



# Porfiria cutánea tarda esporádica y familiar: estudio observacional de las características clínicas, bioquímicas y de los factores de riesgo

Carlos Muñoz Santos

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



**U**  
UNIVERSITAT DE BARCELONA  
**B**

**IDIBAPS**

Institut  
D'Investigacions  
Biomèdiques  
August Pi i Sunyer

# **PORFIRIA CUTÀNEA TARDA ESPORÀDICA Y FAMILIAR: ESTUDIO OBSERVACIONAL DE LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS, BIOQUÍMICAS Y DE LOS FACTORES DE RIESGO**

**Carlos Muñoz Santos**

**Tesis doctoral**

**CLÍNIC**  
**BARCELONA**  
Hospital Universitari

**Directora: Prof. Carmen Herrero Mateu**

**Universitat de Barcelona 2011**



**Porfiria cutánea tarda esporádica y familiar: estudio observacional de las características clínicas, bioquímicas y de los factores de riesgo**

---

**Memoria presentada por Carlos Muñoz Santos  
para optar al grado de Doctor por la  
Universitat de Barcelona**

**Tesis dirigida por  
Prof. Carmen Herrero Mateu**

**LÍNEA DE INVESTIGACIÓN: ONCOLOGÍA Y HEMATOLOGÍA  
GRUPO DE INVESTIGACIÓN: GENÉTICA (IDIBAPS)  
PROGRAMA DE DOCTORADO MEDICINA**

**Facultat de Medicina  
Departament de Medicina**

**Universitat de Barcelona 2011**



*A todos mis  
seres  
queridos*



# INDICE

<b>Agradecimientos</b> .....	Pag. 9
<b>Abreviaturas</b> .....	Pag. 10
<b><u>I-INTRODUCCIÓN GENERAL</u></b> .....	Pag. 13
<b>I.1- Introducción</b> .....	Pag. 15
<b>I.2- Clasificación de la PCT</b> .....	Pag. 17
<b>I.3- Factores etiopatogénicos</b> .....	Pag. 19
<b>I.4- Sintomatología</b> .....	Pag. 22
<b>I.5- Tratamiento</b> .....	Pag. 24
<b>I.6- PCT y enfermedades asociadas</b> .....	Pag. 25
<b>I.7-Estructura de la tesis doctoral</b> .....	Pag. 26
<b><u>II- HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS</u></b> .....	Pag. 27
<b><u>III- METODOLOGÍA</u></b> .....	Pag. 33
<b>III.1- Diseño del estudio y pacientes</b> .....	Pag. 35
<b>III.2- Recogida de datos</b> .....	Pag. 37
<b>III.3- Métodos de laboratorio</b> .....	Pag. 40
<b>III.4- Análisis estadístico</b> .....	Pag. 42
<b>III.5- Medios disponibles y plan de trabajo</b> .....	Pag. 43
<b><u>IV- ASPECTOS ÉTICOS</u></b> .....	Pag. 45



<b><u>V- RESULTADOS</u></b> .....	Pag. 53
-----------------------------------	---------

### **Publicaciones constitutivas de la tesis**

- Resumen y copia de artículo original nº 1.....	Pag. 55
--	---------

#### **V.1- Resultados detallados primera parte**

V.1.1- Características clínicas.....	Pag. 64
--------------------------------------	---------

V.1.2- Diagnóstico de casos atípicos.....	Pag. 67
---	---------

V.1.3- Datos bioquímicos.....	Pag. 70
-------------------------------	---------

V.1.4- Factores de riesgo de PCT.....	Pag. 72
---------------------------------------	---------

V.1.5- PCT familiar <i>versus</i> PCT esporádica.....	Pag. 75
---	---------

- Resumen y copia de artículo original nº 2.....	Pag. 81
--	---------

#### **V.2- Resultados detallados segunda parte**

V.2.1- Identificación e historia natural.....	Pag. 89
---	---------

V.2.2- Comparación entre grupos.....	Pag. 90
--------------------------------------	---------

<b><u>VI- DISCUSIÓN</u></b> .....	Pag. 97
-----------------------------------	---------

<b><u>VII- APLICACIÓN PRÁCTICA</u></b> .....	Pag. 113
--	----------

<b><u>VIII- CONCLUSIONES FINALES</u></b> .....	Pag. 117
--	----------

<b><u>IX- BIBLIOGRAFIA</u></b> .....	Pag. 122
--------------------------------------	----------

#### **X- ANEXOS**

Otras publicaciones relacionadas.....	Pag. 132
---------------------------------------	----------

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra Carmen Herrero, profesora titular y consultora senior del Servicio de Dermatología del Hospital Clínic de Barcelona, por su dirección de la tesis pero también por su dedicación al mundo de las porfirias. Esta dedicación desde los años 70 ha permitido que otros compañeros y yo hayamos podido realizar importantes trabajos y ha creado una línea de investigación que mantiene a la Unidad de Porfirias y al Servicio de Dermatología del Hospital Clínic de Barcelona como centro de referencia mundial en el campo del metabolismo de las porfirias.

Al Dr Antonio Guilabert, del Servicio de Dermatología del Hospital Clínic, por su paciencia y ayuda para poder encauzar y plasmar este laborioso trabajo.

Al Dr Nemesio Moreno, por su inestimable ayuda en el campo de la estadística, haciéndola más amena y divertida

Al Dr Jordi To-Figueras, por su revisión crítica de los trabajos realizados y por su inestimable soporte de laboratorio que ha ayudado a consolidar la Unidad de Porfirias

Y finalmente, a mi familia: a mis padres sin los cuales no hubiera podido cursar mis estudios, a mi mujer Águeda por las horas robadas y a nuestro hijo Víctor, que llegó y se marchó justo cuando comenzaba este proyecto de investigación.

## **ABREVIATURAS**

PCT: Porfiria cutánea tarda

URO-D: Uroporfirinógeno decarboxilasa

S-PCT: Porfiria cutánea tarda esporádica

F-PCT: Porfiria cutánea tarda familiar

ALA: ácido delta-aminolevulínico

URO: uroporfirinógeno

COPRO: coproporfirinógeno

HEMO: grupo hemo

Cy P450 1A: citocromo P450 1A

ROS: especies reactivas de oxígeno

ALAS: ácido  $\delta$ -aminolevulínico sintetasa.

ALAD: ácido  $\delta$ -aminolevulínico dehidratasa.

PBGD: porfobilinógeno deaminasa.

PAI: porfiria aguda intermitente.

UROS: uroporfirinógeno III cosintetasa.

CEP: porfiria eritropoyética congénita.

PHE: porfiria hepatoeritrocitaria.

CPO: coproporfirinógeno oxidasa.

HCP: coproporfiria hereditaria.

PPOX: protoporfirinógeno oxidasa.

VP: porfiria variegata.

FECH: ferroquelatasa.

EPP: protoporfiria eritropoyética.

Fe: hierro.

DM: Diabetes mellitus

IFG: Glucosa en ayunas alterada

VHC: Virus de la Hepatitis C

HIV: Virus de la inmunodeficiencia humana

HH: Hemocromatosis hereditaria

HFE: gen de la hemocromatosis hereditaria clásica

VHB: Virus de la hepatitis B

ALT: Alanin-aminotransferasa

GGT: Gamma-glutamyl transpeptidasa

HCl: Cloruro de Hidrógeno

U/mgHb : Unidades coproporfirinógeno formado por hora y por miligramo de hemoglobina

ROC: receiver operating characteristic

NS: No significativo

OR: Razón de odds

SD: Desviación estándar

CI: Intervalo de confianza

ADA: Asociación americana de diabetes

IMC: Índice de masa corporal



## **I-INTRODUCCIÓN GENERAL**



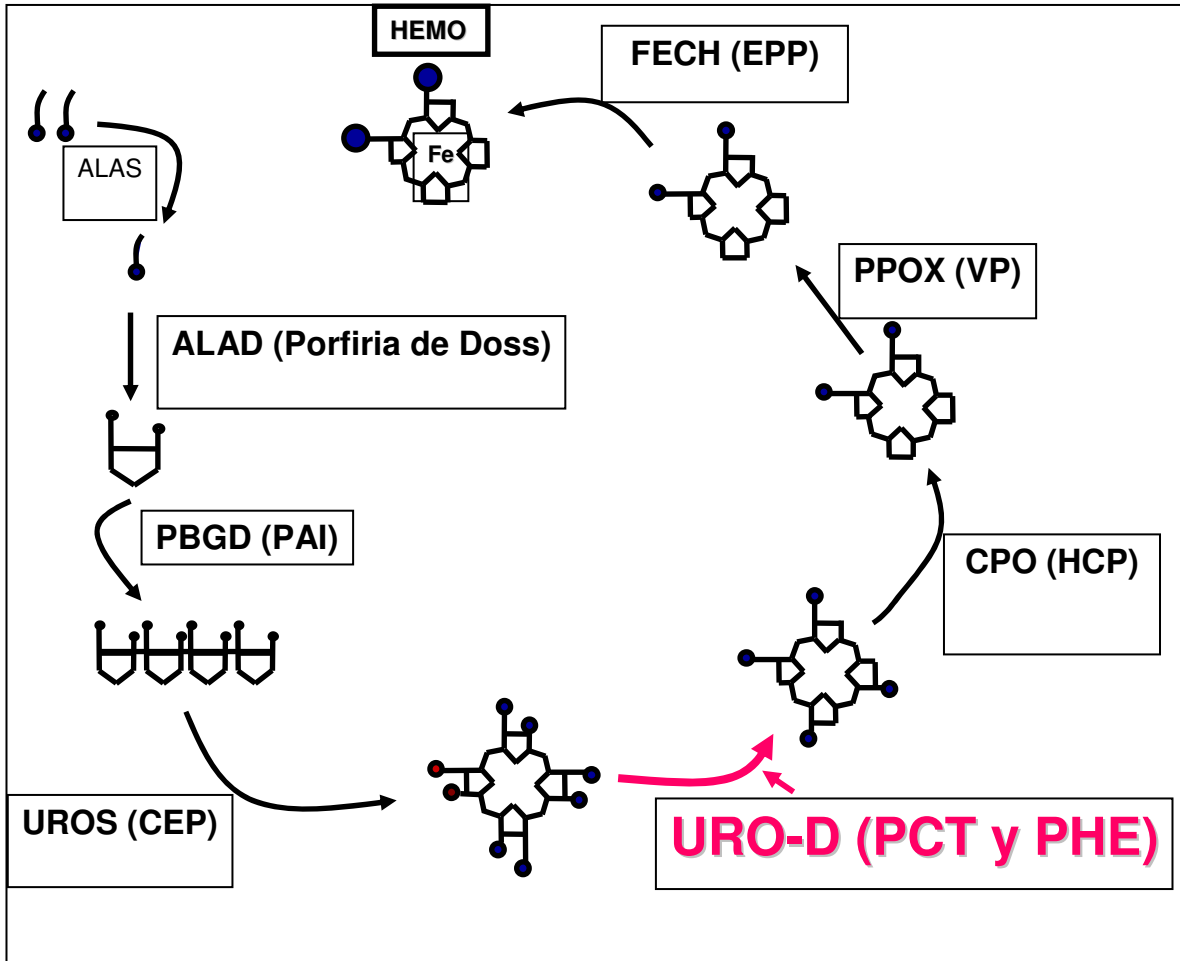
## **I.1- Introducción**

Las porfirias son un grupo de trastornos metabólicos causados por deficiencias en la actividad de las enzimas que participan en la biosíntesis del grupo hemo. Estas alteraciones enzimáticas conducen a la sobreproducción y acumulación de los metabolitos intermedios, porfirinas y precursores, que son sustrato de las enzimas deficitarias. Dichos metabolitos son responsables de la expresividad clínica de estas enfermedades y de los diferentes patrones de excreción de porfirinas característicos de cada tipo de porfiria. La síntesis del grupo hemo se realiza principalmente en la médula ósea e hígado y consta de ocho pasos, catalizados cada uno de ellos por una enzima distinta. Se conocen siete porfirias distintas, cada una de ellas ocasionada por la deficiencia de una de las diferentes enzimas (**Figura 1**).

La porfiria cutánea tarda (PCT) se produce por una deficiencia parcial de la uroporfirinógeno decarboxilasa (URO-D), 5º enzima de la síntesis del grupo hemo y que participa en la decarboxilación del uroporfirinógeno III. Esta deficiencia causa la acumulación de porfirinógenos policarboxilados, principalmente en el hígado y posteriormente, en la sangre, se oxidan a porfirinas y se depositan en los tejidos, especialmente en la piel. Estas porfirinas policarboxiladas, al ser hidrosolubles, se excretan predominantemente por la orina en forma de uroporfirinas y heptaporfirinas. Es por esto que el diagnóstico de la PCT se basa en el análisis de excreción de porfirinas urinarias.<sup>1</sup> La PCT es la forma más frecuente de porfiria y es la única que puede ser adquirida y responder bien a los tratamientos.<sup>1,2</sup>



**Figura 1.** Esquema de la síntesis del grupo hemo donde se muestra cada enzima implicado y la porfiria asociada a la deficiencia del enzima correspondiente.



**Abreviaturas:** **ALAS:** ácido  $\delta$ -aminolevulínico sintetasa. **ALAD:** ácido  $\delta$ -aminolevulínico dehidratasa. **PBGD:** porfobilinógeno deaminasa. **PAI:** porfiria aguda intermitente. **UROS:** uroporfirinógeno III cosintetasa. **CEP:** porfiria eritropoyética congénita. **URO-D:** uroporfirinógeno decarboxilasa. **PCT:** porfiria cutánea tarda. **PHE:** porfiria hepatoeritrocitaria. **CPO:** coproporfirinógeno oxidasa. **HCP:** coproporfiria hereditaria. **PPOX:** protoporfirinógeno oxidasa. **VP:** porfiria variegata. **FECH:** ferroquelatasa. **EPP:** protoporfiria eritropoyética. **Fe:** hierro.

## **I.2- Clasificación de la PCT**

Existen 2 tipos de PCT: la forma esporádica o adquirida (S-PCT, aproximadamente el 80% de casos) y la forma familiar o hereditaria (F-PCT, aproximadamente el 20% de casos). Ambos tipos se manifiestan clínicamente cuando la actividad enzimática de la URO-D desciende por debajo del 20%.<sup>1, 3</sup>

En la forma esporádica la actividad enzimática de la URO-D solamente está disminuida en el hígado y por lo tanto, en estos pacientes, la determinación de la actividad en eritrocitos es normal.

El sustrato genético de la forma familiar lo conforman mutaciones heterocigotas en el gen de la URO-D (cromosoma 1p34) que afectan a la síntesis o degradación enzimática en todas las células y por lo cual, en las formas hereditarias, la actividad enzimática está disminuida en todos los tejidos, incluyendo los hematíes. Es por esto que el estudio de la actividad de la URO-D eritrocitaria permite el diagnóstico de las formas familiares. Cuando existen mutaciones homocigotas en el gen de la URO-D la porfiria resultante se denomina porfiria hepatoeritrocitaria (PHE). Sin embargo, estas mutaciones, en estado heterocigoto, solamente reducen la actividad enzimática en un 50%, con lo cual son necesarias pero no suficientes para producir sintomatología en los casos familiares<sup>1</sup>. Esto explicaría el relativo alto porcentaje de portadores de mutaciones del gen de la URO-D que están asintomáticos.<sup>4</sup> Por lo tanto se necesitan otros factores ambientales y genéticos para disminuir más la actividad

enzimática a nivel hepático y así desencadenar la sintomatología en los casos familiares.<sup>5</sup> Estos factores son los mismos que en las formas esporádicas y están bien establecidos (ver **Factores etiopatogénicos**).

Se ha sugerido que en las formas familiares existiría una mayor deficiencia enzimática que en las formas adquiridas<sup>6,7</sup>, lo que ocasionaría una sintomatología más precoz y grave.<sup>8,9</sup> Sin embargo, no existen estudios clínicos recientes y detallados, con series largas de pacientes, en las que se comparen las diferencias entre estas formas de PCT (S-PCT versus F-PCT). Además, no debemos olvidar la variabilidad geográfica de esta enfermedad respecto a sus factores de riesgo, lo que puede hacer que las características de las formas familiares y esporádicas también puedan variar según en que país se estudien. Tampoco se conoce si existen diferencias en la expresividad clínica entre sexos.

### **I.3- Factores etiopatogénicos**

La PCT es un trastorno metabólico complejo y multifactorial en el que el agente patogenético central es el hierro (ver **Figura 2**).<sup>1</sup> Los factores de riesgo que contribuyen a la inactivación o inhibición de la URO-D son :

la infección crónica por el VHC (y en menor medida la infección por el VIH), el abuso de alcohol, la ingesta de fármacos inductores del citocromo P450, como los estrógenos (como anticonceptivos o terapia sustitutiva) y la siderosis causada por mutaciones en el gen HFE de la hemocromatosis hereditaria (HH) clásica.<sup>1</sup>

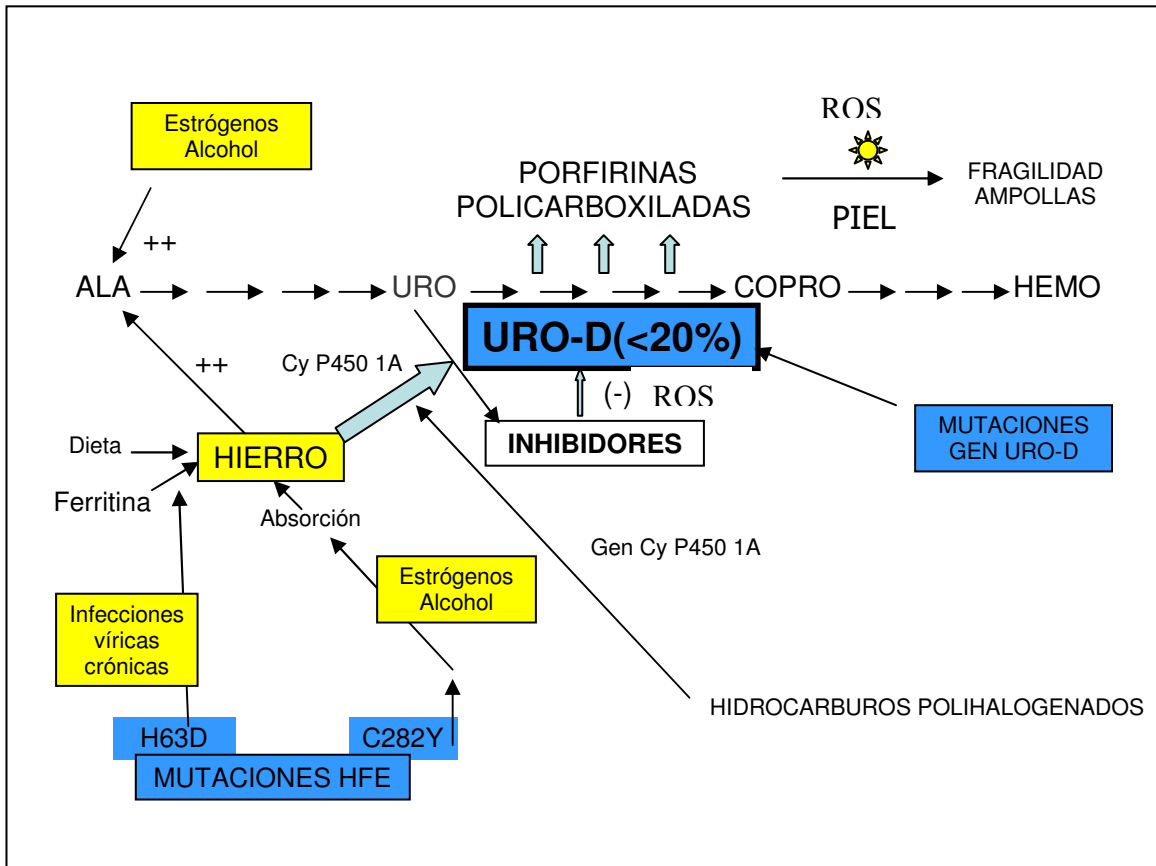
Estos factores precipitantes actuarían solos o en combinación con la sobrecarga férrica hepática ( un hallazgo prácticamente universal en estos pacientes)<sup>10</sup> para generar, en individuos predispuestos, algún factor inhibidor de la URO-D en el hepatocito. Estos inhibidores de la URO-D no están todavía bien caracterizados pero es conocido que se originan por un mecanismo oxidativo hierro-dependiente en el que interactúa una subfamilia de citocromos P450 (Cy P4501A) a través de la formación de especies reactivas de oxígeno.<sup>1</sup>

Una dieta rica en hierro podría incrementar los depósitos hepáticos de este metal y el alcohol y los estrógenos podrían aumentar la absorción intestinal de hierro. Las infecciones víricas crónicas podrían liberar el hierro unido a la ferritina. Un factor genético posiblemente implicado en la susceptibilidad a padecer PCT serían los patrones genotípicos del citocromo p450. El primer

enzima de la síntesis del grupo hemo, la ALA-Sintasa, regula esta síntesis y también podría estar implicado en la patogenia de la PCT mediante la inducción de su gen por el propio hierro o por los estrógenos y el alcohol. El papel de las mutaciones en el gen HFE de la HH en la PCT se ejercería potenciando la absorción intestinal del hierro y su depósito hepático (mutación C282Y, junto con el alcohol) o actuando junto con el virus de la hepatitis C (mutación H63D) en la liberación del hierro unido a la ferritina. A favor de esta hipótesis estarían los hallazgos del trabajo de Toll y cols.<sup>11</sup> en pacientes de nuestro propio hospital. Los hidrocarburos polihalogenados (hexaclorobenceno), a través del citocromo p450, inhiben directamente la URO-D. Este hecho está comprobado en animales de experimentación. La contaminación ambiental por este producto ha sido causa de brotes epidémicos anecdóticos de PCT.

La distribución de estos factores de riesgo varía ampliamente dependiendo de la población estudiada. Por ejemplo, la infección por VHC es mucho más frecuente en pacientes con PCT del sur de Europa (como España)<sup>12</sup> o de los Estados Unidos<sup>13</sup> que en pacientes de Argentina<sup>14</sup> o del norte de Europa (como Suecia).<sup>15</sup>

**Figura 2.** Esquema de la patogenia de la PCT (Adaptado de Thunell y Harper).<sup>1</sup>



**Abreviaturas:** **ALA:** ácido aminolevulínico **URO:** uroporfirinógeno **COPRO:** coproporfirinógeno. **HEMO:** grupo hemo. **Cy P450 1A:** citocromo P450 1A. **ROS:** especies reactivas de oxígeno.

## **I.4- Sintomatología**

La afectación cutánea es la clínica predominante de la PCT. Suele debutar a partir de los 40 años, aunque la forma familiar puede iniciarse alrededor de los 20 años e incluso en la infancia.<sup>3</sup>

Todas las formas comparten la misma clínica. Se produce un síndrome de fotosensibilidad crónica o retardada, en la que a menudo el paciente no relaciona su sintomatología con la exposición solar, aunque la clínica habitualmente debuta o empeora en verano y predomina en áreas fotoexpuestas.<sup>1,3</sup>

Las porfirinas policarboxiladas procedentes del plasma se acumulan en la piel y producen una reacción fototóxica con formación de especies reactivas de oxígeno que dañan las membranas lisosomales. Esta reacción se produce sobre todo bajo la exposición a espectros de luz con longitudes de onda entre 400 y 540 nm.<sup>1</sup>

El síntoma más frecuente es la fragilidad cutánea y la formación de ampollas tensas de contenido seroso o serohemático, en zonas fotoexpuestas, especialmente en el dorso de las manos y la cara. Se forman erosiones y costras de lenta curación, que dejan zonas con cicatrices atróficas, quistes miliares y frecuentemente hiper o hipopigmentación. Existe a menudo prurito en las zonas fotoexpuestas y algunos pacientes refieren coluria. En dos tercios

de los enfermos se produce hipertrichosis facial, de predominio malar y periorbitario. La hiperpigmentación se produce en la mitad de los pacientes y puede adoptar diferentes patrones clínicos: tipo melasma en mejillas y periorbitario, formas moteadas o reticuladas faciales y formas más difusas y generalizadas. Otros hallazgos frecuentes son los signos de daño actínico crónico y fotoenvejecimiento cutáneo, con elastosis dérmica. Puede observarse una piel de coloración amarillenta, engrosada, con arrugas y formación de comedones y quistes, que en la nuca puede tener el aspecto del llamado *cutis rhomboidalis*.

Clásicamente se han descrito, hasta en un 30% de los pacientes, cambios esclerodermiformes en la piel de la cabeza y parte superior del tronco, con una histología indistinguible de una esclerodermia o morfea. Esto se ha descrito en casos de larga evolución y no tratados.<sup>3</sup> Se pueden observar placas hipopigmentadas induradas de predominio en zonas fotoexpuestas, especialmente en la región preauricular, área de la V del cuello y en el dorso de las manos. En el cuero cabelludo estas lesiones pueden provocar una alopecia cicatricial de inicio en la región frontoparietal y occipital, aunque previamente puede hallarse una pérdida difusa del cabello. Una complicación de estas áreas es la formación de calcificaciones distróficas y a veces formación de úlceras tórpidas.<sup>3</sup>



## **I.5- Tratamiento de la PCT**

El tratamiento estándar de la PCT se basa en la realización de sangrías terapéuticas (flebotomías) y dosis bajas de antipalúdicos (cloroquina 250-500 mg/semana o hidroxiclороquina 200-400 mg/semana). Ambos tratamientos pueden combinarse para conseguir una eficacia mayor y más rápida.<sup>2,8</sup> Estos tratamientos conducen a la remisión clínica y bioquímica del trastorno metabólico pero una vez abandonados pueden producirse recaídas y por lo tanto en estos pacientes se recomienda un seguimiento de por vida.<sup>1</sup>

Otro aspecto importante del tratamiento y que en algunos pacientes puede conseguir la remisión de la enfermedad, es la intervención sobre los factores de riesgo. Debe recomendarse la abstención de la ingesta de alcohol y estrógenos y en casos seleccionados valorar el tratamiento de la infección por VHC con interferón y ribavirina. También es aconsejable el uso de medidas de fotoprotección para evitar el desarrollo de nuevas lesiones cutáneas mientras la porfiria esté activa.

La indicación de las sangrías parece clara en aquellos pacientes con sobrecarga férrica y aumento de la ferritina sérica. Se extraen entre 350 y 500 ml de sangre cada 7-15 días, hasta que la hemoglobina y la ferritina se sitúan en el límite inferior de la normalidad o la saturación de transferrina desciende por debajo del 15%.<sup>1,8</sup> La razón fundamental para el uso de los antipalúdicos, a pesar de haber demostrado su eficacia, no ha sido todavía bien establecida.<sup>2</sup> El mecanismo de acción de la cloroquina en la PCT no es bien conocido pero parece que aumentaría la excreción urinaria de porfirinas al formar complejos hidrosolubles con las porfirinas hepáticas y facilitando su liberación.<sup>1,2,8</sup>

## **I.6- PCT y enfermedades asociadas**

La PCT se ha asociado clásicamente con otras patologías, como por ejemplo el lupus eritematoso, síndromes hemoproliferativos, el carcinoma hepatocelular y la diabetes mellitus tipo 2 (DM).<sup>1,8,16,17</sup> Algunas de estas asociaciones podrían ser casuales pero la asociación a hepatocarcinoma o a la diabetes tienen una relación clara con la porfiria. El hepatocarcinoma es consecuencia, en la mayoría de los casos, a la hepatopatía crónica por el VHC.

La diabetes se ha encontrado asociada hasta en un 41 % de los pacientes según las diferentes series <sup>14,15,18-24</sup> y además se ha visto que los pacientes con PCT tienen frecuentemente una tolerancia anormal a la glucosa tras los test de sobrecarga oral o endovenosa.<sup>19,20,25-29</sup> El motivo de esta mayor prevalencia de diabetes en la PCT sigue siendo desconocido. Las posibles causas podrían ser la presencia de mutaciones en el gen de la hemocromatosis, la afectación parenquimatosa y celular del hígado y del páncreas por la acumulación de hierro o por el déficit de enzimas vitales que contengan el grupo prostético hemo y el propio daño hepático crónico que acabaría produciendo una resistencia a la insulina. Todos estos datos sugieren que los pacientes con PCT estarían más predispuestos a desarrollar trastornos del metabolismo de la glucosa (GMA). Todos los estudios previos sobre PCT y DM están orientados a conocer la prevalencia de alteraciones del metabolismo de la glucosa en pacientes con PCT y se han realizado en series relativamente cortas.<sup>19, 20, 23-29</sup> No existe hasta la fecha ningún estudio dirigido a investigar la historia natural ni las causas de esta asociación.

## **I.7- Estructura de la presente tesis doctoral**

El presente estudio se ha realizado en dos fases, con la consiguiente publicación de dos artículos originales independientes pero que han partido de una misma cohorte de pacientes. En la primera fase se ha realizado un extenso trabajo descriptivo de toda una amplia cohorte de pacientes con PCT (N=152) y con descripción de múltiples variables. A raíz de la primera parte del estudio se puso en evidencia la asociación de la PCT y los trastornos del metabolismo de la glucosa (GMA) en esta serie de pacientes. Este hallazgo nos llevó a la segunda parte del estudio, realizada con menor número de pacientes (una subcohorte de 81 pacientes) pero que habían sido seguidos durante un periodo de tiempo prolongado (> 10 años). En esta parte hemos aprovechado muchas de las variables recogidas durante la primera fase pero también se han creado variables nuevas volviendo a revisar datos de la subcohorte de 81 pacientes.

## **II- HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS**



## **Hipótesis de trabajo y objetivos**

### **1ª Hipótesis**

Por nuestra experiencia clínica en la práctica asistencial de la larga serie de pacientes visitados, hemos observado que ciertas manifestaciones clínicas clásicamente descritas son muy poco frecuentes y que existen formas de inicio de la enfermedad que no son las habitualmente descritas. Es posible que el actual diagnóstico y tratamiento precoz evite la aparición de determinados signos y síntomas clásicos, por lo que es importante identificar las manifestaciones más precoces de la enfermedad. También hemos percibido diferencias clínicas entre sexos

***Objetivo 1:*** Describir de forma detallada las manifestaciones clínicas de la PCT en esta serie de 152 pacientes, con especial énfasis en los signos y síntomas más precoces y atípicos, así como las principales diferencias entre sexos.

## **2ª Hipótesis**

Existen pocos estudios que describan la variabilidad geográfica de los factores de riesgo de la PCT. Se desconoce la influencia de los distintos factores de riesgo en el desarrollo de la PCT en nuestro ámbito y las diferencias entre sexos.

**Objetivo 2.1:** Conocer la prevalencia de los diferentes factores desencadenantes de PCT en nuestra población.

**Objetivo 2.2:** Conocer si existen diferencias en la influencia de los factores desencadenantes según el sexo

## **3ª Hipótesis**

Se desconoce la prevalencia de la PCT familiar (F-PCT) en nuestro medio y si existen características distintas entre las formas familiares y las esporádicas

**Objetivo 3.1:** conocer la prevalencia de las formas hereditarias en nuestra población y las principales mutaciones en el gen de la URO-D

**Objetivo 3.2:** determinar si existen diferencias entre los factores desencadenantes entre la F-PCT y la S-PCT.

**Objetivo 3.3:** Conocer si existen características de la enfermedad o factores desencadenantes que pudieran considerarse predictores de las formas familiares.

