grupos de compostos: o heme, a clorofila e a cobalamina, sendo caracterizado por um tetrapirrol cíclico. As porfirinas formam compostos metabólicos importantes para o organismo, sendo a maioria delas, associadas a íons metálicos, chamadas metaloporfirinas. Estruturalmente, se diferenciam pela presença de um quelato de ferro no heme, um quelato de magnésio na clorofila e um quelato de cobalto na cobalamina.[1,2]

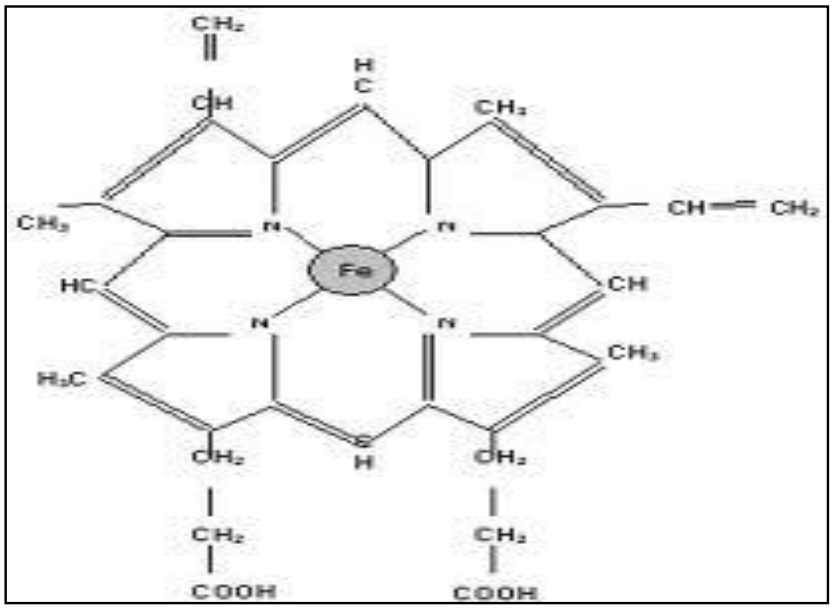
Figura 1 - Molécula de porfirina formada por 4 anéis pirrólicos.



Fonte: Khogo *et al.*[8]

O grupo heme é um tetrapirrol cíclico com quelato de ferro no centro de sua molécula, produzido em todos os tecidos animais, principalmente na medula óssea e no fígado. É usado como precursor da hemoglobina nas hemáceas, e nos hepatócitos serve para formação de catalases, de peroxidases e dos citocromos.

Figura 2 - Molécula do Heme



Fonte: Khogo *et al.* [8]

O heme é um excelente transportador de O_2 e utiliza essa função na hemoglobina e nas enzimas hepáticas. No fígado, o heme é essencial para atividade do citocromo P-450, que participa no metabolismo hepático de diversas substâncias, tornando mais fácil sua eliminação.[3]

A produção diária do heme no organismo humano ocorre em quantidades suficientes para suprir as necessidades metabólicas fisiológicas do corpo humano. Sob circunstâncias normais, podem estar presentes ínfimas quantidades de produtos intermediários da via de biossintese do heme (Tabela 1).

Tabela 1 - Valores normais das Porfirinas e precursores nos seres humanos

PORFIRINAS/ PRECURSORES	URINA µg/24h	SANGUE Eritrocitos µg/100ml	Plasma µg/10ml	FEZES µg/g fezes secas
ALA (Acido δ aminoevulinico)	<4000	-	-	-
PBG (porfobilinogênio)	<1500	-	-	-
Uroporfirina	<40	0 – 2	0 – 2	
Coproporfirina	<280	0 – 2	0 – 1	10 – 50
Protoporfirina	Ausente	<90	0 – 2	10 – 50
Porfirina X	Ausente	Ausente	Ausente	0 – 20
Isocoproporfirina	Ausente	Ausente	Ausente	traços

Fonte: Modificado de Fonseca *et al.* [1]

Variações na biossintese do heme, genéticas ou ambientais, podem levar ao acúmulo de intermediários da via, esse acúmulo dos precursores das porfirinas, dependendo do local e o tipo de percursor armazenado pode levar a diferentes clinicas da doença (Tabela 2).

Tabela 2 - Principais variações genéticas e acumulo de porfirinas

TIPO	HERANÇA	PORFIRINAS URINÁRIAS [1,2,3]	PORFIRINAS FECAIS[4,5]	PORFIRINAS PLASMÁTICAS	PORFIRINAS ERITROCITÁRIAS	ALTERAÇÃO ENZIMÁTICA
Porfiria Eritropoiética Congênita	RECESSIVA	UROI>COPROI	COPRO I	URO	URO>COPRO	UROPORFIRINOGÊNIO III-COSINTASE
Protoporfira Hereditária	DOMINANTE	NORMAL	PROTO	PROTO	PROTO	FERROQUELATASE
Porfiria Aguda Inermitente	DOMINANTE	ALA PBG	NORMAL	NORMAL	NORMAL	PBG-DESAMINASE
Porfiria Variegata	DOMINANTE	ALA PBG	PROTO COPRO	NORMAL	NORMAL	PROTOPORFIRINOGENIO-OXIDASE
Porfiria Cutanea Tardia	DOMINANTE	URO>COPRO	ISOCOPRO COPRO	URO	NORMAL	UROPORFIRINOGENIO-DESCARBOXILASE
Coproporfiria Hereditária	DOMINANTE	ALA, PBG COPRO>URO	COPRO III	NORMAL	NORMAL	COPROPORFIRINOGENO-OXIDASE
Porfiria Hepatoeritropoiética	RECESSIVA	ISOCOPRO URO	ISOCOPRO COPRO	URO PROTO	PROTO	UROPORFIRINOGENIO-DESCARBOXILASE

ALA= acido delta aminolevulinico; PBG=porfobilinogênio; URO=uroporfirina; COPRO=coproporfirina; PROTO=protoporfirina

Fonte: Modificado de Fonseca *et al.* [1]

GUNTHER, no início do século passado, realizou estudos que possibilitaram a primeira classificação das porfirias.[1] Em seguida, FISHER provou que o pigmento escuro na urina era uma porfirina natural, que ele classificou como uroporfirina, sendo isolada de paciente com porfiria congênita. [2]

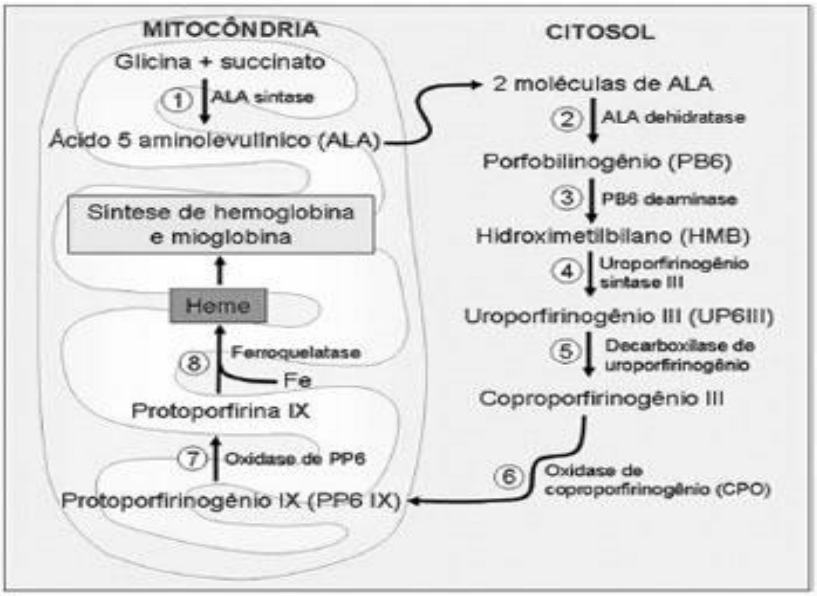
Após essas descobertas iniciais, outros tipos de porfiria foram descritas: a porfiria cutânea tardia e a porfiria aguda intermitente em 1937 por WALDENSTRON, a porfiria variegata por DEAN & BANNER, que apresentava surtos agudos e manifestação cutânea simultaneamente.[1,3]

Na década de 1960 e 1970, foram descritas a coproporfiria eritropoiética, coproporfiria hereditária, porfiria hepatoeritropoiética e a porfiria por deficiência da ALA-deidrase. [2]

1.1.2 Metabolismo do heme

A síntese do heme pode ocorrer tanto na medula óssea como no fígado. As enzimas, responsáveis pelo processo de formação do heme, estão localizadas tanto nas mitocôndrias e como no citosol.

Figura 3 - Biossíntese do Heme.



Fonte: Vieira et al. [68]

A primeira enzima, ALA-sintase, localizada na mitocôndria, realiza a condensação da glicina e succinil-coA na presença do piridoxal fosfato, formando o acido δ aminolevulinico (ALA). Essa reação ocorre sob velocidade controlada no

fígado e possivelmente na medula óssea. Esta enzima pode ser induzida por medicações e hormônios, e também sofre feeback negativo pelo heme. [3,4]

A segunda reação é catalizada pela enzima ALA-deidrase que combina duas moléculas do ALA para formar o porfobilinogenio(PBG). Essa enzima se localiza no citoplasma, sendo influenciada pela presença de metais pesados.[3,4]

A condensação de 4 moléculas de PBG para formar o tetrapirrol uroporfirinogenio (URO) III, ocorre através de duas etapas. A primeira etapa sob ação da URO-I sintase (PBG deaminase) e em seguida através da URO-III sintase (Uroporfirinogênio sintase III). Este processo é importante, pois somente a série III das porfirinas pode funcionar como precursor da síntese do heme. Essa etapa sequencial ocorre no citoplasma celular. [3,4]

A próxima enzima da via, a URO-descarboxilase, localizada no citoplasma, remove os 4 grupos carboxilas da uroporfirinogenio III resultando na formação do coproporfirinogênio III. Este composto penetra nas mitocôndrias e sofre ação da coproporfirinogenio-oxidase, a sexta enzima da via de bisossintese do heme. Neste processo, ocorre a remoção de outras duas carboxilas, formando, então o protoporfirinogenio (PROTO). [3,4]

A seguir, o protoporfirinogenio é oxidado pela enzima protoporfirinogênio-oxidase, gerando a protorfirina IX. A designação IX remete ao fato de que tanto o protoporfirinogênio como a protoporfirina são o nono isômero de quinze enzimas potenciais, apesar de ambos serem isômeros tipo III. Este processo também ocorre dentro da mitocôndria.[4]

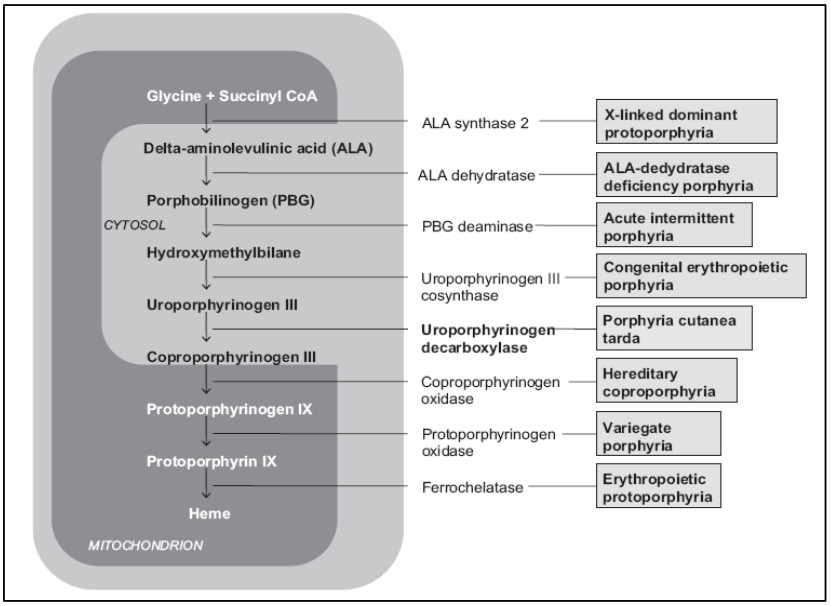
Ao final ocorre a inserção do íon ferro na protoporfirina para formar o heme. Esta etapa é catalizada pela ferroquelatase, a oitava enzima desta via, que se localiza dentro da mitocôndria.[7] Após a formação final do Heme, este é conjugado a várias proteínas para formar a hemoglobina, mioglobina, catalases e citocromos. [3]

Importante ressaltar a presença de uma rota alternativa para conversão do pentaporfirinogenio III para harderoporfirinogenio. A sequência de ação das enzimas URO-descarboxilase e COPRO-oxidase está invertida. Esta inversão gera a formação de produtos intermediáriso que após serem oxidados formam a isocoproporfirina. Esta é a maior porfirina encontrada nas fezes dos pacientes com porfiria cutânea tardia (PCT). A isocroporfirina é muito pouco utilizada na formação do heme, porem torna-se essencial em condições patológicas como PCT.[3]

1.1.3 Fisiopatologia das lesões cutâneas

A fotossensibilidade é uma das manifestações cutâneas mais comuns das porfirias, sendo observada na porfiria cutânea tardia, na protoporfiria eritropoética, na coproporfiria hereditária, porfiria eritropoética congênita, porfiria variegata e porfiria hepatoeritropoética.[2] Esta alteração está relacionada com os precursores acumulados devido a deficiência enzimática de cada tipo de porfiria. Na porfiria aguda intermitente não há fotossensibilidade pois os precursores ALA e PBG não são fotossensibilizantes. [9,10,11]

Figura 4 – Enzimas na Biosíntese do Heme e as doenças relacionadas.



Fonte: Puy *et al.* [12]

Os pacientes com porfiria cutânea tardia queixam-se, principalmente, de fragilidade cutânea que está relacionada com o deposito de porfirinas e conseqüente fotossensibilidade. Já nas formas eritropoiéticas, as principais queixas são: queimação e prurido após exposição solar.

Diversos mecanismos estão implicados na fotossensibilidade do paciente com porfiria cutânea tardia, tais como: os fatores de oxigênio ativado, células (mastócitos, eritróctos e fibroblastos), mediadores solúveis (sistema complemento e

eicosanóides) e metaloproteinases.[9] A interação destes fatores parece ser a responsável pela lesão cutânea na porfiria cutânea tardia.

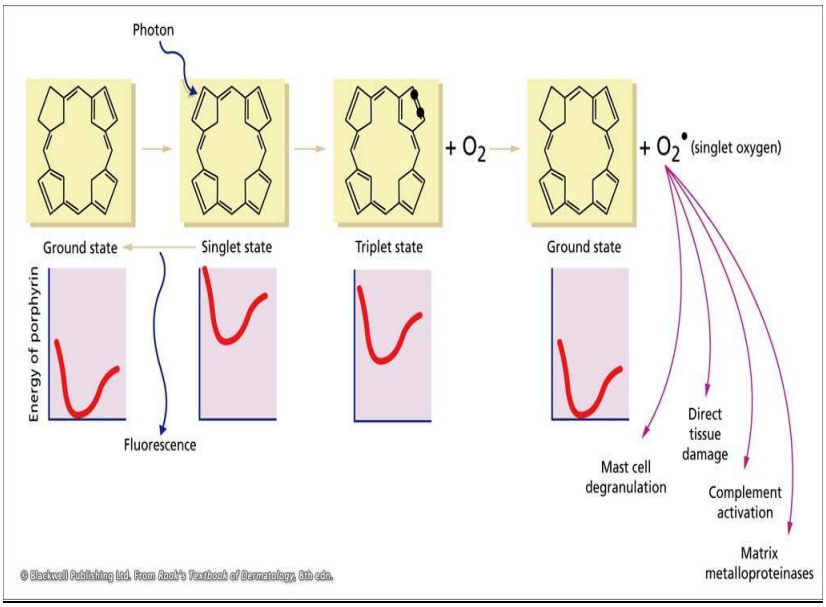
Quadro 1 – Fatores que contribuem para lesões cutâneas

1. Luz solar (380-760nm)
2. Espécies de oxigênio ativado ($^1O_2$, O_2^-, H_2O_2, ^-OH)
3. Células
-Eritrócitos
-Mastócitos
-Polimorfonucleados
-Fibroblastos
4. Mediadores solúveis
-Sistema do Complemento
-Reações dependentes de fator XII
-Eicasonóides
5. Metaloproteínases

Fonte: Modificado de Vieira *et al.* [68]

Na figura abaixo é ilustrada a ativação das espécies de oxigênio presentes na molécula de porfirina. Ao absorver a energia da luz, uma molécula de porfirina em seu estado excitado singlet, se converte em estado triplet. As porfirinas em seu estado *triplet* transferem a energia para as moléculas de oxigênio (O2) produzindo os fatores reatores de oxigênio ($^1O_2$, O_2^-, H_2O_2, ^-OH), que interagem com as membranas celulares, causando lesão tecidual e a liberação de mediadores pró-inflamatórios. O oxigênio singlet ($^1O_2$) é provavelmente o principal mediador da lesão tecidual.[9,10] Com esse acumulo de energia ocorre também ativação de células (mastócitos), de enzimas, do sistema complemento que irão gerar os danos teciduais característicos das porfirias.