#### **4ª Hipótesis**

La mayoría de series publicadas observan una mayor prevalencia de diabetes en pacientes con PCT que en la población general. No es conocida la relación patogenética entre ambas enfermedades y se desconoce si las alteraciones metabólicas propias de la PCT podrían tener relación con el desarrollo de diabetes, como ocurre en pacientes con hemocromatosis hereditaria o en pacientes con otras hepatopatías, en los cuales la prevalencia de diabetes es mayor que en la población general.

Esclarecer esta hipótesis es el objetivo fundamental de la segunda fase de este trabajo, que pretende analizar la relación temporal entre la PCT y los GMA en una subcohorte (81 pacientes) que ha podido ser seguida durante al menos 10 años.

**Objetivo 4.1:** Determinar la prevalencia exacta de trastornos del metabolismo de la glucosa en nuestra cohorte de pacientes con PCT y confirmar si es mayor que en la población general de nuestro entorno.

**Objetivo 4.2:** Estudiar retrospectivamente la historia natural del desarrollo de la diabetes en el contexto de la PCT en estos pacientes seguidos durante más de 10 años y conocer la relación temporal entre ambos trastornos.

**Objetivo 4.3:** Conocer si existen diferencias en las características y factores asociados a la PCT entre el grupo que desarrolla diabetes y el grupo que no la desarrolla tras un largo seguimiento, con el objetivo de conocer si existe algún posible factor o marcador de riesgo que predisponga al desarrollo de la diabetes en estos pacientes.





### **III- METODOLOGÍA**



### **III.1. Diseño del estudio y pacientes**

El estudio está diseñado como observacional y retrospectivo. Consta de dos fases o bloques (que corresponden a cada uno de los artículos). La primera fase está dirigida al estudio de las manifestaciones clínicas, bioquímicas y de los factores de riesgos en toda la cohorte, y respecto a sexo y tipo de porfiria (familiar o esporádica). El objetivo de la segunda fase es estudiar la relación entre PCT y diabetes en aquellos pacientes de la cohorte general que fueron seguidos durante más tiempo.

Para la primera fase (primer artículo) se incluyen todos los pacientes con PCT que consecutivamente han acudido al Servicio de Dermatología del Hospital Clínic durante el periodo 2004-2008. Es un total de 152 pacientes españoles que viven en Barcelona o en su área metropolitana. 113 ya habían sido diagnosticados con anterioridad y fueron visitados para revisión y/o tratamiento y los restantes 39 fueron diagnosticados durante este periodo. El diagnóstico definitivo de PCT se establece en todos los pacientes en base a las manifestaciones clínicas y se confirma tras el análisis de excreción de porfirinas tanto en orina como en heces, descartándose de esta manera otros tipos de porfiria, especialmente la porfiria variegata. El patrón típico de excreción de porfirinas en orina fue el de un aumento de porfirinas totales a expensas del aumento de uroporfirinas (isómero I) y heptaporfirinas (isómero III). Los pacientes son visitados normalmente cada 3 meses mientras la PCT está activa y anualmente cuando ésta entra en remisión total (ausencia de síntomas y porfirinas en orina normales).

Para la segunda fase (segundo artículo), partiendo de la cohorte inicial de 152 pacientes, hemos seleccionado solamente aquellos pacientes con una evolución de la PCT y un seguimiento en nuestro servicio durante al menos 10 años y que hayan acudido al menos una vez al año a los controles. De este subgrupo de pacientes (81 pacientes) hemos determinado cuales tenían trastornos del metabolismo de la glucosa en el momento del estudio. Para determinar estos trastornos del metabolismo de la glucosa esto hemos usado los criterios de la Asociación Americana de Diabetes (ADA) de 1997, que se basan en la glucemia en ayunas. De este modo hemos clasificado a nuestros pacientes como prediabéticos o con glucosa en ayunas alterada (IFG) cuando presentaban al menos en 2 ocasiones diferentes unas cifras de glucosa basal entre 110 y 125 mg/dL. Y hemos considerado como pacientes con diabetes mellitus a aquellos que cumplían cualquiera de estos criterios: al menos 2 glucemias basales mayores de 125 mg/dL, al menos 2 glucemias no basales mayores de 200 mg/dL y síntomas de diabetes, uso de medicamentos para la diabetes o historia de diabetes diagnosticada por un médico.

## **III.2. Recogida de datos**

Se ha realizado por revisión exhaustiva de las historias clínicas de estos pacientes. Hemos recogido los siguientes datos en global:

### Datos epidemiológicos:

- Edad actual (en el momento del estudio)
- Sexo
- Abuso de alcohol (> 50 gr/día) al diagnóstico y a lo largo del tiempo (bebedores persistentes)
- Ingesta de estrógenos (anticonceptivos orales o terapias sustitutivas)

### Datos clínicos en relación con la porfiria:

- Edad en el momento del diagnóstico
- Tiempo transcurrido desde el diagnóstico hasta el momento del estudio
- Tiempo transcurrido sin diagnóstico (desde el inicio de los síntomas hasta su diagnóstico definitivo)
- Manifestaciones clínicas detalladas\*
- Tipo de porfiria (familiar versus esporádica, por estudio enzimático y genético)
- Presencia de cirrosis hepática (confirmada por biopsia hepática)
- Tratamiento realizado para la porfiria (antipalúdicos o sangrías)

- Número de recaídas bioquímicas\*\* en total y media por año (nº recaídas totales dividido por el tiempo transcurrido desde el diagnóstico de la PCT)
- Remisiones completas mantenidas: > 10 años sin recaídas bioquímicas y por tanto sin necesidad de tratamiento y sin síntomas.
- Presencia o ausencia de insuficiencia renal crónica/hemodiálisis

#### Datos en relación con la diabetes:

- Presencia o no de trastorno del metabolismo de la glucosa (en base a criterios de la ADA de 1997 que se basan en la glucemia en ayunas)
- Antecedentes familiares de primer grado de diabetes
- Índice de masa corporal (IMC = peso en kg dividido por la altura en metros al cuadrado).

#### Datos de laboratorio:

- Excreción urinaria de porfirinas al diagnóstico
- Actividad eritrocitaria de la enzima URO-D
- Análisis de mutaciones del gen de la URO-D
- Anticuerpos contra VHC, VHB y VIH
- Ferritina al diagnóstico y tendencia a lo largo del tiempo\*\*\*
- ASAT. ALAT y GGT en el momento del diagnóstico y tendencia a lo largo del tiempo\*\*\*
- Glucemias basales
- Análisis de mutaciones del gen HFE de la hemocromatosis hereditaria.

\*Para las manifestaciones clínicas detalladas hemos diseñado una escala de gravedad que se basa en la suma de síntomas presentes, sumando un punto cada síntoma y con un intervalo de puntuación clínica desde el 0 al 16 (ver Tabla 1 en Resultados).

\*\* Se define como recaída bioquímica a cualquier aumento de las porfirinas urinarias por encima del límite normal (>300 nmol/L) e independientemente de los síntomas clínicos

\*\*\*Para los parámetros bioquímicos en los que evaluamos su tendencia en el tiempo y no solo en el momento del diagnóstico (ferritina sérica y transaminasas) hemos clasificado esta tendencia en tres categorías : (1): siempre normales, (2): elevación solo coincidiendo con actividad de la porfiria y (3): siempre elevadas (elevación en al menos 90% de las determinaciones, incluso en fases de remisión de la porfiria).



### **III.3. Métodos de laboratorio**

La excreción de porfirinas totales en orina ha sido valorada mediante espectrofluorimetría (modelo F-2000; Hitachi). Para realizar esta técnica se recogieron 50 µl de orina y se diluyen en 2.7 ml de cloruro de hidrógeno (HCl) 2.7 N y la fluorescencia se estima tras excitación a 398 nm y emisión a 603 nm. La curva de calibración se realiza con diluciones ácidas de coproporfirina III estándar (Porphyrin products Inc; Logan, Utah, EEUU; 0.5 µg/ml en 1mol/l HCl). El valor de referencia-corte de las porfirinas totales en orina se determina a < 300 nmol/L.

La confirmación bioquímica del patrón de excreción de porfirinas e isómeros en orina se realizó mediante técnicas de cromatografía en capa fina (113 pacientes diagnosticados entre 1977 y 2004) o cromatografía líquida de alta resolución (39 pacientes diagnosticados entre 2004 y 2008), según la técnica de Lim y Peters.<sup>30</sup>

La actividad enzimática en eritrocitos de la URO-D se ha realizado en los 152 pacientes como método de cribado para identificar posibles formas familiares de PCT y se determina en pmoles de coproporfirinógeno formado por hora y por miligramos de hemoglobina (U/mgHb), de acuerdo a la técnica descrita por McManus y colaboradores.<sup>31</sup>

Se consideraron pacientes con actividad baja o en el límite de normalidad a aquellos que según una curva tipo ROC (receiver operating characteristic), descrita y publicada previamente por nuestro grupo de trabajo,<sup>4</sup> (ver artículo en sección **Anexos**) tenían valores de actividad enzimática inferior a 39 U/mgHb.

En estos pacientes se realizó estudio genético mediante el análisis de los exones 1-10 del gen de la URO-D por reacción en cadena de la polimerasa.<sup>4</sup> Además también se realizó el genotipado a todos los pacientes con actividades enzimáticas entre 39 y 43 U/mgHb, y de forma aleatoria a 15 pacientes con actividades por encima de 43 U/mgHb (En este último grupo no se encontraron mutaciones).

Las mutaciones en el gen de la Hemocromatosis clásica HFE (C282Y y H63D) fueron analizadas según las técnicas descritas en el trabajo de Toll y colaboradores.<sup>11</sup>

### **III.4. Análisis estadístico**

Se ha realizado un análisis descriptivo de cada una de las variables recogidas.

El análisis bivariante se ha llevado a cabo mediante los siguientes tests estadísticos:  $\chi^2$ , ANOVA, t de Student y test de correlación de Pearson.

Se han realizado 2 análisis multivariantes con regresión logística. Uno para la primera fase del estudio y que incluye la forma de PCT (familiar versus esporádica) como variable dependiente y la presencia de infección por VHC, sexo, edad y abuso de alcohol como variables independientes. El segundo análisis multivariante se ha realizado para la segunda fase del estudio y ha incluido la presencia o no de trastornos del metabolismo de la glucosa como variable dependiente y la presencia de infección por VHC, sexo, edad, antecedentes familiares de DM2 y tendencia de la ferritina sérica en el tiempo como variables independientes.

Todo este análisis estadístico se ha realizado mediante el programa informático SPSS version 12 (SPSS Inc, Chicago, EEUU) y el nivel de significación estadística se ha establecido para  $p < 0.05$ .

### **III.5. Medios disponibles y plan de trabajo seguido**

Los pacientes han sido visitados y entrevistados por el doctorando y la Dra Carmen Herrero, del Servicio de Dermatología del Hospital Clínic, en las consultas externas del hospital. El doctorando ha tenido acceso a las historias clínicas de todos estos pacientes y ha sido el encargado de su revisión exhaustiva y de introducir los datos primero en una base de datos tipo Access y posteriormente en una base de datos de tipo SPSS para su posterior análisis estadístico.

El análisis estadístico se realiza con el programa SPSS (versión 12) y con la colaboración del Dr Nemesio Moreno, del SAP Santa Coloma de Gramanet de Barcelona.

El análisis de las porfirinas y la actividad enzimática en hematíes ha sido realizado por el Dr Jordi To-Figueras del Servicio de Bioquímica del Hospital Clínic de Barcelona y el análisis de mutaciones del gen URO-D se ha llevado a cabo por la Dra Celia Badenas, del Servicio de Genética del Hospital Clínic de Barcelona.

En la elaboración de los artículos para su publicación, el doctorando ha recibido la colaboración del Dr Antonio Guilabert, del Servicio de Dermatología del Hospital Clínic.

En la revisión crítica de los manuscritos previos a su publicación han participado también la Dra Carmen Herrero y el Dr Jordi To-Figueras. Para la segunda parte del estudio (segundo artículo), el doctorando ha contado además con el asesoramiento científico de la Dra Margarita Gimenez, del Servicio de Endocrinología – Unidad de Diabetes del Hospital Clínic de Barcelona.

Finalmente, la Dra Carmen Herrero ha supervisado y dirigido cada uno de estos pasos hasta la realización final de la tesis doctoral.

La realización de este trabajo ha sido posible gracias a la financiación recibida a través de las siguientes becas de investigación:

- Hospital Clínic de Barcelona. Premio Fin de Residencia Emilio Letang, concedida al Dr Carlos Muñoz Santos, año 2004
- Beca FIS (Fondo de Investigaciones Sanitarias) PI06/0150, concedida al Dr. Jordi To-Figueras, año 2006

## **IV- ASPECTOS ÉTICOS**



Todos los pacientes han firmado una hoja de consentimiento informado donde se les ha explicado el tipo de estudio y sus objetivos, y donde se les pide su aprobación para que puedan ser revisadas las historias clínicas hospitalarias manteniendo la confidencialidad de los datos. El estudio no es intervencionista ni experimental en ningún momento y los pacientes han podido revocar en cualquier momento su consentimiento. A continuación se adjunta ejemplo de la hoja informativa y del consentimiento informado para el paciente, y **también se adjuntan los certificados de su aprobación por el Comité de Ética del Hospital Clinic de Barcelona.**



## ***HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE***

**Título del estudio: "PORFIRIA CUTANEA TARDA ESPORÁDICA Y FAMILIAR: ESTUDIO OBSERVACIONAL DE LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS, BIOQUÍMICAS Y DE LOS FACTORES DE RIESGO"**

**Introducción:** Se le pide que participe en un proyecto para estudiar mejor las características de su enfermedad. Las conclusiones que se extraigan del proyecto investigador podrían suponer una mejora en la comprensión de la enfermedad y, al mismo tiempo, dotar a los médicos de nuevos conocimientos y estudios de laboratorio en el diagnóstico y seguimiento de pacientes como usted.

**Propósito del estudio:** El objetivo de este estudio es revisar y analizar todas las manifestaciones clínicas que le ha provocado su enfermedad, juntamente con los estudios de laboratorio ya practicados y aquellos factores de riesgo ya conocidos que se han visto que pueden desencadenar su enfermedad.

**Procedimientos del estudio:** Si usted participa en este estudio, no se modificará en nada su seguimiento ni el tratamiento que recibirá por su enfermedad, ni la conducta clínica habitual por parte de los médicos encargados de su control. El único procedimiento adicional que se realizará será la revisión exhaustiva de su historial médico en el Hospital Clínic.

**Participación en el estudio:** La participación en el estudio es voluntaria. Usted podrá abandonar cuando lo desee y sin tener que dar explicaciones. Sea cual sea su decisión, ésta no afectará a su asistencia médica habitual ni a la relación con los médicos. Usted será informado de cualquier descubrimiento significativo relacionado con su participación en el estudio.

**Riesgos del estudio:** no hay ningún riesgo para el paciente

**Posibles beneficios derivados del estudio:** No se prevén la existencia de beneficios directos e inmediatos para usted por su participación en el actual estudio. En cambio, si se podrían obtener beneficios futuros en el conocimiento, diagnóstico o seguimiento de los pacientes afectados de enfermedades como la suya.

## **CONSENTIMIENTO INFORMADO**

Título del estudio: **"PORFIRIA CUTÁNEA TARDA ESPORÁDICA Y FAMILIAR: ESTUDIO OBSERVACIONAL DE LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS, BIOQUÍMICAS Y DE LOS FACTORES DE RIESGO"**.

Yo, .....

(nombre y apellidos)

- He leído la hoja de información que se me ha entregado
- He podido hacer preguntas sobre el estudio.
- He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con Dr.....Carlos Muñoz Santos.....

(nombre del investigador)

Entiendo que mi participación es voluntaria y que implica que el promotor tenga acceso de forma disociada a parte de mis datos clínicos y que pueda procesar estos datos y realizar los estudios bioquímicos para el estudio.

Entiendo que puedo retirarme del estudio:

1. Cuando así lo desee.
2. Sin tener que dar explicaciones.
3. Sin que repercuta en mi asistencia médica.

Doy libremente mi conformidad para entrar en el estudio.

---

Fecha

---

Firma del participante

---

Fecha

---

Firma del investigador

**D. Joan Albert Barberá Mir**, Adjunto a la Dirección de Investigación del Hospital Clínic de Barcelona,

CERTIFICA:

Que el Comité de Investigación del Hospital Clínic, en la sesión celebrada en el día de hoy, ha analizado el proyecto de investigación titulado:

*Porfiria cutánea tarda esporádica y familiar: estudio observacional de las características clínicas, bioquímicas y de los factores de riesgo.*

cuyo investigador principal es el Dr. **Muñoz Santos, Carlos** del Servicio de **Dermatología**

entendiendo que dicho estudio se incluye en una de las líneas de investigación biomédica acreditadas en este centro, cumpliendo los requisitos metodológicos necesarios, y que es viable en todos sus términos, por lo que lo ha considerado adecuado y ha decidido su aprobación.

Lo que firmo en Barcelona, a 29/04/2010



**CLÍNIC**  
**BARCELONA**  
Hospital Universitari  
**COMITÉ ÈTIC**  
**INVESTIGACIÓ CLÍNICA**

Registro: 2010 / 5847

Dña. Begoña Gómez Pérez , del Servicio de Farmacia del Hospital  
Clínic de Barcelona y Secretaria del Comité Ético de Investigación  
Clínica (CEIC)

CERTIFICA:

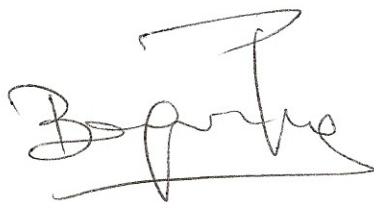
Que el Comité Ético de Investigación Clínica, según consta en el acta  
de la reunión celebrada en el día de hoy, ha analizado el proyecto de  
investigación titulado:

*Porfiria cutánea tarda esporádica y familiar: estudio observacional de las  
características clínicas, bioquímicas y de los factores de riesgo.*

cuyo investigador principal es el Dr. **Muñoz Santos, Carlos**  
del Servicio de **Dermatología**

entendiendo que dicho estudio se ajusta a las normas éticas esenciales  
y criterios deontológicos que rigen en este Centro, y, por tanto, ha  
decidido su aprobación.

Lo que firmo en Barcelona, a 29/04/2010



CLÍNICA  
BARCELONA  
Hospital Universitari  
COMITÉ ÈTIC  
INVESTIGACIÓ CLÍNICA

## **V- RESULTADOS**



## **PUBLICACIONES CONSTITUTIVAS DE LA PRESENTE TESIS**

### **DOCTORAL**

#### **ARTÍCULO ORIGINAL Nº 1**

##### **Familial and sporadic porphyria cutanea tarda: clinical and biochemical features and risk factors in 152 patients**

Carlos Muñoz-Santos\*, Antonio Guilabert\*, Nemesio Moreno\*\*, Jordi To-Figueras\*\*\*, Celia Badenas\*\*\*, Esteve Darwich\* y Carmen Herrero\*

***Medicine (Baltimore).* 2010; 89:69-74**

Servicios de Dermatología\*, Bioquímica y Genética molecular\*\*\*, Hospital Clínic, Barcelona, Universitat de Barcelona, IDIBAPS y SAP Santa Coloma de Gramanet\*\*, Barcelona

Factor de impacto AÑO 2010: **4.256**

(Ranking 17/151 de su área de conocimiento, Medicina general e interna)

Accésit al Premio Profesor Miguel Armijo 2011 de la Academia Española de Dermatología y Venereología al mejor trabajo publicado por autores españoles durante el año 2010



## **RESUMEN ARTÍCULO N° 1**

**Metodología.** Estudio retrospectivo de una serie de 152 pacientes consecutivos con porfiria cutanea tarda que acudieron a la Unidad de Porfirias del Hospital Clínic de Barcelona, España, para actualizar las manifestaciones clínicas de la enfermedad y estudiar las diferencias entre sexos, la proporción de formas familiares y el papel de los diferentes factores de riesgo en esta población. Los pacientes fueron clasificados en formas esporádicas o familiares de acuerdo a la actividad enzimática de la uroporfirinógeno-decarboxilasa y también su genotipado.

**Resultados.** En nuestra cohorte, la fragilidad cutánea y las ampollas en las manos fueron la manifestación clínica más frecuente. Las mujeres presentaron con más frecuencia hipertrichosis facial (84.8%;  $p=0,004$ ), afectación de áreas diferentes a manos y cara (33,3%;  $p= 0,008$ ) y prurito (27,3%;  $p=0,041$ ) respecto de los hombres. De nuestros pacientes, 11,8% no presentaron el inicio clínico típico, siendo la hipertrichosis e hiperpigmentación facial la manifestación más frecuente en estos casos. El análisis de los factores de riesgo mostró una alta prevalencia de infección por virus de la hepatitis C (65,8%) y abuso de alcohol (59,9%), siendo ambos mucho más frecuentes en los hombres ( $p< 0,001$ ). En el análisis multivariante, la ausencia de infección por virus de la hepatitis C fue el único factor predictor de la presencia de formas familiares (odds ratio, 0.05; 95% intervalo confianza, 0.006-0.46).

**Conclusiones.** Las formas de presentación atípica de esta porfiria deben ser tenidas en cuenta de cara a prevenir un retraso en el diagnóstico. Hacemos hincapié en el papel constante de la hepatitis C en la precipitación de las formas esporádicas. Por lo tanto, en países con una alta prevalencia de hepatitis C, la ausencia de esta infección en un paciente con porfiria cutánea tarda debe hacernos sospechar una forma familiar de la enfermedad.

# Familial and Sporadic Porphyrria Cutanea Tarda

## Clinical and Biochemical Features and Risk Factors in 152 Patients

Carlos Muñoz-Santos, MD, Antonio Guilabert, MD, Nemesio Moreno, MD, Jordi To-Figueras, PhD, Celia Badenas, PhD, Esteve Darwich, MD, and Carmen Herrero, MD

**Abstract:** Porphyrria cutanea tarda is the most frequent porphyria and occurs in both sporadic and familial forms. We conducted the current study in a series of 152 consecutive patients with porphyria cutanea tarda attending the Porphyrria Unit of the Hospital Clinic of Barcelona, Spain, to update the clinical manifestations of the disease and to study the sex differences, the proportion of familial forms, and the role of different risk factors in this population. Patients were classified as familial and sporadic cases according to erythrocyte uroporphyrinogen-decarboxylase activity and uroporphyrinogen-decarboxylase genotyping.

In our cohort, skin fragility and blisters on the hands were the most frequent clinical manifestations. Women more frequently had facial hypertrichosis (84.8%;  $p = 0.004$ ), affected areas other than the hands and face (33.3%;  $p = 0.008$ ), and pruritus (27.3%;  $p = 0.041$ ) compared with men. Of our patients, 11.8% did not present the typical clinical onset of the disease, with facial hypertrichosis and hyperpigmentation the more frequent complaints in these cases. Analysis of risk factors showed a high prevalence of hepatitis C virus infection (65.8%) and alcohol abuse (59.9%), both being more frequent in men ( $p < 0.001$ ). Hepatitis C virus infection was the only risk factor that showed differences between the sporadic and familial forms in the logistic regression model (odds ratio, 0.05; 95% confidence interval, 0.006–0.46).

In conclusion, atypical forms of presentation of porphyria cutanea tarda should be considered in order to prevent delayed diagnosis. We note the sustained role of hepatitis C virus infection in the precipitation of sporadic porphyria cutanea tarda. Therefore, in countries with a high prevalence of hepatitis C virus infection, the absence of such infection in a patient with porphyria cutanea tarda may suggest a possible familial case.

(*Medicine* 2010;89: 69–74)

**Abbreviations:** ALT = alanine aminotransferase, F-PCT = familial porphyria cutanea tarda, GGT = gamma-glutamyl transpeptidase, HBV = hepatitis B virus, HCl = hydrogen chloride, HCV = hepatitis C virus, HIV = human immunodeficiency virus, PCT = porphyria cutanea tarda, ROC = receiver operating characteristic, S-PCT = sporadic porphyria cutanea tarda, U/mgHb = coproporphyrinogen formed per hour per mg of hemoglobin, URO-D = uroporphyrinogen decarboxylase.

From the Departments of Dermatology (CMS, AG, ED, CH) and Biochemistry and Molecular Genetics (JTF, CB), Hospital Clinic, IDIBAPS, Universitat de Barcelona, Barcelona; and Institut Català de la Salut, SAP Santa Coloma de Gramenet (NM), Barcelona, Spain.

This study was supported by a grant in aid for scientific research from the Hospital Clinic of Barcelona (Premio Fi de Residència Emili Letang 2004) to Dr. Muñoz-Santos and by a grant from the Spanish Fondo de Investigación Sanitaria (FIS, PI06/0150) to Dr. To-Figueras.

Reprints: Dr. Carlos Muñoz-Santos, Department of Dermatology, Hospital Clinic, Universitat de Barcelona, 170 Villarroel Street, 08036. Barcelona, Spain (e-mail: carlosmunozsantos@gmail.com).

Copyright © 2010 by Lippincott Williams & Wilkins

ISSN: 0025-7974

DOI: 10.1097/MD.0b013e3181d50928

## INTRODUCTION

Porphyrria cutanea tarda (PCT), the commonest porphyria, is caused by the deficiency of the fifth enzyme in heme synthesis, uroporphyrinogen decarboxylase (URO-D), resulting in the accumulation of uroporphyrins in the skin and liver, producing delayed phototoxic skin reactions and asymptomatic chronic hepatopathy.<sup>25</sup> Skin lesions consist of tense blisters and fragile skin on light-exposed areas that heal slowly leaving atrophic scars and milia cysts. However, some patients may not have these characteristic lesions, potentially leading to delayed diagnosis, irreversible scarring, and liver damage.

PCT is a complex, multifactorial disorder with 2 main forms: sporadic PCT (S-PCT or type I, 80% of cases) and familial PCT (F-PCT or type II, 20% of cases). Both F-PCT and S-PCT manifest clinically only when hepatic URO-D activity is  $<30\%$ .<sup>10,25</sup> Heterozygous mutations in the URO-D gene (chromosome 1p34) that impair URO-D synthesis or degradation in all types of cells form the genetic substrate of F-PCT. However, heterozygous URO-D mutations reduce URO-D activity only by about 50%, meaning they are necessary, but not sufficient, to cause overt F-PCT.<sup>25</sup> This may explain the relatively high percentage of asymptomatic carriers of URO-D gene mutations.<sup>2</sup> As a result, additional genetic and environmental factors are necessary to induce F-PCT.<sup>6</sup> In S-PCT, reduced URO-D activity occurs only in the liver, by inhibition or inactivation of the hepatic enzyme due to such factors, which are the same for S-PCT and F-PCT and mainly include hemochromatosis gene mutations, hepatitis C virus (HCV) infection, human immunodeficiency virus (HIV) infection, estrogens, and high alcohol intake.<sup>25</sup> The distribution of these risk factors varies widely between populations. For example, HCV infection is much more common in PCT patients from Spain<sup>13</sup> or the United States<sup>5</sup> than in patients from Argentina<sup>19</sup> or Sweden.<sup>22</sup>

We conducted the current study to describe and compare the clinical manifestations, biochemical features, and risk factors of a cohort of 152 patients from Catalonia, Spain, with regard to sex and type of PCT (S-PCT and F-PCT). Our goal was to detect features that may help to prevent delayed diagnosis and to predict F-PCT in newly diagnosed cases.

## PATIENTS AND METHODS

### Patients

We included all PCT patients ( $n = 152$ ) who consecutively attended the Porphyrria Unit of the Hospital Clinic of Barcelona between 2004 and 2008. All patients were Spanish and lived in Catalonia (northeastern Spain), mainly in the Barcelona metropolitan area. PCT had been previously diagnosed in 113 patients (between 1977 and 2004), and was newly diagnosed in 39 patients (between 2004 and 2008). Written consent was obtained from each patient.

## Data Collection

We reviewed clinical histories to retrieve epidemiologic information (for example, alcohol intake and estrogen use), PCT signs and symptoms, age of disease onset, delay in diagnosis, and laboratory findings. A clinical index including 16 items was designed to assess the severity of PCT at diagnosis (Table 1). Each item scored 1 point when present. Laboratory results recorded at diagnosis included total urinary porphyrins; serologic testing for hepatitis B virus (HBV), HCV, and HIV; serum alanine aminotransferase (ALT), serum gamma-glutamyl transpeptidase (GGT), serum ferritin, and fasting glucose levels. URO-D erythrocyte activity, and URO-D and hemochromatosis gene mutations were analyzed between 2004 and 2008.

## Laboratory Methods

Total porphyrins were analyzed in a 24-hour urine collection by spectrofluorometry (model F-2000; Hitachi). Fifty  $\mu$ L of urine was diluted in 2.7 mL of hydrogen chloride (HCl) 2.7N, and fluorescence was estimated with excitation set at 398 nm and emission at 603 nm. A calibration curve was set with acid dilutions of a Coproporphyrin III standard (Porphyrin Products Inc, Logan, UT; 0.5  $\mu$ g/mL in 1 mol/L HCl). The reference value was <300 nmol/L.

Biochemical confirmation of PCT pattern of porphyrins and isomers in urine and feces was achieved by thin layer chromatography (113 patients diagnosed between 1977 and 2004) or reverse-phase high-performance liquid chromatography of urinary porphyrins according to Lim and Peters<sup>16</sup> (39 patients diagnosed between 2004 and 2008).

URO-D erythrocyte activity was measured in all patients as a screening method for F-PCT according to McManus et al<sup>18</sup> and was reported as pmoles of coproporphyrinogen formed per hour per mg of hemoglobin (U/mgHb). Patients with low or

borderline URO-D activity, according to a previously constructed receiver operating characteristic (ROC) curve and a cutoff point of 39 U/mgHb (Badenas et al<sup>2</sup>), were genotyped. Exons 1–10 of the UROD gene and the associated splice donor and acceptor sites were analyzed by polymerase chain reaction as described previously by our group.<sup>2</sup> Hemochromatosis gene mutations (C282Y and H63D) were analyzed as described by Toll et al.<sup>26</sup>

## Statistical Analysis

A descriptive analysis was performed on each variable. The bivariate analysis was performed using the chi-square, ANOVA, and Student t tests and the Pearson correlation. The final multivariate logistic regression analysis included the PCT form (S-PCT/F-PCT) as the dependent variable and several factors, such as HCV infection, sex, and alcohol abuse, as independent variables. The SPSS program (v12.0, SPSS Inc, Chicago, IL) was used, and the level of statistical significance was established as  $p < 0.05$ .

## RESULTS

### Clinical Features

Detailed clinical manifestations are shown in Table 1. There were 119 men (78.3%) (male to female ratio, 3.6:1). The mean age was 60 years (range, 24–86 yr). The mean age of clinical onset was 45 years (range, 20–74 yr). The onset of clinical symptoms occurred at age >55 years in 75% of patients. The mean delay in diagnosis was 19.9 months (range, 2–120 mo). The most frequent skin features at diagnosis were skin fragility (86.2%) and vesicles and bullae (78.3%) on the dorsa of the hands; 88.2% of patients presented with at least 1 such skin

**TABLE 1.** Detailed Clinical Features of 152 Patients With Porphyrria Cutanea Tarda

Characteristic	Total Patients No. (%)	Men No. (%)	Women No. (%)	P Value
No. of patients	152 (100)	119 (78.3%)	33 (21.7%)	
Mean age at onset (yr)	45.6 $\pm$ 12.6	45.9 $\pm$ 12.0	44.5 $\pm$ 13.0	NS
Skin fragility on hands	131 (86.2)	103 (86.6)	28 (84.8)	NS
Blisters on hands	119 (78.3)	96 (80.7)	23 (69.7)	NS
Facial hypertrichosis	97 (63.8)	69 (58)	28 (84.8)	0.004
Facial hyperpigmentation	64 (42.1)	48 (40.3)	16 (48.5)	NS
Milia cysts	50 (32.9)	38 (31.9)	12 (36.4)	NS
Dark urine	48 (31.6)	38 (31.9)	10 (30.3)	NS
Photosensitivity	44 (28.9)	36 (30.3)	8 (25.0)	NS
Facial skin fragility	34 (22.4)	31 (26.1)	3 (9.1)	0.039
Hyperpigmentation on hands	27 (17.8)	23 (19.3)	4 (12.1)	NS
Involvement of other areas*	27 (17.8)	16 (13.4)	11 (33.3)	0.008
Pruritus	24 (15.8)	15 (12.6)	9 (27.3)	0.041
Premature photoaging†	18 (11.8)	14 (11.8)	4 (12.1)	NS
Facial blisters	18 (11.8)	12 (10.1)	6 (18.2)	NS
Generalized hyperpigmentation	17 (11.2)	14 (11.8)	3 (9.1)	NS
Hypertrichosis on hands	8 (5.3)	6 (5)	2 (6.1)	NS
Sclerodermoid changes	2 (1.3)	1 (0.8)	1 (3)	NS
Mean clinical score (0–16)	4.92 $\pm$ 2.3	4.84 $\pm$ 2.4	5.21 $\pm$ 1.9	NS

Abbreviation: NS = not significant.

\*Involvement of other areas refers to typical signs of PCT (skin fragility or blistering) occurring in areas other than the hands and face.

†Premature photoaging includes either solar elastosis, cyst, and comedos or cutis rhomboidalis nuchae.

feature. The mean clinical score of all patients was 4.92 (range, 0–16), and 94% of patients had a score  $\geq 2$ .

Facial hypertrichosis (84.8% vs. 58%;  $p = 0.004$ ), involvement of areas other than the hands and head (33.3% vs. 13.4%;  $p = 0.008$ ), and pruritus (27.3% vs. 12.6%;  $p = 0.041$ ) were significantly more frequent in women than in men. Skin fragility on the face or scalp was significantly more frequent in men than in women (26.1% vs. 9.1%;  $p = 0.039$ ). Women had less delay in the diagnosis than men (15.8 vs. 20.9 mo) and a higher clinical score (5.21 vs. 4.84), although the differences were not significant.

**Atypical Cases**

Nine patients (5.9%) were diagnosed without presenting skin fragility or blistering. PCT was suspected due to raised transaminases and iron overload ( $n = 3$ ), generalized hyperpigmentation ( $n = 2$ ), or periorbital hypertrichosis with facial hyperpigmentation ( $n = 4$ ). The mean level of urinary porphyrins in these patients was significantly lower than in the rest of the cohort (1692 nmol/L vs. 3859 nmol/L;  $p = 0.03$ ).

These skin manifestations preceded skin fragility and blistering (mean, 16 mo; range, 3–48 mo) in 9 other patients. Four women were on oral contraceptives. When facial hypertrichosis appeared, they were misdiagnosed with hirsutism, which led their general practitioners to switch them to another contraceptive with a greater estrogen dose. Subsequently, they developed blisters and skin fragility on the dorsa of the hands and were diagnosed with PCT.

In these 18 patients with an atypical disease onset (11.8%), periorbital hypertrichosis was the first symptom in 7.9% of the whole cohort and in 25% of the women.

**Biochemical Data**

Mean total urinary porphyrin excretion at diagnosis was 3715 nmol/L (range, 343–19,476 nmol/L), with no significant differences according to sex or the presence or absence of specific risk factors. There was a significant correlation between

total urinary porphyrins and the clinical score at diagnosis (Pearson  $R^2 = 0.348$ ;  $p < 0.001$ ).

The mean ALT value was 96 U/L (range, 21–448; normal value, 5–40 U/L), and 90.7% of patients had raised values. In 54.5% of patients, of whom 96.3% were HCV-positive, liver transaminases remained elevated despite PCT treatment. Mean GGT was 109 U/L (range, 18–900; normal value, 5–40 U/L), with 82.6% of patients having elevated values at diagnosis. GGT mean values were significantly higher in HCV-positive patients compared to HCV-negative individuals (123.6 U/L vs. 80.4 U/L, respectively;  $p = 0.044$ ).

Serum ferritin was analyzed in 113 patients. The mean value was 520 ng/mL (range, 75–1421 ng/mL; normal values, 20–300 ng/mL in men; and 15–200 ng/mL in premenopausal women). Seventy-four percent of patients had elevated serum ferritin values, and 27% had persistent normal values despite having 1 or more disease relapses. Conversely, 32.5% always had elevated values despite treatment and clinical remission. Comparing serum ferritin at diagnosis according to sex or presence/absence of PCT risk factors showed no significant differences.

Mean fasting glucose was 110.7 mg/dL (range, 75–338; normal value, 65–110 mg/dL). Type 2 diabetes mellitus was diagnosed in 36 patients (23.7%) with basal glucose levels  $\geq 126$  mg/dL in 2 determinations. Eighteen additional patients (11.9%) had basal glycemic values between 110 and 125 mg/dL and were considered to have a prediabetic status.

**Risk Factors**

Table 2 shows the distribution of PCT risk factors according to sex. HCV infection was the most prevalent risk factor (65.8%), especially in men (76.5% of men vs. 27.3% of women;  $p < 0.001$ ). Hemochromatosis gene mutations C282Y and H63D were analyzed in 134 patients, of whom 64.9% carried at least 1 mutated allele: the most prevalent genotype was heterozygous H63D (40.3%), followed by homozygous H63D (10.4%), heterozygous C282Y (7.5%), and compound heterozygous C282Y/H63D (6.7%). No patient was homozygous for the

**TABLE 2.** Risk Factors in 152 Patients With PCT

Characteristic	Total Patients No. (%)	Men No. (%)	Women No. (%)	P Value
No. of patients	152 (100)	119 (78.3)	33 (21.7)	<0.001
HCV infection	100 (65.8)	91 (76.5)	9 (27.3)	<0.001
HFE mutation*	87 (64.9)	65 (61.3)	22 (78.6)	NS
C282Y/C282 genotype*	19 (14.2)	13 (12.3)	6 (21.4)	NS
Alcohol abuse	91 (59.9)	82 (68.9)	9 (27.3)	<0.001
URO-D mutation	25 (16.4)	11 (9.2)	14 (42.4)	<0.001
HIV infection	14 (9.2)	13 (10.9)	1 (3)	NS
Estrogen exposure†	12 (7.9)	0 (0)	12 (36.4)	<0.001
HBV infection	2 (1.3)	1 (8.4)	1 (3)	NS
Hemodialysis	2 (1.3)	1 (8.4)	1 (3)	NS
Only 1 risk factor*	18 (13.4)	13 (12.3)	5 (17.8)	NS
2 Risk factors*	60 (44.7)	48 (45.2)	12 (42.8)	NS
3 Risk factors*	53 (39.5)	43 (40.5)	10 (35.7)	NS

Abbreviations: See previous table.

\*HFE mutations available in 134 patients.

†Estrogen exposure reported only in women.

**TABLE 3.** Comparison Between Sporadic and Familial Porphyria Cutanea Tarda Groups

Characteristic	S-PCT No. (%)	F-PCT No. (%)	P Value
No. of patients	127	25	
Men	108 (85)	11 (44)	<0.001
Women	19 (15)	14 (56)	<0.001
Male to female ratio	5.7:1	0.8:1	<0.001
Mean age at onset (yr)	45.7	44.9	NS
Total urinary porphyrins (nmol/L)	3514	4674	NS
ALT (U/L)	94	105.2	NS
GGT (U/L)	115.6	75.4	NS
Serum ferritin (ng/mL)	530.7	454.4	NS
Basal glucose (mg/dL)	113.1	96.6	0.002
HCV infection	96 (75.6)	4 (16)	<0.001
HFE mutation*	73 (64.6)	13 (65)	NS
C282Y/C282 genotype*	15 (13.1)	4 (20)	NS
Alcohol abuse	81 (63.8)	10 (40)	0.027
HIV infection	14 (11)	0 (0)	NS
Estrogen exposure†	7 (38)	5 (35.7)	NS
HBV infection	1 (0.8)	1 (4)	NS
Hemodialysis	2 (1.6)	0 (0)	NS
Only 1 risk factor*‡	16 (14)	5 (25)	NS
2 Risk factors*‡	55 (48.2)	13 (65)	NS
3 Risk factors*‡	39 (34.2)	0 (0)	NS

Abbreviations: See previous tables.

\*HFE mutations available in 134 patients.

†Estrogen exposure reported only in women.

‡Not including URO-D mutations.

C282Y mutation. Alcohol abuse ( $\geq 50$  g/d) was acknowledged by almost 60% of patients (68.9% of men vs. 27.3% of women;  $p < 0.001$ ). Estrogens were an additional risk factor in 12 of 33 women (36.4%), with oral contraceptives being the source in 7 (58.3%). HIV infection was reported in 14 patients (9.2%). HBV infection and chronic hemodialysis were reported in only 2 patients respectively.

A total of 85.8% of patients had more than 1 putative risk factor for developing PCT, while 13.4% had only 1 factor. The most frequent risk factor combination was HCV infection plus high alcohol intake plus any hemochromatosis allelic mutation (24.6%), especially in men (30%). In women, risk factor patterns were more dispersed, with the combination of hemochromatosis gene mutations and estrogens (14.3%) being the most frequent.

### Familial PCT Compared With Sporadic PCT

Twenty-five (16.4%) patients harboring a mutation within the URO-D gene were classified as F-PCT (mean erythrocyte URO-D activity, 36.8 U/mgHb). The remaining 127 patients (83.6%) were classified as S-PCT (mean erythrocyte URO-D activity, 61.2 U/mgHb).

In Table 3 we compare epidemiologic, biochemical, and PCT risk factors in F-PCT and S-PCT patients. The male to female ratio was lower ( $p < 0.001$ ) in F-PCT than in S-PCT (0.8:1 vs. 5.7:1). The only significant difference between S-PCT and F-PCT with regard to skin features was a lower frequency of hand blisters in F-PCT (81.9% vs. 60%;  $p = 0.015$ , data not

shown). There were no significant differences in the age of onset. Mean fasting glucose was lower in F-PCT (96.6 mg/dL vs. 113 mg/dL;  $p = 0.002$ ). HCV infection (16% vs. 75.6%;  $p < 0.001$ ) and alcohol abuse (40% vs. 63.8%;  $p = 0.027$ ) were less frequent in F-PCT patients. Of the F-PCT patients, 90% had at least 1 other risk factor (besides URO-D mutations); the main pattern was the combination of high alcohol intake and hemochromatosis gene mutations (35%).

Applying different logistic regression models to predict F-PCT cases showed only 1 significant association: the absence of HCV infection (odds ratio, 0.05; 95% confidence interval, 0.006–0.46).

### DISCUSSION

We present one of the largest reported series of PCT patients, with special emphasis on the clinical manifestations and differences between S-PCT and F-PCT. PCT mostly presented in the fourth or fifth decade of life with skin fragility and blisters on photo-exposed areas, particularly the dorsa of the hands, consistent with the findings of the seminal paper by Grossman et al<sup>12</sup> in 1979 that included 40 patients studied between 1960 and 1976. However, the clinical profile of PCT may have changed slightly in recent decades: some manifestations described by Grossman et al,<sup>12</sup> such as scleroderma-like changes (18%) or scarring alopecia (33%), were hardly found in our series, perhaps due to earlier diagnosis (even though our delay in diagnosis was 20 months). We believe that is a relevant issue, since PCT reviews<sup>3,23</sup> and medical textbooks continue to reference the results of Grossman et al when describing the prevalence of PCT cutaneous features, which might be inaccurate for the current state of PCT. There is a lack of reports providing a detailed analysis of the clinical manifestations of PCT and comparing PCT in men and women.

Periorbital hypertrichosis was more prevalent in women and as frequent as skin fragility on the dorsa of the hands. Women presented more involved skin areas and more pruritus than men, possibly due to clothes that protect fewer areas from sunlight. Skin fragility on the face or head was significantly more prevalent in men, probably due to beard shaving and androgenetic alopecia.

Eighteen "atypical" patients did not report skin fragility or blisters as the initial PCT sign (50%) or never developed them (50%). Facial hypertrichosis with facial hyperpigmentation (12 patients, 7.9%) and generalized hyperpigmentation (3 patients, 2%) were initial or isolated features of PCT in our cohort. Some experts suggest that hypertrichosis is rarely a debut sign of PCT,<sup>11</sup> and indeed it was the first sign in only 2 reported cases.<sup>4,21</sup> However, in the current series, periorbital hypertrichosis was the initial sign in 25% of women (usually associated with facial hyperpigmentation). Most of these women developed typical skin manifestations after exposure to estrogens, usually after being misdiagnosed with hirsutism. As for generalized hyperpigmentation, we could find only 1 case in the literature where this feature was the earliest cutaneous manifestation of PCT.<sup>20</sup> Physicians should therefore be aware of these PCT presentations, which may be more common than previously suggested.

Three of the 18 atypical cases were totally asymptomatic, but presented with iron overload and increased transaminases and GGT. We suggest urinary porphyrin screening in any patient presenting with iron overload and abnormal liver test function, regardless of HCV status. Atypical cases that were diagnosed without presenting skin fragility and blisters had lower mean levels of urinary porphyrins than stereotypical cases. As the



urinary level of porphyrins mirrors tissue deposits of porphyrins, our results suggest that full-blown PCT may develop only when a critical amount of porphyrins is reached in the skin. Furthermore, we found a significant positive correlation between total urinary porphyrin excretion and a 16-item clinical score index in the whole cohort.

Most patients presented with raised levels of serum ALT (91%) and GGT (82%). GGT values were significantly higher in HCV-positive patients than in HCV-negative patients. As we found in a different cohort,<sup>13</sup> most HCV-positive patients did not normalize liver transaminases after PCT treatment, suggesting that liver changes in PCT patients with concomitant HCV infection are chiefly related to HCV and not to PCT. Serum ferritin was elevated in most patients (74%) but did not parallel clinical activity and was not associated with any specific risk factor.

We studied the prevalence of well-known risk factors. Most patients had at least 2 putative risk factors for developing PCT, with a high prevalence of HCV infection (65.8%) and alcohol abuse (59.9%). Almost 50% of patients (58.5% of men) had these 2 factors simultaneously. In women, URO-D gene mutations (42.4%) and estrogen exposure (36.4%) were the most frequent risk factors.

Few studies have compared F-PCT and S-PCT patients.<sup>1,8,9,14,24</sup> To our knowledge, only 1 study analyzed clinical features,<sup>8</sup> and others did not confirm possible F-PCT cases by URO-D genotyping.<sup>9,14,24</sup> The frequency of F-PCT in our patients (16.4%) was slightly lower than the reported 24% in Danish<sup>8</sup> or 53% in Norwegian patients,<sup>1</sup> probably due to the higher prevalence of HCV in Spain.<sup>7,13</sup>

It is generally established that patients with F-PCT develop overt clinical manifestations earlier than patients with S-PCT.<sup>1,11</sup> Furthermore, higher values of total urine porphyrin excretion<sup>8</sup> and liver porphyrin crystals<sup>24</sup> are reported in F-PCT, suggesting more severe URO-D deficiency. However, we found no significant differences in the age of disease onset, severity of skin manifestations, or total urine porphyrin levels between F-PCT and S-PCT patients. In the bivariate analysis, F-PCT patients had a lower frequency of hand blisters, HCV infection, alcohol abuse, and male sex; and had lower mean fasting glucose. However, in the multivariate analysis, the only factor that remained predictive for F-PCT was negativity for HCV infection, in contrast to the results of Aarsand et al,<sup>1</sup> who found that younger age at diagnosis, male sex, high uroporphyrin to heptaporphyrin ratio, and low alcohol consumption were predictors of F-PCT in Norwegian patients.

A total of 35.6% of patients had diabetes mellitus (23.7%) or prediabetes status (11.9%), an association observed in varying frequency in other reports,<sup>12,15,17,19,22</sup> although its pathogenetic significance remains unclear. Although we did not find significant differences in the diabetes prevalence between patients with both types of PCT (data not shown), the higher mean fasting glucose in S-PCT patients suggests that impaired glucose metabolism could be linked to some factor overrepresented in the S-PCT group.

In conclusion, in the current study we characterize the clinical and biochemical features of a cohort of 152 Spanish PCT patients with regard to sex, and describe atypical cases that might help to prevent misdiagnosis. Although F-PCT features may vary geographically, we believe that our predictive model could be applied to other countries with a high prevalence of HCV infection. We suggest checking for URO-D erythrocyte activity in any HCV-negative PCT patient from these countries, in order to detect hereditary cases and to prevent the development of clinical manifestations of PCT in asymptomatic familial carriers by avoidance of risk factors.

## REFERENCES

1. Aarsand AK, Boman H, Sandberg S. Familial and sporadic porphyria cutanea tarda: characterization and diagnostic strategies. *Clin Chem*. 2009;55:795–803.
2. Badenas C, To-Figueras J, Phillips JD, Warby CA, Munoz C, Herrero C. Identification and characterization of novel uroporphyrinogen decarboxylase gene mutations in a large series of porphyria cutanea tarda patients and relatives. *Clin Genet*. 2009;75:346–353.
3. Bleasel NR, Varigos GA. Porphyria cutanea tarda. *Australas J Dermatol*. 2000;41:197–206.
4. Boffa MJ, Reed P, Weinkove C, Ead RD. Hypertrichosis as the presenting feature of porphyria cutanea tarda. *Clin Exp Dermatol*. 1995;20:62–64.
5. Bonkovsky HL, Poh-Fitzpatrick M, Pimstone N, Obando J, Di Bisceglie A, Tattre C, Tortorelli K, LeClair P, Mercurio MG, Lambrecht RW. Porphyria cutanea tarda, hepatitis C, and HFE gene mutations in North America. *Hepatology*. 1998;27:1661–1669.
6. Brady JJ, Jackson HA, Roberts AG, Morgan RR, Whatley SD, Rowlands GL, Darby C, Shudell E, Watson R, Paiker J, Worwood MW, Elder GH. Co-inheritance of mutations in the uroporphyrinogen decarboxylase and hemochromatosis genes accelerates the onset of porphyria cutanea tarda. *J Invest Dermatol*. 2000;115:868–874.
7. Bruguera M, Forns X. [Hepatitis C in Spain.] *Med Clin (Barc)*. 2006;127:113–117.
8. Bygum A, Christiansen L, Petersen NE, Horder M, Thomsen K, Brandrup F. Familial and sporadic porphyria cutanea tarda: clinical, biochemical and genetic features with emphasis on iron status. *Acta Derm Venereol*. 2003;83:115–120.
9. Cruz-Rojo J, Fontanellas A, Moran-Jimenez MJ, Navarro-Ordóñez S, García-Bravo M, Mendez M, Muñoz-Rivero MC, de Salamanca RE. Precipitating/aggravating factors of porphyria cutanea tarda in Spanish patients. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2002;48:845–852.
10. Elder GH. Porphyria cutanea tarda. *Semin Liver Dis*. 1998;18:67–75.
11. Elder GH. Porphyria cutanea tarda and related disorders. In: Kadish KM, Smith KM, Guillard R, eds. *The Porphyrin Handbook: Medical Aspects of Porphyria*. Vol 14. San Diego, CA: Academic Press; 2003:67–92.
12. Grossman ME, Bickers DR, Poh-Fitzpatrick MB, Deleo VA, Harber LC. Porphyria cutanea tarda. Clinical features and laboratory findings in 40 patients. *Am J Med*. 1979;67:277–286.
13. Herrero C, Vicente A, Bruguera M, Ercilla MG, Barrera JM, Vidal J, Teres J, Mascaro JM, Rodes J. Is hepatitis C virus infection a trigger of porphyria cutanea tarda? *Lancet*. 1993;341:788–789.
14. Koszo F, Morvay M, Dobozy A, Simon N. Erythrocyte uroporphyrinogen decarboxylase activity in 80 unrelated patients with porphyria cutanea tarda. *Br J Dermatol*. 1992;126:446–449.
15. Lamón JM, Frykholm BC. Pregnancy and porphyria cutanea tarda. *Johns Hopkins Med J*. 1979;145:235–237.
16. Lim CK, Peters TJ. Urine and faecal porphyrin profiles by reversed-phase high-performance liquid chromatography in the porphyrias. *Clin Chim Acta*. 1984;139:55–63.
17. Lundvall O, Weinfeld A, Lundin P. Iron storage in porphyria cutanea tarda. *Acta Med Scand*. 1970;1–2:37–53.
18. McManus J, Blake D, Ratnaik S. An assay of uroporphyrinogen decarboxylase in erythrocytes. *Clin Chem*. 1988;34:2355–2357.
19. Mendez M, Rossetti MV, Battlle AMDC, Parera VE. The role of inherited and acquired factors in the development of porphyria cutanea tarda in the Argentinean population. *J Am Acad Dermatol*. 2005;52:417–424.

20. Pascual C, Garcia-Patos V, Bartralot R, Pedragosa R, Capdevila M, Barbera J, Castells A. Cutaneous pigmentation, only manifestation of porphyria cutanea tarda in a HIV-1 positive patient. *Ann Dermatol Venereol*. 1996;123:262–264.
21. Ramsay CA, Magnus IA, Turnbull A, Baker H. The treatment of porphyria cutanea tarda by venesection. *Q J Med*. 1974;43:1–24.
22. Rossmann-Ringdahl I, Olsson R. Porphyria cutanea tarda in a Swedish population: risk factors and complications. *Acta Derm Venereol*. 2005;85:337–341.
23. Sarkany RP. The management of porphyria cutanea tarda. *Clin Exp Dermatol*. 2001;26:225–232.
24. Siersema PD, Rademakers LH, Cleton MI, ten Kate FJ, de Bruijn WC, Marx JJ, Wilson JH. The difference in liver pathology between sporadic and familial forms of porphyria cutanea tarda: the role of iron. *J Hepatol*. 1995;23:259–267.
25. Thunell S, Harper P. Porphyrins, porphyrin metabolism, porphyrias. III. Diagnosis, care and monitoring in porphyria cutanea tarda—suggestions for a handling programme. *Scand J Clin Lab Invest*. 2000;60:561–579.
26. Toll A, Celis R, Ozalla MD, Bruguera M, Herrero C, Ercilla MG. The prevalence of HFE C282Y gene mutation is increased in Spanish patients with porphyria cutanea tarda without hepatitis C virus infection. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2006;20:1201–1206.





## **V.1- Resultados detallados de primera fase del estudio**

### **V.1.1- Características clínicas**

Las manifestaciones clínicas en detalle se muestran en la **Tabla 1**.

De los 152 pacientes 119 eran hombres (78.3%) y 33 eran mujeres (razón hombre-mujer de 3.6 a 1). La edad media de los pacientes en el momento del estudio fue de 60 años (rango: 24-86). La edad media de inicio de los síntomas de PCT fue de 45 años (rango: 20-74). El inicio de los síntomas se produjo a partir de los 55 años en más del 75% de los pacientes. El retraso medio en el diagnóstico de la porfiria fue de 19.9 meses (rango: 2-120).

Las manifestaciones clínicas más frecuentes fueron la fragilidad cutánea (86.2%) y las vesículas y ampollas (78.3%) en el dorso de las manos; 88.2% de los pacientes se presentaron con al menos uno de estos signos clínicos. La puntuación clínica media fue de 4.92 (rango: 0-16) y el 94% de los pacientes tenían una puntuación mínima igual o superior a 2 (al menos 2 signos o síntomas).

La hipertrichosis facial (84.8% vs. 58%,  $p=0.004$ ), la afectación de áreas diferentes a las manos o la cabeza (33.3% vs. 13.4%,  $p=0.008$ ) y la presencia de prurito (27.3% vs. 12.6%,  $p=0.041$ ) fueron significativamente más frecuentes en las mujeres que en los hombres. La fragilidad cutánea de la cara o el cuero cabelludo fue significativamente más frecuente en los hombres (26.1% vs. 9.1%,  $p=0.039$ ). Las mujeres presentaron un menor retraso en el diagnóstico (15.8 vs 20.9 meses) y una mayor puntuación clínica que los hombres (5.21 vs. 4.84), pero estas diferencias no fueron estadísticamente significativas.

**Tabla 1.** Manifestaciones clínicas detalladas de 152 pacientes con porfiria cutánea tarda, ordenadas por frecuencia y clasificadas por sexo (porcentajes entre paréntesis). NS = No significativo ( $p > 0,05$ )

	<b>Total pacientes (N=152)</b>	<b>Hombres n=119 (78.3)</b>	<b>Mujeres n=33 (21.7)</b>	<b>valor P</b>
<b>Edad diagnóstico (años, media+-SD)</b>	45.6 +/-12.6	45.9+/-12.0	44.5+/- 13.0	NS
<b>Fragilidad cutánea manos</b>	131 (86.2)	103 (86.6)	28 (84.8)	NS
<b>Ampollas en manos</b>	119 (78.3)	96 (80.7)	23 (69.7)	NS
<b>Hipertrichosis facial</b>	97 (63.8)	69 (58)	28 (84.8)	0.004
<b>Hiperpigmentación facial</b>	64 (42.1)	48 (40.3)	16 (48.5)	NS
<b>Quistes miliares</b>	50 (32,9)	38 (31.9)	12 (36.4)	NS
<b>Coluria</b>	48 (31.6)	38 (31.9)	10 (30.3)	NS
<b>Fotosensibilidad</b>	44 (28.9)	36 (30.3)	8 (25.0)	NS
<b>Fragilidad cutánea facial</b>	34 (22,4)	31 (26.1)	3 (9.1)	0.039
<b>Hiperpigmentación manos</b>	27 (17.8)	23 (19.3)	4 (12.1)	NS
<b>Afectación de otras áreas*</b>	27 (17.8)	16 (13.4)	11 (33.3)	0.008
<b>Prurito</b>	24 (15.8)	15 (12.6)	9 (27.3)	0.041
<b>Daño actínico prematuro**</b>	18 (11.8)	14 (11.8)	4 (12.1)	NS
<b>Ampollas faciales</b>	18 (11.8)	12 (10.1)	6 (18.2)	NS
<b>Hiperpigmentación generalizada</b>	17 (11.2)	14 (11.8)	3 (9.1)	NS
<b>Hipertrichosis manos</b>	8 (5.3)	6 (5)	2 (6.1)	NS
<b>Cambios esclerodermiformes</b>	2 (1.3)	1 (0.8)	1 (3)	NS
<b>Puntuación clínica media (0-16)***</b>	4.92 +/- 2.3	4.84 +/- 2.4	5.21 +/- 1.9	NS

\*Se refiere a los signos típicos de la PCT (fragilidad-ampollas) en áreas diferentes al dorso de manos y cabeza-cara. \*\*Incluye signos de elastosis solar, quistes y comedones y el *cutis rhomboidalis nuchae*. \*\*\*Puntuación obtenida sumando un punto por cada uno de los 16 síntomas o signos de la tabla

### **V.1.2- Diagnóstico de casos atípicos (Tabla 2)**

En 18 pacientes la sintomatología clínica inicial no fue la típica.

Nueve pacientes (5.9%) fueron diagnosticados de PCT sin haber presentado nunca fragilidad cutánea o ampollas. La enfermedad se sospechó en estos casos por los siguientes signos: 1) hipertrichosis periorbitaria con hiperpigmentación facial (n=4), 2) aumento de transaminasas y sobrecarga férrica (n=3) o 3) hiperpigmentación generalizada (n=2). El valor medio de las porfirinas urinarias en el momento del diagnóstico en estos 9 pacientes fue significativamente más bajo que en el resto de la cohorte (1692 nmol/L vs. 3859 nmol/L; p=0.03). El diagnóstico y tratamiento precoz en estos casos evitó el desarrollo de la sintomatología de forma completa.

En otros 9 pacientes, la sintomatología clínica inicial se presentó en forma de hipertrichosis periorbitaria e hiperpigmentación facial, pero posteriormente acabaron desarrollando fragilidad y ampollas, tras una media de 16 meses (rango: 3-48), momento en el que se realizó el diagnóstico. De estos 9 pacientes, 4 eran mujeres en tratamiento con anticonceptivos orales. Cuando les apareció la hipertrichosis facial fueron diagnosticadas de hirsutismo y se les cambió el anticonceptivo a uno de mayor dosis estrógena. Posteriormente a este cambio presentaron la clínica típica y florida de PCT haciéndose finalmente el diagnóstico.

En el global de estos 18 casos atípicos (sin fragilidad o ampollas al debut, 11.8% del total), la hipertrichosis periorbitaria fue el primer síntoma en 7.9% del total de la cohorte y en el 25% del total de mujeres.

**Tabla 2.** Resumen de las características de los casos atípicos (n=18)

<b>Nº paciente/ sexo</b>	<b>Primer síntoma</b>	<b>Fragilidad y/o ampollas</b>	<b>Factores de riesgo PCT</b>	<b>Porfirinas urinarias al diagnóstico (nmol/24h)</b>
<b>1 / Varón</b>	Asintomático	Nunca	Mutación UROD Alcohol heterocigoto C282Y	639
<b>2 / Varón</b>	Asintomático	Nunca	Infección VHC Alcohol heterocigoto H63D	1199
<b>3 / Varón</b>	Asintomático	Nunca	Infección VHC Homocigoto H63D	2887
<b>4 / Varón</b>	Quistes y comedones faciales Hiperpigmentación generalizada	Nunca	Alcohol Heterocigoto H63D	557
<b>5 / Varón</b>	Hiperpigmentación generalizada	Nunca	Infección VHC Alcohol	635
<b>6 / Varón</b>	Hipertriosis e hiperpigmentación facial	Nunca	Infección VHC Homocigoto H63D	1180
<b>7 / Varón</b>	Hipertriosis e hiperpigmentación facial	Nunca	Infección VHC Alcohol	1991
<b>8 / Mujer</b>	Hipertriosis e hiperpigmentación facial	Nunca	Alcohol Heterocigoto H63D	286
<b>9 / Mujer</b>	Hipertriosis e hiperpigmentación facial	Nunca	Estrogenos Heterocigoto compuesto HFE	959
<b>10 / Varón</b>	Hiperpigmentación generalizada	Varios años después	Infección VIH Alcohol	1306

**Tabla 2.** Resumen de las características de los casos atípicos (n=18).

(Continuación).