Figura 5 - Mecanismo de Lesão tecidual.



Fonte: Bickers *et al.* [3]

1.1.4 Classificação das Porfirias

As porfirias são classificadas por diversos pesquisadores e diversas formas. Pode ser dividida em adquirida e hereditária, e esta relacionada com o déficit enzimático específico. De acordo com a origem dos precursores em excesso, é subclassificada em porfirias eritropoiéticas ou hepáticas. Outra forma de classificar é de acordo com os sintomas clínicos: porfirias agudas, com predomínio sintomas neuropsiquiátricos e viscerais, e porfirias cutâneas, que se manifestam por fotossensibilidade cutânea. [12,13]

A classificação proposta abaixo é uma síntese das diversas formas de classificar as porfirias. Dentro desta classificação, tanto a Coproporfiria Hereditária, como a Porfiria Variegata apresentam também quadro clinico cutâneo, além de ataques agudos.

Tabela 3 - Classificação das Porfirias

Tipo porfiria	Déficit Enzimático	Origem
Agudas		
Porfiria ALA deidrase	Ac. Delta-amino desidrase	Hepática
Porfiria Aguda Intermitente	Porfobilinogênio desaminase	Hepática
Coproporfiria Hereditária	Coproporfirinogênio oxidase	Hepática
Porfiria Variegata	Protoporfirinogênio oxidase	Hepática
Cutânea		
Porfiria Eritropoeiética congênita	UroporfirinogênioIII co-sintase	Eritropoiética
Porfiria Cutânea Tardia	Uroporfirinogênio descarboxilase	Hepática
Porfiria Hepatoeritropoiética	Uroporfirinogênio descarboxilase	Hepatoeritropoiética
Protoporfiria Eritropoiética	Ferroquelatase	Eritropoiética

Fonte: Modificado de Puy *et al.* [12]

A porfiria aguda intermitente (PAI) não é infreqüente nas emergências ou hospitais, porém é diagnosticada erroneamente como distúrbios psiquiátricos ou até abdome agudo. Em alguns casos, é realizado o diagnóstico de laparotomia branca, sem chegar à causa final do problema. [2,13]

Os achados clínicos da PAI são muito variados e ocorrem, principalmente em mulheres. Drogas como barbitúricos, dapsona, dipirona, eritromicina são fatores agravantes ou precipitantes da doença. A dificuldade de diagnóstico ocorre devido ao período entre o fim do ataque e a coleta dos exames laboratoriais, pois os metabólitos medidos em sangue, urina e fezes tendem a normalizar com o tempo. [3, 12]

Os sintomas principais são os da tríade de Gunther: dor abdominal aguda, vômitos e constipação, com possível manifestação neurologia e psiquiátrica. Os sinais mais comuns são taquicardia, hipertensão e redução dos reflexos tendinosos, associado a aumento de excreção do porfobilinogênio na urina. Nem sempre é possível detectar este precursor do heme, pois no período de latência e de remissão da doença, menos de 50% dos casos excretam PBG e ALA acima dos níveis normais. [2,11]

Atualmente existem testes enzimáticos mais sensíveis e específicos, que favorece o diagnóstico de casos de PAI, mesmo no período de latência ou remissão. Hoje é realizada investigação de possível mutação genética como uma predisposição para desenvolver a PAI.[12]

A coproporfiria hereditária (CPH) é caracterizada por poucas alterações clínicas e laboratoriais, entretanto podem acontecer surtos agudos semelhantes aos da PAI. Ocorre quando a atividade da enzima coproporfirinogênio-oxidase está reduzida mais de 50% do seu valor normal. Nesses casos ocorre excreção urinária aumentada da coproporfirina III.

A porfiria Variegata é uma doença que se assemelha em diversos aspectos com a PAI, como o fato de ocorrer principalmente em mulheres e de diversas medicações servirem como desencadeantes ou agravantes.[11] A porfirina fecal encontra-se elevada constantemente, entretanto os níveis de ALA e PBG encontram-se elevados apenas durante os surtos agudos. Nessa forma de porfiria, o defeito enzimático ocorre na protoporfirinogênio oxidase, penúltima enzima da síntese do heme.

A protoporfiria eritropoiética (PPE) ocorre na etapa final da biossíntese do heme, onde a enzima ferroquelatase realiza a inserção do ferro na protoporfirina para formar o Heme.[7]

A porfiria cutânea tardia, por ser o assunto principal da nossa dissertação, será dsicutida, a parte no próximo capítulo.

Apesar de alterações clínicas e laboratoriais serem de extrema importância para a classificação das porfirias, o diagnóstico definitivo depende da demonstração da deficiência enzimática ou do defeito gênico. As análises de genética molecular permitem a identificação exata de heterozigose e o estabelecimento do diagnóstico pré-natal em famílias com mutações conhecidas.[12]

1.2 **Porfiria Cutânea Tardia**

1.2.1 Aspectos gerais

A porfiria cutânea tardia foi primeiramente classificada por Waldenstron, que distinguiu os pacientes com surtos agudos das porfirias que nunca desenvolviam lesões cutâneas.[14] Dessa forma ele concluiu que as duas doenças distintas eram a porfiria cutânea tardia e a porfiria aguda intermitente. A porfiria cutânea tardia decrorre deficiência parcial da atividade enzimática da uroporfirinogênio-decarboxilase (Urod), herdada ou adquirida.[15,16] O termo porfiria origina-se da palavra grega *porphura*, que significa cor roxa, sendo escolhido devido a coloração arroxeada da urina destes pacientes.

1.2.2 Etiopatogenia

A porfiria cutânea Tardia é o tipo mais comum das porfirias. A doença geralmente se inicia em indivíduos de meia-idade, a maioria acima dos 40 anos, porém pode acometer faixa etária menor. Antes do uso difundido de anticoncepcionais, a doença predominava em homens, mas atualmente há aumento da incidência em mulheres, devido à influência dos estrógenos na patogênese da PCT, além de haver aumento do consumo de álcool entre a população feminina. [17,18]

A maioria, das classificações da PCT, separa a doença em dois grandes grupos, de acordo com o grau de atividade da enzima uroporfirinogênio-descarboxilase. Entretanto, atualmente, alguns estudos classificam a PCT em quatro formas:

- PCT sintomática, esporádica, adquirida ou tipo I.
- PCT hereditária, familial ou tipo II.
- PCT tipo III.
- PCT tóxica.

Na PCT sintomática (tipo I), a deficiência enzimática ocorre apenas no fígado. Esta é o tipo mais comum entre as porfiria cutâneas tardias e esta não possui

história familiar. O defeito enzimático não é causado por mutação no gene da uroporfirinogênio-descarboxilase (URO-D), entretanto alguns pacientes quando expostos a substâncias como álcool ou estrogênio desenvolvem a porfiria, pois tais fatores reduzema atividade da enzima URO-D gerando acumulo de precursores do heme. [17,19]

Na PCT hereditária (tipo II), o quadro clínico é muito semelhante à PCT tipo I porém a atividade da URO-D está diminuída a 50%, tanto no tecido hepático com eritrocitário. Esta redução tanto ocorre por redução da síntese como prejuízo da estabilidade da enzima nos tecidos. A herança é do tipo autossômico dominante, com penetrância clinica baixa. Diversos estudos empregaram técnicas para determinar a atividade da URO-D, porém a avaliação da atividade desta enzima não serve isoladamente como forma de diferenciar a PCT tipo I da tipo II, pois a forma hereditária pode apresentar atividade no limite inferior da normalidade e abaixo do intervalo normal da forma tipo I.[20] Dessa forma a analise das mutações do gene da URO-D auxilia de forma mais precisa a diferenciar a forma familiar da adquirida.[21,22]

A PCT tipo III é indistinguível imunobioquimicamente da tipo I, apresentando atividade enzimática normal. Entretanto mais de uma pessoa da família costuma ser afetada pela doença. [23] As hipóteses para tal problema seriam que tais pacientes poderiam herdar uma forma de URO-D aparentemente normal, porem, esta seia inibida no fígado. Ou que estes indivíduos poderiam sofrer a herança de outra deficiência enzimática não relacionada a URO-D. Desta forma, não se comprovou até hoje se a PCT tipo III seria um forma distinta ou apenas a Tipo I com componente hereditário associado.

A porfiria cutânea tóxica ocorre após a exposição a determinadas substâncias. Diferente da forma tipo I ou tipo II, que a exposição a substâncias como álcool e estrogênio podem sensibilizar indivíduos predispostos, qualquer individuo, se não a grande maioria, quando exposto a substâncias como hexaclorobenzeno (HCB) e 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina desenvolvem a doença devido a redução da atividade da URO-D. [24,25]

Na PCT adquirida (tipo I) os agentes mais relacionados com o desenvolvimento da doença são: álcool, estrogênio, sobrecarga de ferro, hemocromatose, hepatite C, virus da imunodeficiência adquirida (HIV), hidrocarbonetos polihalogenados (HCB e dioxina) e a hemodiálise em pacientes com insuficiência renal crônica.

Álcool

O hábito exagerado do etilismo há muito é reconhecido como exacerbador da PCT. Como a maioria dos etilistas não desenvolve PCT, isso indica que o álcool só age em sinergismo com outros fatores em indivíduos predispostos. A maioria dos pacientes homens portadores de PCT são alcoólicos e ¼ irá desenvolver cirrose hepática. O mecanismo pelo qual o álcool desencadeia a PCT ainda é incerto apesar de ser sabido que ele estimula a enzima ALA sintase e inibe outras enzimas da síntese do heme, como a feroquelatase e a ALA deidrase.[26] O etilismo crônico leva à supressão da eritropoiese e aumenta a absorção de ferro da dieta alimentar. Este aumento da sobrecarga de ferro no organismo é conhecidamente um dos fatores desencadeantes da PCT. O álcool pode precipitar tanto a PCT adquirida como a hereditária.[26,27]

Estrógenos

A terapia estrogênica é hoje totalmente aceita como fator desencadeante da PCT. O uso de estrógenos é realizado, principalmente, como contraceptivos, para reposição hormonal pós-menopausa ou na terapêutica hormonal nos homens com carcinoma de próstata. Na gravidez, a PCT pode tornar-se manifesta no primeiro trimestre de gestação quando ocorre aumento nos níveis de estrogênio. O estrógeno é o único fator desencadeante em grande parte das mulheres com PCT, e sua suspensão é suficiente para a remissão do quadro clínico. O mecanismo pelo qual ele atua na expressão da PCT ainda não foi estabelecido. Alguns estudos consideram que o estrógeno induz a ALA-sintetase hepática, porém isso não explica o padrão de excreção das porfirinas na PCT. O estrógeno também pode atuar inibindo a Urod no fígado de doentes que já apresentem a enzima geneticamente diminuída, entretanto a grande maioria dos pacientes que usa estrogênio, não manifesta anormalidades bioquímicas de PCT. [11,28]

Hexaclorobenzeno (HCB)

Uma forma tóxica desta porfiria foi evidenciada em 1956 na Turquia, devido a ingestão de sementes de trigo tratadas com HCB ou através do pão fabricado com

estes grãos. A porfiria tóxica pode ser causada por outros hidrocarbonetos clorados, como 2, 3, 7, 8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD). O padrão de excreção das porfirinas e as alterações dermatológicas observadas são semelhantes àquelas da PCT tipo I, ou seja, indivíduos não predispostos geneticamente. Estudos em animais de laboratório demonstraram que a ingestão crônica de HCB produz acúmulo de porfirinas no fígado por inativação da URO-D. [24]

Tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD)

Considerado o mais potente agente porfirinogênico conhecido. Além de causar a porfiria hepática, também é responsável pela cloracne e lesões hepáticas em animais de laboratório. Responsável por induzir a delta-aminolevulinico sintase hepática e inibir a URO-D hepática. Apenas se houver predisposição genética poderá desenvolver a PCT clínica. [25]

Metabolismo do ferro

O envolvimento do ferro na patogênese da PCT é extremamente complexo. A sobrecarga de ferro varia de leve a moderada na maioria dos doentes. A hemocromatose clínica é relativamente incomum, porém a siderose hepática está presente em até 80% dos doentes com PCT. Alguns estudos relatam que a sobrecarga de ferro é capaz de inibir diretamente a URO-D. Outros trabalhos relatam que o ferro hepático em excesso causa aumento na síntese das porfirinas e inibe a atividade da URO III cosintase, explicando o excesso de uroporfirinas, característico da PCT. [4,8,16]

Hemocromatose

Hemocromatose hereditária é uma doença autossômica recessiva do metabolismo do ferro em que o excesso deste ion, se acumula em diferentes órgãos, incluindo o fígado. Ocorre devido a presença de duas mutações específicas do gene HFE, (C282Y e H63D),sendo considerada um fator importante para a susceptibilidade ao desenvolvimento do PCT.[29,30] Embora uma outra mutação no gene HFE, S65C, tenha sido associada com uma forma leve de acúmulo de ferro,

vários estudos indicam que esta mutação predisponha o paciente a PCT. A homozigose para o C282Y mutação do gene HFE, além de gerar um risco aumentado de até 50 vezes, parece estar associado com um início mais precoce das lesões cutâneas nos com PCT esporádica e familiar. Uma segunda mutação no gene da hemocromatose que também pode estar associada à PCT é a H63D.[31,32,33]

Infecções virais

Há uma associação entre PCT e hepatite C (HCV), bem como infecções combinados do HCV e HIV. No entanto, o papel específico desses vírus na patogênese da PCT é ainda incerto. [34]

Em relação ao vírus do HCV, não há predominância de nenhum genótipo do HCV nas porfirias. É necessária uma predisposição a desenvolver a deficiência da Urod, pois a maioria dos doentes com hepatite C não desenvolve PCT.[35,36] Como a PCT pode ser a primeira indicação de infecção pelo HCV, é importante investigar todos os doentes. Os possíveis mecanismos que explicam o papel do HCV na PCT seriam: a redução da atividade da Urod secundária à lesão do hepatócito, aumento da resposta auto-imune no fígado e alteração no citocromo P450. [37,38,39,40]

Já associação do HIV com a PCT foi inicialmente reconhecida em 1987. Nos primeiros relatos, três homens com quadro clínico e bioquímico de PCT desenvolveram SIDA.[41,42] Atualmente, na maioria dos casos relatados o diagnóstico de HIV é concomitante ao de PCT, portanto deve-se considerar a sorologia para HIV em todos os doentes com PCT. Embora a fisiopatologia desta associação seja desconhecida, considera-se que o vírus poderia comprometer a função hepática gerando as manifestações da PCT.[43,44] Outros fatores desencadeantes geralmente estão associados, tais como álcool, hepatite B e hepatite C. Atualmente existem relatos de casos onde as terapias antiretrovirais seriam as responsáveis por desencadear a PCT em pacientes previamente infectados com o vírus HIV, entretanto são necessários outros estudos para corroborar com tal hipótese.[45,46,47]

Dentre todos os efeitos conhecidos do álcool, estrogênio, HCV, HIV, hemocromatose, sobrecarga de ferro e hidrocarbonetos halogenados sobre a síntese do heme, ficou claro que cada um deles poderia contribuir na patogênese na PCT. Entretanto, o real e preciso mecanismo de como estes fatores atuariam sobre

a atividade da URO-D ainda é desconhecido. É sabido que a apresentação clínica da PCT sofre influência tanto de fatores genéticos como ambientais. [48]

1.2.3 Genética

A porfiria cutânea tardia tipo II (hereditária) é resultado de mutações no gene da URO-D. Tais Mutações são herdadas de forma autossômica dominante, porém apresentam baixa penetrância clinica. [49,50]

O gene da URO-D está localizado no braço curto do cromossomo 1 (1p34). Mais de 60 mutações foram identificadas até o momento. Tais mutações resultam em uma redução acentuada na meia-vida da enzima de mais de 100h para cerca de 4hs.[50]

Os primeiros relatos de investigação imunogenética na PCT surgiram com a utilização dos antígenos HLA. O estudo de *Fonseca et al* demonstrou a associação entre os antígenos HLA-A28 e HLA-B14 entre os pacientes com PCT adquirida. Neste trabalho, o HLA-B14 foi mais freqüente nas mulheres que usaram estrogênio enquanto o HLA-A28 foi mais freqüente no homens sadios.[2,3, 51]

O primeiro relato de avaliação da mutação do gene da URO-D em modelo animal foi de Phillips et al evidenciando que a homozigose para esta mutação acarreta a morte durante a embriogênese. Entretanto o camundongo com heterozigose apresentava desenvolvimento normal. [52,53]

1.2.4 Diagnóstico Clínico

A incidência da porfiria cutânea tardia varia de acordo com a população estudada, sendo nos Estados Unidos da América de 1 : 25.000 pessoas. Era considerada uma doença masculina, ocorrendo em homens de meia idade. Atualmente, a incidência nas mulheres aumentou devido a introdução de terapias de reposição hormonal, uso indiscriminado de contraceptivos orais e o consumo aumentado de álcool. Consequentemente, a incidência entre homens e mulheres é praticamente a mesma.

Manifestação Cutânea

As manifestações cutâneas da PCT, apesar de serem muito diversificadas, quando em conjunto com um contexto epidemiológico favorável (alcoolismo, sorologia positiva para hepatite C) torna esse diagnóstico muito provável. Entre os principais achados cutâneos estão: fragilidade cutânea, vesículas e bolhas, hipertricose, hiperpigmentação, alterações esclerodermóides, calcificações com ulceração e alopecia cicatricial.[12, 54]

Quase todos os pacientes notam aumento da fragilidade cutânea em áreas expostas a luz, principalmente dorso das mãos e antebraços. A fragilidade da pele é caracterizada pelo desenvolvimento de vesículas e bolhas após pequenos e, as vezes, imperceptíveis traumas. Após o traumatismo, há deslocamento da epiderme formando pequenas erosões que resolvem em 4 a 6 semanas. A cicatrizaçaõ é caracterizada pela presença de áreas atroficas, hiper ou hipocrômicas, com a presença de pequenas lesões císticas (mílio) assintomática. Todos estes estagios de lesoes podem ser visto no mesmo paciente.[3,55]

Os pacientes raramente associam o desenvolvimento de novas lesões com a exposição solar, apesar das lesões serem principalmnete em areas expostas e os sintomas serem piores durante verão. Resposta anormal à radiação de 400nm pode ser observada nestes pacientes.[11]

Trabalhos recentes sugerem que a irradiação do soro de pacientes com PCT resultaria na ativação da via clássica do complemento e consequente presença de depósitos autoimunes gerando a formação da bolha na doença. Apesar destas hipóteses o mecanismo permanece desconhecido.[9]

O hirsutismo é proeminente nas áreas periorbital, temporal e malar. Esta é freqüentemente a queixa apresentada pelas mulheres. (No surto de hexaclorobenzeno na Turquia, hipertricose da face, especialmente em crianças, foi marcante.) Inicialmente os pelos são finos e pouco perceptíveis e com a evoluçãoda doença vão se tornando espessos, escuros e em maior numero. Outras áreas como tronco, braços e pernas tambem são comprometidas. Essa é uma das principais causas de procura de atendimento médico. Apesar de muito característico sua causa ainda permanece desconhecida.

Placas esbranquiçadas, assemelhando-se a morféia ou a esclerodermia, podem ser vistas em 10-15% dos pacientes. Isto é especialmente proeminente no pescoço e na região peitoral (áreas expostas ou não a luz). Calcificação distrófica

pode ocorrer nessas lesões, prinipalmente quando estas se localizam na região pré-auricular. A causa dessas placas é desconhecida. Alguns estudos tem demonstrado que uroporfirinogenio I presente no plasma dos pacientes de PCT, poderia estimular a síntese de colágeno pelos fibroblastos da pele. Importante ressaltar que este aumento na sintese está relacionado com a concentração e tempo de exposição, sem haver relação com exposição a luz.[10,16]

Alopécia cicatricial ocorre nas áreas de comprometimento cutâneo repetido e após resolução das bolhas no couro cabeludo.[55]

A hiperpigmentação é muito comum na PCT. Apresenta um padrão de melasma-simile na região malar e ao redor dos olhos, padrão difuso na pele exposta, ou ocasionalmente em uma distribuição reticulada. Quando possui hiperpigmetnação difusa pode simular doença de Addison ou hemocromatose. [1,3]

Raramente outras apresentações são vistas, como: onicólise induzida e elastose solar acelerado também podem ocorrer. [1]

Condiçoes extracutâneas associadas

Grande parte dos pacientes com PCT apresenta alguma evidencia de sobrecarga de ferro. Isto é evidenciado através de aumento do ferro sérico ou da ferritina. Tais elevações são mais comuns na PCT tipo I ou adquirida. Alguns estudos demonstraram através de biópsia hepática niveis aumentados de ferro, além de inflamação hepatocelular, necrose e infiltração gordurosa. [55,56]

Apesar de ser comum a bioquímica hepática alterada, a doença hepática em si não é usual. A cirrose está presente em menos de 15% dos doentes, e estes apresentam maior risco de desenvolver carcinoma hepatocelular (CHC). A incidência de CHC na PCT varia de cinco a 16%, e, em necropsias, de 40 a 50%, indicando que esses tumores são assintomáticos e progridem lentamente. A coexistência de fatores como hepatite viral, álcool e sobrecarga de ferro pode explicar a ocorrência de CHC em doentes com PCT. Segundo alguns estudos, o risco de CHC aumenta nos homens acima de 50 anos, que apresentam PCT sintomática por 10 anos ou mais e com cirrose.[56,57] Os doentes devem ser monitorados por ultra-som e dosagem de alfa-fetoproteína sérica para a detecção precoce do CHC. [58,59]

A Intolerância à glicose é freqüentemente mencionada na PCT, podendo ocorrer em mais de 50% destes pacientes. Há alguns relatos de incidência de

diabetes mellitus(DM), especialmente em homens, com até 15 % destes doentes acometidos. A associação de porfiria e diabetes deve ser ressaltada quando ocorre um resultado anormal da porfirina fecal, particularmente, em homens diabéticos com mais de 40 anos. [1,2,58]

Com relação ao lúpus eritematoso sistêmico, sua associação com a PCT continua a ser pesquisada. Apesar da descrição de inúmeros casos na literatura, ainda resta esclarecimentos se é meramente coincidência ou se esta associação é verdadeira. [3,11]

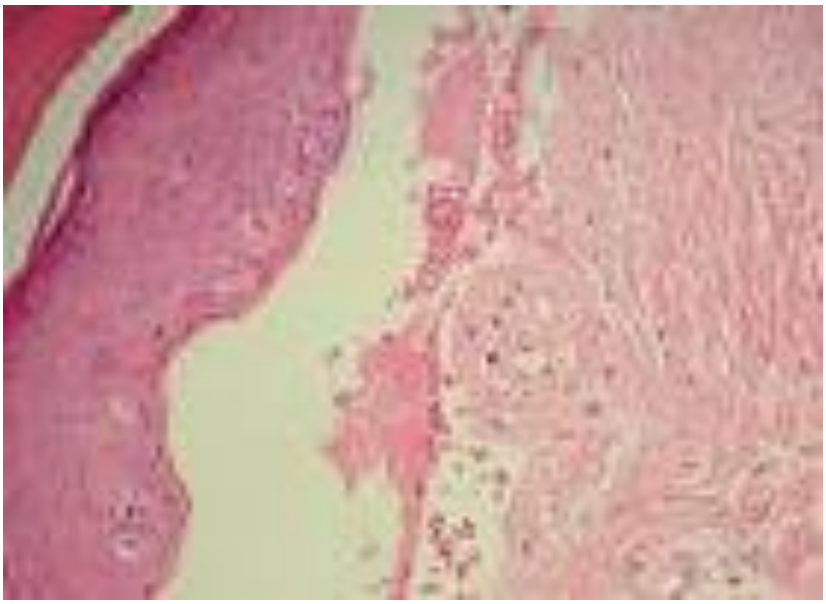
1.2.5 Diagnóstico Laboratorial

Histopatologia Cutânea

As alterações histológicas vistas nas lesões cutâneas são as mesmas em todos os seis tipos de porfiria com lesões cutâneas. As diferenças são baseadas na gravidade e não no tipo de porfiria.

As vesículas ou bolhas na PCT revelam fendas subepidérmicas com as papilas dérmicas elevando-se irregularmente do assoalho da bolha para o interior, fenômeno chamado de festonamento.[60,61] Este é explicado pela rigidez da derme superior induzida pela presença de material eosinofilico dentro e em torno das paredes capilares nas papilas e na derme papilar.Também é encontrado degeneração basofílica do colágeno, espessamento homogêneo da parede dos vasos da derme papilar e esparso infiltrado inflamatório.[62] Na junção dermo-epidérmica e na parede dos vasos dérmicos encontramos material PAS positivo.

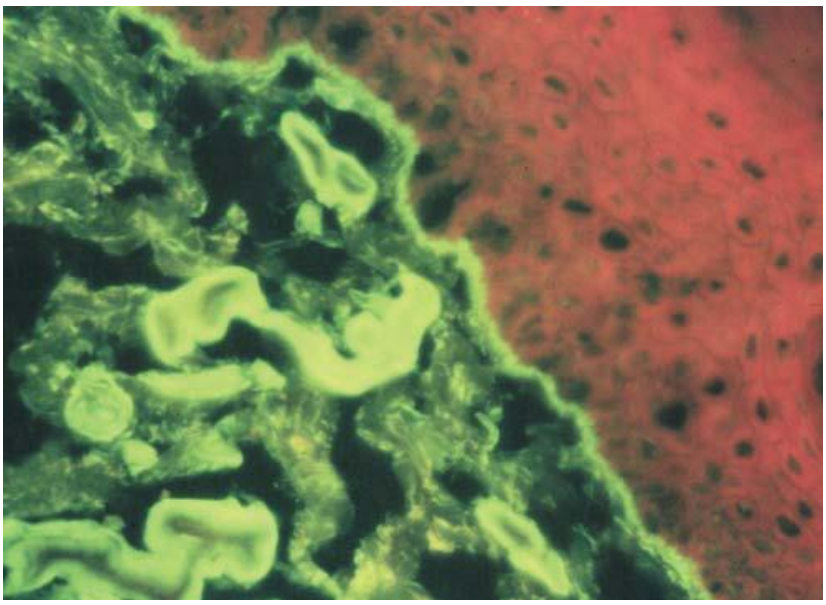
Figura 6 - Bolhas subepidérmicas com infiltrado inflamatório discreto e fenômeno do festonamento.



Fonte: Bickers *et al.* [3]

A imunofluorescência direta da lesão com doença em atividade é positiva em quase 100% para IgG principalmente, também IgM, complemento, fibrina e, ocasionalmente, IgA na parede do vasos da derme papilar e junção dermo-epidermica. Já a positividade da pele sã para doença em atividade cai para 50% dos casos. [63]

Figura 7 - Pele lesada demonstrando fluorescência homogênea, intensa e contínua na junção dermoepidérmica e na parede dos vasos com anti-IgG.



Fonte: Vieira *et al.* [68]

Com o uso da microscopia eletrônica são evidenciados os diferentes níveis de clivagem da bolha, como: lâmina lúcida, sublâmina densa e derme papilar. Através destas novas técnicas, alguns estudos sugeriram que as bolhas nos casos brandos de PCT originariam-se dentro da zona juncional, mas que nos casos graves elas se formariam abaixo da zona da membrana basal-positiva e assim deixariam cicatrizes residuais. [9,10,62]

Nas lesões esclerodermiformes, a esclerose da derme é causada por aumento de colágeno tipo I, semelhante à esclerodermia sistêmica, e no infiltrado inflamatório há um número significativo de mastócitos. [2]

Avaliação hematológica e bioquímica

A maior parte dos pacientes com PCT apresenta hematócrito normal, sendo ocasional eritrocitose associado com aumento dos valores da hemoglobina. Quando presente a anemia, esta geralmente é resultado de doenças concomitantes, tais como infecção pelo HIV, doença renal crônica, lúpus eritematoso sistêmico entre

outras. Como descrito anteriormente, praticamente todos os doentes apresentam aumento do ferro sérico, da saturação de ferro e da ferritina. Cerca de 50% deles apresentam transaminases séricas e a Gama Glutamil-Transferase elevadas.

Teste com lâmpada de Wood

O teste com a lâmpada de Wood é um teste simples que pode ser realizado no próprio consultório para determinar a presença das porfirinas. Esta técnica foi descrita inicialmente por Rimington e mais tardiamente por Cripps e Peters.[2,3] Quando as porfirinas estão elevadas, a urina se torna marron-avermelhada e fluoresce sob a luz de Wood. Para detectar baixas concentrações de porfirinas, primeiro acidifica-se a urina com poucas gotas de acido hidroclorídrico a 10% ou acido acético e sob a luz de Wood observaremos fluorescência laranja-avermelhada. A urina normal emite fluorescência amarelo-esverdeada. Importante ressaltar que este exame é positivo na urina (++) e nas fezes (++) e negativo no sangue (hemáceas). [2,10,12]

Figura 8 - Teste com lâmpada de Wood é positivo na urina.

Notas: Urina marron-avermelhada devido à presença de porfirinas.
Fonte: Bickers *et al.* [3]

Porfirinas Urinárias

Os métodos qualitativos usados entre eles, o método da Clae (Cromatografia líquida de alta eficiência), separam as duas frações chamadas de uroporfirina e coproporfirina. Esse exame detecta e identifica as seis frações de uroporfirina (URO), 8-, 7-, 6- e 5-carboxilas e coproporfirina (Copro), na urina de 24 horas. [64]

A excreção aumentada das porfirinas na PCT ocorre por conta das uroporfirinas, particularmente de 7 carboxilas e, em menor proporção da corpoporfirina. A 6- e a 5-carboxilas porfirinas também podem estar aumentadas. [65,66]

Em indivíduos normais, a excreção urinária total das porfirinas é menor do que 300µg/dia e a relação coproporfirina/uroporfirina é de 5:1 a 10:1. Nos pacientes com PCT, a excreção urinária das porfirinas varia entre 1000 a 10000 µg/dia e a relação uroporfirina/coproporfirina está invertida sendo maior que 3:1.[1,2,67,68]

Deve ser enfatizado que o marcador bioquímico para avaliar a resposta ao tratamento é a quantificação das porfirinas urinárias.

Eventualmente, alguns pacientes com quadro clínico de PCT não exibe fluorescência urinária e as porfirinas totais urinárias de 24hs estarão discretamente aumentadas, sendo nestes casos necessária a determinação das porfirinas fecais.[1,12,68]

Porfirinas Fecais

Em indivíduos normais são encontrados somente traços das uroporfirinas, enquanto que nas fezes de pacientes com PCT está muito aumentada.

As fezes são o maior sítio de excreção de porfirinas e a excreção de porfirinas fecais nas 24 horas excede o total excretado pela urina. Nestas ocorre aumento de Isocoproporfirina, 7-carboxil porfirina, e menor quantidade de URO e Copro. A presença de isocoproporfirina é considerada diagnóstica da deficiência de URO-D.[11,13]

Em alguns casos a concentração de porfirinas pode ser tão elevada que as fezes fluorescem sob a luz de Wood. [68]

Porfirinas Sanguíneas

Atualmente através de métodos recentes é possível quantificar as porfirinas no plasma e eritrócitos. Normalmente, há apenas vestígios de porfirinas no plasma, e ocorre aumento significativo em pacientes com porfirias cutâneas. Este é um teste muito útil e subutilizados quando uma porfiria é suspeita como causa de fotossensibilidade. O método preferencial, pelo menos para o rastreio, envolve a diluição de plasma e a mensuração das porfirinas diretamente pelo escaneamento de fluorescência. O nome deste método é Emissão de Fluorescencia Máxima (EFM) e consiste no princípio de que moléculas de porfirina absorvem a luz visível, tornando-se moléculas ativadas. Este estado ativado é instável e esta energia absorvida é liberada sob a forma de luz. Esta luz emitida possui um comprimento de onda especifico e caracteristico de cada tipo de porfiria, logo possibilita a identiicação das diversas forma de porfiria. Enquanto nos individuos normais apresentam no plasma uma EFM negativa, no caso dos pacientes com porfiria cutanea tardia o plasma mostra uma EFM característico entre 618 e 620nm.[1,2,13,68]

1.2.6 Diagnóstico Diferencial

Casos clássicos de PCT devem ser distinguidos, em primeiro lugar de outros tipos de porfirias cutâneas que se manifestam com bolhas. Estes incluem porfiria variegata, coproporfiria hereditária, variantes leve de porfiria hepatoeritropoiética e porfiria eritropoiética congênita, além da pseudoporfiria.[1,2,10]

A pseudporfiria apresenta sólida associação com a ingestão de medicamentos específicos, incluindo anti-inflamatórios não-esteróides (por exemplo, o naproxeno, nabumetona, e cetoprofeno), furosemida, antibióticos (por exemplo, ácido nalidíxico e tetraciclinas), psoralenos e retinóides. Além da relação medicamentosa, ocorre elevada incidência em pacientes com doença renal crônica. Alguns estudos demontraram até 16% dos pacientes tratados com hemodiálise apresentando lesões cutâneas semelhantes a PCT. Nestes pacientes o hirsutismo, geralmente está ausente.[9,11]

Entre as formas de porfiria, a porfiria variegata é a mais difícil de ser distinguida clinicamente da PCT. Isto decorre do fato dos achados cutâneos de

ambas serem idênticos. Entretanto, elas podem ser distinguidas por testes laboratoriais. Na PCT a excreção urinária tende a ser mais alta (acima de 1000µ/24h) do que na porfiria variegata (geralmente menos de 1000µ/24h). Outra análise útil para diferenciar estas porfirias é a relação URO/COPRO. Na PCT esta relação costuma ser cinco vezes, enquanto na porfiria variegata é menor que um. Outra forma de diferenciá-las é atraves das porfirinas fecais. Na PCT, as coproporfirinas fecais estão elevadas, enquanto na porfiria variegata as protoporfirinas e coproporfirinas fecais estão muito aumentadas. [1,10,12]

A porfiria hepatoeritropoiética (PHE), uma forma rara de porfiria também faz diagnóstico diferencial com a PCT. Nessa forma, ocorre intensa fotossenssibilidade e excreção aumentada de uroporfirina, alem de outras formas de porfirinas.