<b>Nº paciente/ sexo</b>	<b>Primer síntoma</b>	<b>Fragilidad y/o ampollas</b>	<b>Factores de riesgo PCT</b>	<b>Porfirinas urinarias al diagnóstico (nmol/24h)</b>
<b>11 / Varón</b>	Hipertricosis e hiperpigmentación facial	1 año después	Infección VIH	1023
<b>12 / Mujer</b>	Hipertricosis facial	1 año después	Estrógenos Heterocigoto H63D	3436
<b>13 / Mujer</b>	Hipertricosis e hiperpigmentación facial	6 meses después	Alcohol	1060
<b>14 / Mujer</b>	Hipertricosis e hiperpigmentación facial	No disponible	Alcohol H63D Heterocigoto	523
<b>15 / Varón</b>	Hipertricosis facial y fotosensibilidad	Varios años después	Infección VHC y VIH	380
<b>16 / Mujer</b>	Hipertricosis e hiperpigmentación facial	9 meses después	Estrógenos Heterocigoto H63D	9107
<b>17 / Mujer</b>	Hipertricosis e hiperpigmentación facial	3 meses después	Estrógenos Heterocigoto H63D	1071
<b>18 / Mujer</b>	Hipertricosis facial	4 meses después	Mutación UROD Estrógenos Homocigoto H63D	3156

### **V.1.3- Datos bioquímicos**

Los datos bioquímicos son los correspondientes al momento del diagnóstico, previos a realizar cualquier procedimiento terapéutico.

La excreción total media de porfirinas en orina fue de 3715 nmol/L (rango: 343-19476 nmol/L), sin diferencias significativas entre sexos o en relación a la presencia o ausencia de factores de riesgo específicos. Se encontró una correlación positiva significativa entre las porfirinas urinarias totales y la puntuación clínica al diagnóstico (Pearson  $R^2 = 0.348$ ;  $p < 0.001$ ).

Los valores medios de ALT fueron de 96 U/L (rango: 21-448, valores normales: 5-40 U/L) y el 90.7% de los pacientes tenían valores elevados. En el 54.5% de los pacientes, de los cuales el 96.3% eran positivos para el VHC, las transaminasas permanecieron elevadas a pesar del tratamiento de la PCT. Un 82,6% de los pacientes presentaron valores elevados de GGT, con valores medios de 109 U/L (rango: 18-900, valores normales: 5-40 U/L. Estos valores fueron significativamente más altos en los pacientes infectados por VHC (123.6 vs. 80.4,  $p=0.044$ ).

La ferritina sérica se pudo determinar en 113 pacientes. El valor medio fue de 520 ng/mL (rango: 75-1421 ng/mL, valores normales: 20-300 ng/mL en hombres y mujeres postmenopáusicas y 15-200 ng/mL en mujeres premenopáusicas). 74% de los pacientes presentaron cifras de ferritina sérica elevada al diagnóstico. 27% de los pacientes siempre tuvieron cifras normales, tanto en el momento del diagnóstico como en el seguimiento y a pesar de presentar recaídas de la enfermedad, mientras que un 32.5% de los pacientes siempre mantuvieron cifras elevadas de ferritina en el seguimiento, incluso en periodos de remisión de la porfiria. La comparación de las cifras de ferritina al diagnóstico de acuerdo al sexo o presencia/ausencia de los diferentes factores de riesgo no mostró diferencias significativas.

La glucemia basal media fue de 110.7 mg/dL (rango: 75-338, valores normales: 65-110 mg/dL). Según los criterios de la Asociación Americana de Diabetes (ADA) de 1997, 36 pacientes (23.7%) fueron diagnosticados de diabetes mellitus tipo 2 (glucemia basal  $\geq$  126 mg/dL) y 18 pacientes (11.9%) se consideró que presentaban una glucemia en ayunas alterada (IFG, glucemia basal entre 110 y 125 mg/dl).



#### **V.1.4- Factores de riesgo de PCT**

La **Tabla 3** muestra la distribución de los factores de riesgo de PCT de acuerdo con el sexo.

La infección por VHC fue el factor de riesgo más frecuente (65.8%), especialmente entre los hombres (76.5% vs. 27.3% en las mujeres,  $p < 0.001$ ).

Las mutaciones en el gen HFE de la hemocromatosis (C282Y y H63D) fueron analizadas en 134 pacientes, presentando el 64.9% de ellos al menos un alelo mutado. El genotipo más frecuente fue el heterocigoto para H63D (40.3%), seguido por el homocigoto para H63D (10.4%), heterocigoto para C282Y (7.5%) y finalmente el heterocigoto compuesto C282Y-H63D (6.7%). No se detectó ningún paciente homocigoto para C282Y. Esto supone que el 14,2% de los pacientes presentaba al menos un alelo mutado para C282Y.

El abuso de alcohol ( $\geq 50$  g/día) fue reconocido por casi el 60% de los pacientes, sobretodo los hombres (68.9% vs. 27.3% de mujeres;  $p < 0.001$ ).

Los estrógenos fueron otro factor de riesgo adicional en 12 de las 33 mujeres (36.4%), siendo los anticonceptivos orales la causa en 7 mujeres (58.3%). La infección por el VIH fue descrita en 14 pacientes (9.2%).

La infección por el VHB y hemodiálisis crónica fueron descritas solo en 2 pacientes respectivamente.

El 85.8% de los pacientes tenía más de un factor de riesgo para desarrollar PCT y solo el 13.4% tenía un único factor reconocible. La combinación más frecuente de factores de riesgo fue la de VHC + abuso de alcohol + algún alelo mutado del gen HFE de la hemocromatosis (24.6% del total, en hombres: 30%). En las mujeres estas distribuciones eran más dispersas, predominando la combinación de mutaciones en el gen de la hemocromatosis y la ingesta de estrógenos (14.3%).

**Tabla 3.** Prevalencia de factores de riesgo en 152 pacientes españoles con PCT y comparación entre sexos (porcentajes entre paréntesis).

NS = No significativo ( $p > 0,05$ )

	<b>Total pacientes</b>	<b>Hombres</b>	<b>Mujeres</b>	<b>Valor p</b>
<b>Número de pacientes</b>	152 (100)	119 (78.3)	33 (21.7)	<0.001
<b>Infección VHC</b>	100 (65.8)	91 (76.5)	9 (27.3)	<0.001
<b>Mutaciones gen HFE*</b>	87 (64.9)*	65 (61.3)*	22 (78.6)*	NS
<b>Genotipo HFE (C282Y)**</b>	19 (14.2)*	13 (12.3)*	6 (21.4)*	NS
<b>Abuso de alcohol (&gt; 50 gr/día)</b>	91 (59.9)	82 (68.9)	9 (27.3)	<0.001
<b>Mutaciones gen UROD</b>	25 (16.4)	11 (9.2)	14 (42.4)	<0.001
<b>Infección HIV</b>	14 (9.2)	13 (10,9)	1 (3)	NS
<b>Exposición a estrógenos***</b>	12 (7.9)	0 (0)	12 (36.4)	<0.001
<b>Infección VHB</b>	2 (1.3)	1 (8.4)	1 (3)	NS
<b>Hemodiálisis</b>	2 (1.3)	1 (8.4)	1 (3)	NS
<b>Solo 1 factor de riesgo*</b>	18 (13.4)*	13 (12.3)*	5 (17.8)*	NS
<b>2 factores de riesgo*</b>	60 (44.7)*	48 (45.2)*	12 (42.8)*	NS
<b>3 factores de riesgo*</b>	53 (39.5)*	43 (40.5)*	10 (35.7)*	NS

\* Mutaciones gen HFE disponibles en 134 pacientes.

\*\* Se muestran los pacientes con al menos un alelo mutado para la mutación C282Y.

\*\*\* La exposición a estrógenos solo fue descrita en mujeres.

## **V.1.5- PCT familiar versus PCT esporádica**

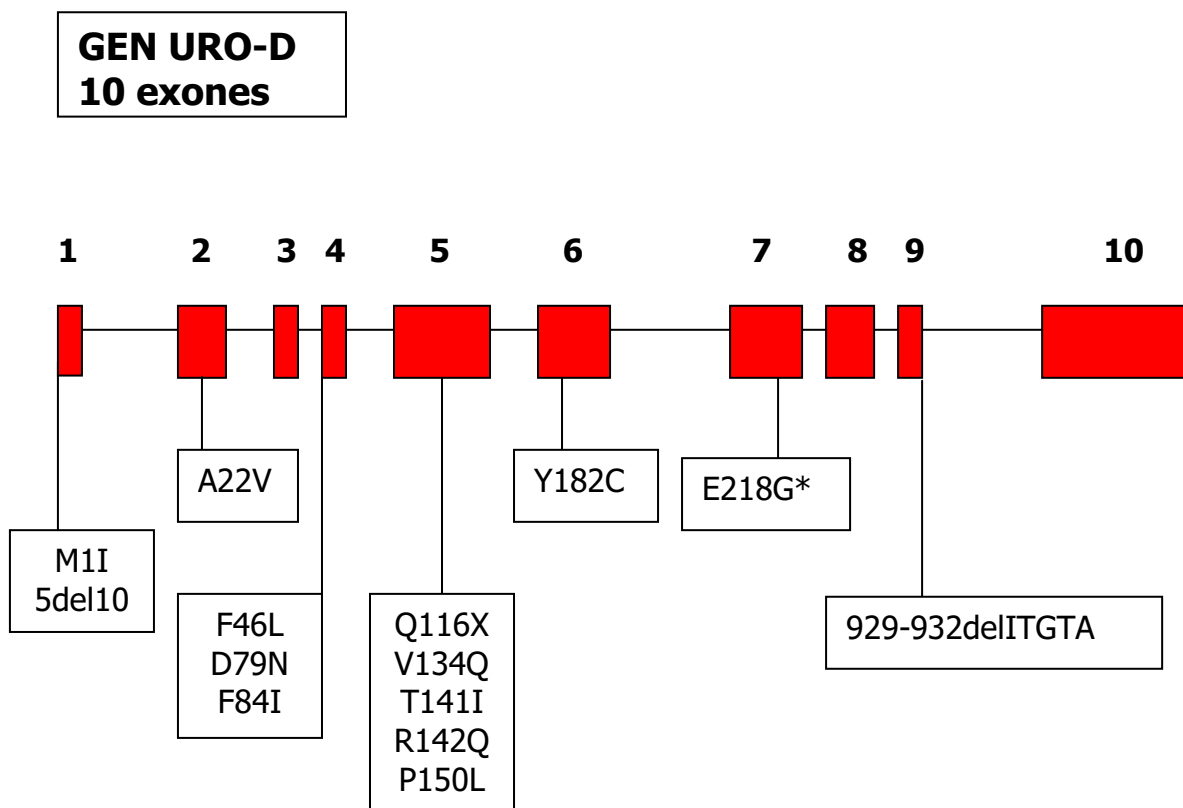
### **1. Frecuencia de F-PCT**

La actividad de la URO-D en eritrocitos fue determinada en todos los pacientes con PCT (N=152). La identificación y realización del genotipado del gen URO-D se realizó según el trabajo de Badenas y cols.<sup>4</sup> (Ver sección de **Metodología** y **Anexo** final).

Gracias a estos análisis enzimáticos y genéticos, 25 pacientes (16.4%) fueron clasificados como casos de F-PCT debido a la presencia de mutaciones en el gen de la URO-D. Estos pacientes presentaban una actividad enzimática eritrocitaria media de 36.8 U/mgHb. Los restantes 127 pacientes (83.6%) fueron clasificados como S-PCT, presentando una actividad enzimática eritrocitaria media de 61.2 U/mgHb.

En la **Figura 3** y la **tabla 4** se resumen las principales mutaciones encontradas en este gen (10 exones). La mutación más frecuente en nuestra cohorte es la E218G, situada en el exón 7, y el exón con más mutaciones fue el 5. A pesar de haber encontrado 5 pacientes con la mutación E218G, los resultados globales muestran una gran heterogeneidad genética de los casos familiares, con 14 mutaciones diferentes en 25 pacientes. La mayoría de mutaciones eran cambios puntuales de nucleótidos (*missense mutation*) y solo 2 eran delecciones. 8 de estas mutaciones no habían sido descritas previamente.

**Figura 3.** Esquema del gen de la URO-D (10 exones) y principales mutaciones encontradas. \* Mutación más frecuente.



**Tabla 4.** Resumen de las 14 mutaciones encontradas en el gen URO-D.

<b>Mutación</b>	<b>Exon</b>	<b>Posición nucleótido</b>	<b>Nº casos</b>
M1I	1	3G>A	1
5del10	1	5	2
A22V	2	65C>T	1
F46L	4	138T>I	2
D79N	4	235G>A	2
F84I	4	250T>A	1
Q116X	5	346C>T	1
V134Q	5	399-401TGC>CCA	2
T141I	5	422C>T	1
R142Q	5	425G>A	2
P150L	5	449C>T	1
Y182C	6	645A>G	1
E218G	7	653A>G	5
929-932delITGTA	9	929	3

## **2. Comparación entre F-PCT y S-PCT**

En la **Tabla 5** se comparan los datos epidemiológicos, bioquímicos y factores de riesgo entre el grupo de F-PCT y el S-PCT.

La S-PCT es mucho más frecuente en varones, mientras que las mujeres constituyen el 50% de la forma familiar, es por esto que la razón hombre-mujer fue más baja en el grupo familiar que en el esporádico (0.8:1 *vs.* 5.7:1,  $p < 0.001$ ).

En cuanto a la sintomatología clínica, la única diferencia que encontramos entre los dos grupos fue una menor prevalencia de ampollas en las manos en el grupo familiar (81.9% *vs.* 60%,  $p = 0.015$ , datos no mostrados en la tabla). No hubo diferencias significativas en cuanto a la edad de inicio de los síntomas en los dos grupos.

La glucosa media basal fue superior en el grupo de S-PCT (113 mg/dL *vs.* 96.6 mg/dL.,  $p = 0.002$ ). Sin embargo, la prevalencia de infección por VHC (16% *vs.* 75.6%;  $p < 0.001$ ) y el abuso de alcohol (40% *vs.* 63.8%;  $p = 0.027$ ), fueron inferiores en el grupo familiar, probablemente en relación a la menor frecuencia de varones en este grupo.

Los factores de riesgo inciden de una manera similar en la forma familiar y en la esporádica. El 90% de los pacientes del grupo F-PCT tenían al menos otro factor de riesgo reconocible para desarrollar PCT (además de la propia mutación en el gen de la URO-D) y la combinación de factores de riesgo más frecuente en este grupo fue la presencia de algún alelo mutado en el gen HFE de la hemocromatosis y el abuso del alcohol (35% de estos pacientes)

### **3. Factores predictivos de formas familiares**

Tras la aplicación de diferentes modelos de regresión logística para predecir casos de F-PCT, el análisis multivariante mostró solamente una asociación significativa: la ausencia de infección por VHC (OR: 0.05, 95% CI [0.006-0.46]).



**Tabla 5.** Comparación entre los pacientes con formas familiares (F-PCT) y esporádicas de PCT (S-PCT). NS = No significativo ( $p > 0,05$ )

	<b>S-PCT n=127</b>	<b>F-PCT n=25</b>	<b>Valor P</b>
<b>Hombres</b>	108 (85)	11 (44)	<0.001
<b>Mujeres</b>	19 (15)	14 (56)	<0.001
<b>Razón hombre/mujer</b>	5.7/1	0.8/1	<0.001
<b>Edad de inicio (años)</b>	45.7	44.9	NS
<b>Porfirinas totales orina (nmol/L)</b>	3514	4674	NS
<b>ALT (U/L)</b>	94	105.2	NS
<b>GGT (U/L)</b>	115.6	75.4	NS
<b>Ferritina sérica (ng/mL)</b>	530.7	454.4	NS
<b>Glucemia basal (mg/dL)</b>	113.1	96.6	0 .002
<b>Infección VHC</b>	96 (75.6)	4 (16)	<0.001
<b>Mutaciones gen HFE*</b>	73 (64.6)*	13 (65)*	NS
<b>Genotipo C282Y/C282*</b>	15 (13.1)*	4 (20)*	NS
<b>Abuso de alcohol</b>	81 (63.8)	10 (40)	0.027
<b>Infección HIV</b>	14 (11)	0 (0)	NS
<b>Exposición estrógenos†</b>	7 (38)†	5 (35.7)†	NS
<b>Infección VHB</b>	1 (0.8)	1 (4)	NS
<b>Hemodiálisis</b>	2 (1.6)	0 (0)	NS
<b>Solo 1 factor riesgo*, ‡</b>	16 (14)*, ‡	5 (25)*, ‡	NS
<b>2 factores riesgo*, ‡</b>	55 (48.2)*, ‡	13 (65)*, ‡	NS
<b>3 factores riesgo*, ‡</b>	39 (34.2)*, ‡	0 (0)*, ‡	NS

\*Mutaciones gen HFE de hemocromatosis disponible en 134 pacientes.

†Exposición a estrógenos solo descrita en mujeres. ‡ Sin incluir mutaciones gen UROD

**ARTÍCULO ORIGINAL Nº 2**

**The association between porphyria cutanea tarda and diabetes  
mellitus: analysis of a long-term follow-up cohort**

Carlos Muñoz Santos\*, Antonio Guilabert\*, Nemesio Moreno\*\*, Margarita  
Gimenez\*\*\*, Esteve Darwich\*, Jordi To-Figueras\*\*\*\* y Carmen Herrero\*

***Br J Dermatol* 2011; 165: 486-91**

Servicios de Dermatología\*, Endocrinología y Unidad de Diabetes\*\*\* y  
Bioquímica y Genética Molecular\*\*\*\*, Hospital Clínic, Universitat de Barcelona,  
Barcelona, IDIBAPS.

SAP Santa Coloma de Gramanet\*\*, Barcelona

FACTOR DE IMPACTO 2010: **4.351**

(Ranking 3/54 de su área de conocimiento, Dermatología)

## **RESUMEN ARTÍCULO ORIGINAL N° 2**

**Metodología.** Es un estudio longitudinal y retrospectivo que ha incluido 81 pacientes con PCT que han seguido estrictas revisiones durante un periodo de al menos 10 años. Clasificamos a los pacientes en dos grupos: 1) pacientes que habían desarrollado alteraciones del metabolismo de la glucosa (GMA) y 2) pacientes que no habían desarrollado GMA. Las características y los factores de riesgo de PCT y DM fueron recogidos de las historias clínicas y se hizo una comparación entre grupos.

**Resultados.** Se han identificado 33 pacientes (41%) con GMA, de los cuales 27 (82%) habían desarrollado estos trastornos un largo periodo después del diagnóstico de la PCT (media= 12,7 años). En el análisis bivariante, estos pacientes habían presentado cifras medias significativamente más altas de ferritina sérica en el momento del diagnóstico de la PCT (651 vs. 405 ng/mL,  $p= 0.005$ ), una mayor frecuencia de ferritina persistentemente elevada (52% vs. 15%,  $p$  de tendencia  $< 0,001$ ) y una prevalencia más alta de historia familiar de diabetes (48% vs. 15%,  $p= 0.004$ ). En el análisis multivariante, la ferritina persistentemente elevada [odds ratio (OR), 10,66, 95% intervalo confianza (CI), 1,95-58,19,  $p= 0,006$ ] y la historia familiar de diabetes (OR 4,82, CI 95%, 1,34-17,33,  $p= 0,016$ ) continuaron asociándose significativamente con la presencia de GMA

**Conclusiones.** Los trastornos del metabolismo de la glucosa son muy prevalentes en pacientes con PCT y se pueden desarrollar mayoritariamente tras un largo periodo de tiempo después del diagnóstico de la porfiria. La hiperferritinemia persistente parece ser un biomarcador de riesgo de desarrollo de GMA en pacientes con PCT, probablemente en el contexto de la sobrecarga férrica y la inflamación hepática. Una estricta monitorización a largo plazo del metabolismo de la glucosa y de la ferritina sérica puede ser aconsejable en el seguimiento rutinario de los pacientes con PCT

# The association between porphyria cutanea tarda and diabetes mellitus: analysis of a long-term follow-up cohort

C. Muñoz-Santos, A. Guilabert, N. Moreno,\* M. Gimenez,† E. Darwich, J. To-Figueras‡ and C. Herrero

Department of Dermatology, †Department of Endocrinology and Diabetes Unit and ‡Department of Biochemistry and Molecular Genetics, Hospital Clinic, IDIBAPS, University of Barcelona, 170 Villarroel, 08036 Barcelona, Spain

\*Institut Català de la Salut, SAP Santa Coloma de Gramenet, Barcelona, Spain

## Summary

### Correspondence

Carlos Muñoz-Santos.

E-mail: carlosmunozsantos@gmail.com

### Accepted for publication

19 April 2011

### Funding sources

This study was supported by a scientific grant from the Hospital Clinic of Barcelona (Premio Fi de Residencia Emili Letang 2004) to C.M.-S. and a grant from the Spanish Fondo de Investigación Sanitaria (FIS, PI06/0150) to J.T.-F.

### Conflicts of interest

None declared.

DOI 10.1111/j.1365-2133.2011.10401.x

**Background** An association between porphyria cutanea tarda (PCT) and diabetes mellitus (DM) is widely reported, but the pathogenetic link remains unknown.

**Objectives** To investigate the natural history of DM in the setting of PCT and to determine which PCT features and risk factors may be associated with the development of DM.

**Methods** This retrospective longitudinal study included 81 Spanish patients with PCT with at least 10 years of strict follow-up. Patients attended our Porphyria Unit for follow-up visits and the data were collected in the period 2004–2008. We classified patients into two groups: patients with glucose metabolism alterations (GMA: DM or impaired fasting glucose), and patients without. PCT features and PCT and DM risk factors were retrieved from clinical charts and compared between groups.

**Results** We identified 33 patients (41%) with GMA, of whom 27 (82%) developed GMA a long time after the diagnosis of PCT (mean 12.7 years). In bivariate analysis, these patients had significantly higher mean serum ferritin at diagnosis (651 vs. 405 ng mL<sup>-1</sup>;  $P = 0.005$ ), a higher prevalence of persistently elevated serum ferritin (52% vs. 15%;  $P < 0.001$  for trend) and a higher prevalence of family history of DM (48% vs. 19%;  $P = 0.004$ ). In multivariate analysis, persistently elevated serum ferritin [odds ratio (OR) 10.66, 95% confidence interval (CI) 1.95–58.19;  $P = 0.006$ ] and family history of DM (OR 4.82, 95% CI 1.34–17.33;  $P = 0.016$ ) remained significantly associated with the presence of GMA.

**Conclusions** GMA are highly prevalent in patients with PCT and mostly develop a long time after the diagnosis of PCT. Persistent hyperferritinaemia seems to be a risk biomarker of GMA in patients with PCT, probably in the setting of chronic iron overload and hepatic inflammation. Strict long-term monitoring of glucose metabolism and serum ferritin may be advisable in the routine follow-up of patients with PCT.

Porphyria cutanea tarda (PCT), the most common form of porphyria, is caused by a deficiency of the fifth enzyme of haem synthesis [uroporphyrin decarboxylase (UROD)], which produces an accumulation of uroporphyrins in the skin and liver.<sup>1</sup> It usually manifests in the fourth or fifth decade of life with skin fragility and blisters on photoexposed areas and liver dysfunction. Risk factors for PCT include UROD gene mutations, hepatitis C virus (HCV) and human immunodeficiency virus (HIV) infection, alcohol abuse, HFE gene mutations (causing classic hereditary haemochromatosis, HH) and oestrogen intake. Most of these factors are believed to alter

hepatic UROD function via an iron-dependent mechanism, which explains the presence of iron overload parameters in patients with PCT (e.g. increased serum ferritin).<sup>1</sup> The most effective treatment for PCT is phlebotomies, which act by reducing iron overload. Antimalarials can be also effective, although their mechanism of action is unclear.<sup>2</sup>

In past decades, several authors reported an association between PCT and type 2 diabetes mellitus (DM), with DM prevalences of up to 41% in PCT cohorts.<sup>3–11</sup> A recent study by our group detected a rate of DM of 23.7% in a cohort of 152 patients with PCT from Catalonia (Spain).<sup>12</sup> These data

suggest that patients with PCT are prone to carbohydrate metabolism impairment. Although the pathogenetic mechanism that could lead to DM remains speculative, some intrinsic features of PCT (porphyrin accumulation, chronic liver damage, iron overload) or PCT-associated risk factors (e.g. HCV and alcohol abuse) might act over time and contribute to the development of DM in these patients.

The objective of this study was to analyse a long-term follow-up cohort of patients with PCT and compare PCT- and DM-related factors between patients with and without glucose metabolism alterations (GMA), better to describe the natural history of DM in patients with PCT and to clarify the mechanisms that may explain the association between the two diseases.

## Materials and methods

### Study design and patients

In order to elucidate how DM is related to the natural history of PCT, we analysed 81 patients from the aforementioned PCT cohort<sup>12</sup> with at least 10 years of strict follow-up without missing any routine visit. All patients lived in Catalonia (North-East of Spain) and attended our Porphyrin Unit for follow-up visits. Data were collected in the period 2004–2008. Urinary porphyrin concentrations, serum ferritin and liver function were monitored every 3 months as long as patients presented either biochemical or clinical activity, and yearly once remission was achieved (24-h urinary porphyrins < 300 nmol L<sup>-1</sup>).

Patients with abnormal levels of urinary porphyrins were treated with oral low-dose chloroquine (100–200 mg twice per week) or phlebotomies in cases with serum ferritin levels > 500 ng mL<sup>-1</sup> (normal values 20–300 in men/postmenopausal women and 15–200 in premenopausal women). Phlebotomies (350–500 mL) were performed every 1–2 weeks until PCT remission was achieved or haemoglobin levels decreased to < 12 g dL<sup>-1</sup>.

Impaired fasting glucose (IFG) was defined as fasting glucose levels of 5.6–6.9 mmol L<sup>-1</sup> (110–125 mg dL<sup>-1</sup>) at two or more different times and DM as fasting glucose ≥ 7 mmol L<sup>-1</sup> (≥ 126 mg dL<sup>-1</sup>) at two or more different times or random plasma glucose ≥ 11.1 mmol L<sup>-1</sup> (≥ 200 mg dL<sup>-1</sup>) and symptoms of hyperglycaemia, according to the 1997 American Diabetes Association (ADA) criteria. Diabetes mellitus medication use or self-reported physician diagnosis of DM were additional criteria for DM. Patients with PCT were classified into two groups: patients with GMA (either IFG or DM) vs. patients without. PCT features and PCT and DM risk factors were compared between groups. The hospital ethics committee approved the study and written consent was obtained from each patient.

### Data collection

All patient data were collected from clinical charts. We recorded age, gender, follow-up, age at PCT onset, clinical

severity at diagnosis (according to a 16-item score that correlates with porphyrin excretion at diagnosis),<sup>12</sup> treatment (chloroquine or phlebotomy), alcohol abuse at diagnosis and over time (> 50 g daily), oestrogen use and total and mean yearly PCT relapses, defined as any new elevation of urinary porphyrins > 300 nmol L<sup>-1</sup>. Long-term remission was defined as the absence of relapses for ≥ 10 years. Laboratory tests at PCT diagnosis included total 24-h urinary porphyrins, serum alanine aminotransferase (ALT), serum  $\gamma$ -glutamyltransferase and serum ferritin. Data on hepatitis B and C virus and HIV serology, HFE (C282Y and H63D) and UROD gene mutations were also collected. Porphyrin laboratory studies and HFE and UROD gene mutations were determined as previously reported.<sup>12</sup> Fasting glucose levels were measured at every visit. Liver cirrhosis was demonstrated by liver biopsy. DM risk factors assessed included a first-degree family history of DM and the body mass index (BMI): weight (kg)/height (m<sup>2</sup>).

The long-term impact of iron overload and liver damage was analysed using the trend of serum ferritin and ALT values over time, with three categories for each parameter: (i) always normal values; (ii) elevated values only during biochemical activity of PCT; and (iii) persistently elevated values (elevated in > 90% of determinations, including remission periods).

### Statistics

A descriptive analysis was performed for each variable. The bivariate analysis used the Student's t-test, ANOVA and  $\chi^2$  test as appropriate. The multivariate logistic regression model included the presence of GMA as the dependent variable and variables significant in the bivariate analysis or clinically relevant as independent variables. The analysis was made using the SPSS v12.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, U.S.A.) program and statistical significance was established as  $P < 0.05$ .

## Results

The mean  $\pm$  SD age of the study group was 64.1  $\pm$  13.3 years and 67 (83%) were male (Table 1). The mean  $\pm$  SD follow-up was 23.1  $\pm$  7.6 years (range 10–35) with a mean  $\pm$  SD age at onset of PCT of 44.9  $\pm$  12.6 years. The mean number of PCT total relapses was 2.21 (range 0–8). The mean  $\pm$  SD BMI was 25.6  $\pm$  3.9 kg m<sup>-2</sup> and 25 patients (31%) had a first-degree family history of DM. Although HFE gene mutations were present in 72% of patients, genotypes causing HH (C282Y/C282Y or C282Y/H63D) were not detected (data not shown).

We identified 33 patients (41%) with GMA (DM, 25; IFG, 8). Of these, 27 (82%) developed GMA after the diagnosis of PCT, with a mean  $\pm$  SD time of 12.7  $\pm$  5.6 years (median 13, range 3–24). Only three patients had DM prior to the diagnosis of PCT and three were diagnosed with DM and PCT at the same time.

In the bivariate analysis (Table 1), mean age, gender, mean follow-up, intrinsic PCT features, liver damage parameters, BMI and PCT risk factors were similar in patients with PCT

Table 1 Comparison of patients with porphyria cutanea tarda (PCT) with and without glucose metabolism alterations (GMA)

	PCT (N = 81)	PCT with GMA (n = 33)	PCT without GMA (n = 48)	P-value
Age (years), mean $\pm$ SD	64.1 $\pm$ 13.3	65.4 $\pm$ 12.4	63.5 $\pm$ 14.1	0.57
Male, n (%)	67 (83)	30 (91)	37 (77)	0.11
Follow-up (years), mean (range)	23.1 (10–35)	22.5 (11–35)	23.9 (10–35)	0.45
PCT features				
Age at onset (years), mean $\pm$ SD	44.9 $\pm$ 12.6	47.6 $\pm$ 11.5	43.6 $\pm$ 13.5	0.20
Clinical score (0–16) at diagnosis, mean <sup>a</sup>	4.88	4.64	5.13	0.44
Total urinary porphyrins at diagnosis (nmol L <sup>-1</sup> ), mean	3213	3257	3190	0.91
PCT activity parameters				
Total relapses, mean (range)	2.21 (0–8)	2.43 (0–7)	2.15 (0–8)	0.56
Relapses per year, mean $\pm$ SD	0.10 $\pm$ 0.08	0.11 $\pm$ 0.08	0.09 $\pm$ 0.09	0.33
Long-term remission, n (%)	35 (46)	10 (36)	25 (52)	0.17
Treatment				
Antimalarials, n (%)	27 (33)	8 (24)	19 (40)	0.20
Phlebotomies, n (%)	54 (67)	25 (76)	29 (60)	
Iron overload parameters				
Serum ferritin at diagnosis (ng mL <sup>-1</sup> ), mean (median)	496 (423)	651 (586)	405 (325)	0.005
Serum ferritin trend over time, n (%)				
Always normal	19 (23)	3 (9)	16 (33)	
Elevated only during PCT activity	38 (47)	13 (39)	25 (52)	< 0.001 <sup>b</sup>
Persistently elevated	24 (30)	17 (52)	7 (15)	
Liver damage parameters				
Serum ALT at diagnosis (U L <sup>-1</sup> ), mean	92.3	89.3	94.1	0.75
Serum GGT at diagnosis (U L <sup>-1</sup> ), mean	83.9	76.3	88.8	0.50
Serum ALT trend over time, n (%)				
Always normal	11 (14)	6 (18)	5 (10)	
Elevated only during PCT activity	29 (36)	11 (33)	18 (38)	0.65 <sup>b</sup>
Persistently elevated	41 (51)	16 (49)	25 (52)	
Persistent alcohol abusers, n (%)	16 (20)	9 (27)	7 (15)	0.16
Liver cirrhosis, n (%) <sup>c</sup>	8 (10)	3 (9)	5 (10)	0.73
DM risk factors				
Body mass index (kg m <sup>-2</sup> ), mean $\pm$ SD	25.6 $\pm$ 3.9	25.9 $\pm$ 3.1	25.5 $\pm$ 4.3	0.60
Family history of DM, n (%)	25 (31)	16 (48)	9 (19)	0.004
PCT risk factors, n (%)				
UROD gene mutation	17 (21)	7 (21)	10 (21)	0.87
HCV infection	55 (68)	21 (63)	34 (71)	0.49
Alcohol abuse	50 (62)	24 (73)	26 (54)	0.09
HFE gene mutations <sup>d</sup>	55 (72)	24 (73)	31 (65)	0.55
HIV infection	1 (1)	0	1 (2)	0.44
Oestrogen intake	5 (7)	0	5 (10)	0.20

ALT, alanine aminotransferase; GGT,  $\gamma$ -glutamyltransferase; DM, diabetes mellitus; HCV, hepatitis C virus; HIV, human immunodeficiency virus; SD, standard deviation. <sup>a</sup>According to a previously reported 16-item score.<sup>12</sup> <sup>b</sup>P-value for trend. <sup>c</sup>Liver biopsies performed in 45 patients. <sup>d</sup>Any HFE gene mutation (C282Y or H63D, available in 76 patients).

with and without GMA. There were no significant differences with regard to treatment modality between groups. Patients with GMA had significantly higher mean serum ferritin at diagnosis (651 vs. 405 ng mL<sup>-1</sup>;  $P = 0.005$ ) and a higher prevalence of both persistently elevated serum ferritin (52% vs. 15%;  $P < 0.001$  for trend) and a family history of DM (48% vs. 19%;  $P = 0.004$ ).

The multivariate analysis showed that persistently elevated serum ferritin [odds ratio (OR) 10.66, 95% confidence interval (CI) 1.95–58.19;  $P = 0.006$ ] and a family history of DM

(OR 4.82, 95% CI 1.34–17.33;  $P = 0.016$ ) remained significantly associated with the presence of GMA (Table 2).

## Discussion

In the middle of the twentieth century, the idea of a possible association between PCT and DM began to interest various investigators worldwide.<sup>13–15</sup> Subsequently, other authors not only confirmed a higher prevalence of DM in patients with PCT, but also detected abnormal glucose tolerance after oral or

Variable (vs. reference value)	Beta	P-value	OR (95% CI)
Age	0.035	0.126	1.04 (0.99–1.08)
Family history of DM (vs. not)	1.573	0.016	4.82 (1.34–17.33)
HCV infection (vs. not)	-0.921	0.152	0.39 (0.11–1.40)
Gender (male vs. female)	1.436	0.116	4.20 (0.70–25.24)
Serum ferritin elevated only during PCT activity (vs. always normal)	0.470	0.548	1.60 (0.34–7.43)
Serum ferritin persistently elevated (vs. always normal)	2.366	0.006	10.66 (1.95–58.19)

OR, odds ratio; CI, confidence interval; DM, diabetes mellitus; HCV, hepatitis C virus; PCT, porphyria cutanea tarda.

**Table 2** Multivariate logistic regression model using the presence of glucose metabolism alterations as the dependent variable

endovenous glucose tolerance tests.<sup>4,5,16–20</sup> However, these studies failed to provide a plausible explanation for this observation and the issue gradually lost interest. Nonetheless, leading textbooks and reviews still list DM as one of the diseases associated with PCT.<sup>1,21,22</sup>

A very recent study by our group, which included one of the largest clinical cohorts of patients with PCT published so far (152 patients, mean age 60 years), found a crude prevalence of DM of 23.7%, together with a rate of IFG of 11.9%.<sup>12</sup> This latter percentage would have been higher if we had used 100 mg dL<sup>-1</sup> as the cut-off point to define IFG, as recommended by the ADA in 2010.<sup>23</sup> A population-based study in our region, using the same DM diagnostic criteria, revealed a crude prevalence of DM of 13%.<sup>24</sup> When comparing the prevalence in the most representative age range of our PCT study (55–64 years) with that in the same age range in the population-based study we still found notable differences (men 41%, women 33% vs. men 23%, women 19%). In light of these findings, we considered that the relationship between PCT and DM was worth revisiting. We have carried out what is, to the best of our knowledge, the first study aimed at elucidating the factors associated with DM in patients with PCT.

As we were able to analyse a large cohort over a long period of time, we can provide new data on the natural history of PCT with regard to its association with DM. We found that GMA mostly appears a long time after the diagnosis of PCT (mean 12.7 years). This suggests that strict long-term (and not only at the time of the diagnosis of PCT) monitoring of glucose metabolism (including a glucose tolerance test if necessary) may be advisable in the routine follow-up of patients with PCT and might permit early detection of DM.

After comparing the characteristics of patients with PCT with and without GMA, we found no link between any PCT risk factors or parameters related to PCT activity and chronic liver damage and GMA. There was no difference in ALT levels at diagnosis and over time between groups, which may be due to the high prevalence of alcohol abuse and HCV infection in Spanish patients with PCT.<sup>12</sup> There were no differences in the BMI between groups, suggesting that the BMI may not be an important risk factor for DM in patients with PCT.

The multivariate model showed that patients with PCT with GMA more frequently presented persistently elevated values of serum ferritin over time and a higher likelihood of presenting a first-degree family history of DM.

The relation of hyperferritinaemia and DM has been widely reported in the non-PCT literature.<sup>25–29</sup> However, the exact pathogenetic link is not well understood. Most of the data on this field come from cross-sectional and case-control studies where the directionality of the association cannot be established. In some of these studies, ferritin was considered most likely to reflect DM-related systemic inflammation as samples were collected after the diagnosis of DM.<sup>27</sup> Hyperferritinaemia has also been found in patients with insulin resistance in the absence of hepatic siderosis.<sup>30</sup> In contrast, Jiang *et al.*<sup>27</sup> published in 2004 a prospective study including 32 826 healthy women and they found that basal hyperferritinaemia and a lower ratio of transferrin receptors to ferritin (adjusted for C-reactive protein) independently preceded the development of DM. These results were later confirmed by another prospective study including 1277 healthy individuals.<sup>29</sup> Results from both studies point toward a causative role of iron overload in the subsequent development of DM. Furthermore, it is known that iron overload can cause DM in patients with HH.<sup>31</sup> In murine models, dietary iron restriction or iron chelation protects against diabetes and loss of beta-cell function.<sup>32</sup> Excessive iron can be deposited in the liver and pancreas and may cause organ-specific oxidative damage by catalysing the formation of hydroxyl radicals (a powerful pro-oxidant). In addition to the intrinsic pancreatic damage, this process may lead to insulin resistance in the liver, with eventual beta-cell failure and the development of DM.<sup>27</sup>

Serum ferritin may also be raised in a variety of conditions different from iron overload. Proinflammatory cytokines in hepatic tissue have been found to regulate ferritin in the liver by iron-independent mechanisms, therefore an increased ferritin in serum may be associated not only with changes in iron homeostasis but also with hepatic oxidative stress and inflammation.<sup>33</sup> However, there is strong evidence for a critical role of iron in the pathogenesis of PCT, with hepatic iron overload in most patients with PCT.<sup>22</sup> Liver biopsies usually show siderosis,<sup>34</sup> and depletion of hepatic iron by repeated phlebotomies is an effective treatment for PCT.<sup>2</sup>

Accordingly, hyperferritinaemia in patients with PCT may reflect both iron loading and the hepatic production of acute-phase reactants.

We found no protective trend for phlebotomies against the risk of DM. It might be argued that patients receiving this treatment should have been better protected against DM, due to their greater ability to reduce ferritin. However, our phlebotomy protocol was guided not by ferritin levels but mainly by PCT activity, with phlebotomies being stopped when PCT biochemical remission was achieved. Therefore, it seems that our guidelines for phlebotomies may not have allowed long-term ferritin normalization and DM protection. Nonetheless, extrapolation from our results suggests that, in patients (even those in remission) with a marked trend to persistently raised serum ferritin, effective suppression of iron stores by means of phlebotomies and close monitoring of ferritin might help to prevent DM, as shown in patients with HH.<sup>31</sup> This management could be particularly intensified in patients with PCT with a first-degree family history of DM and those with a prediabetic state (patients with IFG or impaired glucose tolerance).

In summary, we investigated the natural history and mechanism behind the known association between PCT and DM. Our results suggest for the first time that persistent hyperferritinaemia (maybe reflecting chronic iron overload, hepatic oxidative stress and inflammation processes) is a risk biomarker of GMA in patients with PCT. Further prospective studies with larger samples analysing more of the known risk factors for DM (steroids intake, diet, exercise or central adiposity), inflammation parameters and better iron overload biomarkers are needed to clarify the complex interrelation between PCT and GMA and to determine if effective depletion of iron loading, even during PCT remission periods, might help to prevent DM in patients with PCT.

### What's already known about this topic?

- Diabetes mellitus (DM) is one of the conditions traditionally associated with porphyria cutanea tarda (PCT).
- The natural history of DM in patients with PCT and the cause of this association remain unclear.

### What does this study add?

- In the present study we show that glucose metabolism alterations are highly prevalent in patients with PCT and mostly develop a long time after the diagnosis of PCT.
- We also observed that persistently elevated serum ferritin over time is an independent risk factor for DM in patients with PCT.

## References

- 1 Thunell S, Harper P. Porphyrins, porphyrin metabolism, porphyrias. III. Diagnosis, care and monitoring in porphyria cutanea tarda – suggestions for a handling programme. *Scand J Clin Lab Invest* 2000; **60**:561–79.
- 2 Mascaro JM, Herrero C. New reasons for an archaic treatment: phlebotomy in sporadic porphyria cutanea tarda. *Arch Dermatol* 2003; **139**:379–80.
- 3 Berman J. Porphyrie und Zuckerkrankheit: aufsuchen der Porphyrie bei Zuckerkranken. *Z Ges Inn Med* 1956; **11**:186–8.
- 4 Grossman ME, Bickers DR, Poh-Fitzpatrick MB *et al.* Porphyria cutanea tarda. Clinical features and laboratory findings in 40 patients. *Am J Med* 1979; **67**:277–86.
- 5 Lundvall O, Weinfeld A, Lundin P. Iron storage in porphyria cutanea tarda. *Acta Med Scand* 1970; **2**:37–53.
- 6 Méndez M, Rossetti MV, del Carmen Batlle AM, Parera VE. The role of inherited and acquired factors in the development of porphyria cutanea tarda in the Argentinean population. *J Am Acad Dermatol* 2005; **52**:417–24.
- 7 Rossmann-Ringdahl I, Olsson R. Porphyria cutanea tarda in a Swedish population: risk factors and complications. *Acta Derm Venereol (Stockh)* 2005; **85**:337–41.
- 8 Jalil S, Grady JJ, Lee C, Anderson KE. Associations among behavior-related susceptibility factors in porphyria cutanea tarda. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2010; **8**:297–302.
- 9 Lamon JM, Frykholm BC. Pregnancy and porphyria cutanea tarda. *Johns Hopkins Med J* 1979; **145**:235–7.
- 10 Kostler E. Porphyria cutanea tarda and diabetes mellitus. *Dermatol Monatsschr* 1986; **172**:481–4.
- 11 Krivosheev AB, Kuimov AD, Krivosheeva IA. The combination of carbohydrate and porphyrinic exchange disturbances: is it a chance or regularity? *Klin Med (Mosk)* 2006; **84**:51–4.
- 12 Muñoz-Santos C, Guilabert A, Moreno N *et al.* Familial and sporadic porphyria cutanea tarda: clinical and biochemical features and risk factors in 152 patients. *Medicine (Baltimore)* 2010; **89**:69–74.
- 13 Berman J, Bielicky T. Some external factors in the etiology of porphyria cutanea tarda and diabetes mellitus with special reference to syphilitic infection and its treatment. *Dermatologica* 1956; **113**:78–87.
- 14 Rook A, Champion RH. Porphyria cutanea tarda and diabetes. *Br Med J* 1960; **1(5176)**:860–1.
- 15 Burnham TK, Fosnaugh RP. Porphyria, diabetes, and their relationship. A case report. *Arch Dermatol* 1961; **83**:717–22.
- 16 Naidenov E, Ivanov E, Polonov K *et al.* Carbohydrate metabolic disorders in porphyria cutanea tarda. *Vutr Boles* 1987; **26**:62–5.
- 17 Lisi P, Santeusano F, Lombardi G, Compagnucci P. Carbohydrate metabolism in porphyria cutanea tarda. *Dermatologica* 1983; **166**:287–93.
- 18 Mengistu M. Glucose tolerance and glycosuria in Ethiopian porphyria cutanea tarda patients. *Trop Geogr Med* 1987; **39**:361–5.
- 19 Mengistu M, Gebreselassie F, Tsega E. Glucose tolerance in adult Ethiopian patients with liver disease and porphyria cutanea tarda. *Ethiop Med J* 1989; **27**:107–14.
- 20 Franks AG Jr, Pulini M, Bickers DR *et al.* Carbohydrate metabolism in porphyria cutanea tarda. *Am J Med Sci* 1979; **277**:163–71.
- 21 Bleasel NR, Varigos GA. Porphyria cutanea tarda. *Australas J Dermatol* 2000; **41**:197–206.
- 22 Elder GH. Porphyria cutanea tarda and related disorders. In: *The Porphyrin Handbook: Medical Aspects of Porphyria* (Kadish KM, Smith KM, Guillard R, eds), Vol. 14. San Diego, CA: Academic Press, 2003; 67–92.
- 23 American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes – 2010. *Diabetes Care* 2010; **33** (Suppl. 1): S11–61.
- 24 Masia R, Sala J, Rohlfs I *et al.* Prevalence of diabetes mellitus in the province of Girona, Spain: the REGICOR study. *Rev Esp Cardiol* 2004; **57**:261–4.



- 25 Jehn ML, Guallar E, Clark JM *et al.* A prospective study of plasma ferritin level and incident diabetes: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Am J Epidemiol* 2007; **165**:1047–54.
- 26 Sun L, Franco OH, Hu FB *et al.* Ferritin concentrations, metabolic syndrome, and type 2 diabetes in middle-aged and elderly Chinese. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; **93**:4690–6.
- 27 Jiang R, Manson JE, Meigs JB *et al.* Body iron stores in relation to risk of type 2 diabetes in apparently healthy women. *JAMA* 2004; **291**:711–17.
- 28 Forouhi NG, Harding AH, Allison M *et al.* Elevated serum ferritin levels predict new-onset type 2 diabetes: results from the EPIC-Norfolk prospective study. *Diabetologia* 2007; **50**:949–56.
- 29 Fumeron F, Péan F, Driss F *et al.* Ferritin and transferrin are both predictive of the onset of hyperglycemia in men and women over 3 years: the data from an epidemiological study on the Insulin Resistance Syndrome (DESIR) study. *Diabetes Care* 2006; **29**:2090–4.
- 30 Brudevold R, Hole T, Hammerstrøm J. Hyperferritinemia is associated with insulin resistance and fatty liver in patients without iron overload. *PLoS ONE* 2008; **3**:e3547.
- 31 Utzschneider KM, Kowdley KV. Hereditary hemochromatosis and diabetes mellitus: implications for clinical practice. *Nat Rev Endocrinol* 2010; **6**:26–33.
- 32 Cooksey RC, Jones D, Gabrielsen S *et al.* Dietary iron restriction or iron chelation protects from diabetes and loss of beta-cell function in the obese (ob/ob lep<sup>-/-</sup>) mouse. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010; **298**:E1236–43.
- 33 Torti FM, Torti SV. Regulation of ferritin gene and protein. *Blood* 2002; **99**:3505–16.
- 34 Puy H, Gouya L, Deybach JC. Porphyrias. *Lancet* 2010; **375**:924–37.

## **V.2- Resultados detallados de segunda fase del estudio**

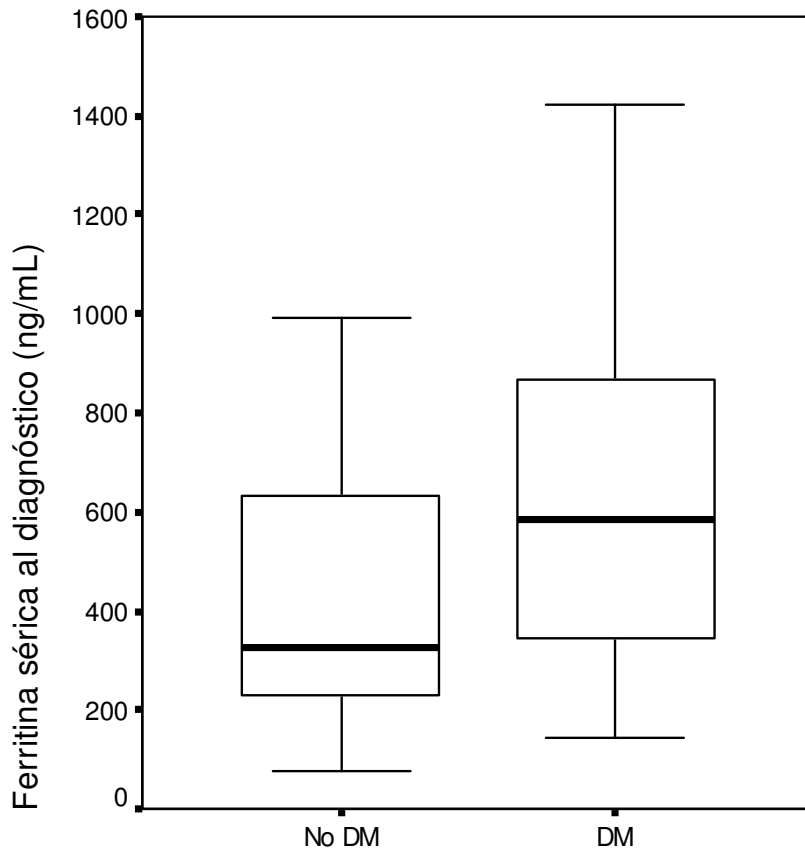
En cuanto a la segunda fase del estudio (sobre la asociación entre PCT y DM), se incluyeron 81 pacientes de los 152, siguiendo los criterios de inclusión/exclusión previamente citados (ver **Tabla 6**). La edad media de este grupo fue de 64.1 años (SD=13.3) y 67 eran hombres (82.7%). El tiempo medio de seguimiento en nuestro servicio desde el diagnóstico inicial fue de 23.1 años (rango: 10-35) y la edad media de inicio de síntomas de la PCT fue de 44.9 años (SD=12.6). El número medio de recaídas bioquímicas de la PCT fue de 2.21 (rango: 0-8). El IMC medio fue de 25.6 (SD=3.9) y 25 pacientes (30.9%) tenían antecedentes de diabetes en familiares de primer grado. Aunque el 72.4% de los pacientes seleccionados tenían alguna mutación en el gen HFE, no se encontraron genotipos relacionados con la hemocromatosis hereditaria clásica (homocigotos C282Y o doble heterocigotos C282Y/H63D, dato no mostrado en la tabla).

### **V.2.1- Identificación e historia natural de los pacientes con PCT y trastornos del metabolismo de la glucosa**

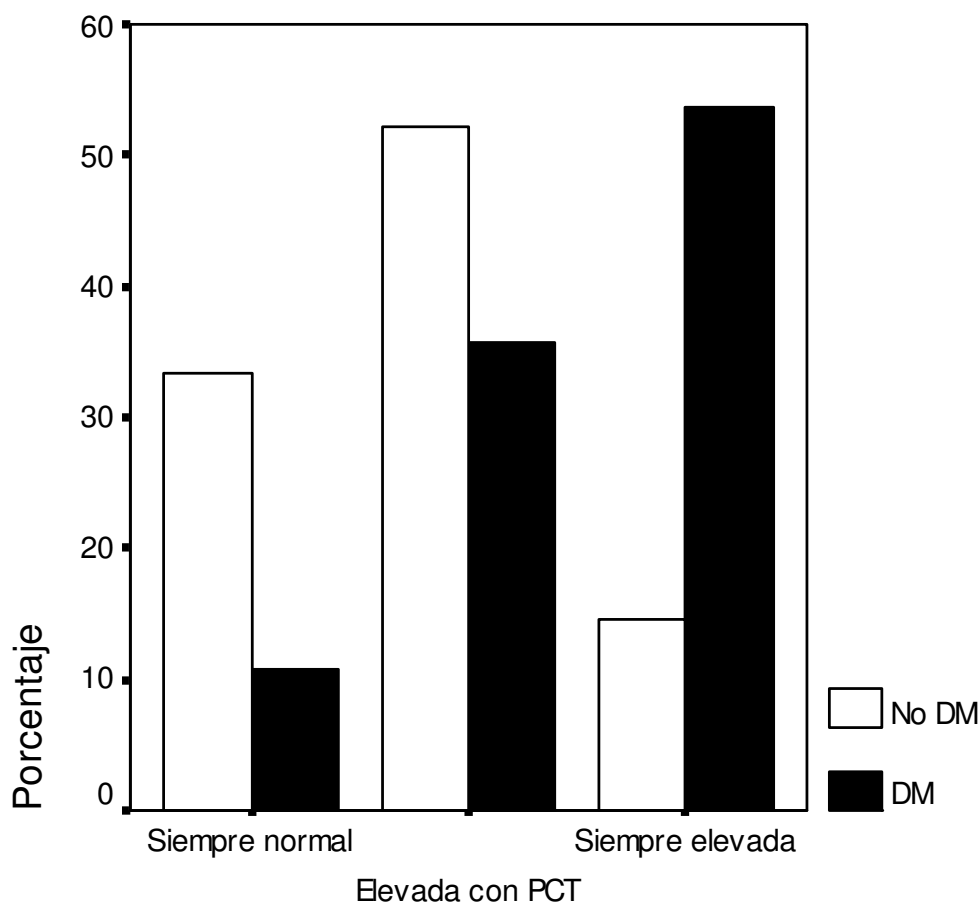
En el momento del estudio identificamos a 33 pacientes con trastornos del metabolismo de la glucosa (DM: 25, IFG: 8). 27 de estos pacientes (81.8%) desarrollaron estas alteraciones después del diagnóstico de la PCT, tras una media de 12.7 años (mediana: 13, SD: 5.6, rango: 3-24). Solo tres pacientes habían desarrollado diabetes antes del diagnóstico de PCT y en otros tres pacientes el diagnóstico de ambos trastornos se realizó a la vez.

### **V.2.2- Comparación entre el grupo de pacientes con PCT asociada a trastornos del metabolismo de la glucosa y el grupo de PCT sin estos trastornos**

En el análisis bivalente, la edad media, el sexo, el tiempo medio de seguimiento, la edad media de diagnóstico de la PCT, la puntuación clínica, el nº de rebrotes de la PCT, el tipo de tratamiento, los parámetros de daño hepático, el IMC y los factores de riesgo de PCT fueron similares entre el grupo de pacientes con alteraciones del metabolismo de la glucosa y el grupo sin alteraciones. Los pacientes del grupo con diabetes presentaron valores medios más altos de ferritina al diagnóstico (651 *vs* 405 ng/mL,  $p = 0.005$ )(**Figura 4**), mayor prevalencia de ferritina persistentemente elevada a lo largo del tiempo (51.5% *vs* 14.6%) y menor prevalencia de ferritina con valores siempre normales (9.1% *vs* 33.3%) ( $p$  de tendencia = 0.001)(**Figura 5**). También se encontró una mayor prevalencia de historia de diabetes en familiares de primer grado en el grupo con diabetes (48.5% *vs* 18.8%,  $p = 0.004$ ) (**Tabla 6**).



**Figura 4.** Diagramas de caja representando la ferritina sérica al diagnóstico en pacientes con PCT que desarrollaron trastornos del metabolismo de la glucosa (DM) y los que no desarrollaron (No DM). Mediana de la ferritina sérica grupo no DM : 325 ng/mL, grupo DM: 586 ng/mL.



### Tendencia ferritina a lo largo del tiempo

**Figura 5.** Diagrama de barras de la tendencia de la ferritina sérica a lo largo del tiempo en pacientes con PCT que desarrollaron alteraciones del metabolismo de la glucosa (DM) y los que no desarrollaron (no DM). Ferritina persistentemente elevada: 51,5% grupo DM vs. 14,6% grupo no DM, p de tendencia = 0.001.

**Tabla 6.** Comparación entre pacientes con PCT con y sin trastornos del metabolismo de la glucosa

	<b>PCT (N=81)</b>	<b>PCT con alteraciones glucosa (n=33)</b>	<b>PCT sin alteraciones glucosa (n=48)</b>	<b>Valor p</b>	
Edad, media (SD), años	64.1(13.3)	65.4 (12.4)	63.5 (14.1)	0.57	
Hombres, n (%)	67 (82.7)	30 (90.9)	37 (77.1)	0.11	
Seguimiento medio (rango), años	23.1 (10-35)	22.5 (11-35)	23.9 (10-35)	0.45	
<b>CARACTERÍSTICAS PCT</b>					
Edad inicio, media (SD), años	44.9 (12.6)	47.6 (11.5)	43.6 (13.5)	0.20	
Puntuación clínica al diagnóstico, media (0-16) <sup>a</sup>	4.88	4.64	5.13	0.44	
Porfirinas totales urinarias al diagnóstico, media, nmol/L	3213	3257	3190	0.91	
<i>Parámetros actividad de la PCT</i>					
Rebrotos totales, media (rango)	2.21 (0-8)	2.43 (0-7)	2.15 (0-8)	0.56	
Rebrotos por año, media (SD)	0.10 (0.08)	0.11 (0.08)	0.09 (0.09)	0.33	
Remisión prolongada, n (%)	35 (46)	10 (35.7)	25 (52.1)	0.17	
<b>TRATAMIENTO</b>					
Antipalúdicos, n (%)	27 (33.3)	8 (24.2)	19 (39.6)	0.20	
Flebotomías, n (%)	54 (66.6)	25 (75.8)	29 (60.4)		
<b>PARAMETROS FÉRRICOS</b>					
Ferritina sérica al diagnóstico, media (mediana), ng/mL	496 (423)	651 (586)	405 (325)	0.005	
Tendencia ferritina sérica a lo largo del tiempo, n (%)	Siempre normal	19 (23.5)	3 (9.1)	16 (33.3)	0.001 <sup>b</sup>
	Elevada solo durante actividad PCT	38 (46.9)	13 (39.4)	25 (52.1)	
	Persistentemente elevada	24 (29.6)	17 (51.5)	7 (14.6)	
<b>PARÁMETROS DAÑO HEPÁTICO</b>					
ALT sérica al diagnóstico, media, U/L	92.3	89.3	94.1	0.75	
GGT sérica al diagnóstico, media, U/L	83.9	76.3	88.8	0.50	
Tendencia ALT sérica a lo largo del tiempo, n (%)	Siempre normal	11 (13.6)	6 (18.1)	5 (10.4)	0.65 <sup>b</sup>
	Elevada solo durante actividad PCT	29 (35.8)	11 (33.3)	18 (37.5)	
	Persistentemente elevada	41 (50.6)	16 (48.8)	25 (52.1)	
Abuso persistente de alcohol, n (%)	16 (19.7)	9 (27.3)	7 (14.6)	0.16	
Cirrosis hepática, n (%) <sup>c</sup>	8 (9.9)	3 (9)	5 (10.4)	0.73	

**Tabla 6.** Comparación de pacientes con PCT con y sin alteraciones del metabolismo de la glucosa. (Continuación)

	<b>PCT (N=81)</b>	<b>PCT con alteraciones glucosa (n=33)</b>	<b>PCT sin alteraciones glucosa (n=48)</b>	<b>Valor p</b>
<b>FACTORES RIESGO DE DM</b>				
Indice masa corporal, media (SD), [peso (kg)/ altura (m <sup>2</sup> )]	25.6 (3.9)	25.9 (3.1)	25.5 (4.3)	0.60
Historia familiar de DM, n (%)	25 (30.9)	16 (48.5)	9 (18.8)	0.004
<b>FACTORES RIESGO DE PCT</b>				
Mutaciones gen URO-D, n (%)	17 (21)	7 (21.2)	10 (20.8)	0.87
Infección VHC, n (%)	55 (67.9)	21 (63.6)	34 (70.8)	0.49
Abuso alcohol , n (%)	50 (61.7)	24 (72.7)	26 (54.2)	0.09
Mutaciones gen HFE , n (%) <sup>d</sup>	55 (72.4)	24 (72.8)	31 (64.6)	0.55
Infección VIH, n (%)	1 (1.2)	0 (0)	1 (0.02)	0.44
Ingesta de estrógenos, n (%)	5 (6.6)	0 (0)	5 (10.4)	0.20

<sup>a</sup> De acuerdo a la escala clínica previamente descrita en la primera parte del estudio (ver Tabla 1).

<sup>b</sup> p de tendencia

<sup>c</sup> Biopsias hepáticas realizadas en 45 pacientes

<sup>d</sup> Cualquier mutación alélica en el gen HFE (C282Y o H63D, disponible en 76 pacientes)

Para el análisis multivariante final de esta segunda fase del estudio hemos usado como variables independientes: edad, sexo, infección VHC, familiares de primer grado con diabetes y tendencia de la ferritina sérica a lo largo del tiempo.

El modelo de regresión logística mostró que una ferritina persistentemente elevada (OR 10.66; 95% CI, 1.95-58.19,  $p = 0.006$ ) y una historia de diabetes en familiares de primer grado (OR, 4.82; 95% CI, 1.34-17.33,  $p = 0.016$ ) seguían asociándose significativamente con la presencia de trastornos del metabolismo de la glucosa. (**Tabla 7**).

**Tabla 7.** Modelo de regresión logística usando la presencia de trastornos del metabolismo de la glucosa como variable dependiente.