Diversas outras dermatoses podem ser confundidas com PCT, tais como a escleroderma, pelagra, escoriações neuróticas, erupção polimorfa a luz, hidroa vaciniforme, pênfigo vulgar, penfigóide, dermatite herpetiforme, epidermolise bolhosa adquirida e erupções fototóxicas a drogas.[1,13] Todas estas doenças podem ser diferenciadas através da histopatologia, imunofluorescência ou pelo estudo das porfirinas. Através da avaliação clínica, do contexto epidemiológico e, principalmente, da análise cuidadosa das porfirinas urinárias e fecais, o diagnóstico de PCT é facilmente confirmado.

Alguns tumores hepáticos primários, como hepatoma benigno e carcinomas hepáticos produtores de porfirinas têm sido associados com PCT. Porém os padrões de excreção de porfirinas não são idênticos aos encontrados na PCT. [48]

1.2.7 Tratamento

A primeira medida necessária para o tratamento da porfiria cutânea tardia é a realização do diagnóstico correto, através de uma cuidadosa anamnese associada ao exame clinico e laboratorial adequados. O objetivo do tratamento nestes pacientes é obter tanto a remissão clinica como normalizar os níveis de porfirinas urinárias.

A suspensão ou tratamento dos fatores desencadeantes (traumas, álcool, estrogênio, sobrecarga de ferro, vírus HIV e HCV) é essencial para o sucesso terapêutico da PCT.[69,70] Outra medida importante para o tratamento e profilaxia

dessa doença é o controle a exposição solar. A fotoproteção nesses pacientes requer o uso de filtros físicos (oxido de zinco e dióxido de titânio) associados a uso de roupas adequadas pois o comprimento de onda da luz que sensibiliza as porfirinas estão entre 380-600. Esse espectro de luz corresponde a UVA de banda larga e luz visível que não é protegida pelos filtros solares convencionais. O uso de óculos adequados também é necessário para evitar a sensibilização da retina segundo alguns estudos.

A eliminação dos fatores desencadeantes associado a proteção solar melhora vagarosamente o quadro clínico e as anormalidades bioquímicas.[1,13] Entretanto, a maioria dos pacientes com PCT necessita de um tratamento mais específico que consiste normalmente em flebotomias e ou administração de antimaláricos. Outras formas possíveis de tratamento são utilizadas em situações especiais (paciente com HCV, com HIV ou com insuficiência renal crônica) ou quando ocorre falha da terapêutica convencional.[70,71,72] Entre as possibilidades terapêuticas estão o uso de: eritropoietina recombinante humana, interferon-alfa, deferoxamina subcutânea e colestiramina. [73,74,75]

Flebotomia

A flebotomia foi introduzida em 1961, por Ippen e permanece até hoje como a principal e mais comum forma de tratamento.[1,3] O programa da flebotomia consiste na retirada de 400-500 ml de sangue total semanalmente ou a cada duas semanas. O objetivo do tratamento é alcançar níveis de hemoglobina de 10 – 11g/dL, ferro sérico de 50-60 g/dL ou ferritina abaixo de 25µg/L. Outro método para monitorizar a resposta ao tratamento é através da avaliação quantitativa das porfirinas urinárias nas 24 horas.[12,21,76]

A melhora clinica ocorre nos primeiros 2 – 3 meses com a resolução das bolhas na pele. A fragilidade cutânea costuma melhorar após 6 – 9 meses e as concentrações das porfirinas urinárias com 12 – 13 meses de terapêutica, quando o tratamento deve ser suspenso. Tanto a hipertricose como as lesões esclerodermóides respondem muito bem, porém de forma mais lenta. A excreção das porfirinas continua reduzindo mesmo após a suspensão das flebotomias. Em até 90% dos pacientes com PCT os níveis de porfirina urinária normalizam após 12 meses de flebotomia, com um período médio de remissão de 5 anos. Entretanto, os

pacientes que persistiram no uso de álcool ou estrogênio, não apresentaram remissões tão duradouras. As recidivas quando ocorrem, demoram de 2 – 3 anos após o fim do tratamento e grande parte dos pacientes respondem a reintrodução da flebotomia.

A vantagem da monitorização com as porfirinas, ao invés da hemoglobina, ferritina ou ferro sérico, é que geralmente é necessário menor número de flebotomias. Além disto, a quantificação das porfirinas permite reiniciar as flebotomias antes do aparecimento da sintomatologia clínica.[10,68,74]

Apesar do uso da flebotomia para reduzir os níveis elevados de ferro, que inibe a atividade da uroporfirinogêno descarboxilase, o efeito exato desta alteração do ferro sérico na PCT continua desconhecido. Nem todos os pacientes possuem níveis elevados de ferro sérico, embora todos tenham aumento do armazenamento do ferro hepático. Por sua vez o ferro sozinho não é capaz de explicar a excessiva produção de porfirinas hepáticas, visto que pacientes com hemocromatose (níveis elevados de ferro) apresentam níveis normais de porfirinas. [12,14,21,76]

Dessa forma especula-se que a uroporfirinogênio descarboxilase seja inibida pelos altos níveis de ferro apenas em pacientes com predisposição genética para PCT ou que a flebotomia removeria uma substancia plasmática porfirinogênica indeterminada. Alguns trabalhos demonstram a efetividade da plasmaferese na PCT em pacientes com anemia grave impossibilitados de realizar flebotomia.[77]

Atualmente, diversos estudos demonstrararm que a flebotomia é o tratamento de escolha nos pacientes com a presença do gene da hemocromatose, pois além de prevenir a lesão hepática induzida pelo ferro, ocorre baixa resposta terapêutica, nesses pacientes, com o uso de antimaláricos.[1,2,68,74,78]

Antimaláricos

Apesar do uso benéfico da flebotomia, nem todos pacientes podem tolerar este procedimento. Pacientes com doença coronariana, doença pulmonar, anemia grave e alguns casos de infecção pelo HIV não podem ser submetidos a flebotomias, estando assim indicado a administração de cloroquina ou hidroxicloroquina.[1,2,68,78]

Os antimaláricos, cloroquina e hidroxicloroquina, foram usados, inicialmente, em 1957. Nesta época, utilizou-se doses usuais para o tratamento do lúpus

eritematoso sistêmico, ou seja, doses de 250 mg/dia de cloroquina e 400 mg/dia de hidroxicloroquina. Nestas doses as porfirinas hepáticas são eliminadas rapidamente provocando uma reação caracterizada por febre, adinamia, dor abdominal, náuseas e vômitos. Além disto, ocorre aumento na excreção das porfirinas urinárias, aumento da TGO, TGP e em alguns casos necrose hepática. Apesar desta grave reação, ocorre remissão clinica e laboratorial [79,80,81].

O mecanismo de ação dos antimaláricos na PCT não está completamente esclarecido. Há diversas hipóteses: 1) cloroquina liga-se às porfirinas tornando-as mais solúvel na água e este complexo porfirina-cloroquina que é excretado pelo fígado na bile; 2) cloroquina liga-se ao ferro no hepatócito, formando um complexo que é então excretado; 3) aumenta a excreção de porfirinas por exocitose e tem efeito porfirinostático, inibindo a formação de porfirinas; 4) reduz a atividade da ALA-sintase.[10,12,13,68,82]

Quando os antimaláricos são administrados em doses normais, estes causam a liberação de grande quantidade de porfirinas hepáticas em pouco tempo com risco elevado de reação hepatotóxica. Desta forma convencionou-se o uso de antimaláricos em dose baixa para o controle da PCT.[3,12,82,83]

O primeiro estudo sobre o uso de cloroquina na dose atual (125 mg duas vezes na semana) foi realizado por Kordac e col.[1,83]

Hoje, recomenda-se que o tratamento para PCT seja realizado com doses de de 125 mg de cloroquina e 200 mg de hidroxicloroquina duas vezes na semana. Antes de iniciar o tratamento devem-se dosar as porfirinas urinárias e a função hepática. Os testes durante o acompanhamento são realizados mensalmente. È esperado que após o início do antimalárico ocorra aumento na excreção das porfirinas urinárias, assim como discreto aumento das transaminases hepáticas. Entretanto em doses baixas os antimaláricos não causam dano hepático nem retinopatia. Geralmente a remissão clinica é alcançada em 6 – 12 meses, com a normalização da excreção das porfirinas ocorrendo por volta de 9- 15 meses. È recomendado que o tratamento seja mantido até a uroporfirna urinária atingir níveis menores que 100 µg/24h.[12,21,68,]

A maioria dos pacientes mantém remissão por períodos de 9 – 20 meses. Alguns estudos referem que o uso da hidroxicloroquina está relacionado com quadros de recidiva precoce.

O uso combinado de flebotomia e de antimalárico é indicado na resposta inadequada a qualquer dos tratamentos isoladamente. Outra possível utilização da terapia combinada seria para os casos de recidiva. Um protocolo utilizado nestes casos de recidiva seria a realização de quatro flebotomias semanais seguida de 250 mg/dia de cloroquina durante sete dias.[1,13] Este esquema seria repetido quando houver recidiva clínica ou bioquímica da doença. Os autores deste estudo concluíram que a flebotomia reduz o aumento nas porfirinas urinárias visto inicialmente quando se utiliza a cloroquina , reduzindo assim, a hepatotoxicidade.

Além do tratamento da PCT (tabela 1) é essencial compreender que a porfiria é uma doença primaria do fígado. A monitorização da função hepática e, possível desenvolvimento de cirrose ou hepatocarcinoma são essenciais para a sobrevida. A função hepática deve ser avaliada no momento da apresentação em todos os pacientes com PCT, e pacientes com alto risco de malignidade hepática requerem ultra-sons regulares e α-fetoproteína sérica para detectar carcinoma em fase tratável. Os pacientes que necessitam de maior acompanhamento são aqueles com período sintomático maior que 10 anos antes do tratamento, alterações graves na histologia / USG hepática, infecção por hepatite C, sexo masculino e idade acima de 50 anos. [35,48,68]

A tabela abaixo tem o intuito de resumir as principais orientações para o tratamento e acompanhamento do paciente com porfiria cutânea tardia.

Tabela 4 - Condutas do tratamento do paciente com PCT.

1	Fotoproteção: filtros solares de amplo espectro e roupas protetoras.
2	Evitar exposição solar e traumas na pele.
3	Não ingerir álcool, suspender uso de estrogênio.
4	Flebotomia: 400-500 ml de 14/14 dias durante 3 – 6 meses.
5	Doses baixas de anti-malárico: cloroquina (125 mg 2x semana) ou hidroxicloroquina (200 mg 2x semana), durante um período de 6 – 12 meses, até normalizar as porfirinas urinárias
6	Monitorizar as porfirinas urinarias de 3/3 meses durante tratamento e depois de 6/6 meses ou anual.

Fonte: Modificado de Bickers *et al.* [3]

1.3 **Mutação do gene da hemocromatose**

1.3.1 PCT e sua associação com Hemocromatose

A hemocromatose hereditária é a doença genética mais comum entre indivíduos com origem européia, sendo causada em sua grande maioria pela presença de um gene mutante chamado HFE. Essa doença é caracterizada pelo aumento da absorção intestinal de ferro, com conseqüente depósito de quantidades anormais deste metal em diversos órgãos. O quadro clínico característico é composto por: cirrose hepática, diabetes mellitus, artrite, miocardiopatia, hipercromia difusa e hipogonadismo hipogonadotrópico. [84]

Apesar de ser considerada uma das doenças genéticas mais comuns, sua prevalência na população é variável. Fatores não genéticos como o consumo de álcool, a ingestão de ferro alimentar, a doação de sangue, a esteatohepatite, a hepatitie viral pelo vírus B ou C, contribuem para a diferença da prevalência desta doença entre diversas populações.[84,85] No Brasil, a prevalência da Hemocromatose Hereditária ainda é desconhecida, principalmente, pela grande mistura de raças de nossa população.

Um estudo realizado por *Martinelli et col* demonstrou que apesar desta doença não ser comum na população estudada, todos os pacientes com hemocromatose que tinham sobrecarga de ferro apresentaram associação a uma mutação no gene HFE.[86]

A hemocromatose hereditária ainda não apresenta um padrão claro de hereditariedade, e atualmente pode ser dividida entre aquelas relacionadas com o gene HFE e as que não apresentam esta relação[87] .

Tabela 5 - classificação das hemocromatoses hereditárias.

Hemocromatose relacionada com HFE	Hemocromatose não relacionada com HFE
Homozigose para C282Y	Hemocromatose Juvenil
Heterozigose composta C282Y/H63D	Mutação do gene do Receptor de Transferrina 2
	Mutação do gene da Ferroportina
	Mutação do gene da H Ferritina
	Hemocromatose da Ilha de Solomon

Fonte: Modificado de Bulaj *et al.* [29]

A mais importante mutação do gene HFE1 é a C282Y, principalmente na forma de homozigose para o aminoácido tirosina . Este resultado na substituição da cisteína por tirosina na posição 282 (C282Y) do DNA e evidenciada em ate 95% dos pacientes com hemocromatose hereditária nas populações da Europa, porém sua prevalência varia muito em outras partes do mundo. Uma segunda mutação do gene HFE que resulta da substituição do aminoácido histidina por ácido aspártico na posição 63 (H63D) do DNA, essa variação vem sendo descrita na literatura com importância clinica apenas quando em homozigose, não sendo tão relevante o aumento dos níveis de ferro quando em heterozigose[88].

Em algumas composições dessas e outras variações descritas é possível observar casos onde há um aumento das reservas de ferro corporal, podendo até mesmo desencadear doenças que possuem o ferro como fator causal, como é o caso da Porfiria Cutânea Tardia[89] (tabela 6).

Tabela 6: Valores de ferro em indivíduos normais e com hemocromatose hereditária

	Normal	Homozigoto C282Y	Heterozigoto C282Y
Ferro plasmático µg/dl	9 – 27 (50-150)	Elevado	Elevado/ Normal
Saturação de transferrina, %	22 - 46	50 – 100	Normal
Ferritina sérica µg/l	10 – 200	200 – 500	< 500
Ferro Hepático µg/g de peso seco	300 – 1.400	2.000 – 4.000	300 – 3.000

Fonte: Modificado de Bulaj *et al* [29]

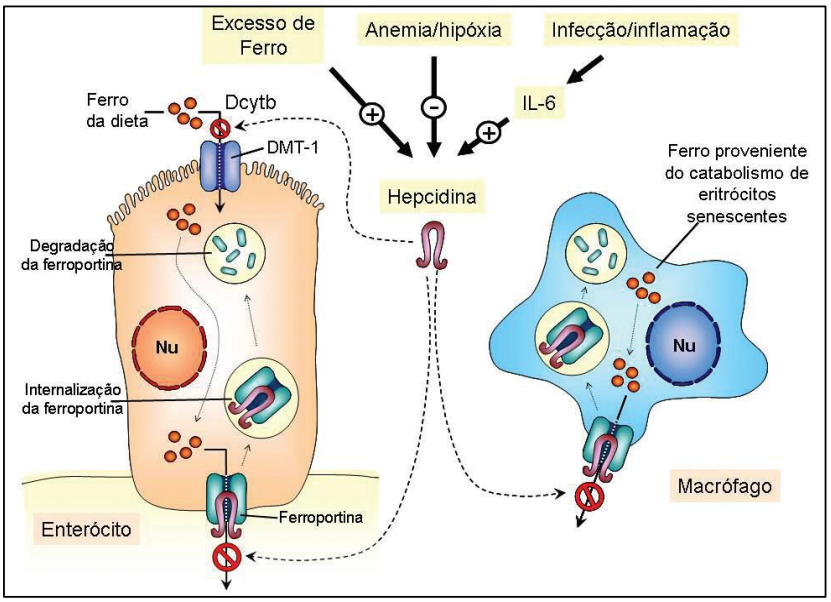
Existem algumas hipóteses sobre o mecanismo de ação da sobrecarga de ferro sobre a fisiopatogenia da PCT. A principal possibilidade seria a inibição ou redução da atividade da enzima URO-D na presença de níveis elevados de ferro. Mesmo níveis, levemente, aumentados podem prejudicar a ação desta enzima na biossíntese do heme, ocasionando o acumulo das porfirinas do organismo. [90]

O conhecimento sobre mecanismo da sobrecarga de ferro foi aprimorado com a identificação do gene HFE1 como influente nesta via metabólica, localizado no cromossomo 6. As suas duas principais mutações são o C282Y e H63D, sendo a primeira mais relacionada com a sobrecarga de ferro segundo diversos estudos. A possível relação entre estas duas mutações e a sobrecarga de ferro seria explicada através da redução de uma enzima chave no controle dos depósitos de ferro: a Hepcidina. [4,5,8]

Hepcidina é um hormônio peptídeo circulante regulador do metabolismo do ferro nos enterócitos, hepatócitos, e macrófagos, sendo o responsável pela comunicação entre os locais de absorção, utilização e estoque de ferro. A expressão gênica da hepcidina é estimulada na sobrecarga de ferro, inflamação e infecção. Em contrapartida, sua síntese é inibida na deficiência de ferro, hipóxia, eritropoiese e anemia ferropriva. No caso dos níveis elevados de ferro no organismo, a expressão aumentada da hepcidina age com o objetivo de reduzir este aporte exagerado de ferro no organismo.