<b>Variable</b> ( vs valor de referencia)	<b>Beta</b>	<b>Valor P</b>	<b>OR (95% CI)</b>
<b>Edad</b>	0.035	0.126	1.04 (0.99-1.08)
<b>Historia familiar DM</b> ( vs no historia)	1.573	0.016	4.82 (1.34-17.33)
<b>Infección VHC</b> ( vs no)	-0.921	0.152	0.39 (0.11-1.40)
<b>Sexo</b> (hombre vs mujer)	1.436	0.116	4.20 (0.70-25.24)
<b>Ferritina sérica solo elevada durante actividad PCT</b> ( vs siempre normal)	0.470	0.548	1.60 (0.34-7.43)
<b>Ferritina sérica persistentemente elevada</b> ( vs siempre normal)	2.366	0.006	10.66 (1.95-58.19)





## **VI- DISCUSIÓN**

Presentamos una de las series de pacientes con PCT que incluye un mayor número de pacientes y con un seguimiento más prolongado. En esta serie se hace un énfasis especial en: las manifestaciones clínicas; los datos de bioquímica hepática y porfirinas urinarias; los factores de riesgo de PCT; los parámetros del metabolismo del hierro y de la glucosa; las diferencias entre sexos y las diferencias entre las formas hereditarias y las adquiridas.

La PCT es un trastorno que se suele presentar a partir de los 40 años de edad con la aparición de fragilidad y ampollas en el dorso de las manos, tal como ya lo describió Grossman y col.<sup>19</sup> en 1979 en 40 pacientes con PCT estudiados entre 1960 y 1976. Sin embargo el perfil clínico de nuestros pacientes en la actualidad puede ser diferente y/o haber cambiado ligeramente en las recientes décadas puesto que algunas manifestaciones descritas por Grossman,<sup>19</sup> como son los cambios cutáneos esclerodermiformes (18%) o la alopecia cicatricial (33%), son en nuestra serie actual muy poco frecuentes o no descritos. Esto podría ser debido a que actualmente se realiza el diagnóstico y el tratamiento de manera más precoz, a pesar de que el retraso medio en el diagnóstico en nuestros pacientes (tiempo que transcurre desde el inicio de los síntomas hasta el diagnóstico definitivo) ha sido de unos 20 meses. Creemos que este hecho es relevante puesto que revisiones recientes sobre PCT<sup>16,17</sup> y libros de texto especializados<sup>8</sup> siguen refiriéndose a los resultados de Grossman<sup>14</sup> cuando describen la prevalencia de las manifestaciones cutáneas de la PCT, lo cual puede ser inexacto en la actualidad.

Existen realmente pocas publicaciones detallando y analizando las manifestaciones clínicas y comparando entre sexos. La hipertrichosis periorbitaria fue más prevalente en las mujeres y tan frecuente en éstas como la fragilidad cutánea en el dorso de las manos, la manifestación princeps de la PCT. Las mujeres presentaron más frecuentemente afectación de otras áreas cutáneas y más prurito que los hombres, posiblemente por llevar ropas que protegen menos áreas de la radiación solar. La fragilidad cutánea en la cara y cabeza fue significativamente más prevalente en los hombres, probablemente por el afeitado y la alopecia androgenética que pueda asociarse.

18 pacientes no presentaron la típica clínica de fragilidad y ampollas en dorso de manos como signo de debut de la PCT (9 pacientes) o nunca la llegaron a desarrollar (9 pacientes). Hemos denominado a estos casos como casos atípicos de PCT. La hipertrichosis facial con hiperpigmentación facial (12 pacientes, 7.9%) o la hiperpigmentación generalizada (3 pacientes, 2%) fueron signos iniciales o aislados de PCT en nuestra cohorte. Algunos expertos sugieren que la hipertrichosis es un signo de debut raro en la PCT<sup>8</sup> y solo existen 2 casos descritos en la literatura como el primer signo de la enfermedad.<sup>32,33</sup> Sin embargo, en nuestra serie, la hipertrichosis periorbitaria fue el signo inicial en el 25% de las mujeres (casi siempre asociado a hiperpigmentación facial). La mayoría de estas mujeres desarrollaron las manifestaciones típicas de la enfermedad tras iniciar una exposición a estrógenos, normalmente después de ser confundida la hipertrichosis facial con hirsutismo.

En cuanto a la hiperpigmentación generalizada, solo hemos encontrado un caso en la literatura en el cual este signo fue la primera manifestación de la PCT.<sup>34</sup>

Los médicos deben pues ser conscientes de estas presentaciones poco usuales de la PCT, que podrían ser más frecuentes de lo pensado. 3 de los 18 casos con presentación atípica estaban totalmente asintomáticos, pero presentaban signos de sobrecarga férrica y aumento de las transaminasas y la GGT. Sugerimos hacer un cribado de la excreción de porfirinas urinarias en cualquier paciente que presente sobrecarga férrica y una bioquímica hepática alterada, independientemente de que exista o no infección por VHC.

En estos casos que fueron diagnosticadas antes de presentar la clínica típica, los niveles medios de porfirinas urinarias totales al diagnóstico fueron inferiores al resto de la cohorte. Dado que los niveles urinarios de porfirinas reflejan los depósitos tisulares de porfirinas, nuestros resultados sugieren que la PCT no se manifiesta clínicamente de forma clara hasta que las porfirinas acumuladas en la piel no alcanzan un punto crítico. Además, hemos encontrado una correlación significativamente positiva entre la excreción total de porfirinas en orina y una escala de puntuación clínica de 16 ítems al diagnóstico.

La mayoría de nuestros pacientes se presentaron con unos niveles séricos elevados de ALT (91%) y GGT (82%) en el momento del diagnóstico. Los valores de GGT fueron significativamente mayores en los pacientes VHC positivos. Al igual que fue descrito por nuestro grupo en otra cohorte más antigua,<sup>12</sup> la mayoría de los pacientes con VHC y PCT no normalizan sus transaminasas después del tratamiento y remisión de la PCT, sugiriendo esto que los cambios hepáticos persistentes en pacientes con PCT y VHC son mayormente debidos a la infección vírica crónica y no a la propia PCT.

La ferritina sérica en el momento del diagnóstico estaba elevada en la mayoría de pacientes (74%) pero no se correlacionó con la actividad de la PCT ni se asoció con ningún factor de riesgo específico. En el seguimiento a largo plazo de estos pacientes, nos empezó a llamar la atención que los podíamos clasificar en 3 grupos atendiendo a la tendencia de su ferritina a lo largo del tiempo: aquellos con ferritinas siempre normales, aquellos con ferritinas que se elevaban solo coincidiendo con actividad de la PCT y por último aquellos que siempre presentaban ferritinas elevadas, a pesar de las sangrías realizadas e incluso en periodos de remisión de la PCT. Estas tendencias fueron usadas en la segunda parte del estudio.

Hemos estudiado también la prevalencia de los factores de riesgo conocidos para desarrollar PCT. La mayoría de pacientes presentaron al menos 2 factores de riesgo reconocibles para desarrollar PCT (86%), con una alta prevalencia de la infección por VHC (65.8%), mutaciones alélicas del gen HFE de la hemocromatosis (64.9%) y el abuso de alcohol (59.9%). Casi el 25% de los pacientes (30% de los hombres) tenían estos tres factores de forma concomitante. Otros factores de riesgo como son la infección por el virus de la hepatitis B o la hemodiálisis apenas están representados en nuestra serie. En las mujeres, las mutaciones en el gen HFE de la hemocromatosis y en el gen de la UROD, junto con la ingesta de estrógenos, fueron los factores de riesgo más frecuentes.

El papel de las mutaciones H63D en el gen HFE de la HH puede que sea controvertido, ya que su frecuencia en la forma heterocigota en pacientes con PCT de nuestra población no difiere significativamente de la frecuencia en la población española. Sin embargo se ha visto en los estudios realizados por Toll y cols.<sup>11</sup> en nuestro hospital que podría haber una asociación sinérgica de la mutación H63D con la infección por VHC. En este estudio se observó que la mutación H63D era más frecuente en pacientes con PCT e infección por VHC que en el grupo control con VHC y que la frecuencia de la mutación C282Y era mayor en aquellos pacientes con PCT y sin la infección por VHC. Esto encajaría bastante con el hecho de que en los países del norte de Europa<sup>6,9,15</sup> predomine la combinación de mutaciones C282Y en el gen HFE con la ausencia de infección por VHC y que en países del sur de Europa predomine la combinación de mutación H63D con infección por VHC.<sup>11,12</sup>

Nuestros resultados respecto a los factores de riesgo en nuestra cohorte (85.8% de pacientes tenía > 1 factor) fortalecen la idea ya conocida de que la PCT es una enfermedad multifactorial en la que se necesitan diferentes factores que juntos puedan disminuir suficientemente la actividad enzimática y producir un trastorno sintomático.

Pocos estudios han comparado la forma familiar y la adquirida de la PCT.<sup>6,7,9,35,36</sup> Solo un estudio analizó las manifestaciones clínicas<sup>6</sup> y los otros no confirmaban los casos familiares mediante estudio genético.<sup>7,35,36</sup> La frecuencia de casos familiares en nuestra cohorte (16.4%) es ligeramente inferior a la descrita en pacientes de Dinamarca (24%)<sup>6</sup> o Noruega (53%),<sup>9</sup> probablemente debido a la alta prevalencia de infección crónica por VHC en España<sup>12,37</sup> en comparación con países del norte de Europa. Está generalmente establecido que los pacientes con formas familiares de PCT desarrollan manifestaciones clínicas de forma más precoz que los pacientes con formas adquiridas.<sup>8,9</sup> Además, en las formas familiares se han encontrado valores más altos de porfirinas urinarias y cristales hepáticos de porfirinas,<sup>7</sup> sugiriéndose una deficiencia mayor de la UROD en estos pacientes. Sin embargo, nosotros no hemos encontrado diferencias en la edad de inicio de las manifestaciones clínicas, en la severidad de la clínica ni en los niveles de porfirinas totales en orina entre los casos familiares y los adquiridos.



En el análisis bivariante, nuestros casos familiares tuvieron una menor frecuencia de ampollas en las manos, de infección por VHC y de abuso de alcohol, junto con una prevalencia menor de hombres y unos niveles medios de glucemia basal más bajos. Sin embargo, en el análisis multivariante, el único factor que siguió siendo predictivo de caso familiar fue la ausencia de la infección por VHC. Esto contrasta con los resultados de Aarsand y col.<sup>9</sup> que encontraron que una menor edad al diagnóstico, el sexo masculino, una razón uroporfirinas/heptaporfirinas mayor y un menor consumo de alcohol eran predictores de casos familiares en la población noruega.

El 35.6% de nuestros 152 pacientes presentaban diabetes mellitus (23.7%) o glucosa en ayunas alterada (11.9%), en una cohorte con una edad media de 60 años. Estos valores podrían haber sido incluso mayores si hubiéramos realizado test de sobrecarga oral de glucosa a nuestros pacientes o si hubiéramos considerado una glucemia anormal a partir de 100 mg/dL (y no a partir de 110 mg/dL), como proponen las últimas guías de la Asociación Americana de Diabetes.<sup>38</sup> Un estudio epidemiológico poblacional realizado en Cataluña, con nuestros mismos criterios diagnósticos para DM y realizado en la misma época que el nuestro, mostró que la prevalencia cruda de DM en nuestra población se situaba en torno al 13%.<sup>39</sup> Y cuando comparamos la prevalencia de DM del rango de edad más representativo de nuestra cohorte (ajustada, entre 55 y 64 años) con el mismo rango de edad del estudio poblacional catalán,<sup>39</sup> todavía encontramos diferencias notables (hombres=41.4%, mujeres=33% *vs* hombres = 23%, mujeres = 18.6%).

A mediados del siglo pasado la idea de una posible asociación entre la PCT y la DM había atraído la atención de varios investigadores en diferentes partes del mundo.<sup>40,41,42</sup> En 1956, Berman<sup>40</sup> describió 3 casos de DM y 4 casos de tolerancia alterada a la glucosa entre 17 pacientes con PCT. Revisó la literatura en aquel momento y encontró una prevalencia del 25% de DM en varones con PCT, una prevalencia mucho mayor que la de la población general. Posteriormente, otros autores no solo confirmaron la mayor prevalencia de DM en series de pacientes con PCT sino que también detectaron una mayor tolerancia alterada a la glucosa después de los test orales o endovenosos de sobrecarga.<sup>19,20,25-29</sup> Sin embargo estos estudios descriptivos no encontraron una explicación plausible a estas observaciones y este tema fue gradualmente abandonado a finales de los años 80. No obstante, los principales tratados de Dermatología y revisiones de PCT<sup>1,8,16,17</sup> todavía incluyen a la DM como una de las enfermedades que se asocian a la PCT (junto con el lupus eritematoso, los trastornos linfoproliferativos o el hepatocarcinoma).

En un principio, los valores de glucemia basal más elevados en el grupo de S-PCT que encontramos en la primera fase del estudio nos sugirieron que algún factor más representado en este grupo pudiera ser la causa de esta mayor prevalencia de alteraciones del metabolismo de la glucosa. Sin embargo, en la segunda fase del estudio no encontramos diferencias en la prevalencia de alteraciones del metabolismo de la glucosa entre los casos familiares y los adquiridos.

En vista de todos estos hallazgos, consideramos que la asociación entre PCT y DM merecía una nueva revisión y este fue el motivo de diseñar la segunda parte del estudio. Hemos llevado a cabo el que es, según nuestro conocimiento, el primer estudio que se dirige a intentar esclarecer que factores están asociados con la alta prevalencia de DM en los pacientes con PCT. Para intentar encontrar estas causas, seleccionamos de nuestros 152 pacientes con PCT que participaron en la primera fase del estudio a aquellos que llevaban más de 10 años de estricto seguimiento en nuestro servicio tras el diagnóstico de su porfiria. Para evaluar el posible efecto crónico (y no solo en el momento del diagnóstico) de la actividad de la PCT, del daño hepático y de la sobrecarga férrica, revisamos retrospectivamente estos parámetros y creamos variables que expresaban la tendencia a lo largo del tiempo de estos factores. Esto fue gracias a la tendencia que ya habíamos empezado a observar en la primera parte del estudio.

Al ser capaces de analizar retrospectivamente una cohorte grande y con tanto seguimiento, hemos podido determinar nuevos datos de la historia natural de la asociación entre PCT y DM. Hemos encontrado que los trastornos del metabolismo de la glucosa aparecen casi siempre tras un largo periodo de tiempo después del diagnóstico de la PCT (media: 12.7 años). Esto sugiere que un estricto control y monitorización a largo plazo del metabolismo de la glucosa de estos pacientes (no solo en el momento del diagnóstico de la PCT y además valorando incluso un test de sobrecarga oral) puede ser recomendable en el seguimiento rutinario de los pacientes con PCT y puede permitir una detección precoz de la DM.

Tras comparar los pacientes con PCT que desarrollaron alteraciones del metabolismo de la glucosa con aquellos que no desarrollaron, no hemos encontrado relación con ningún factor de riesgo de PCT, ningún parámetro de actividad de la PCT y ningún parámetro de daño hepático crónico (**Tabla 5**). Tampoco hemos encontrado diferencias respecto al IMC, indicando quizás que el IMC no sería un factor de riesgo importante para desarrollar DM en los pacientes con PCT.

En el modelo multivariante de la segunda parte del estudio, encontramos que nuestros pacientes con PCT y alteraciones del metabolismo de la glucosa habían presentado con más frecuencia niveles persistentemente elevados de ferritina sérica a lo largo del tiempo y una mayor probabilidad de tener algún familiar de primer grado con diabetes. Estos datos sugieren que estos dos factores estarían independientemente asociados con alteraciones del metabolismo de la glucosa en estos pacientes.

La relación entre hiperferritinemia y la DM en la población general ha sido ampliamente descrita en la literatura.<sup>43-47</sup> Sin embargo, la relación patogénica exacta no está bien establecida. La mayoría de datos en este campo vienen de estudios transversales o casos-control, donde la direccionalidad de la asociación no puede ser aclarada. En algunos de estos estudios, la ferritina se consideró que reflejaba la inflamación sistémica asociada al síndrome metabólico, puesto que fue determinada después del diagnóstico de diabetes. La hiperferritinemia se ha encontrado también en pacientes con resistencia insulínica en ausencia de siderosis hepática.<sup>48</sup> En cambio, Jiang y cols.<sup>45</sup> publicaron en 2004 en la revista JAMA un estudio prospectivo incluyendo 32826 mujeres sanas y encontraron que la hiperferritinemia, ajustada por la proteína C reactiva, precedía independientemente al desarrollo de diabetes. Estos resultados fueron posteriormente confirmados en otro estudio prospectivo que incluía 1277 sujetos sanos.<sup>47</sup> Los resultados de ambos estudios prospectivos apuntan hacia un papel causal de la sobrecarga férrica, expresada en forma de hiperferritinemia, en el subsecuente desarrollo de la diabetes.

Nuestro estudio, a pesar de ser retrospectivo y no ajustar por marcadores de actividad inflamatoria, también observa una hiperferritinemia persistente años antes del desarrollo de la DM. Además, es bien conocido que la sobrecarga férrica puede causar DM en pacientes con HH<sup>49</sup> y en modelos murinos la restricción férrica en la dieta o la quelación del hierro protege frente al desarrollo de diabetes y pérdida de función de las células beta pancreáticas.<sup>50</sup>

El hierro excesivo puede depositarse en el hígado y páncreas y causar daño oxidativo mediante la catalización de la formación de radicales hidroxilo, que son potentes pro-oxidantes. Junto con el daño pancreático intrínseco, este proceso conduce a una resistencia insulínica en el hígado, con el consiguiente y progresivo fallo de la célula beta y posterior desarrollo de la DM.<sup>45</sup>

La ferritina sérica puede también estar elevada en diferentes situaciones diferentes a la sobrecarga férrica. Se ha hallado que las citoquinas proinflamatorias en el tejido hepático regulan a la ferritina en el hígado mediante mecanismos hierro-independientes, y por lo tanto, un aumento de la ferritina sérica puede asociarse no solo a cambios en la homeostasis del hierro sino también a estrés oxidativo hepático e inflamación.<sup>51</sup> Sin embargo nuestro estudio no ha sido en población general sino en pacientes con PCT. Y hay una fuerte evidencia del papel crítico del hierro en la patogénesis de la PCT, ya que la mayoría de pacientes con PCT tienen siderosis hepática.<sup>8,10</sup> Las biopsias hepáticas de estos pacientes suelen mostrar siderosis<sup>10</sup> y la depleción de este hierro mediante flebotomías repetidas es el tratamiento más efectivo para la PCT.<sup>1,2,8</sup> Por lo tanto, la hiperferritinemia en el paciente con PCT puede reflejar perfectamente una sobrecarga férrica, aunque en nuestro estudio no podemos descartar que también sea por producción hepática de reactantes de fase aguda en el contexto de inflamación.

En nuestro trabajo no hemos encontrado una tendencia protectora de las flebotomías frente al riesgo de desarrollar DM. Se podría argumentar que aquellos pacientes que recibieron flebotomías estarían mejor protegidos contra la DM, debido a su mayor poder para reducir la sobrecarga férrica y por tanto la ferritina. Sin embargo, nuestro protocolo de flebotomías estaba más orientado a normalizar los niveles de porfirinas en orina (marcador de actividad de la PCT) que a disminuir la ferritina. Es por este motivo que las flebotomías se paraban cuando se conseguía la remisión de la PCT. Por lo tanto, parece razonable pensar que nuestra forma de utilizar las flebotomías no consiguiera en algunos pacientes normalizar a largo plazo la ferritina y de este modo no proteger contra el riesgo de DM asociado a la hiperferritinemia.

No obstante, la extrapolación de nuestros resultados sugiere que en pacientes (incluso en aquellos con remisión de la PCT) con una clara tendencia a presentar una ferritina persistentemente elevada, la disminución efectiva de los depósitos de hierro mediante flebotomías y una monitorización estrecha de la ferritina sérica podrían ayudar a prevenir la DM, como se ha mostrado en pacientes con HH.<sup>49</sup> Este modo de proceder podría intensificarse particularmente en aquellos pacientes con PCT y con historia familiar de primer grado de DM y/o en aquellos con estados prediabéticos (pacientes con IFG o tolerancia alterada a la glucosa).

En resumen, hemos caracterizado de forma detallada y en una gran cohorte de pacientes las manifestaciones clínicas de la PCT (con respecto al sexo y a aquellos casos de inicio atípico), los principales datos bioquímicos (ferritina sérica, transaminasas y glucemias), los factores de riesgo de PCT en nuestra población y las diferencias entre las formas familiares y las esporádicas. Gracias a esta primera parte también hemos podido investigar la historia natural y el mecanismo que se esconde detrás de la conocida asociación entre la PCT y la DM.

A pesar de las limitaciones de un estudio retrospectivo, nuestros resultados han mostrado que en nuestro medio la infección crónica por el VHC sigue siendo un factor muy importante en las formas esporádicas y que por lo tanto el factor predictivo más importante de una forma familiar es la ausencia de VHC.

Además, sugerimos por primera vez que la hiperferritinemia persistente (reflejando seguramente un estado crónico de sobrecarga férrica, sin que podamos descartar además un estrés oxidativo hepático y/o procesos inflamatorios) es un biomarcador de riesgo de alteraciones del metabolismo de la glucosa en pacientes con PCT. Estos hallazgos están en consonancia con otros estudios realizados en la población general y con otras enfermedades que cursan con sobrecarga férrica, como la hemocromatosis hereditaria, en los cuales la exposición crónica a una sobrecarga férrica (expresado como una ferritina elevada) ha demostrado ser un factor de riesgo independiente para desarrollar DM.



Serían necesarios estudios con diseños prospectivos y con muestras mayores, que incluyan parámetros de inflamación y otros conocidos factores de riesgo para desarrollar DM (p. ej: dieta, ejercicio, ingesta de corticoides y obesidad central) junto con otros parámetros de sobrecarga férrica, para poder clarificar definitivamente la compleja interrelación entre estas dos enfermedades. De este modo, se podría determinar si la PCT por si misma es realmente un factor de riesgo para desarrollar DM, como lo son otras enfermedades, y si la depleción férrica mediante tratamiento con flebotomías (incluso en periodos de remisión de la PCT) reduce el riesgo de desarrollar DM.

## **VII- APLICACIÓN PRÁCTICA**

**VII. 1.** El conocimiento más detallado de las manifestaciones clínicas, incluyendo las diferencias entre sexos y las formas de presentación atípicas, nos puede ayudar a realizar un diagnóstico correcto y más precoz. De esta forma se podrá comenzar antes un tratamiento para prevenir el daño cutáneo y hepático que puede causar esta porfiria.

**VII. 2.** Si conocemos que pacientes con PCT van a presentar con más probabilidad una forma familiar en nuestra población, podremos detectar con más facilidad y precocidad estos casos familiares de PCT. Esto llevaría posteriormente a un estudio familiar que nos pueda identificar casos de portadores asintomáticos dentro de la misma familia y que puedan prevenir los síntomas de la enfermedad mediante la evitación de los factores de riesgo extrínsecos ya conocidos (alcohol, estrógenos, sobrecarga férrica, etc...). Aunque las características de las formas familiares de PCT pueden variar geográficamente, creemos que nuestro modelo predictivo puede ser aplicado a otros países que tengan una alta prevalencia de infección por VHC, como los del sur de Europa (p. ej: Italia) o los Estados Unidos. Nuestra sugerencia en estas poblaciones es realizar siempre que se pueda una determinación de la actividad enzimática eritrocitaria de la UROD en cualquier paciente con PCT y especialmente en aquellos que no tengan la infección por VHC.

**VII. 3.** Nuestros resultados sobre la asociación entre la PCT y la diabetes pueden tener implicaciones prácticas que podrían afectar a la forma en la que tratamos y controlamos a nuestros pacientes con PCT. En primer lugar, creemos que ante un paciente con PCT debería descartarse la presencia de DM o IFG, preguntar por la presencia de familiares de primer grado con diabetes e incluso realizar un test de sobrecarga oral de glucosa. En aquellos pacientes con una tendencia clara a la hiperferritinemia persistente, incluso en periodos de remisión de la PCT, creemos que una disminución efectiva y mantenida de la sobrecarga férrica, sobre todo mediante la práctica de flebotomías y monitorización estricta, podría prevenir o mejorar las alteraciones del metabolismo de la glucosa. Esto se ha demostrado en otras enfermedades como la hemocromatosis hereditaria. Por lo tanto este podría ser un nuevo motivo para no dejar de usar un tratamiento tan antiguo como son las flebotomías. También creemos que los médicos que controlan a pacientes con PCT, deberían animar a este subgrupo de pacientes a adoptar medidas del estilo de vida dirigidas a prevenir la DM. Toda esta aproximación global anterior debería ser especialmente intensificada en aquellos pacientes con PCT que tengan familiares de primer grado con diabetes o aquellos que ya estén en un estado prediabético (IFG o tolerancia alterada a la glucosa).



## **VIII – CONCLUSIONES FINALES**

1. La hipertrichosis e hiperpigmentación facial es la forma de debut atípico más frecuente en nuestros pacientes con PCT. Esta presentación de la enfermedad no es infrecuente en las mujeres (25%). La hiperpigmentación generalizada o el aumento de transaminasas y ferritina sérica también pueden ser de forma aislada signos de inicio de la enfermedad.
2. El retraso medio en el diagnóstico de nuestros pacientes ha sido de casi 20 meses. A pesar de este dato, en nuestra cohorte actual apenas se observan lesiones esclerodermiformes o alopecias cicatriciales, signos clásicamente descritos en casos de diagnóstico muy tardío o sin tratamiento.
3. Hemos encontrado una correlación entre la sintomatología y la excreción urinaria de porfirinas, lo cual sugiere que la sintomatología cutánea típica se produce cuando se acumulan suficientes porfirinas en la piel
4. El 90% de nuestros pacientes presenta cifras elevadas de ALT en el momento del diagnóstico de la porfiria y en más de la mitad de casos estas cifras no se normalizan al remitir la PCT. Casi todos estos casos están asociados a infección por VHC. Hasta un tercio de nuestros pacientes presenta una tendencia a cifras persistentemente elevadas de ferritina sérica, incluyendo periodos de remisión de la PCT.

5. La infección crónica por VHC y el alcoholismo son los factores de riesgo de PCT más frecuentes en nuestro medio, especialmente en varones. En las mujeres los factores de riesgo más importantes son los estrógenos y las mutaciones en el gen HFE de la HH y la UROD.
6. El 86% de los pacientes, incluyendo también casos familiares, presenta más de un factor de riesgo reconocible para desarrollar PCT, lo cual apoya el origen multifactorial de la enfermedad.
7. Las formas hereditarias, con mutaciones en el gen URO-D, representan el 16,4% de nuestros casos. Esta prevalencia es más baja que en otras series posiblemente por la alta prevalencia de VHC y abuso de alcohol en nuestra población.
8. Existe una gran heterogeneidad molecular en las mutaciones del gen de la URO-D, habiéndose encontrado en los 25 casos familiares 14 mutaciones diferentes, siendo la más frecuente la E218G (exon 7).
9. Las formas hereditarias son más frecuentes en mujeres, mientras que las formas esporádicas son más frecuentes en varones y se asocian sobre todo a VHC y alcoholismo.
10. La ausencia de infección por VHC es el principal factor que nos debe hacer sospechar de una forma familiar en nuestro medio. Este razonamiento también podría aplicarse a otros países con alta prevalencia de VHC (como por ejemplo EEUU o Italia).



11. No hemos encontrado indicios de un déficit enzimático mayor en las formas familiares, presentando éstas una edad de inicio, sintomatología y excreción de porfirinas urinarias similar a las formas esporádicas.
  
12. Se ha identificado en toda nuestra cohorte de pacientes con PCT un 35,6% con alteraciones del metabolismo de la glucosa (GMA), DM o IFG. Este porcentaje es superior al del único estudio poblacional comparable que hemos encontrado en nuestro medio, pero no se puede descartar que esta asociación sea fortuita ya que no tenemos grupo control y la prevalencia de GMA en la población general es alta.
  
13. Las GMA se han desarrollado en un 81% de los casos después del diagnóstico de la PCT y tras un periodo medio de 12,5 años
  
14. Los pacientes con PCT que desarrollaron GMA habían tenido una alta prevalencia de hiperferritinemia persistente a lo largo de los años, incluso en periodos de remisión de la PCT. Esta prevalencia fue significativamente mayor que la de los pacientes que no habían desarrollado estos trastornos tras el mismo periodo de seguimiento

15. La hiperferritinemia persistente en un paciente con PCT puede ser un biomarcador de riesgo para el desarrollo a largo plazo de diabetes. Esta hiperferritinemia "prediabética" no queda claro si se puede atribuir a la sobrecarga férrica habitual que padecen estos pacientes o si también es un marcador de procesos inflamatorios.
  
16. Recomendamos el estricto control de glucemia y ferritina en el seguimiento a largo plazo de los pacientes con PCT.
  
17. Si se confirmase que la propia sobrecarga férrica de la PCT incrementa el riesgo de DM, el tratamiento con flebotomías podría bajar este riesgo y habría que considerarlo en cualquier paciente con PCT y sobretodo en aquellos con tendencia persistente a presentar cifras elevadas de ferritina.

## **IX- BIBLIOGRAFIA**

- 1 - Thunell S, Harper P. Porphyrins, porphyrin metabolism, porphyrias. III. Diagnosis, care and monitoring in porphyria cutanea tarda--suggestions for a handling programme. *Scand J Clin Lab Invest* 2000;60:561-79.
- 2 - Mascaró JM, Herrero C. New reasons for an archaic treatment: phlebotomy in sporadic porphyria cutanea tarda. *Arch Dermatol.* 2003;139:379-80.
- 3 - Elder GH. Porphyria cutanea tarda. *Semin Liver Dis* 1998;18:67-75.
- 4 - Badenas C, To-Figueras J, Phillips JD, Warby CA, Muñoz C, Herrero C. Identification and characterization of novel uroporphyrinogen decarboxylase gene mutations in a large series of porphyria cutanea tarda patients and relatives. *Clin Genet* 2009;75:346-53.
- 5 - Brady JJ, Jackson HA, Roberts AG, Morgan RR, Whatley SD, Rowlands GL, Darby C, Shudell E, Watson R, Paiker J, Worwood MW, Elder GH. Co-inheritance of mutations in the uroporphyrinogen decarboxylase and hemochromatosis genes accelerates the onset of porphyria cutanea tarda. *J Invest Dermatol* 2000;115:868-74.
- 6- Bygum A, Christiansen L, Petersen NE, Hørder M, Thomsen K, Brandrup F. Familial and sporadic porphyria cutanea tarda: clinical, biochemical and genetic features with emphasis on iron status. *Acta Derm Venereol* 2003;83:115-20.

7- Siersema PD, Rademakers LH, Cleton MI, ten Kate FJ, de Bruijn WC, Marx JJ, Wilson JH . The difference in liver pathology between sporadic and familial forms of porphyria cutanea tarda: the role of iron. *J Hepatol* 1995;23:259-67.

8- Elder GH. Porphyria cutanea tarda and related disorders. In: Kadish KM, Smith KM, Guillard R, eds. The porphyrin handbook: medical aspects of porphyria, Vol 14. San Diego, CA: Academic Press, 2003: 67-92.

9- Aarsand AK, Boman H, Sandberg S. Familial and sporadic porphyria cutanea tarda: characterization and diagnostic strategies. *Clin Chem* 2009;55:795-803.

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

11- Toll A, Celis R, Ozalla MD, Bruguera M, Herrero C, Ercilla MG. The prevalence of HFE C282Y gene mutation is increased in Spanish patients with porphyria cutanea tarda without hepatitis C virus infection. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2006;20:1201-6.

12- Herrero C, Vicente A, Bruguera M, Ercilla MG, Barrera JM, Vidal J, Terés J, Mascaró JM, Rodés J. Is hepatitis C virus infection a trigger of porphyria cutanea tarda? *Lancet* 1993;341:788-9.

13 - Bonkovsky HL, Poh-Fitzpatrick M, Pimstone N, Obando J, Di Bisceglie A, Tattre C, Tortorelli K, LeClair P, Mercurio MG, Lambrecht RW. Porphyria cutanea tarda, hepatitis C, and HFE gene mutations in North America.

*Hepatology* 1998;27:1661-9.

14 - Mendez M, Rossetti MV, Batlle AMDC, Parera VE. The role of inherited and acquired factors in the development of porphyria cutanea tarda in the Argentinean population. *J Am Acad Dermatol* 2005;52:417-24.

15 - Rossmann-Ringdahl I, Olsson R. Porphyria cutanea tarda in a Swedish population: risk factors and complications. *Acta Derm Venereol* 2005;85:337-41.

16- Bleasel NR, Varigos GA. Porphyria cutanea tarda. *Australas J Dermatol* 2000;41:197-206.

17- Sarkany RP. The management of porphyria cutanea tarda. *Clin Exp Dermatol* 2001;26:225-32.

18- Berman J. Porphyrie und Zuckerkrankheit: Aufsuchen der Porphyrie bei Zuckerkranken. *Z Ges Inn Med* 1956; 11:186-188

- 19- Grossman ME, Bickers DR, Poh-Fitzpatrick MB, Deleo VA, Harber LC. Porphyrinuria cutanea tarda. Clinical features and laboratory findings in 40 patients. *Am J Med* 1979;67:277-86.
- 20- Lundvall O, Weinfeld A, Lundin P. Iron storage in porphyria cutanea tarda. *Acta Med Scand* 1970;1-2:37-53.
- 21- Jalil S, Grady JJ, Lee C, Anderson KE. Associations among behavior-related susceptibility factors in porphyria cutanea tarda. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2010 ;8:297-302
- 22- Lamon JM, Frykholm BC. Pregnancy and porphyria cutanea tarda. *Johns Hopkins Med J* 1979;145:235-7.
- 23- Kostler E. Porphyrinuria cutanea tarda and diabetes mellitus. *Dermatol Monatsschr*. 1986;172:481-4.
- 24- Krivosheev AB, Kuimov AD, Krivosheeva IA. The combination of carbohydrate and porphyrin exchange disturbances: is it a chance or regularity?. *Klin Med (Mosk)*. 2006;84:51-4.
- 25- Naidenov E, Ivanov E, Polonov K, et al. Carbohydrate metabolic disorders in porphyria cutanea tarda. *Vutr Boles*. 1987;26:62-5

- 26- Lisi P, Santeusanio F, Lombardi G, Compagnucci P. Carbohydrate metabolism in porphyria cutanea tarda. *Dermatologica*. 1983;166:287-93.
- 27- Mengistu M. Glucose tolerance and glycosuria in Ethiopian porphyria cutanea tarda patients. *Trop Geogr Med*. 1987;39:361-5.
- 28- Mengistu M, Gebreselassie F, Tsega E. Glucose tolerance in adult Ethiopian patients with liver disease and porphyria cutanea tarda. *Ethiop Med J*. 1989;27:107-14.
- 29- Franks AG, Jr., Pulini M, Bickers DR, et al. Carbohydrate metabolism in porphyria cutanea tarda. *Am J Med Sci*. 1979;277:163-71
- 30- Lim CK, Peters TJ. Urine and faecal porphyrin profiles by reversed-phase high-performance liquid chromatography in the porphyrias. *Clin Chim Acta* 1984;139:55-63.
- 31- McManus J, Blake D, Ratnaike S. An assay of uroporphyrinogen decarboxylase in erythrocytes. *Clin Chem* 1988; 34 : 2355–2357.
- 32- Boffa MJ, Reed P, Weinkove C, Ead RD. Hypertrichosis as the presenting feature of porphyria cutanea tarda. *Clin Exp Dermatol* 1995;20:62-4.



- 33- Ramsay CA, Magnus IA, Turnbull A, Baker H. The treatment of porphyria cutanea tarda by venesection. *Q J Med* 1974;43:1-24.
- 34- Pascual C, Garcia-Patos V, Bartralot R, Pedragosa R, Capdevila M, Barberá J, Castells A. Cutaneous pigmentation, only manifestation of porphyria cutanea tarda in a HIV-1 positive patient. *Ann Dermatol Venereol* 1996;123:262-4.
- 35- Cruz-Rojo J, Fontanellas A, Moran-Jimenez MJ, Navarro-Ordóñez S, García-Bravo M, Méndez M, Muñoz-Rivero MC, de Salamanca RE. Precipitating/aggravating factors of porphyria cutanea tarda in Spanish patients. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2002;48:845-52.
- 36- Koszo F, Morvay M, Dobozy A, Simon N. Erythrocyte uroporphyrinogen decarboxylase activity in 80 unrelated patients with porphyria cutanea tarda. *Br J Dermatol* 1992;126:446-9.
- 37- Bruguera M, Fornis X. Hepatitis C in Spain. *Med Clin (Barc)*. 2006; (3):113-7.
- 38- Standards of medical care in diabetes--2010. *Diabetes Care*. 2010 ;33 Suppl 1:S11-61.
- 39- Masia R, Sala J, Rohlfis I, et al. Prevalence of diabetes mellitus in the province of Girona, Spain: the REGICOR study. *Rev Esp Cardiol*. 2004;57:261-4.

40- Berman J, Bielicky T. Some external factors in the etiology of porphyria cutanea tarda and diabetes mellitus with special reference to syphilitic infection and its treatment. *Dermatologica*. 1956;113:78-87.

41- Burnham TK, Fosnaugh RP. Porphyria, diabetes, and their relationship. A case report. *Arch Dermatol*. 1961;83:717-22.

42- Rook A, Champion RH. Porphyria cutanea tarda and diabetes. *Br Med J*. 1960;1:860-1.

43- Jehn ML, Guallar E, Clark JM, et al. A prospective study of plasma ferritin level and incident diabetes: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Am J Epidemiol*. 2007;165:1047-54.

44- Sun L, Franco OH, Hu FB, et al. Ferritin concentrations, metabolic syndrome, and type 2 diabetes in middle-aged and elderly chinese. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008 ;93:4690-6.

45- Jiang R, Manson JE, Meigs JB, et al. Body iron stores in relation to risk of type 2 diabetes in apparently healthy women. *JAMA*. 2004;291:711-7.

46- Forouhi NG, Harding AH, Allison M, et al. Elevated serum ferritin levels predict new-onset type 2 diabetes: results from the EPIC-Norfolk prospective study. *Diabetologia*. 2007;50:949-56.

47- Fumeron F, Péan F, Driss F, et al. Insulin Resistance Syndrome (DESIR) Study Group. Ferritin and transferrin are both predictive of the onset of hyperglycemia in men and women over 3 years: the data from an epidemiological study on the Insulin Resistance Syndrome (DESIR) study. *Diabetes Care*. 2006; 29:2090-4.

48- Brudevold R, Hole T, Hammerstrøm J. Hyperferritinemia is associated with insulin resistance and fatty liver in patients without iron overload. *PLoS One*. 2008; 3:e3547

49- Utzschneider KM, Kowdley KV. Hereditary hemochromatosis and diabetes mellitus: implications for clinical practice. *Nat Rev Endocrinol*. 2010;6:26-33.

50- Cooksey RC, Jones D, Gabrielsen S, et al. Dietary iron restriction or iron chelation protects from diabetes and loss of beta-cell function in the obese (ob/ob lep<sup>-/-</sup>) mouse. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2010;298:E1236-43.

51- Torti FM, Torti SV. Regulation of ferritin gene and protein *Blood*. 2002; 99:3505-16

## **X- ANEXOS**

**PUBLICACIÓN NO CONSTITUTIVA DE LA TESIS DOCTORAL PERO  
RELACIONADA CON EL TRABAJO REALIZADO Y EN LA QUE HA  
COLABORADO EL DOCTORANDO**

**Identification and characterization of novel uroporphyrinogen  
decarboxylase gene mutations in a large series of porphyria cutanea  
tarda patients and relatives.**

Badenas C, To-Figueras J, Phillips JD, Warby CA, Muñoz C, Herrero C.

***Clin Genet* 2009; 75: 346–353**

## Original Article

# Identification and characterization of novel uroporphyrinogen decarboxylase gene mutations in a large series of porphyria cutanea tarda patients and relatives

Badenas C, To-Figueras J, Phillips JD, Warby CA, Muñoz C, Herrero C. Identification and characterization of novel uroporphyrinogen decarboxylase gene mutations in a large series of porphyria cutanea tarda patients and relatives.

Clin Genet 2009; 75: 346–353. © Blackwell Munksgaard, 2009

Porphyria cutanea tarda (PCT) arises from decreased hepatic activity of uroporphyrinogen decarboxylase (UROD). Both genetic and environmental factors interplay in the precipitation of clinically overt PCT, but these factors may vary between different geographic areas. Decreased activity of UROD in erythrocytes was used to identify patients with *UROD* mutations among a group of 130 Spanish PCT patients. Nineteen patients (14.6%) were found to harbor a mutation in the *UROD* gene. Eight mutations were novel: M1I, 5del10, A22V, D79N, F84I, Q116X, T141I and Y182C. Five others were previously described: F46L, V134Q, R142Q, P150L and E218G. The new missense mutations and P150L were expressed in *Escherichia coli*. D79N and P150L resulted in proteins that were localized to inclusion bodies. The other mutations produced recombinant proteins that were purified and showed reduced activity (range: 2.3–73.2% of wild type). These single amino acid changes were predicted to produce complex structural alterations and/or reduced stability of the enzyme. Screening of relatives of the probands showed that 37.5% of mutation carriers demonstrated increased urinary porphyrins. This study emphasizes the role of *UROD* mutations as a strong risk factor for PCT even in areas where environmental factors (hepatitis C virus) have been shown to be highly associated with the disease.

**C Badenas<sup>a,\*</sup>, J To-Figueras<sup>a,\*</sup>,  
JD Phillips<sup>b</sup>, CA Warby<sup>b</sup>,  
C Muñoz<sup>c</sup> and C Herrero<sup>c</sup>**

<sup>a</sup>Department of Biochemistry and Molecular Genetics, Hospital Clinic, IDIBAPS, University of Barcelona, Barcelona, Spain, <sup>b</sup>Division of Hematology, University of Utah School of Medicine, Salt Lake City, UT, USA, and <sup>c</sup>Department of Dermatology, Hospital Clinic, University of Barcelona, Barcelona, Spain

\*These authors contributed equally to this work.

Key words: porphyria – *UROD* gene – UROD protein

Corresponding author: Dr Jordi To-Figueras, Department of Biochemistry and Molecular Genetics, Hospital Clinic, University of Barcelona, Villarroel 170, Barcelona, Spain.  
Tel.: (34) 932275419;  
fax: (34) 932275697;  
e-mail: jto@clinic.ub.es

Received 10 September 2008,  
revised and accepted for publication  
1 December 2008

The porphyrias are a group of metabolic diseases that arise from disturbances in heme biosynthesis (1). Porphyria cutanea tarda (PCT; OMIM 176100), the most common form, arises from a deficiency of uroporphyrinogen decarboxylase (UROD), the fifth enzyme of the heme synthesis pathway (2). In overt PCT, there is accumulation of uroporphyrinogen and other polycarboxylated intermediates in the liver that are oxidized to the corresponding porphyrins. These are then released from the liver and circulate in plasma where they become phototoxic on sun-exposed areas, leading to formation of the bullous lesions

and hypertrichosis associated with the clinical phenotype of PCT (3).

At least two variants of the disease exist, designated types I and II. The most common form is type I (sporadic PCT, S-PCT) in which UROD deficiency is restricted to the liver. In type II (familial PCT, F-PCT), transmitted as an autosomal dominant trait, mutations in the *UROD* gene are present and enzyme activity is reduced in all tissues. Variable clinical expression is seen in F-PCT and in the absence of aggravating factors is rarely sufficient to trigger an active phenotype.

Several environmental factors have been shown to precipitate overt clinical PCT in both F-PCT and S-PCT, including alcohol abuse, chronic hepatitis C virus (HCV) infection and use of oral estrogens (3). Mutations in the hemochromatosis gene (*HFE*) facilitate hepatic siderosis that is recognized as a significant risk factor for developing PCT (4).

In overt PCT, the catalytic activity of UROD in the liver decreases to ~20% of normal without an apparent change in protein level. Similar observations have been reported in chemically induced porphyria in rodents. The conclusion from these studies was that a heat-stable competitive inhibitor of UROD is formed *in vivo* by a cytochrome P450-dependent mechanism (5, 6).

The human UROD protein (accession number NP\_000365) is a cytosolic homodimer that catalyzes the sequential decarboxylation of four acetate chains of uroporphyrinogen to form the tetracarboxylic coproporphyrinogen. The amino acid sequence is highly conserved among species, and the crystal structures of both human and tobacco UROD have been solved (7, 8). The two structures are very similar with respect to the overall fold.

The human *UROD* gene has been cloned, sequenced and mapped to the short arm of chromosome 1 (1p34). The gene is ~3.4 kb and has 10 exons (9). Approximately 70 different mutations have been identified in *UROD* that associate with F-PCT or the homozygous variant of PCT named hepatoerythropoietic porphyria [HEP; (10)].

In this study, we examined a series of Spanish PCT patients, mainly from the northeastern Mediterranean area (Barcelona). In this region, the high prevalence of chronic HCV infection has been shown to significantly contribute to the appearance of S-PCT (11). Among this cohort of PCT patients, we characterized new mutations in the *UROD* gene, studied the pathogenicity of the new mutants and explored the complex structural and functional consequences of single amino acid substitutions in the UROD protein. We also screened family members in search of silent mutation carriers that may present alterations in the porphyrin excretion profile.

## Materials and methods

### Subjects studied

We studied 130 patients with suspected PCT who were referred to the Dermatology Unit, Hospital Clinic of Barcelona (Spain) during the period 2004–2007 for diagnosis or follow-up. There were 100 men and 30 women, Spanish Caucasians, liv-

ing mainly in the area of Barcelona. A diagnosis of PCT was established on clinical grounds and confirmed by biochemical analysis of urine and feces. The mean age was 61 (range: 25–86 years). The average age at the clinical onset of disease was 44.8 (range: 22–74 years), with no significant differences between men and women.

All patients showed a positive response to standard treatment of PCT. A clinical history and a lifestyle questionnaire were given to all patients with data including age at onset of the cutaneous symptoms, associated diseases, family history, estrogen use and drug and alcohol consumption. Additional biochemical and genetic data for most of these patients were available including serum markers of HCV infection, markers of hepatic iron status and presence or absence of mutations in the *HFE* gene (C282Y and H63D). All patients were asked to enroll in a study that would include further biochemical analysis of urine porphyrins, erythrocyte UROD activity and sequencing of the *UROD* gene.

Additionally, 39 relatives of 12 probands were also genotyped and their urinary porphyrins were examined.

The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki principles and was approved by the Ethics Committee of the Hospital Clinic of Barcelona. Written consent was signed by all patients and relatives studied.

### Biochemical characterization of PCT in patients and relatives

Urinary porphyrin excretion pattern was analyzed by reverse-phase high-pressure liquid chromatography (HPLC) according to Lim and Peters (12).

Separation of porphyrins and isomers was achieved using an analytical column of 250 × 4.6 mm, 5- $\mu$ m particle size (BDS-Hypersil; Shandon HPLC, Cheshire, UK). Each porphyrin and isomer fraction was quantified independently in urine and referred to nmol/mmol creatinine. Urinary porphyrin excretion profiles were classified as being either normal (total porphyrins in urine <35 nmol/mmol creatinine and normal distribution: coproporphyrin III > I, coproporphyrin I + III > uroporphyrins, and heptacarboxyl porphyrin III <0.2 nmol/mmol creatinine) or abnormal [total porphyrins >35 nmol/mmol creatinine and significant deviations from the normal distribution (13)].

### Erythrocytes UROD activity

UROD activity in erythrocytes was measured essentially according to McManus et al. (14).

Briefly, pentacarboxyl porphyrin I (Porphyrin Products, Logan, Utah) was reduced to pentacarboxylic porphyrinogen I (PPI) with a sodium mercury amalgam (Sigma-Aldrich), and red blood cells lysates were incubated adding PPI as a substrate of UROD, for 30 min at pH 6.0, 37°C, under nitrogen. The substrate concentration used was ~10-fold greater than the  $K_m$  of UROD for PPI. The reaction was stopped by adding 0.5 ml of a 1:1 mixture of trichloroacetic acid (10%) and dimethyl sulfoxide containing 0.7  $\mu$ mol of mesoporphyrin per liter as internal standard. The amount of coproporphyrinogen formed from PPI was assessed by HPLC according to the method described above. UROD activity is reported as pmoles of coproporphyrinogen formed per hour per mg of hemoglobin (U/mgHb).

#### Sequencing of the *UROD* loci

Genomic DNA was extracted from whole blood samples following the salting-out procedure (15). We analyzed exons 1–10 of the *UROD* gene and the associated splice donor and acceptor sites. The primers used for exon amplification are available from the authors.

Polymerase chain reaction products were purified using the GFX™ PCR DNA and gel band purification kit (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) and automatically sequenced using the BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) and an ABI3100 automatic sequencer (Applied Biosystems). Direct sequencing was performed using primers available from the authors.

#### Expression of UROD proteins

The expression plasmid pHT77 contains the human *UROD* complementary DNA under the control of the T7 inducible promoter (16). Missense mutations in the *UROD* gene identified in this study were introduced into pHT77 using the QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA). The mutations were confirmed by sequencing.

UROD proteins were expressed in Rosetta2 (*DE3*) pLysS (Novagen, Madison, WI) in 2-l cultures by autoinduction. Cells were harvested and resuspended in 50 mM Tris at pH 8.0 and 100 mM NaCl and allowed to lyse for 30 min on ice. The lysate was sonicated for three times for 30 s for 1.5 min total. The cell debris was removed by centrifugation and the supernatant was filtered through a 0.8- $\mu$ m filter. The UROD was purified on a 1 ml Ni-NTA (Qiagen, Valencia, CA) col-

umn using a step gradient with buffers containing 50 mM NaPO<sub>4</sub> at pH 7.0, 500 mM NaCl, 5% glycerol and 2.5 mM  $\beta$ -mercaptoethanol with or without 250 mM imidazole. Peak fractions containing UROD were pooled, concentrated to 1–6 mg/ml and dialyzed against 4 l 50 mM Tris at pH 6.8, 150 mM NaCl, 5% glycerol and 1 mM  $\beta$ -mercaptoethanol. Proteins were assayed for enzymatic activity as previously described (17).

## Results

### Identification of F-PCT patients

Erythrocyte UROD activity was measured in all PCT patients. Selection of candidates for sequencing the *UROD* loci and the identification of individuals harboring *UROD* mutations were performed as follows.

A preliminary receiver operating characteristic (ROC) curve was constructed for UROD activity in erythrocytes based on the *UROD* genotyping (presence or absence of mutation) as a reference (18). UROD activity of the first 20 individuals (including 10 patients and 10 family members) who were found to harbor a mutation within the *UROD* gene was plotted against enzyme activity of 21 control individuals who were negative for a mutant *UROD* allele (including 10 family members and 11 unrelated controls).

The area under the curve was 0.983 (SE: 0.016; 95% CI: 0.914–0.998). A provisional cutoff value for UROD activity was set at 38 U/mgHb (sensitivity: 96.7; 95% CI: 82.7–99.4; specificity: 88.6; 95% CI: 73.2–96.7). From there on, all new consecutive PCT patients, with erythrocyte UROD activity below the cutoff point, were sequenced ( $n = 6$ ; all were found to be carriers). All the patients who showed UROD activity between 38 U/mgHb (cutoff) and 43 U/mgHb (cutoff + 15; sensitivity: 100; 95% CI: 88.3–100) were also sequenced ( $n = 25$ ; 3 were found to be carriers). Fifteen additional patients with high UROD activity (all UROD >43 U/mgHb) were randomly selected and genotyped. None of these patients were found to be carriers of mutant *UROD* alleles. This allowed classification of the patients into F-PCT ( $n = 19$ ; 12 women and 7 men; all genotyped and with a confirmed mutation) and S-PCT ( $n = 111$ ; 18 women and 93 men; 37 genotyped and being wild type and the rest with high UROD activity and not genotyped). All the relatives ( $n = 39$ ) were directly genotyped. At the conclusion of the study, a new ROC curve was constructed based on all individuals sequenced and with UROD measured ( $n = 95$ ; Fig. 1). The cutoff point was adjusted and set at 39 U/mgHb



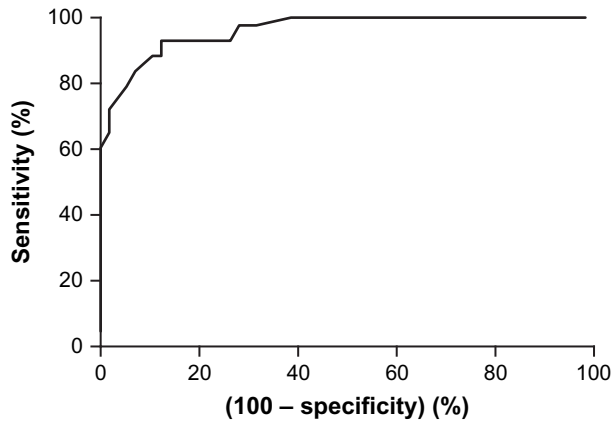


Fig. 1. Receiver operating characteristic curve for UROD activity in erythrocytes. Area under the curve (95% CI): 0.9625 (0.9314–0.9935).

(sensitivity: 93.00; 95% CI: 80.94–98.5; specificity: 87.7; 95% CI: 75.3–94.9).

Consequently, the proportion of F-PCT among this series of Spanish PCT patients was 14.6%. No patients with a family history of PCT and normal UROD activity (PCT type III) were identified in this study.

Identification of mutations within the *UROD* gene

Sequencing of the *UROD* loci of the F-PCT patients allowed identification of 13 different mutations within the *UROD* gene including 8 novel mutations (Table 1).

Expression of new missense mutations in prokaryotes

Previously uncharacterized missense mutations were cloned into an expression system and purified

for additional analysis. The P150L mutation that had been initially found in Italy but not expressed in prokaryotes was incorporated into this analysis (19). Recombinant UROD proteins were recovered from four of the mutants: A22V, F84I, T141I and Y182C (Fig. 2a). Two of the mutants, D79N and P150L, were expressed in the *Escherichia coli* to significant levels; however, the proteins were not present in the soluble fraction and were not studied further (Fig. 2b). The activities of the mutant proteins were measured using uroporphyrinogen I and uroporphyrinogen III as substrates. The activities for each are shown in Table 2.

Additional risk factors

Additional risk factors for PCT were investigated among this group of F-PCT patients. Twelve out of 19 patients (63%) presented at least one identifiable risk factor in addition to the *UROD* gene mutation. Three patients were heterozygous for the *HFE C282Y* allele and other three were homozygous for the *H63D* allele; three other patients presented anti-HCV antibodies in blood and other three confirmed the use of estrogens either for oral contraception or menopausal symptoms. Daily alcohol consumption >40 g was found in 6 out of 7 men and in 1 out of 12 women.

Comparison between F-PCT and S-PCT patients showed that the only environmental risk factor which was significantly different between both groups was chronic HCV infection (15% and 75%, respectively).

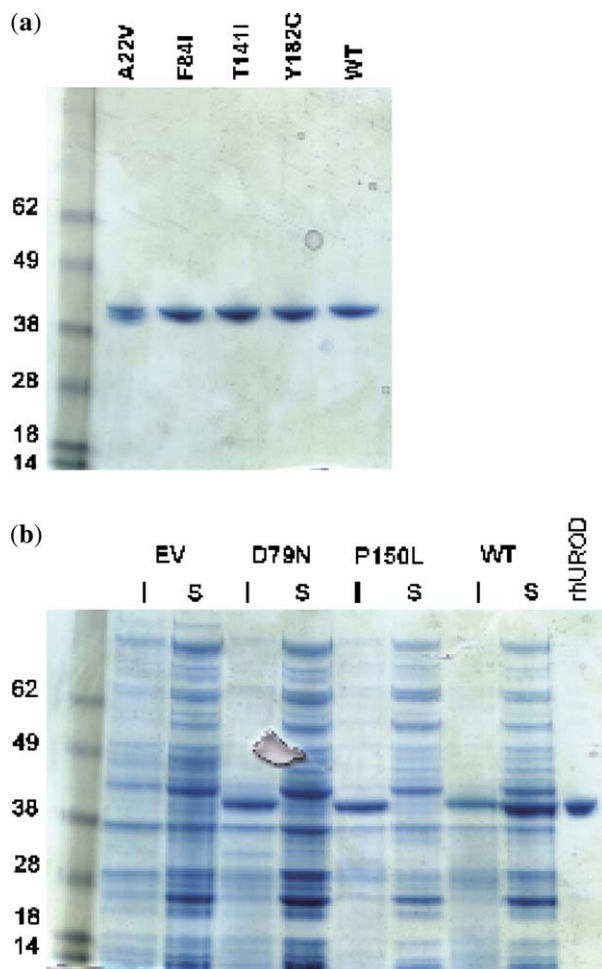
Family study

We genotyped 39 relatives belonging to 12 different F-PCT families. Mutations in *UROD* were

Table 1. Mutations found in the *UROD* gene among porphyria cutanea tarda patients

Mutation	Exon	Nucleotide position	Number of cases	Conserved	Reference
M1I	1	3G>A	1	T	Present study
5del10	1	5	1		Present study
A22V	2	65C>T	1	L	Present study
F46L	4	138T>I	2	H	Ged et al. (2002)
D79N	4	235G>A	1	T	Present study
F84I	4	250T>A	1	H	Present study
Q116X	5	346C>T	1		Present study
V134Q	5	399-401TGC>CCA	2	L	Meguro et al. (1994)
T141I	5	422C>T	1	L	Present study
R142Q	5	425G>A	2	H	Cappellini et al. (2001)
P150L	5	449C>T	1	H	Martinez et al. (2002)
Y182C	6	645A>G	1	H	Present study
E218G	7	653A>G	4	H	Méndez et al. (2007)

H, highly conserved; L, low conservation among divergent species; T, totally conserved.



**Fig. 2.** Expression and purification of UROD proteins in *Escherichia coli*. (a) Recombinant proteins were purified using an Ni-NTA resin and separated on a 10% sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) gel. Recombinant human UROD runs at an apparent molecular weight of 42 kDa. The UROD without a mutation (wild type, WT) is run for comparison. (b) The insoluble pellet (I) and the soluble supernatant (S) were separated on a 10% SDS-PAGE gel; D79N, P150L and WT were compared with the purified recombinant human UROD (rhUROD). The UROD protein from D79N and P150L is present in the insoluble fraction, while WT is primarily present in the soluble fraction. EV, empty vector control.

**Table 2.** Activity of UROD proteins

Mutation	Uroporphyrinogen I activity <sup>a</sup>		Uroporphyrinogen III activity <sup>b</sup>	
	activity <sup>a</sup>	SD	activity <sup>b</sup>	SD
A22V	62.6	12.3	73.2	14.5
F84I	1.7	1.3	2.3	1.4
T141I	21.3	2.9	26.7	4.0
Y182C	40.0	10.8	65.2	10.0

<sup>a</sup>Activity of UROD mutant proteins toward uroporphyrinogen I.  
<sup>b</sup>Activity of UROD mutant proteins toward uroporphyrinogen III. Activity shown as percentage of wild-type activity.

detected in 16 of the relatives genotyped (41%). On examination, 6 of 16 (37.5%) revealed increased urinary porphyrins and a typical PCT pattern (Table 3). Only three of them presented dermatological manifestations, thus documenting the existence of a number of PCT family carriers with only biochemical abnormalities.

## Discussion

The proportion of PCT patients classified as F-PCT, based on the presence of a mutant *UROD* allele, has differed based on geographic and ethnic factors. According to published reports that include *UROD* genotyping, this may range from 24% found among Danish PCT patients to 50% found among a series of patients from Chile (20, 21). Our study found a somewhat lower percentage of F-PCT (14.6%), which may be in accordance with previous studies that found a high prevalence of HCV infection among the general Spanish population and a probable major role of HCV infection in the triggering of PCT in this geographic zone (11, 22).

The prevalence of *UROD* mutations among the general population is unknown but is most likely very low. Therefore, the finding of *UROD* mutations in 14.6% of our patients, even if lower to that found in other studies, clearly shows that harboring a *UROD* mutation is a major risk factor for developing PCT. Moreover, the existence of a significant number of family carriers with increased urinary porphyrins (Table 3) reinforces this notion. However, given the frequent coexistence of other risk factors among the F-PCT patients (at least 63% in our series), the inherited *UROD* mutation may be viewed as one factor among

**Table 3.** Screening of family members

Family	Mutation	Number screened <sup>a</sup>	Number of carriers <sup>b</sup>	Urinary porphyrins <sup>c</sup>
1	V134Q	5	3	0
2	V134Q	6	2	1
3	R142Q	4	1	0
4	E218G	2	1	0
5	E218G	1	0	0
6	M1I	2	2	2
7	D79N	3	1	0
8	F46L	1	0	0
9	P150L	2	2	1
10	R142Q	2	2	0
11	A22V	1	0	0
12	F46L	7	2	2

<sup>a</sup>Number of family members genotyped.

<sup>b</sup>Family members carriers of *UROD* mutation.

<sup>c</sup>Family members with increased urinary porphyrins and porphyria cutanea tarda pattern.

a complex series of events that ultimately lead to the clinical precipitation of the disease.

One of the previously reported mutations, the E218G mutation, has been observed in Spanish PCT patients unrelated to the four probands reported in this study, thus suggesting a relatively high frequency of this mutation among Spanish F-PCT carriers (23).

The F46L mutation, found in two independent probands of our series, had been previously reported in patients with HEP and also in a PCT patient from Chile (21, 24, 25). One study reported an HEP patient with a unique urinary excretion pattern with a predominance of pentacarboxylated porphyrins (25). This observation was not confirmed in the F-PCT patients reported in this study. Both our patients with the F46L mutation presented with typical urine porphyrin profiles with a predominance of uroporphyrin and heptacarboxylated porphyrins.

The V134Q mutation has also been reported both in HEP and in PCT patients (20, 26, 27). Its appearance in a different series of patients is also striking as the amino acid change involved is distant from the enzyme active site and the purified recombinant UROD yielded a nearly normal activity when engineered in prokaryotes (27). This suggests that this mutation creates a UROD protein that may be rapidly degraded *in vivo*.