Atualmente sabe-se que a expressão da hepcidina também sofre influência dos genes da hemocromatose. Desta maneira, quando ocorre mutação nos genes C282Y e H63D, a expressão da hepcidina fica diminuída ou não responsiva ao excesso de ferro absorvido da dieta, o que acarreta um acúmulo de ferro no organismo e conseqüente prejuízo de doenças como porfiria cutânea tardia.[4,8,9]

Figura 9 - Ação da hepacidina no metabolismo do ferro.



Fonte: Khogo *et al.* [8]

Desta forma é possível criar um paralelo entre a presença da mutação dos genes HFE, a sobrecarga de ferro no organismo, e conseqüente desencadeamento de doenças como a PCT.

Apesar da Porfiria Cutânea Tardia não colocar a vida do paciente em risco, a possível associação com Hemocromatose á torna de extrema importância. A detecção de um quadro subclínico da hemocromatose pode impedir a evolução para complicações fatais, como a portadores de cirrose hepática.

1.3.2 Novas associações genéticas para PCT (CYP)

Os avanços recentes no campo da biologia molecular tornaram evidente o envolvimento da genética na patogênese de diversas doenças, inclusive a porfiria cutânea tardia. Diante destas novas correlações, estudos em roedores demonstraram que o Citocromo P-450 1A2 (CYP1A2) participa de maneira central na síntese de um inibidor competitivo da URO-D hepática, porém em humanos existem poucas evidências. [91,92,93] Um dos poucos estudos, realizados em humanos, avaliou a mutação dos genes CYP1A2 demonstrando que sua expressão está

elevada nos pacientes portadores de PCT tanto da forma familial como esporádica. A maior expressão deste gene ou presença de alelo com maior poder de catalise poderia explicar a predisposição de alguns pacientes quando sob influência de fatores externos como álcool, estrogênio e sobrecarga de ferro de desenvolverem PCT [87,90].

Em um trabalho científico realizado por *Wickliffe e col*. em 2011, foi observado que apenas os alelos do gene CYP1A2 seriam o suficiente para desencadear a doença[87]. Desta forma, surge uma forte evidência da associação entre PCT e as mutações do gene do Citocromo P-450 1A2, onde esta alteração funcional hepática seria um fator independente para o desenvolvimento da porfiria cutânea tardia[89].

2 **OBJETIVOS**

2.1 **Objetivo geral**

Descrever a frequência das mutações H63D e C282Y do gene da Hemocromatose *HFE1* em pacientes brasileiros atendidos no HUPE, com Porfiria Cutânea Tardia, durante o período de janeiro de 1990 a dezembro de 2012, e estabelecer a correlação da presença desta mutação com a sobrecarga de ferro neste grupo de pacientes.

2.2 **Objetivos específicos**

- Determinar a frequência da mutação do gene HFE da Hemocromatose em pacientes com Porfiria Cutânea Tardia, atendidos no "Projeto Porfiria", do ambulatório de dermatologia geral, do Hospital Universitário Pedro Ernesto-UERJ, durante o período de janeiro de 1990 a dezembro de 2012.

- Comparar os dados avaliados com os de um grupo controle da população do Rio de Janeiro - Brasil pareado por idade, sexo e grupo étnico informado e dos ascendentes.

- Verificar as alterações bioquímicas (nível sérico de ferritina) dos pacientes com Porfiria Cutanea Tardia que possuem e os que não possuem a mutação do gene HFE.

3 **MÉTODOS**

3.1 **Desenho do estudo**

Estudo transversal, observacional com os pacientes que receberam o diagnóstico de Porfiria Cutânea Tardia no período de 1990 a 2012, do ambulatório de Dermatologia Geral do Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE).

Os pacientes consultados e os elegíveis foram chamados por carta, telegrama ou telefonema para avaliação clínica e laboratorial (ficha anexo A). Todos os pacientes foram submetidos a exame clinico dermatológico detalhado e coleta de amostra de sangue para avaliação de alterações laboratoriais (ferritina), e pesquisa de mutações no gene HFE. Todos apresentaram diagnostico comprovados através de exame clínico, laboratorial e/ou histopatológico. Os exames laboratoriais foram realizados no laboratório central do HUPE e a avaliação da mutação dos genes da hemocromatose (C282Y e H63D) realizada no Laboratório de Histocompatibilidade e Criopreservação da UERJ, localizado na Policlínica Piquet Carneiro.

Tabela 7 - Distribuição de 25 pacientes portadores de PCT quanto a idade, sexo quadro clínico (continua)

	Idade	Sexo	Bolhas	Hipertricose	Hiperpig-mentação	Fotossensi-bilidade
ASR	70	F	N	N	N	S
AFTC	50	M	N	N	S	S
CAS	47	M	S	S	S	S
CSR	51	M	N	N	S	N
DSO	54	M	S	N	S	S
ERL	56	M	N	N	N	N
JBPV	34	F	S	S	S	S
JJSP	63	M	N	N	N	N
JAA	46	M	S	S	S	S
LBA	52	M	S	S	S	S
LAO	59	M	N	S	S	S
MAJF	55	F	N	N	N	N
MGPB	44	F	N	S	S	S
MLAS	55	F	N	N	N	N
MMO	29	F	S	S	S	S
JVS	17	F	N	N	N	N
QLF	52	F	S	N	N	S
LCL	55	M	S	S	S	S
LSC	53	F	S	S	S	S
CAL	61	M	N	S	S	S
RML	35	F	N	N	N	N
GMM	49	F	S	S	S	S
VC	45	F	N	N	N	N
ES	57	M	S	S	S	S
CQ	63	M	S	S	S	S

3.2 **Técnica de avaliação da mutação do gene**

Foram avaliadas as mutações genéticas C282Y e H63D do gene da hemocromatose. Este processo foi realizado através da extração de DNA do leucócitos do sangue periférico, e o DNA analisado através de técnicas de PCR tempo real e sequenciamento de Sanger [32,40].

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 10minutos para separação de fases. Com o auxilio 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 15segundos para lise celular e incubação a 56°C por 10minutos. Após centrifugação breve foram adicionados 200,0µl de etanol P.A. as 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 1minuto, a coluna transferida para um novo tubo coletor adicionado 500,0µl de tampão AW1 e centrifugados a 8000rpm por 1minuto, novamente a coluna transferida para um novo tubo coletor adicionado 500,0µl de tampão AW2 e centrifugados a 14.000rpm por 3minutos, 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 5minutos e então centrifugado por 8000rpm por um minuto para recuperação do DNA, a coluna então foi descartada e o microtubo devidamente armazenado.

3.2.3 Análise do DNA extraído

PCR em Tempo Real

Para identificação alelo específica foi projetado um novo conceito de ensaio molecular visando uma maior rapidez da identificação a baixo custo. Foram analisadas três mutações sendo duas no gene HFE1 (H63D / C282Y), e uma que caracteriza o alelo CYP1A2*1F (C32035A). Para tal analise foram elaborados iniciadores capazes de diferenciar os alelos por amplificação preferencial, sendo aceito relevante diferenças de pelo menos 5 *CycloThreshold* (Ct) entre os alelos, ou seja, iniciadores que amplificam 32 vezes mais preferencialmente seu alelo determinante. Os alelos que não atenderam essa especificação foram configurados como inconclusivos e foram identificados por sequenciamento.

Tabela 8 - Iniciadores utilizados para diferenciação alélica

Iniciadores a jusantes	
HFE1 H63	5´ GACCAGCTGTTCGTGTTCTATGATC 3´
HFE1 D63	5´ GACCAGCTGTTCGTGTTCTATGATG 3´
HFE1 C282	5´ CCTGGATCAGCCCCTCATTG 3´
HFE1 Y282	5´ CCTGGATCAGCCCCTCATTA 5´
CYP1A2*1F C	5´CAAAGGGTGAGCTCTGTGGGCC 3´
CYP1A2*1F A	5´GGCAAAGGGTGAGCTCTGTGGGCA 3´
Iniciadores a montates	
HFE1 H63D R	5´CCCTCTCCACATACCCTTGCTGTG 3´
HFE1 C282Y R	5´GACTAGGGTGCCAGACGGTGAGG 3´
CYP1A2*1F R	5´ AGGCTGAGGGTTGAGATGGAGA 3´

As reações de PCR Tempo Real foram realizadas separadamente para cada iniciador a jusante e o mesmo iniciador a montante com o reagente máster *SybrGreen* (Tabela 2).

Tabela 9 - Reagentes utilizados para a PCR Tempo Real.

Reagentes	Concentração Final [1]
Power SybrGreen Master Mix	1X
Iniciador a jusante	0,125mM
Iniciador a montante	0,125mM
Água ultra pura	-
Amostra	5-10ng/µl

Nota: Foi utilizado um volume final de 25µl para a reação[1]

A ciclagem térmica e dissociação para as reações de PCR Tempo Real seguiram uma mesma condição (tabela 3).

Tabela 10 - Condições da termociclagem para discriminação alélica

Temperatura	Tempo	Repetições
	Amplificação	
50°C	2 minuto	1
95°C	10 minutos	1
95°C	15 segundos	45
57°C	1 minuto	
	Dissociação	
95°C	15 segundos	1
58°C	30 segundos	1
95°C	15 segundos	1

Sequenciamento de Sanger

A técnica de sequenciamento foi utilizada para confirmação de amostras inconclusivas ou para certificação dos resultados obtidos por PCR Tempo Real. Para a técnica de sequenciamento foi necessário a elaboração de mais alguns iniciadores para não haver o comprometimento das regiões a serem sequenciadas (tabela 4).

Tabela 11 - Iniciadores utilizados para o ensaio de sequenciamento

Iniciadores	Sequência dos oligos utilizados no PCR Tempo Real
HFE1 H63D SEQ F	5´GGCCTGTTGCTCTGTCTCCAGG 3´
HFE1 C282Y SEQ F	5´ CACCATGAAGTGGCTGAAGGAT 3´

As etapas seguidas para obtenção de sequências com qualidade foram; Amplificação, identificação de amplificação em eletroforese, purificação em coluna de sílica, reação de seqüenciamento, purificação por precipitação com álcool e eletroforese em capilar.

Para as amplificações foram utilizados o iniciador a jusante de seqüenciamento e o iniciador a montante utilizado na PCR Tempo Real, os reagentes e condições da amplificação (Tabela 5 e 6).

Tabela 12 - Reagentes utilizados para amplificação

Reagentes	Concentração Final[1]
Tampão de reação	1X
$MgCl_2$	2,5mM
Deoxinucleotídeos	1mM
Iniciador a jusante	0,125mM
Polimerase	1U/25µl
Iniciador a montante	0,125mM
Água ultra pura	-
Amostra	~ 100ng

Nota: Foi utilizado um volume final de 50µl para a reação[1].

Tabela 13 - Condições de termociclagem para amplificação

Temperatura	Tempo	Repetições
95°C	10 minutos	1
95°C	15 segundos	45
57°C	30 segundos	
72°C	30 segundos	
72°C	10 minutos	1

Ao término da termociclagem foi verificada a presença de amplicon em ultravioleta (254nm) após eletroforese em gel de agarose 2%p/v(Gel de Tampão TBE 1X pH8,0 Agarose 2%p/v com Brometo de Etídio 0,5nM, ddp de 6,25V/cm durante 1 hora em solução Tampão TBE 1X pH8,0) de 5µl de amostra homogeneizado com 2µl de Tampão de Corrida 6X (0,25%p/v de Azul de Bromofenol, 0,25% de Xileno Cianol e 30% glicerol) e tendo como referencia de peso molecular 2µl do *TrackIt 100pb DNA Ladder*.. As amostras identificadas como positivas para amplificação foram então submetidas à purificação com *Montage™ PCR Centrifugal Filter Devices* segundo instruções do fabricante. (http://www.blossombio.com.tw/PDF/Products/Single%20PCR-2.pdf).

Ao final da purificação as amostras foram novamente submetidas a eletroforese conforme descrito anteriormente, contudo nesta etapa foi aplicado uma referência de peso e massa molecular, o *Low Mass DNA Ladder*, para avaliação semi-quantitativa do purificado. As amostras que apresentaram mais de 10ng/µl seguiram adiante no processo.

Para a reação de seqüenciamento foi utilizado ***BigDye®*** *Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* com modificações (Tabela 7 e 8).

Tabela 14 - Reagentes utilizados no sequenciamento

Reagentes	Concentração Final [1]
BigDye	0,5X
Tampão de seqüenciamento BigDye	1,7X
Iniciador	0,250mM
Amostra	~ 5ng/µl
Água ultra pura	-

Nota: Foi utilizado um volume final de 20µl para a reação [1]

Tabela 15 - Condições de termociclagem para reação de seqüenciamento

Temperatura	Tempo	Repetições
96°C	1minutos	1
96°C	10 segundos	25
50°C	5 segundos	
60°C	4 minutos	
4°C	∞	1

Ao final da etapa de reação de sequenciamento as amostras foram submetidas a purificação por precipitação com álcool. Ao microtubo da reação foi adicionado isopropanol para concentração final de 50% (v/v), homogeneizados, incubados a temperatura ambiente por 15 minutos e centrifugados a 14.000rpm por 30 minutos à 4°C, ao final o sobrenadante foi retirado cuidadosamente e adicionado etanol P.A (200,0µl) e centrifugados a 14.000rpm por 10 minutos e novamente retirado cuidadosamente o sobrenadante. O microtubo foi então incubado a 95°C por 5 minutos para evaporação de álcool residual e em seguida adicionado 10,0µl de *Formamida Hi-Di*. O seqüenciamento foi realizado em eletroforese de capilar de 36cm no equipamento AB3130 segundo recomendações do fabricante.

Os eletroferogramas das sequências obtidos no AB3130 foram analisados no software Chrome Lite e Bioedit quanto à qualidade do sinal e posterior identificação alélica.

3.3 **Grupo de comparação**

Para comparação das frequências das mutações presentes no gene HFE foi utilizado um painel com indivíduos controle da população do Rio de Janeiro pareado por idade e sexo. Trata-se de um grupo de indivíduos aparentemente normais, não submetidos qualquer tipo de seleção. Não se pode, porém, afirmar com total segurança, que este grupo seja uma real e efetiva representação da distribuição destas mutações na população geral.

3.4 **Técnica para análise estatística**

Os dados foram analisados de acordo com a escala de mensuração das variáveis. No cruzamento de variáveis categóricas será utilizado o Teste Qui-quadrado; já no cruzamento de variáveis dicotômicas com numéricas, o Teste T de *Student.* Em todos os testes utilizados, fixou-se em 0,05 ou 5% ($p<0,05$) como nível de rejeição da hipótese de nulidade. As medidas de tendência central foram expressas como média $\pm$ desvio padrão. *Odds Ratio* (OR), ajustado com o intervalo de confiança 95%, (IC 95%), foi estimado com modelo de regressão logística na análise dos fatores de risco e doenças associadas. A significância estatística foi considerada como $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

Foram analisados duas mutações no gene HFE1 (um dos fatores desencadeantes da PCT) em 25 pacientes do nosso estudo, através de discriminação alélica por PCR Tempo Real para as posições Aa63 e Aa282. Posteriormente os resultados foram corroborados por técnicas de sequenciamento.

Para a discriminação alélica das mutações H63D e C282Y foram sintetizados iniciadores alelo especifico e o genótipo foi determinado mediante a razão dos *Cycle Threshold* (CT) obtidos em cada uma das amplificações conforme as Tabelas 9 e 10 demonstradas a seguir.

Tabela 16 - Determinação dos genótipos pela razão dos C*ycle Thresholds* (CT) para a posição Aa63 (continua)

PACIENTE	CT H63	CT D63	RAZÃO (CT H/CT D)	GENOTIPO REAL TIME *	GENOTIPO SANGER
1	25,02	24,74	1,01	HD	HD
2	23,3	29,95	0,78	HH	HH
3	23,58	30,5	0,77	HH	HH
4	24,34	24,31	1,00	HD	HD
5	23,35	30,78	0,76	HH	HH
6	31,66	24,3	1,30	DD	DD
7	23,78	31,01	0,77	HH	HH
8	24,25	31,45	0,77	HH	HH
9	24,73	25,02	0,99	HD	HD
10	23,35	30,25	0,77	HH	HH
11	23,11	29,75	0,78	HH	HH
12	23,94	24,06	1,00	HD	HD
13	22,69	29,6	0,77	HH	HH
14	24,66	32,06	0,77	HH	HH
15	24,83	24,76	1,00	HD	HD
16	22,97	29,6	0,78	HH	HH
17	26,04	35,94	0,72	HH	HH
18	25,05	32,91	0,73	HH	-
19	25,2	32,98	0,74	HH	-
20	26,35	36,03	0,75	HH	-
21	25,79	33,61	0,76	HH	-
22	27,48	27,69	0,77	HH	-
23	29,45	28,48	1,03	HD	-
24	34,26	40,0	0,79	HH	-
25	35,32	40,0	0,80	HH	-

Nota: Homozigotos HH [<0,81]; Heterozigoto HD [0,94-1,04]; Homozigoto DD [>1,17]

Tabela 17 - Determinação dos genótipos pela razão dos C*ycle Thresholds* (CT) para a posição Aa282.

PACIENTE	CT C282	CT Y282	RAZÃO (CT C/ CT Y)	GENOTIPO REAL TIME *	GENOTIPO SANGER
1	24,76	29,36	0,84	CC	CC
2	24,28	28,65	0,85	CC	CC
3	25,06	30,41	0,82	CC	CC
4	24,08	28,76	0,84	CC	CC
5	24,94	30,71	0,81	CC	CC
6	24,73	29,42	0,84	CC	CC
7	24,5	29,99	0,82	CC	CC
8	25,36	30,72	0,83	CC	CC
9	24,63	29,63	0,83	CC	CC
10	24,69	29,67	0,83	CC	CC
11	25,66	31,18	0,82	CC	CC
12	25,03	29,68	0,84	CC	CC
13	24,22	30,62	0,79	CC	CC
14	26,93	33,19	0,81	CC	CC
15	24,77	28,06	0,88	CC	CC
16	23,85	27,89	0,86	CC	CC
17	24,36	29,31	0,83	CC	CC
18	24,84	31,05	0,80	CC	-
19	24,91	31,14	0,80	CC	-
20	27,02	35,57	0,76	CC	-
21	25,45	30,44	0,84	CC	-
22	25,87	31,59	0,82	CC	-
23	26,94	34,03	0,79	CC	-
24	34,01	39,67	0,85	CC	-
25	32,87	37,45	0,87	CC	-

Nota: Homozigotos CC [<0,90]; Os valores para determinação dos genótipos heterozigoto HD e homozigoto YY não foram determinados.

Para a posição Aa63 foram identificados 18 pacientes homozigotos HH, 6 pacientes heterozigotos HD e apenas 1 paciente homozigoto DD. Em relação as frequências alélicas e genotípicas não foram observadas diferenças entre as duas coortes. A tabela abaixo faz um resumo dos achados da mutação H63D em nosso estudo (Tabela 11).

Tabela 18 - Frequência dos genótipos e alelos da posição Aa63.

	Pacientes (n=25)	Controle (n=40)
Frequencia Genotipica		
HH	18 (76%)	28 (70%)
HD	6 (20%)	12 (30%)
DD	1 (4%)	0 (0%)-
Frequencia Alelica		
H	43 (86%)	68 (85%)
D	7 (14%)	12 (15%)

Em análise estatística não foi possível observar diferenças significativas em relação aos carreadores do alelo D com a PCT, OR de 0,73 (95 % CI, 0.23 to 2.30, p=0,59). Quando analisado o genótipo DD, foi possível observar uma tendência com a PCT com uma OR de 4.95 (95 % CI 0.19 to 126.59). No entanto esta correlação não atingiu nível de significância (Teste de Fischer, p=0,33).

No caso da posição Aa282 foram observados apenas homozigotos CC, não sendo observada a presença em nenhuma das populações a presença do alelo Y, ou seja, não foi encontrada a mutação C282Y em nenhum paciente do estudo realizado.

Como foi detectado apenas o alelo C para a posição Aa282 no trabalho, as frequências alélicas para C e genotípica para CC são absolutas (=1, 100%).

Com relação aos níveis de ferritina no organismo, foram observadas discretas diferenças entre os indivíduos carreadores da mutação H63D e os indivíduos sem esta mutação. Dos pacientes diagnosticados com PCT 12 (48%) apresentaram aumento dos níveis de ferritina, sendo 2 (16,6%) deles carreadores

do alelo mutante D63, 1 paciente (8,3%) heterozigoto (H/D) e 1 (8,3%) homozigoto (D/D) para a mutação. Em cinco pacientes (41,6%) heterozigotos (H/D) os níveis de ferritina sérica estavam dentro da normalidade.

Tabela 19 - Relação das mutações e níveis de ferritina sérica

PACIENTE	C282Y	H63D	Ferritina.Sérica ng/ml	Valores de referência
1	CC	HD	290	normal
2	CC	HH	217	normal
3	CC	HH	567	alto
4	CC	HD	195	normal
5	CC	HH	59	normal
6	CC	DD	343	alto
7	CC	HH	389	alto
8	CC	HH	799	muito alto
9	CC	HD	10	normal
10	CC	HH	131	normal
11	CC	HH	54	normal
12	CC	HD	1473	muito alto
13	CC	HH	392	alto
14	CC	HH	207	normal
15	CC	HD	9	normal
16	CC	HH	2242	muito alto
17	CC	HH	1078	muito alto
18	CC	HH	358	alto
19	CC	HH	358	alto
20	CC	HH	3000	muito alto
21	CC	HH	41	normal
22	CC	HH	89	normal
23	CC	HD	21	normal
24	CC	HH	1684	muito alto
25	CC	HH	510	normal

Nota: Homens - 18.2 - 341.2, Mulheres < 45 Anos - 4.0 - 104.2; Mulheres > 45 Anos - 4.9 - 232.2; Unidade: ng/mL ; Método: Quimioluminescência; Valores de referencia do kit.

5 DISCUSSÃO

As porfirias constituem um grupo de doenças metabólicas derivadas de deficiências de enzimas responsáveis pela síntese do grupamento heme, gerando acúmulo excessivo de porfirinas e seus precursores.

A Porfiria Cutânea Tardia (PCT) é a mais frequente das porfirias, e pode se apresentar da forma adquirida (esporádica) ou hereditária (familial). No caso da PCT a doença decorre da deficiência da enzima uroporfirinogênio-descarbixilase e pode ser desencadeada por fatores como o etilismo, estrogênio, hepatite C e ou sobrecarga de ferro. Clinicamente os primeiros sintomas são caracterizados por fotossensibilidade induzida pela circulação de porfirinas que se depositam na pele, e podem apresentar erupções vesicobolhosas, fragilidade cutânea, cicatrizes atróficas, milia, hipertricose e hiperpigmentação.

Tanto a forma familial como a esporádica da PCT tem como característica predominante o acúmulo de ferro como fator desencadeante, sendo essa associação bem estabelecida na literatura [3,10,12,13,14], logo, o principal tratamento em caso agudo é a flebotomia, pois se trata de uma forma invasiva de depuração da sobrecarga de ferro do organismo.

Embora a causa desse excesso de ferro hepático ainda não esteja bem elucidada, existe uma forte relação entre o gene de Hemocromatose (HFE1) e o desenvolvimento da Porfiria Cutânea Tardia [16,19,32]. Atualmente algumas pesquisas veem enfatizando a presença das mutações C282Y e H63D do gene HFE1 como possível fator de risco para o desenvolvimento da PCT [4,6,19,29,50]. Em trabalho recente de meta-analise, que analisou 202 estudos com 66.263 casos e 226.515 controles, foi examinada a associação entre as mutações C282Y e H63D em algumas doenças, entre elas foi analisada a PCT [5]. Observou-se uma grande consistência entre eles, que a presença da forma homozigota C282Y gera o maior risco para o desenvolvimento da PCT nos pacientes predispostos. Essa observação vai de acordo com o fato da PCT estar relacionada ao acúmulo de ferro no fígado e responder a tratamentos com objetivo de depletar o excesso de ferro do organismo.

A prevalência dos genótipos na população tende a variar de acordo com a distribuição geográfica e ancestralidade, no caso da Hemocromatose sabe-se que essa desordem genética é mais comum na população caucasiana norte americana

e européia, não sendo refletido na população brasileira, especialmente na relação das mutações do gene HFE1 com a Porfiria Cutânea Tardia [5,40].

Neste estudo, através de técnicas moleculares determinamos a frequência dos alelos e genótipos de variações nas posições 63 e 282 do gene HFE1 em 25 pacientes com Porfiria Cutânea Tardia acompanhados no Ambulatório de Dermatologia Geral, do Hospital Universitário Pedro Ernesto-UERJ, durante o período de janeiro de 1990 a dezembro de 2012. A ascendência étnica de todos os indivíduos foi avaliada por um questionário da Fundação Hemorrio de forma autodeclarada (utilizado largamente em pesquisas de etnia). Apesar da escolha aleatória dos pacientes não se pode afirmar que este grupo seja uma amostra real e efetiva desta mutação na população geral. É possível que a influência da ascendência étnica tenha sido responsável pela diferença étnica encontrada entre nossos resultados quando comparados a estudos realizados na América do Norte[40].

Não foi observada a presença das mutações C282Y em nenhum dos pacientes ou indivíduos controle, não sendo possível fazer uma análise de ligação entre os alelos, assim como outros estudos realizados em população de origem latina, ratificando que provavelmente se tratem de alelos raros.

A avaliação das mutações foi realizada através da extração de DNA do leucócitos do sangue periférico. Todos os genótipos observados foram obtidos por PCR em tempo real e foram ratificados através da técnica de sequenciamento de Sanger, demonstrando que a técnica pode ser utilizada na triagem de genótipos para as mutações H63D e C282Y com alto grau de confiança.

Com relação à sobrecarga de ferro no organismo, dentro da coorte de pacientes foram observadas algumas diferenças entre os indivíduos carreadores e não carreadores de pelo menos um alelo da mutação H63D. Dos pacientes diagnosticados com PCT, 12 (48%) apresentaram aumento dos níveis de ferritina, sendo 2 (16,6%) deles carreadores de um alelo D63. Não houve alteração dos exames laboratoriais (TGO, TGP e GGT) nos indivíduos com PCT independente da presença do alelo D63.

Entre os estudos internacionais, um que merece destaque, foi realizado por Roberts et al., na Inglaterra[6], onde foram avaliados 41 pacientes com porfiria cutânea tardia esporádica para rastrear as mutações C282Y e H63D do gene HFE. O alelo Y282 estava presente em 18 (44%) dos pacientes com PCT comparado com 11 (11%) dos controles. Destes com a mutação C282Y, apenas 7 (17%) eram

homozigotos. Em relação a mutação H63D não foi observada diferenças entre os pacientes e grupo controle.

Neste estudo o perfil genético destes indivíduos provavelmente ocasionou um viés. pois indivíduos controles apresentaram frequência superior para o alelo Y282 quando comparado a pacientes com PCT de outras etnias , como a latina.

Nos Estados Unidos, *Bonkoviski et al* estudaram 26 pacientes com porfiria cutânea tardia para avaliar a frequência das mutações C282Y e H63D e encontraram que 11 dos 26 (42%) pacientes apresentavam a mutação C282Y (23% heterozigotos e 19% homozigotos) e 8 dos 26 pacientes (31%) possuíam a mutação H63D. Nenhum paciente apresentou ambas as mutações ao mesmo tempo. Dos 26 pacientes estudados 19 (73%) apresentavam sobrecarga de ferro, sendo que aqueles com a mutação homozigota C282Y possuíam níveis maiores que os pacientes heterozigotos ou sem a mutação.

No presente estudo não observamos diferenças entre os níveis de ferro no organismo nos pacientes heterozigotos para a posição Aa63 e pacientes sem a mutação. Também não observamos diferenças significativas nos valores de ensaios bioquímicos como GGT, TGO e TGP entre os pacientes heterozigotos e sem a mutação para a posição H63D. Contudo, no único paciente homozigoto DD para a posição Aa63 foi possível observar um aumento moderado de ferritina sem outra causa provável que não a genética. Em ambos o trabalhos, de *Bonkoviski e Roberts* [6,40] os autores, consideram o alelo Y282 principalmente na forma homozigota como fator mais relevante para o desenvolvimento da PCT, recomendando a varredura desta mutação em pacientes diagnosticados com PCT.

Em contraste aos trabalhos anteriores, um estudo italiano, conduzido por *Sampietro et al* [(33)] avaliou 68 pacientes com PCT e não conseguiu estabelecer uma relação entre a mutação C282Y e a PCT. Entre os indivíduos estudados apenas 2,9% apresentavam a mutação C282Y na forma heterozigota e 1,5% dos indivíduos controle, não havendo diferença estatística nesse caso. Entretanto, a mutação H63D do gene HFE apresentou uma frequência elevada nestes pacientes estudados quando comparado ao grupo controle respectivamente (50% e 14%). Não foi estabelecida uma relação entre a mutação H63D e a sobrecarga de ferro, e segundo o autor isto poder ser explicado devido aos testes padrões serem incapazes de detectar alterações sutis nos estoques de ferro do organismo. Além disso o autor sugere que esta variação das frequências ocorra devido a esta

mutação ser menos homogênea no sul da Europa. Pode se afirmar que o perfil genético apresenta semelhanças com os nossos pacientes ainda que não tenham apresentado relação com a sobrecarga de ferro fazendo supor que as influências de diversas populações na genética de nossos pacientes ou a presença de uma outra mutação associada poderiam aumentar a captação de ferro pelo organismo.

Em relação a dados brasileiros há apenas um estudo realizado por *Martinelli et al* em 2001, [7] que avaliou a presença das mutações C282Y e H63D em 23 indivíduos com PCT. Detectaram em 10 indivíduos a presença do alelo Y282 (43,5%), todos na forma de heterozigose C/Y, mas não sendo observada a forma homozigota Y/Y para a posição. Em relação a posição Aa63 não foram observadas frequências genotípicas diferente do grupo controle (30,4% ; 31,1%). O autor considerou uma possível associação das variantes do gene HFE1 com o acúmulo de ferro e consequentemente a PCT, contudo não houve diferença significativa para uma correlação. Apesar de inicialmente nossos resultados corroborarem com esta condição, acreditamos que a significância da correlação entre os dados genéticos e bioquímicos não foi alcançada pelo pequeno número de pacientes estudados. Como trata-se de uma doença rara faz-se necessário uma maior captação de pacientes em outras unidades de saúde para maior significância dos resultados. Um dos fatores que claramente apontam neste sentido é a similaridade dos resultados com outros estudos de populações de origem latina na Europa (Italianos e espanhóis) [33,48,49] onde a frequência da mutação C282Y, muitas vezes, também não foi identificada.

Apesar de não ter sido um dos objetivos de nosso estudo, também avaliamos a mutação S65C que, segundo alguns autores, pode apresentar relação com a sobrecarga de ferro. Segundo *Asberg et al*, [91] esta mutação quando associada com a mutação C282Y parece estar associada com um forma moderada de Hemocromatose. Esta mutação é relativamente rara com frequência entre 0,5-35 da população de caucasianos. Assim como em outros estudos, não foi encontrada relação entre indivíduos carreadores da mutação S65C e a sobrecarga de ferro no organismo dos pacientes estudados.

Diferentemente de Martinelli et al, [7] não encontramos nenhum indivíduo carreador da mutação C282Y. A mutação H63D foi encontrada numa frequência parecida (20% ; 4%), apresentando tanto a forma heterozigota (HD) como homozigota (DD). A sobrecarga de ferro também não apresentou diferença

significativa quando comparado pacientes com PCT com ou sem a mutação. Tem sido bem evidenciado em outros trabalhos, que diversos fatores de origem genética e ambiental, além da sobrecarga de ferro, podem desencadear a PCT, como álcool, estrogênio, HCV, HIV. A pesquisa ressaltou a influencia de diferenças das mutações genéticas de acordo com a localização geográfica do indivíduo, podendo ocorrer até dentro de um mesmo território, como evidenciado por Martinelli et al[7] .

Acreditamos que o pequeno numero de pacientes do estudo restringiu nossa capacidade de avaliação. A agregação de novos pacientes, assim como a possibilidade de estudos multicêntricos, ajudaria na compreensão da dinâmica das mutações no gene HFE1 e dessa determinar sua relevância e identificar outras possíveis mutações desse mesmo gene que possam ser influentes na PCT.

Apesar das diversas pesquisas internacionais criarem um paralelo entre as mutações C282Y e H63D com a sobrecarga de ferro e, possível, desencadeamento de PCT, nosso trabalho não conseguiu consolidar na população fluminense tal hipótese, assim como nos demais trabalhos realizados em populações latinas. Logo, ainda não seria plausível definir como uma condição mandatória a análise genética ou varredura do gene HFE1 em pacientes diagnosticados com PCT, e a avalição da sobrecarga de ferro em indivíduos carreadores das mutações H63D e C282Y.

CONCLUSÕES

1- A frequência do alelo D63 do gene HFE1 foi maior nos pacientes com PCT que na população controle, contudo sem significância estatística. A frequência do alelo Y282 do gene HFE1 não foi estabelecida, pois não foi possível detectá-lo em pacientes nem na população controle.

2- A frequência genotípica para a posição Aa63 encontrada em ambas as populações foram semelhantes, pacientes e população controle. Aproximadamente, dois terços para genótipo HH e um terço para HD na avaliação da mutação no gene H63D. Para a mutação do gene C282Y não foi encontrado nenhum individuo carreador.

3- Os níveis de ferritina encontrados entre os pacientes com PCT carreadores de pelo menos um alelo mutante foram semelhantes aos dos pacientes não carreadores de mutação. Foi observado em um paciente a presença da mutação D63 em forma homozigota e o aumento da ferritina sérica, sem a presença de outra causa acumuladora.

SUGESTÕES

Embora estudos das possíveis mutações genéticas relacionadas a porfiria cutânea tardia tenham sido realizados em alguns centros de pesquisas difundidos pelo mundo e no Brasil, nenhuma associação definitiva com essa doença foi relatada. Apesar de avaliarmos uma mutação específica fica claro que outros possíveis fatores genéticos parecem estar implicados no desencadeamento da PCT. Dessa forma, para tentar elucidar algumas dúvidas sugerimos alguns possíveis caminhos a serem estudados:

a) Formar um casuística ampla, ou organizar estudos multicêntricos e assim determinar novas possíveis mutações relacionadas com a PCT.

b) Realizar estudos para detectar o citocromo P-450 1A 2 (CYP1A2) que participa de maneira central na síntese de um inibidor competitivo da URO-D hepática, porém em humanos ainda existem poucas evidências e nenhum estudo foi realizado no Brasil.

Apesar do presente estudo não permitir uma conclusão definitiva sobre qualquer associação das mutações estudadas com a porfiria cutânea tardia, tendo em vista o tamanho reduzido da amostra, tal linha de estudo deve ser continuada para eliminar dúvidas na sua etiopatogenia.

REFERÊNCIAS

1- FONSECA, J.C.M.; **Porfiria Cutânea Tardia Sintomática:** estudo dos antígenos HLA em 30 pacientes. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1995.

2- FONSECA, J.C.M.; **Porfiria Cutânea Tardia.** Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1988.

3- BICKERS, D.R.; FRANK, J.; **The porphyrias**. In: WOLFF, K.; GOLDSMITH, L.A., KATZ, S.I.; GILCHREST, B.A.; PALLER, A.; LEFFELL, D.J.; editors. Fitzpatrick's dermatology in general medicine. McGraw Hill; 2007. p. 1228–1256.

4- MEHRANY, et al. Association of porphyria cutanea tarda with hereditary hemochromatosis. **J Am Acad Dermatol**. 2004, v.51, p.205-211.

5- ELLERVIK,. et al. Hemochromatosis Genotypes and Risk of 31 Disease Endpoints: Meta-Analyses Including 66,000 Cases and 226,000 Controls. **Hepatology.** 2007. v.46, p.1071-1080.

6- ROBERTS, A.G.; et al. Increased frequency of the haemochromatosis Cys282Tyr mutation in sporadic porphyria cutanea tarda. **Lancet.** 1997, n. 349, p. 321–323.

7- MARTINELLI, AL.; et al. Porphyria Cutanea Tarda in Brazilian Patients: Association With Hemochromatosis C282Y Mutation and Hepatitis C Virus Infection. **Am J Gastroenterol.** 2000, v.95, p.3516–3521.

8- KHOGO, Y.; et al. Body iron metabolism and pathophysiology of iron overload. **Int J Hematol**. 2008, v.88, p.7–15.

9- CAPUTO, R. et al. The morphologic events of blister formation in porphyria cutanea tarda**. Int J Dermatol.** 1983, v.22, p.467–72.

10- SILVA, M.M. et al. Porfiria Cutanea Tardia Sintomatica. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. 1990. v.65, p. 196-197.

11- TEUBNER, A. et al. Hepatitis C, hemochromatosis and porphyria cutanea tarda. **Dtsch Med Wochenschr**. 2006, v.131, n.13, p. 691-695

12- PUY, H.; GOUYA, L.; DEYBACH J.C.; Porphyrias. **Lancet.** 2010. v.375:p.924-37.

13- BICKERS D.R.; FRANK J.; **The porphyrias**. In: FREEDBERG, I.M.; EISEN, A.Z., WOLFF, K.; et al. Fitzpatick's Dermatology in Medicine. 6th ed. New York, NY: McGraw-Hill; 2003. p.1435-1466.

14- ELDER, G.H.; Porphyria cutanea tarda. **Semin Liver Dis** 1998. p.1867–75.

15- RICH, M.W.; Porphyria cutanea tarda. Don't forget to look at the urine. **Postgrad Med**. 1999. v. 105, p.208-2014.

16- BYGUM, A.; at al. Familial and sporadic porphyria cutanea tarda: clinical, biochemical and genetic features with emphasis on iron status. **Acta Derm Venereol**. 2003. v.83, p.115-20.

17- ELDER, G.H.; ROBERTS, A.G.; Uroporphyrinogen decarboxylase. **J Bioenerg Biomembr**. 1995. v.27, p.207-14.

18- SIERSEMA, P.D.;RADEMAKERS, L.H.; CLETON, M.I.; TEN KATE, F.J.;, et al. The difference in liver pathology between sporadic and familial form of porphyria cutanea tarda: the role of iron. **J Hepatol**. 1995. v.23, p.259-67.

19- ELDER, G.H.; WORWOOD, M.; Mutations in the hemochromatosis (HFE) gene, porphyria cutanea tarda and iron overload**. Hepatology**. 1998. v.27, p.289-91.

20- HELD,J.L.;at.al.; Erythrocyte uroporphyrinogen decarboxylase activity in porphyria cutanea tarda: a study of 40 consecutive patients. **J Invest Dermatol**. 1989. v.93, p.332-4.

21- ELDER, G.H.; The cutaneous porphyrias. In: HAWK, J.L.M.; ARNOLD. **Photodermatology**. New York: Oxford University Press Inc; 1999. p.171-97.

22- D'ALESSANDRO GANDOLFO, L.; GRISO, D**.;** Familial porphyria cutanea tarda with normal erythrocytic urodecarboxylase: an exception to the rule? **Dermatologica**. 1989. v.178, p.206-8.

23- GAREY.J.R.; et.al. Analysis of uroporphyrinogen decarboxylase complementary DNAs in sporadic porphyria cutanea tarda. **Gastroenterology**. 1993. v.105,1p.65-9.

24- CRIPPS, D.J, et al. Porphyria turcica due to hexachlorobenzene – a 20 to 30 year follow-up study on 204 patients. **Br J Dermatol**. 1984, v.111, p. 413-422.

25- PAZDEROVA-VEJLUPKOVÁ J.ç, et.al. The development and prognosis of chronic intoxication by tetrachlorodibenzo-p-dioxin in men. **Arch Environ Health**. 1981. v.36, p.5-11.

26- GROSSMAN ME et al.. Porphyria Cutanea Tarda. Clinical features and Laboratory Findings in 40 pacients. **Am J Med.** 1979. v.67, p.277-86.

27- HINES, J.D.; Effects of alcohol in born errors of metabolism, porphyria cutanea tarda and hemochromatosis. **Semin Hematol.** 1990. v.17, p.113-8.

28- URBANEK R.W.; COHEN, D.J.; Porphyria cutanea tarda: pregnancy versus estrogen effect. **J Am Acad Dermatol.** 1994. v.31(2), p. 390-2.

29- 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. v.95, p.1565–71.

30- FEDER, J.N.; GNIRKE, A.; THOMAS. W.; TSUCHIHASHI. Z.; RUDDY DA, BASAVA A, et al**.** A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. **Nat Genet.** 1996. v.13, 399–408.

31- HASHIMOTO. K.; HIRAI. M.; KUROSAWA. Y.; A gene outside the human MHC related to classical HLA class I genes. **Science.** 1995. v.269, p.693–5.

32- ELDER. G.H.; WORWOOD. M.; Mutations in the hemochromatosis gene, porphyria cutanea tarda, and iron overload. **Hepatology.** 1998. v. 27, p.289–91.

33- SAMPIETRO. M.; PIPENO. A.; LUPICA. L.; AROSIO. C.; VERGANI. A.; CORBETA. N.; et al. High prevalence of the His63Asp HFE mutation in Italian patients with porphyria cutanea tarda. **Hepatology.** 1998. v.27, p.181-4.

34- FARGION. S, et al. Hepatitis C virus and porphyria cutanea tarda: evidence of a strong association. **Hepatology**. 1992, v.16, p.1322-1326.

35- QUECEDO. L.; COSTA. J.; DE SALAMANCA. R.E.; The role of the hepatitis C virus in the liver disease of porphyria cutanea tarda**. Med Clin (Barc).** 1996. v.106, p.321-4.

36- LACOUR. J.P.H.; BODOKH. I.; CASTANET. J.; BEKRI. S.; ORTONNE. J.P.;. Porphyria cutanea tarda and antibodies to hepatitis C virus. **Br J Dermatol**. 1993. v.28, p.121-3.

37- DE CASTRO. M.; SÁNCHEZ. J.; HERRERA. J.F.; CHÁVES. A.; DURÁN R, GARCIA-BUEY L, et al. Hepatitis C virus antibodies and liver disease in patients with porphyria cutanea tarda. **Hepatology**. 1993. v. 17, p.551-7.

38- DABROWSKA. E.; JABLONSKA-KASZEWSKA. I.; FALKIEWICZ.; B.; High prevalence of hepatitis C virus infection in patients with porphyria cutanea tarda in Poland**. Clin Exp Dermatol**. 1998. v.23, p.95-6.

39- CRIBIER. B.; PETIAU. P.; KELLER. F.; SCHMITT. C.; VETTER. D.; HELD. E.; et al. Porphyria cutanea tarda and hepatitis C viral infection. **Arch Dermatol**. 1995. v.131, p.801-4.

40- BONKOVSKY.;H.L.; POH-FITZPATRICK. M.; PIMSTONE. N.; OBANDO. J.; DI BISCEGLIE. A.; TATTRIE. C.; et al. Porphyria cutanea tarda, hepatitis C, and HFE gene mutations in North America. **Hepatology**. 1998. v.27, p.1661-9.

41- CHUANG. T.Y; BRASHEAR, R.; LEWIS, C.;. Porphyria cutanea tarda and hepatitis C virus. A case control study and meta-analysis of the literature. **J Amer Acad Dermatol** 1999. v.41, p.31–6.

42- WISSEL, P.S; SORDILLO, P.; ANDERSON, K.E.; SASSA, S.; SAVILLO, R.L.; KAPPAS. A.; Porphyria cutanea tarda associated with the acquired immune deficiency syndrome**. Am J Hematol**. 1987. v.25, p.107-13.

43- CASTANET. J, et. al.Porphyria cutanea tarda in association with humanism muno deficiency virus infection: is it related to hepatitis C virus infection? **Arch Dermatol.** 1994, v.130, p.664-665.

44- MANSOURATI. F.F.; STONE. V.E.; MAYER. K.H.; Porphyria cutanea tarda and HIV/AIDS: a review of pathogenesis, clinical manifestations and management. **Int J STD AIDS.** 1999. v.10, p.51-56 .

45- MA. Y.; FRACANZANI, A.L.; SAMPIETRO, M.; MATTIOLI, M.; CHEESEMAN, P. WILLIAMS R.; et al. Autoantibodies to human cytosol: a marker of sporadic porphyria cutanea tarda. **Clin Exp Immunol**. 2001. v.126, p.47-53.

46- GREGORIO. G.V.; PENSATI. P.; IORIO. R.; VEGNENTE, A.; MIELI-VERGANI, G.; VERGANI, D.; Autoantibody prevalence in children with liver disease due to chronic hepatitis C virus infection. **Clin Exp Immunol.** 1998. v.112, p.471-6

47- NAVAS, S.; BOSCH, P.; CASTILLO, I.; MARRIOTT, E.; CARRENO, V.; Porphyria cutanea tarda and hepatitis C virus and B virus infection: a retrospective study. **Hepatology**. 1995. v.21, p.279-84.

48- CRUZ-ROJO, J.;, FONTANELLAS A, MORÁN-JIMÉNEZ MJ, NAVARRO-ORDÓÑEZ S, GARCÍA-BRAVO M, MÉNDEZ M, et al. Precipitating/ aggravating factors of porphyria cutanea tarda in Spanish patients. **Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).** 2002. v.48, p.845–52

49- CASTIELLA, A.; et al. Significance of H63D homozygosity in a Basque population with hemochromatosis. **J Gastroenterol Hepatol**. 2010. v.25, p. 1295-8.

50- LAMBRECHT, R.W.; THAPAR, M.; BONKOVSKY, H.L.; Genetic aspects of porphyria cutanea tarda. **Semin Liver Dis**. 2007. v.27, p.99–108.

51- CAPPELLINI, M.D.;l. et al. Seven novel point mutations in the uroporphyrinogen decarboxylase (UROD) gene in patients with familial porphyria cutanea tarda (f-PCT). **Hum Mutat**. 2001. v.17, p.350.

52- MÉNDEZ. M.; SORKIN, L.; ROSSETTI, M.V.; ASTRIN, K.H.; BATLLE, A.; PARERA, V.; et al. Familial porphyria cutanea tarda: characterization of seven novel uroporphyrinogen decarboxylase mutations and frequency of common hemochromatosis alleles. **Am J Hum Genet**. 1998. v.63, p.1363–75.

53- BADENAS, C.; et.al. Identification and characterization of novel uroporphyrinogen decarboxylase gene mutations in a large series of porphyria cutanea tarda patients and relatives. **Clin Genet**. 2009. v.75, p.346–53.

54- INGLESE, M.J.; BERGAMO B.M.; Large, nonhealing scalp ulcer associated with scarring alopecia and sclerodermatous change in a patient with porphyria cutanea tarda. **Cutis.** 2005. v.76, p.329–33.

55- FRACANZANI, A.L, et al. Liver cancer risk is increased in patients with porphyria cutanea tarda in comparison to matched control patients with chronic liver disease. **J Hepatol**. 2001, v.35, p.498-503.

56- SALATA, H.; CORTES, J.M.; et al. Porphyria cutanea tarda and hepatocellular carcinoma. Frequency of occurrence and related factors. **J Hepatol**. 1985. v.1, p.477-87.

57- FAKAN, F.; CHLUMSKA, A.; Demonstration of needle-shaped hepatic inclusions in porphyria cutanea tarda using the ferric ferricyanide reduction test. **Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol.** 1987. v.411, p.365-8

58- CORTÉS, J.; OLIVA, H.; PARADINAS, F.J.; HERNANDEZ-GUÍO, C.; The pathology of the liver in porphyria cutanea tarda. **Histopathology**. 1980. v.4, p.471-85.

59- LIM, H.W.; MASCARO, J.M.; The porphyries and hepatocelular carcinoma. **Dermatol Clin**. 1995. v.13, p.135-42

60- WOLFF, K.; HÖNIGSMANN, H.; RAUSCHMEIER. W.; SCHULER, G.;PECHLANER, R**.;** Microscopic and fine structural aspects of porphyrias. **Acta Derm Venereol (Stockh).** 1982. v.100 (Suppl), p.S17-28

61- EPSTEIN, J.H.; TUFFANELLI, D.L.; EPSTEIN, W.L.; Cutaneous changes in the porphyrias: a microscopic study. **Arch Dermatol**. 1973. v.107, p.689-98.

62- CORMANE, R.H.; SZABÒ, E.; HOO, T.T.; Histopathology of skin in acquired and hereditary porphyria cutanea tarda. **Br J Dermatol**. 1971. v.85, p.531-9.

63- TIMONEN. K.; NIEMI, K.M.; MUSTAJOKI, P.; Skin morphology in porphyria cutanea tarda does not improve despite clinical remission. **Clin Exp Dermatol**. 1991. v.16, p.355-8.

64- LIM, C.K.; PETERS, T.J.; Urine and faecal porphyrin profiles by reversed-phase high-performance liquid chromatography in the porphyrias. **Clin Chim Acta**. 1984. v.139, p.55-63.

65- GIBBS, N.K.; TRAYNOR, N.; FERGUSON, J.; Biochemical diagnosis of the cutaneous porphyrias: five years experience of plasma spectrofluorimetry [abstract]. **Br J Dermatol**. 1995. v.133, p18.

66- SWEENEY, G.D.; PORPHYRIA cutanea tarda, or the uroporphyrinogen decarboxylase deficiency diseases**. Clin Biochem**. 1986. v.19, p.3-14.

67- THUNELL, S.; HARPER, P.; Porphyrins, porphyrin metabolism, porphyrias. III. Diagnosis, care and monitoring in porphyria cutanea tarda - suggestions for a handling programme. **Scand J Clin Lab Invest**. 2000. v.60, p.561-79.

68- VIEIRA, F.M.J.; MARTINS, J.E.C. Porfiria cutanea tardia. **An Bras Dermatol**. 2006, v.81, n.6, p.573-584.

69- SHEIKH, M.Y.; WRIGHT, R.A.; BURRUSS, J.B.; Dramatic resolution of skin lesions associated with porphyria cutanea tarda after interferon-alpha therapy in a case of chronic hepatitis C. **Dig Dis Sci**. 1998. v.43, p.529-33.

70- FONTANELLAS, A.; HERRERO, J.A.; CORONEL, F.; SANTOS, J.L.; MORÁN, J.M.; BARRIENTOS, A.; et al. Effects of recombinant human erythropoietin on porphyrin metabolism in uremic patients on hemodialysis**. J Am Soc Nephrol**. 1996. v.7, 774-9.

71- SARKELL, B.; PATTERSON, J.W.; Treatment of porphyria cutanea tarda of end stage renal disease with erythropoietin. **J Am Acad Dermatol**. 1993. v.29, p.499-500.

72- POUX, J.M.; DEMONTIS, R.; CADRANEL, J.F; GHAZALI, A.; FIEVET, P.; NORDMANN, Y.; Porphyria cutanea tarda in a dialyzed patient with hepatitis C virus infection: dramatic efficacy of small repeated phlebotomies. **Am J Med**. 1997. v.103, p.163-4.

73- EWING, S.; CROSBY, D.L.;. Renal transplantation for porphyria cutanea tarda**. N Engl J Med.** 1997. p.336:811.

74- ROCCHI, E.; GIBERTINI, P.; CASSANELLI M, PIETRANGELO A, BORGHI A, PANTALEONI M, et al. Iron removal therapy in porphyria cutanea tarda: phlebotomy versus slow subcutaneous desferrioxamine infusion. **Br J Dermatol**. 1986. v.114, p.621-9.

75- STATHERS, G.M.; Porphyrin-binding effect of cholestyramine. Results of in vitro and in vivo studies**. Lancet**. 1966. v.2, p.780-3.

76- LIPSCHITZ DA; COOK. J.D.; FINCH, C.A.; A clinical evaluation of serum ferritin as an index of iron stores**. N Engl J Med**. 1974. v.290, p.1213-6.

77- RATNAIKE, S.; BLAKE, D.; CAMPBELL, D;. COWEN, P.; VARIGOS, G.; Plasma ferritin levels as a guide to the treatment of porphyria cutanea tarda by venesection. **Australas J Dermatol**. 1988. v.29, p.3-8.

78- MALINA, L.; CHLUMSKY, J.; A comparative study of the results of phlebotomy therapy and low-dose chloroquine treatment in porphyria cutanea tarda. **Acta Derm Venereol**. 1981. v.;61, p.346-50.

79- MCCROSSIN, I;. Porphyria cutanea tarda in south-east New South Wales. **Austral J Dermatol**. 2002. v.43, p.285-8.

80- MALKINSON, F.D.; LEVITT, L.; Hydroxychloroquine treatment of porphyria cutanea tarda**. Arch Dermatol**. 1980. v.116, p.1147-50.

81- LIU, A.C.; Hepatotoxic reaction to chloroquine phosphate in a patient with previously unrecognized porphyria cutanea tarda. **West J Med**. 1995, v.162, p.548-551.

82- ASHTON, R.E; HAWK J.L.M.; MAGNUS I.A.; Low-dose oral chloroquine in the treatment of porphyria cutanea tarda. **Br J Dermatol**. 1981. v.111, p.609-13.

83- KORDAC, V.; PAPEZOVÁ R.; SEMRÁDOVÁ M.; Chloroquine in the treatment of porphyria cutanea tardia. **N Eng J Med**. 1977. p.296:949.

84- BURKE, W.; THOMPSON E.; KHOURY M.J.; et al. Hereditary hemochromatosis. Gene discovery and its implications for population- based screening. **JAMA** 1998. v.280, p.172– 8.

85- NEGHINA, A.M.; ANGHEI A.; Hemochromatosis genotypes and risk of iron overload - a meta-analysis. **Ann epidemiol.** 2011. v.21, p.1–14.

86- MARTINELLI. et al. Hereditary hemochromatosis in a Brazilian university hospital in São Paulo State (1990-2000). **Genetics and Molecular Research**. 2005. v.1, 31-38.

87- WICKLIFEE, J.K.; et al. Cyp1a2*1f and gstm1 alleles are associated with Susceptibility to porphyria cutanea tarda. **Mol Med 2011**. v.17, (3-4), p.241-247.

88- FONTANELLAS, A.; et al. Smoking but not homozygosity for CYP1A2 g-163A allelic variant leads to earlier disease onset in patients with sporadic porphyria cutanea tarda. **Experimental Dermatology** 2010. v.19, p.326–328.

89- CHRISTIANSEN, L.; et al. Association between CYP1A2 polymorphism and susceptibility to porphyria cutanea tarda. **Hum. Genet**. 2000. v.107, p.612–4.

90- BADENAS, C.; et al. Identification and characterization of novel uroporphyrinogen decarboxylase gene mutations in a large series of porphyria cutanea tarda patients and relatives. **Clin. Genet**. 2009. v.75, p.346–53.

91- ASBERG, A.;THORSTENSEN K.; HVEEM K.; et al. Hereditary hemocromatosis: the clinical significance of the S65C mutation. **Gene Test** 2002. v.6, p.59-62.

Anexo A – Avaliação de Paciente com porfiria cutânea tardia

Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Hospital Universitário Pedro Ernesto
Serviço de Dermatologia
Coordenadora da Disciplina Profª Solange Cardoso Maciel

Prevalência da mutação do gene HFE em pacientes com porfiria cutanea tardia do Hospital Universitário Pedro Ernesto- UERJ

Data da 1ª. Consulta: / / Registro: Médico:

I-Identificação

Nome_____

Endereço:_____Cidade:_____Estado:_____

CEP:_____-_____telefone( )Naturalidade (NUF):_____

Data Nascimento: ___/___/___ Idade:_____ Sexo:( ) Feminino ( )Masculino

EstadoCivil:_____

Profissão/Ocupação:_____

Cor: ( )Branca ( )Preta ( )Parda ( )Amarela ( )Indígena

Outras:_____

Ascendência:

Asiático (Oriental) ( ): País/Região:_____( )Pai ( )Mae ( )Avos ( )Bisavo

Caucasóide (Branco) ( ): País/Região:_____( )Pai ( )Mae ( )Avos ( )Bisavo

Indígena ( ): País/Região: _____( )Pai ( )Mae ( )Avos ( )Bisavo

Negro ( ): País/Região:_____( )Pai ( )Mae ( )Avos ( )Bisavo

Outra:_____: País/Região: _____( )Pai ( )Mae ( )Avos ( )Bisavo

II-Anmenese: (evolução, localização das 1as. Lesões, exames e tratamentos realizados, etc.)

_____

_____

_____

II-Avaliação Clínica

1-Vesiculas:	( )Sim	( )Não	Local:
2-Bolhas:	( )Sim	( )Não	Local:
3-Hipertricose:	( )Sim	( )Não	Local:
4-Hiperpigmentação:	( )Sim	( )Não	Local:
5-Fotossensibilidade:	( )Sim	( )Não	Local:
6-Cicatrizes hipocrônico-atróficas:	( )Sim	( )Não	Local:
7-Mílio:	( )Sim	( )Não	Local:

III-Fatores Desencadeantes:

( ) Alcoolismo

( ) Terapia Estrogênica

( ) Terapia Anti-Malárica

( ) Sobrecarga de Ferro

( ) outros. Quais?

IV- Exames Laboratoriais

-Biópsia de pele

-Bioquimica (AST, ALT, GGT, ferro sérico, saturação de transferrina e ferritina)

-Uroporfirinas Urinarias

-Coproporfirinas

-Gene encontrado

Heterozigoto

Homozigoto

V- Doenças Associadas

( ) Diabetes Militus

( ) Doenças auto-imunes. Quais?

( ) Infecção pelo HIV

( ) Infecção pelo HCV

( ) Outras. Quais?

VI- Resposta ao Tratamento

Data de início / /

(Esquema I (a) Flebotomia + (b) Cloroquina

a) Intervalo e vol. Retirado

b) Dose

( ) Esquemas Alternativos

a) Só Flebotomia

b) Só Cloroquina

c) Outros:

MÉDICO RESPONSÁVEL:

Anexo B - Termo de consentimento livre e esclarecido

Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Hospital Universitário Pedro Ernesto
Serviço de Dermatologia
Coordenadora da Disciplina Profª Solange Cardoso Maciel Costa Silva

Termo de consentimento livre e esclarecido

Título: Prevalência da mutação do gene HFE em pacientes com porfiria cutânea tardia do Hospital Universitário Pedro Ernesto- UERJ

JUSTIFICATIVA

Você possui uma doença de pele conhecida como Pofiria Cutânea Tardia. Você está sendo convidado pelo seu médico a tomar parte de um estudo clínico para avaliar o seu perfil genético relacionado à doença.

Você será entrevistado, responderá a um questionário contendo várias perguntas sobre sua história e de sua família e uma amostra de sangue será coletada para a avaliação da presença da mutação do gene HFE. Podem ser necessários exames complementares como exames hematológicos e bioquimicos, além de radiografias e biópsia de pele.

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.

OBJETIVOS

Determinar a prevalência do gene mutante HFE da Hemocromatose nos pacientees com Porfiria Cutanea Tardia, atendidos no ambulatório de dermatologia geral do HUAP, no período de 1990 a 2010.

PROCEDIMENTOS

Você será avaliado pelo Dr Roberto Souto da Silva que irá lhe informar sobre o questionário e a coleta de amostra de sangue. Talvez haja necessidade de realizar

exames complementares, como exame de urina, radiografias e biopsia de pele. A biópsia de pele é feita da seguinte forma: limpeza com álcool; Injeção superficial na pele com anestesia 0,5 ml (proporcional a 10 gotas); Retirada de pequeno pedaço da pele de 3mm, pontos com fio mononylon e curativo com fita micropore. A retirada dos pontos será feita após 7 a 14 dias do procedimento.

O sangue coletado não será estocado, e os resultados obtidos a partir da sua análise serão armazenados em banco de dados e poderão ser utilizados em estudos futuros.

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.

Exame de urina: o exame do tipo EAS é coletado do jato médio da 1ª urina da manhã. O exame do tipo urina de 24 horas deve se iniciar após desprezar a primeira urina do dia, coletando a urina produzida em 24horas, até a primeira urina produzida na manhã seguinte inclusive, sendo depositada em garrafa(s) de plástico transparente limpa e seca e armazenada em local fresco. Deve ser encaminhada ao laboratório imediatamente ao término da coleta. Não há risco na coleta de ambas as amostras de urina.

Radiografia: não há risco, exceto em caso de mulheres grávidas, cujo exame é contra-indicado.

Biópsia de pele: anestesia - dor e sensação de ardor com a introdução da agulha e do líquido anestésico dentro da pele. A biópsia é um corte redondo de 3mm de diâmetro, que retira as três camadas da pele (epiderme, derme e subcutâneo) em bloco, gerando assim uma área ferida que precisará levar pontos para ser fechada . Após 7 dias serão retirados os 2 pontos dados na superfície da pele.

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/ou seu endereço.

SEUS DIREITOS

Você não é obrigado a participar deste estudo. Você pode recusar a responder o questionário e a fazer o exame de sangue. Sua decisão não afetará seu direito a assistência médica.

O médico pesquisador se compromete a tornar público o resultado da pesquisa, qualquer que seja ele, tanto através de apresentações orais quando meios impressos e eletrônico à comunidade cientifica nacional e internacional, mantendo o seu nome e o seu endereço em sigilo.

O médico pesquisador estará a sua disposição para esclarecer qualquer dúvida que possa surgir a respeito do estudo. Você pode se comunicar com Dr. Roberto Souto da Silva nos telefones (21)8671-5671 e (21) 266183021 e com a Dra. Sueli Carneiro pelo telefone (21)2562-2580 ou (21) 9606-4849 para qualquer esclarecimento. Em caso de dúvidas éticas você poderá ligar para (21)2587-6100, ou se dirigir ao Comitê de Ética em Pesquisa,situado no andar térreo do Hospital Universitário Pedro Ernesto, situado à Avenida 28 de Setembro 77, Vila Isabel, CEP 20551-030, no horário de 8h00 às 12h00 e de 13h00 às 15h00.

As informações pessoais obtidas ao seu respeito durante o estudo permanecerão confidenciais.

Se você decidir participar, será necessário um consentimento por escrito.

1. Li o documento de consentimento livre e esclarecido para este estudo. Recebi as informações necessárias sobre a natureza, proposta do procedimento e o que será esperado de mim. Minhas dúvidas foram devidamente esclarecidas.
2. Concordo em participar deste estudo.
3. Informei ao médico sobre todas as doenças e medicamentos anteriores ou atuais e sobre qualquer consulta com outro médico nos últimos três meses.

4. A minha participação neste estudo é voluntária, podendo recusar em participar ou retirar-me do estudo a qualquer momento, sem penalidade ou perda dos benefícios aos quais tenha direito.

5. Concordo que os resultados do estudo podem ser comunicados à comunidade científica e publicados em revistas médicas, mantendo em sigilo o meu nome e o meu endereço.

6. Autorizo comitês de ética, autoridades regulatórias locais ou estrangeiras, a examinarem, se assim o desejarem, estes registros médicos para confirmação das informações coletadas.

Nome do paciente _____

Assinatura_____Data_____

Médico_____

Eu confirmo haver pessoalmente explicado, para o indivíduo acima identificado, a natureza e o propósito do estudo.

Assinatura_____Data_____

Anexo C - Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do HUPE

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PEDRO ERNESTO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESOUISA

Rio de Janeiro, 13 de Outubro de 2010

Do: Comitê de Ética em Pesquisa
Prof.: Wille Oigman
Para: Aut. Roberto Souto da Silva – Orient. Profª. Sueli Coelho da Silva Carneiro / Dermatologia

Registro CEP/HUPE: 2764/2010 (este número deverá ser citado nas correspondências referentes ao projeto)
CAAE: 0209.0.228.000-10

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto, após avaliação, considerou o projeto, "PREVALÊNCIA DA MUTAÇÃO DO GENE HFE EM PACIENTES COM PORFIRIA CUTANEA TARDIA DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PEDRO ERNESTO- UERJ" aprovado, encontrando-se este dentro dos padrões éticos da pesquisa em seres humanos, conforme Resolução n.º196 sobre pesquisa envolvendo seres humanos de 10 de outubro de 1996, do Conselho Nacional de Saúde, bem como o termo de consentimento livre e esclarecido.

O pesquisador deverá informar ao Comitê de Ética qualquer acontecimento ocorrido no decorrer da pesquisa.

O Comitê de Ética solicita a V. Sª., que ao término da pesquisa encaminhe a esta comissão um sumário dos resultados do projeto.

Prof. Wille Oigman
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa

CEP - COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
AV. VINTE E OITO DE SETEMBRO, 77 TÉRREO - VILA ISABEL - CEP 20551-030
TEL: 21 2587-6353 – FAX: 21 2264-0853 - E-mail: cep-hupe@uerj.br