Mutations initially identified in HEP patients were considered to rarely precipitate overt disease when present as simple heterozygotes (3). One study reported the existence of an HEP pedigree member who was heterozygous for the F46L allele and presented a normal erythrocyte UROD activity (24).

Nonetheless, our results as a whole tend to confirm an increasing number of HEP mutations being found also among heterozygous F-PCT patients.

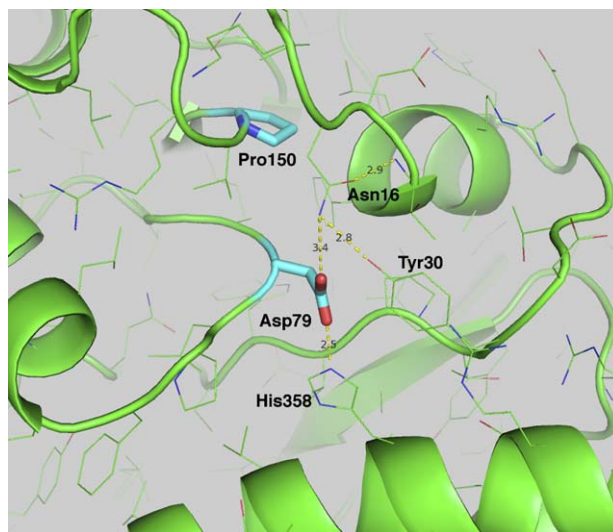
The M1I substitution (c.3G>A) is a novel mutation found in this study, although a different change in the same codon, M1T, has been previously reported (20). The absence of an initial methionine codon within the messenger RNA (mRNA) Kozac consensus sequence is predicted to lead to a loss of translation from the mutant allele.

Nucleotide sequencing of a proband identified a C>T substitution at nucleotide position 346 in exon 5 (Table 1). The predicted effect is a change from glutamine at amino acid position 116 to a stop codon (CAG > TAG), designated Q116X. This may yield a truncated protein of 115 amino acids or nonsense-mediated mRNA decay. A similar effect can be predicted from a deletion of 10 bp initiated at the fifth nucleotide of exon 1 (5del10; Table 1).

Our study identified several new missense mutations. Characterization of these (plus the already reported P450L) (28) included heterologous expression and biochemical characterization.

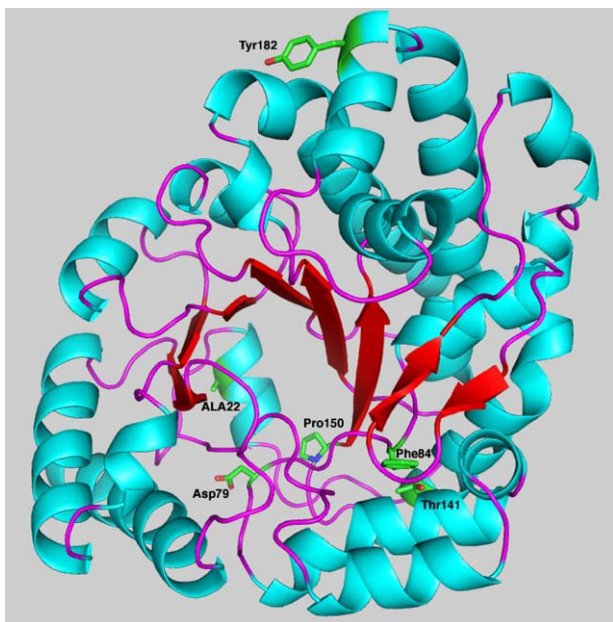
The two mutants that failed to produce a soluble protein are located at the base of the  $(\beta/\alpha)_8$ -barrel. The aspartic acid at position 79 (D79N mutant) is totally conserved across 13 species of UROD (7). The extensive hydrogen bonding network of D79, to H358, N16 and Y30 is important to correctly position the terminus of the helix as it transitions into the  $\beta$ -sheet. Both carboxylate oxygen atoms participate in the formation of the hydrogen bonding network (Fig. 3). The proline in position 150 is also situated at the base of an  $\alpha$ -helix that turns sharply up into one of the  $\beta$ -sheets that forms the core of the barrel. Proline at position 150 (P150L) is highly conserved, and disruption of either of these two leads to a misfolded protein that is trafficked to inclusion bodies.

The four remaining mutants produce a protein that is soluble but has reduced catalytic activity (Table 2). The alteration of alanine 22 to a valine is a minor structural shift (Fig. 4). The residue is buried in at the base of the barrel, and the additional bulk of the valine residue may be sufficient to alter the active site geometry. The minimal loss in catalytic activity supports this; however, this alteration may decrease the stability of the protein thereby reducing the total amount of UROD available for catalysis. Residue 84 is one of several phenylalanines that forms the base of the active site (Fig. 4). This network of hydrophobic aromatic residues forms a platform that allows the



*Fig. 3.* Location of UROD mutants at the base of the TIM barrel. Mutants D79N and P150L destabilize the core of the barrel and lead to misfolding of the proteins. The hydrogen bonding distances of D79 are shown as dashed yellow lines.





*Fig. 4.* Location of UROD missense mutants identified in this study. A monomer of UROD with  $\beta$ -sheets in red,  $\alpha$ -helices in blue and stands in purple is shown in the cartoon. The side chains of amino acids mutated are labeled and shown in green.

substrate to adopt the domed configuration that positions the four pyrrole nitrogens to hydrogen bond to aspartic acid 86.

Threonine in position 141 is positioned with the side chain exposed to the interior of the structure. The larger sidespin of isoleucine is unable to be accommodated in this environment. Compensatory changes in the structure would likely be required to adjust to the bulk of the isoleucine. The tyrosine in position 182 is located on the dimer interface and has few inter- or intramolecular interactions. The loss in catalytic activity may be due to subtle alterations in the structure that affect interaction between monomers.

The family study showed that a significant proportion of mutation carrier relatives present abnormal and increased urinary excretion of porphyrins. Only a few of them presented with clinical symptoms, suggesting that the mutations may induce only subtle biochemical manifestations in some individuals. The study also confirms that a high proportion of UROD mutation carriers never develop overt PCT symptoms and that the factors that may lead to clinical expression in the patients remain in many cases obscure.

### Acknowledgements

We are grateful to Maria Sala for their skilled technical assistance. This study was supported by Spanish 'Fondo de Investi-

gación Sanitaria' (grant PI06/0150) and the NIH RO-1 DK20503 to J. P. The authors state no conflict of interest.

### References

- Kappas A, Sassa S, Galbraith RA, Nordmann Y. The porphyrias. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, Vol. 2. New York, NY: McGraw-Hill, 1995: 2103–2160.
- Kushner JP. The enzymatic defect in porphyria cutanea tarda. *N Engl J Med* 1982; 306 (13): 799–800.
- Elder GH. Porphyria cutanea tarda. *Semin Liver Dis* 1998; 18 (1): 67–75.
- Bulaj ZJ, Phillips JD, Ajioka RS et al. Hemochromatosis genes and other factors contributing to the pathogenesis of porphyria cutanea tarda. *Blood* 2000; 95 (5): 1565–1571.
- Smith AG. Porphyria caused by chlorinated AH receptor ligands and associated mechanisms of liver injury and cancer. In: Kadish KM, Smith KM, Guillard R, eds. *The porphyrin handbook: medical aspects of porphyria*, Vol. 14. San Diego, CA: Academic Press, 2003: 169–210.
- Phillips JD, Bergonia HA, Reilly CA, Franklin MR, Kushner JP. A porphomethene inhibitor of uroporphyrinogen decarboxylase causes porphyria cutanea tarda. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104 (12): 5079–5084.
- Whitby FG, Phillips JD, Kushner JP, Hill CP. Crystal structure of human uroporphyrinogen decarboxylase. *EMBO J* 1998; 17 (9): 2463–2471.
- Martins BM, Grimm B, Mock HP, Huber R, Messerschmidt A. Crystal structure and substrate binding modeling of the uroporphyrinogen-III decarboxylase from *Nicotiana tabacum*. Implications for the catalytic mechanism. *J Biol Chem* 2001; 276 (47): 44108–44116.
- Romana M, Dubart A, Beaupain D, Chabret C, Goossens M, Romeo PH. Structure of the gene for human uroporphyrinogen decarboxylase. *Nucleic Acids Res* 1987; 15 (18): 7343–7356.
- The Human Gene Mutation Database (HGMD), Institute of Medical Genetics in Cardiff. Retrieved July 2008, from <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>
- Herrero C, Vicente A, Bruguera M et al. Is hepatitis C virus infection a trigger of porphyria cutanea tarda? *Lancet* 1993; 341 (8848): 788–789.
- Lim CK, Peters TJ. Urine and faecal porphyrin profiles by reversed-phase high-performance liquid chromatography in the porphyrias. *Clin Chim Acta* 1984; 139 (1): 55–63.
- Smith SG, Rao KR, Jackson AH. The porphyrins of normal human urine, with a comparison of the excretion pattern in porphyria cutanea tarda. *Int J Biochem* 1980; 12 (5–6): 1081–1084.
- McManus J, Blake D, Ratnaik S. An assay of uroporphyrinogen decarboxylase in erythrocytes. *Clin Chem* 1988; 34 (11): 2355–2357.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky H. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16 (3): 12–15.
- Phillips JD, Whitby FG, Kushner JP, Hill CP. Characterization and crystallization of human uroporphyrinogen decarboxylase. *Protein Sci* 1997; 6 (6): 1343–1346.
- Studier FW. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expr Purif* 2005; 41 (1): 207–234.
- Zweig MH, Campbell G. Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. *Clin Chem* 1993; 39 (4): 561–577.

19. Cappellini MD, Martinez di Montemuros F, Tavazzi D et al. Seven novel point mutations in the uroporphyrinogen decarboxylase (UROD) gene in patients with familial porphyria cutanea tarda. *Hum Mutat* 2001; 17 (4): 350.
20. Christiansen L, Brøns-Poulsen J, Hørder M, Brock A, Petersen NE. Expression and characterization of six clinically relevant uroporphyrinogen decarboxylase gene mutations. *Scand J Clin Lab Invest* 2005; 65 (3): 227–235.
21. Poblete-Gutiérrez P, Méndez M, Wiederholt T et al. The molecular basis of porphyria cutanea tarda in Chile: identification and functional characterization of mutations in the uroporphyrinogen decarboxylase gene. *Exp Dermatol* 2004; 13 (6): 372–379.
22. Bruguera M, Fornis X. Hepatitis C in Spain. *Med Clin (Barc)* 2006; 127 (3): 113–117.
23. Méndez M, Poblete-Gutiérrez P, García-Bravo M et al. Molecular heterogeneity of familial porphyria cutanea tarda in Spain: characterization of 10 novel mutations in the UROD gene. *Br J Dermatol* 2007; 157 (3): 501–507.
24. Ged C, Ozalla D, Herrero C et al. Description of a new mutation in hepatoerythropoietic porphyria and prenatal exclusion of a homozygous fetus. *Arch Dermatol* 2002; 138 (7): 957–960.
25. Armstrong DK, Sharpe PC, Chambers CR, Whatley SD, Roberts AG, Elder GH. Hepatoerythropoietic porphyria: a missense mutation in the UROD gene is associated with mild disease and an unusual porphyrin excretion pattern. *Br J Dermatol* 2004; 151 (4): 920–923.
26. Meguro K, Fujita H, Ishida N et al. Molecular defects of uroporphyrinogen decarboxylase in a patient with mild hepatoerythropoietic porphyria. *J Invest Dermatol* 1994; 102 (5): 681–685.
27. Phillips JD, Parker TL, Schubert HL, Whitby FG, Hill CP, Kushner JP. Functional consequences of naturally occurring mutations in human uroporphyrinogen decarboxylase. *Blood* 2001; 98 (12): 3179–3185.
28. Martinez di Montemuros F, Di Pierro E, Patti E et al. Molecular characterization of porphyrias in Italy: a diagnostic flow-chart. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2002; 48 (8): 867–876.

**ARTÍCULO DE COMENTARIO SOBRE UNA DE LAS PUBLICACIONES  
CONSTITUYENTES DE LA TESIS DOCTORAL**

**Porphyria cutanea tarda, iron, inflammation and diabetes mellitus**

Hift RJ

***Br J Dermatol* 2011; 165: 453-454**

## Porphyria cutanea tarda, iron, inflammation and diabetes mellitus

DOI: 10.1111/j.1365-2133.2011.10518.x

### ORIGINAL ARTICLE, p 486

Porphyria cutanea tarda (PCT), the only form of porphyria which is commonly acquired rather than genetic, is strongly associated with hepatic siderosis.<sup>1</sup> The C282Y and H63D mutations associated with hereditary haemochromatosis are over-represented among patients with PCT of Northern European ancestry,<sup>2,3</sup> although not for populations with a different genetic profile.<sup>4</sup> Polymorphisms in the transferrin receptor TFR1 gene<sup>5</sup> and evidence for disordered hepcidin regulation<sup>6</sup> have also been shown in patients with PCT, indicating that the development of iron overload in this condition is complex and multifactorial. Venesection is highly effective in inducing remission of PCT.

In this issue, Muñoz-Santos *et al.*<sup>7</sup> have shown a significant association between PCT and late onset of abnormalities of glucose metabolism, including type 2 diabetes mellitus. Patients with a higher mean serum ferritin at the time of diagnosis of PCT and persistent hyperferritinaemia appeared predisposed to the subsequent development of abnormalities of glucose metabolism. This follows several previous studies which have suggested an increased prevalence of diabetes in patients with PCT. Given the high population prevalence of type 2 diabetes, the possibility of a spurious association must be considered. None of the studies which have suggested an increased risk of diabetes in patients with PCT<sup>8,9</sup> was strictly case controlled. Caution is therefore necessary in interpreting the association.

That said, there are reasons to suspect that the association may be real. Studies have repeatedly shown an association between hyperferritinaemia and the subsequent risk of type 2 diabetes mellitus, hypertension, obesity, dyslipidaemia, the metabolic syndrome and the polycystic ovarian syndrome.<sup>10</sup> As yet it is unclear whether such prediabetic hyperferritinaemia truly reflects the presence of increased iron stores, or just serves as a marker of inflammation; hyperferritinaemia is a common accompaniment of inflammatory states and there is mounting evidence that inflammation may play an important role in the pathogenesis of type 2 diabetes.

The evidence suggesting a positive association between increased iron levels and diabetes includes the experience with untreated hereditary haemochromatosis, which is strongly associated with diabetes, positive correlations between diabetes and dietary iron intake, work on iron-loaded rodents and evidence in animals that iron restriction and phlebotomy may improve diabetes.<sup>11</sup> There is also evidence in humans that suggests that the reduction in iron levels results in reduced insulin resistance.<sup>10</sup>

Yet the role of iron as a precipitant of diabetes remains unproven. Correlation of soluble transferrin receptor levels

(which vary with iron status but are not affected by inflammation) has tended to exclude underlying iron overload as a cause for the hyperferritinaemia.<sup>12,13</sup> A histological study has suggested that hepatic iron stores are normal in patients with diabetes.<sup>14</sup> There is no clear association between the HFE C282Y and H63D genotypes and the risk of diabetes.<sup>3,15</sup> Ferritin levels have been shown to decrease in response to metformin in patients with the polycystic ovarian syndrome, suggesting that insulin resistance itself may contribute to the elevation of ferritin levels.<sup>16</sup>

Clearly the relationship between iron levels, ferritin concentrations, inflammation and the risk of type 2 diabetes is complex. As such, the nature of the relationship between hyperferritinaemia in PCT and the predisposition to type 2 diabetes is, as Muñoz-Santos *et al.*<sup>7</sup> state, uncertain. It is possible that hyperferritinaemia in the two conditions represents two different sets of circumstances: genuine iron loading in PCT, and a nonspecific marker of inflammation in diabetes. Yet a case can be made for both the characteristic iron loading of PCT and the inflammatory nature of the liver disease which frequently accompanies it, such as hepatitis C, to mediate a higher risk of subsequent diabetes. In this context it is surprising that Muñoz-Santos *et al.*<sup>7</sup> were unable to show an association between markers of hepatic inflammation, or even obesity, and risk of subsequent diabetes.

As Muñoz-Santos *et al.*<sup>7</sup> state, confirmation that the iron loading of PCT itself mediates the increased risk of type 2 diabetes would strengthen the argument of those who believe that a reduction in hepatic iron stores via phlebotomy is an essential aspect of the management of these patients. Chloroquine therapy, by contrast, may satisfactorily reverse the abnormality in porphyrin metabolism, but does not reduce hepatic siderosis and would therefore not be expected to correct other metabolic consequences of hepatic iron loading. Although these authors were unable to show a protective effect of phlebotomy on the subsequent risk of diabetes, their phlebotomy protocol may not have been sufficiently rigorous to allow the detection of such an association. Type 2 diabetes and related diseases of lifestyle are a major public health concern; iron loading and PCT very much less so. The possibility of a convergence, with an iron-loading disorder, PCT, is intriguing and may yet provide important insights allowing for better control of these common disorders.

Division of Medicine,  
Nelson R. Mandela School of Medicine,  
University of KwaZulu-Natal,  
Durban,  
South Africa  
E-mail: hift@ukzn.ac.za

R.J. HIFT

### Conflicts of interest

None declared.

## References

- 1 Frank J, Poblete-Gutiérrez P. Porphyrin cutanea tarda – when skin meets liver. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2010; **24**:735–45.
- 2 Roberts AG, Whatley SD, Morgan RR et al. Increased frequency of the haemochromatosis Cys282Tyr mutation in sporadic porphyria cutanea tarda. *Lancet* 1997; **349**:321–3.
- 3 Ellervik C, Birgens H, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG. Hemochromatosis genotypes and risk of 31 disease endpoints: meta-analysis including 66,000 cases and 226,000 controls. *Hepatology* 2007; **46**:1071–80.
- 4 Hift RJ, Corrigan AV, Hancock V et al. Porphyrin cutanea tarda: the etiological importance of mutations in the HFE gene and viral infection is population-dependent. *Cell Mol Biol (Noisy-le-Grand)* 2002; **48**:853–9.
- 5 Lamoril J, Andant C, Gouya L et al. Hemochromatosis (HFE) and transferrin receptor-1 (TFRC1) genes in sporadic porphyria cutanea tarda (sPCT). *Cell Mol Biol (Noisy-le-Grand)* 2002; **48**:33–41.
- 6 Ajioka RS, Phillips JD, Weiss RB et al. Down-regulation of hepcidin in porphyria cutanea tarda. *Blood* 2008; **112**:4723–8.
- 7 Muñoz-Santos C, Guilabert A, Moreno N et al. The association between porphyria cutanea tarda and diabetes mellitus: analysis of a long-term follow-up cohort. *Br J Dermatol* 2011; **165**:486–91.
- 8 Rossmann-Ringdahl I, Olsson R. Porphyrin cutanea tarda in a Swedish population: risk factors and complications. *Acta Derm Venereol (Stockh)* 2005; **85**:337–41.
- 9 Krivosheev AB, Kuimov AD, Krivosheeva IA. [The combination of carbohydrate and porphyric exchange disturbances: is it a chance or regularity?]. *Klin Med (Mosk)* 2006; **84**:51–4.
- 10 Rajpathak SN, Crandall JP, Wylie-Rosett J et al. The role of iron in type 2 diabetes in humans. *Biochim Biophys Acta* 2009; **1790**:671–81.
- 11 Minamiyama Y, Takemura S, Kodai S et al. Iron restriction improves type 2 diabetes mellitus in Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010; **298**:E1140–9.
- 12 Hernández C, Lecube A, Carrera A, Simó R. Soluble transferrin receptors and ferritin in type 2 diabetic patients. *Diabet Med* 2005; **22**:97–101.
- 13 Rajpathak SN, Wylie-Rosett J, Gunter MJ et al. Biomarkers of body iron stores and risk of developing type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab* 2009; **11**:472–9.
- 14 Dinneen SF, Silverberg JD, Batts KP et al. Liver iron stores in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Mayo Clin Proc* 1994; **69**:13–15.
- 15 Qi L, Meigs J, Manson JE et al. HFE genetic variability, body iron stores, and the risk of type 2 diabetes in U.S. women. *Diabetes* 2005; **54**:3567–72.
- 16 Luque-Ramírez M, Alvarez-Blasco F, Botella-Carretero JI et al. Increased body iron stores of obese women with polycystic ovary syndrome are a consequence of insulin resistance and hyperinsulinism and are not a result of reduced menstrual losses. *Diabetes Care* 2007; **30**:2309–13.

## A biased comment on double-blind review

DOI: 10.1111/j.1365-2133.2011.10546.x

### ORIGINAL ARTICLE, p563

It is not surprising that, if given the chance, researchers will complain about the bias of the editors who declined to send

their paper out for review, or, if it was sent out, the poor quality of the reviewers' comments. To be treated fairly, you have to be known by the editors, come from the right institution or already be world famous. Fear of bias from editors and reviewers explains why a survey of researchers found a clear preference for implementing double-blind peer review (DBR) (<http://www.publishingresearch.net/PeerReview.htm>).

In DBR, the names and affiliations of the authors of a manuscript are not revealed to the reviewers, and sometimes not even to the editors. Like the double-blind clinical trial, DBR is an innovation that attempts to reduce bias and increase objectivity in scientific publications.

The rationale is that if reviewers and editors don't know the names of authors of a paper, they can only judge it on the quality of its scientific content, and cannot be biased for or against a publication because of the nationality, gender or affiliation of the authors. But does DBR actually work?

A paper in this volume of *BJD* puts DBR to the test.<sup>1</sup> In this study, manuscripts submitted to *Dermatologic Surgery* were each assigned to four reviewers, two of whom were blinded to the identity of the authors, and two who were not. When the reviews they wrote were compared, no significant differences were found between those from the blinded and nonblinded reviewers, which led the authors to conclude that, at least for this journal, blinding during peer review did not affect the quality of the reviews.

The message I take is that DBR is at least as good as regular peer review. However, this study might have underestimated the benefits of DBR. As pointed out by the authors, both the blinded and nonblinded reviewers in the study knew they were being scrutinized on the quality of their reviews, so it seems likely that they would all have been on their best behaviour. In other words, because this wasn't a double-blind trial of double-blind review, the conclusions should be treated cautiously.

I'll declare my prejudice – I believe that DBR, like the double-blind clinical trial, is simply a better way of doing science, because both reduce bias. The real question is why isn't DBR standard practice?

The Walter and Eliza Hall Institute,  
1G Royal Parade, Parkville VIC 3052,  
Australia  
E-mail: [vaux@wehi.edu.au](mailto:vaux@wehi.edu.au)

D.L. VAUX

### Conflicts of interest

None declared.

### Reference

- 1 Alam M, Kim NA, Havey J et al. Blinded vs. unblinded peer review of manuscripts submitted to a dermatology journal: a randomized multi-rater study. *Br J Dermatol* 2011; **165**:563–67.



**ARTICULO DE CORRESPONDENCIA SOBRE UNA DE LAS  
PUBLICACIONES CONSTITUYENTES DE LA TESIS DOCTORAL Y  
NUESTRA RESPUESTA**

Aceptados el 30 de agosto de 2011 para su publicación conjunta

**Porphyria cutanea tarda and glucose metabolism alterations**

Purnak T, Purnak S

***Brit J Dermatol* 2011** (en prensa, no editado)

**Porphyria cutanea tarda and glucose metabolism alterations: reply  
from authors**

Muñoz-Santos C, Guilabert A, Herrero C

***Brit J Dermatol* 2011** (en prensa, no editado)



## Porphyria cutanea tarda and glucose metabolism alterations

Journal:	<i>British Journal of Dermatology</i>
Manuscript ID:	BJD-2011-1094
Manuscript Type:	Item of Correspondence
Date Submitted by the Author:	13-Jul-2011
Complete List of Authors:	Purnak, Tugrul; Numune Education and Research Hospital, Gastroenterology Purnak, Seda; Baskent University Faculty of Medicine, Dermatology
Keywords:	Porphyria cutanea tarda , Glucose metabolism , Diabetes mellitus

SCHOLARONE™  
Manuscripts

Review

1  
2  
3 **Porphyria cutanea tarda and glucose metabolism**  
4  
5  
6  
7 **alterations**  
8  
9

10  
11  
12  
13  
14 Tugrul Purnak<sup>1</sup>, Seda Purnak<sup>2</sup>  
15

16  
17 <sup>1</sup>Numune Education and Research Hospital, Gastroenterology Department  
18

19 <sup>2</sup>Baskent University Faculty of Medicine, Dermatology Department  
20  
21  
22  
23

24  
25 **Corresponding author**  
26

27 Seda Purnak, MD  
28

29 Baskent University Faculty of Medicine  
30

31 Department of Dermatology  
32

33 5. sok No: 48 Bahcelievler  
34

35 Ankara, Turkey 06490  
36  
37

38 **Phone:** (+90) 312 2151996  
39

40 **Fax:** (+90) 312 2152631  
41

42 **E-mail:** [sedasevimler@yahoo.com](mailto:sedasevimler@yahoo.com)  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 **To the editor,**  
4

5  
6  
7 We read with great interest the article entitled 'The association between porphyria cutanea  
8 tarda and diabetes mellitus, analysis of a long-term follow-up cohort' by Muñoz-Santos et  
9 al.<sup>1</sup> The authors successfully discussed the relationship between two conditions.  
10  
11

12  
13 We would like to get some additional data from the authors for the appreciation of this  
14 interesting study.  
15

16  
17 Firstly, the patients were evaluated for glucose metabolism alterations in the study using  
18 serum glucose levels mainly however, we were wondering that whether Homa-IR score and  
19 HbA1c are available or not in the authors's data.  
20  
21

22  
23 Secondly, some important diabetes studies showed us current smoking status, family history  
24 of diabetes mellitus, hypertension and increased body mass index (BMI), increased  
25 triglyceride, apolipoprotein A1, liver enzyme levels are best clinical predictors for future  
26 diabetes risk.<sup>2-4</sup> In the study, authors didn't mention the factors particularly smoking status,  
27 lipid profile and hypertension which may change the study results strikingly.  
28  
29

30  
31 Also, it is stated that 45 patients were performed liver biopsy and thus diagnosis of cirrhosis is  
32 established. Chronic liver damage were evaluated by liver function tests. However, for the  
33 follow up of chronic liver damage, liver function tests are not reliable as these tests may be  
34 normal. It could be much better if basal and end liver biopsy results of all patients were  
35 compared. Also, as mentioned by the authors, some inflammatory conditions may change the  
36 liver histology similar to porphyria cutanea tarda (PTC). For example, non-alcoholic  
37 steatohepatitis (NASH) may cause glucose metabolism alterations and hyperferritinemia in  
38 that patients.<sup>5</sup> Also, NASH is more prevalent than PTC. For discriminating these two  
39 conditions, the revealing of the detailed liver biopsy findings of the entire study patients if  
40 possible would be much valuable to interpret the study results.  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

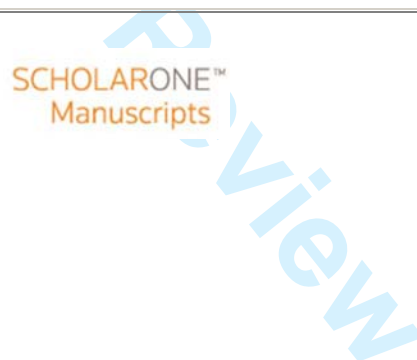
## REFERENCES

- 1 Munoz-Santos C, Guilabert A, Moreno N *et al*. The Association between Porphyria Cutanea Tarda and Diabetes Mellitus. *Br J Dermatol* 2011.
- 2 Groop L, Forsblom C, Lehtovirta M *et al*. Metabolic consequences of a family history of NIDDM (the Botnia study): evidence for sex-specific parental effects. *Diabetes* 1996; **45**: 1585-93.
- 3 Eriksson KF, Lindgarde F. Prevention of type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus by diet and physical exercise. The 6-year Malmo feasibility study. *Diabetologia* 1991; **34**: 891-8.
- 4 Lyssenko V, Jonsson A, Almgren P *et al*. Clinical risk factors, DNA variants, and the development of type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2008; **359**: 2220-32.
- 5 Yoneda M, Nozaki Y, Endo H *et al*. Serum ferritin is a clinical biomarker in Japanese patients with nonalcoholic steatohepatitis (NASH) independent of HFE gene mutation. *Dig Dis Sci* 2010; **55**: 808-14.



**Porphyria cutanea tarda and glucose metabolism alterations: reply from authors**

Journal:	<i>British Journal of Dermatology</i>
Manuscript ID:	BJD-2011-1342
Manuscript Type:	Item of Correspondence
Date Submitted by the Author:	24-Aug-2011
Complete List of Authors:	Muñoz-Santos, Carlos; Hospital Clinic, Dermatology Guilabert, Antonio; Hospital Clinic, Dermatology Herrero, Carmen; Hospital Clinic, Dermatology
Keywords:	Porphyria cutanea tarda, glucose metabolism, diabetes mellitus



1  
2  
3 **Porphyria cutanea tarda and glucose metabolism alterations: reply**  
4  
5 **from authors**  
6  
7

8  
9  
10 Carlos Muñoz-Santos, Antonio Guilabert, Carmen Herrero  
11

12  
13  
14 Department of Dermatology, Hospital Clinic, Universitat de Barcelona, Barcelona.  
15

16  
17 Spain  
18

19  
20  
21 **Corresponding author:**  
22

23  
24 Dr Carlos Muñoz-Santos,  
25

26 Department of Dermatology, Hospital Clinic, Universitat de Barcelona,  
27

28 170 Villarroel. 08036-Barcelona, Spain.  
29

30 Phone: (00 34) 93 2275438 Fax: (00 34) 93 2275438  
31

32 E-mail: carlosmunozsantos@gmail.com  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 **To the editor,**  
4

5  
6  
7 MADAM, We thank Drs. Purnak and Purnak<sup>1</sup> for their interest and comments on our  
8 recent article.<sup>2</sup> In their letter they suggest that some additional clinical data may be  
9 needed in order to strengthen the results of our study about the association between  
10 porphyria cutanea tarda (PCT) and glucose metabolism alterations (GMA).<sup>2</sup>  
11  
12  
13  
14  
15

16  
17  
18 On one hand, they ask for other glucose metabolism markers (Homa-IR score and  
19 HbA1c) and other diabetes mellitus risk factors (particularly smoking status, lipid  
20 profile and hypertension) not analysed in our study and that might act as confounders.  
21 We agree with the importance of such parameters, but it is important to emphasize the  
22 difficulty of getting this type of information from a retrospective study like ours with so  
23 many years of follow-up (mean = 23 years) and mostly with baseline data from the  
24 seventies and eighties. We only chose data that was consistently present in the clinical  
25 records since the diagnosis of PCT.  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37

38 On the other hand, we also agree with Purnak and Purnak<sup>1</sup> that liver function tests are  
39 not the most reliable method to assess chronic liver damage and comparison of basal  
40 and end liver biopsies of all patients would have been the best approach. Unfortunately,  
41 baseline and end liver biopsies results are not available in our study since in our routine  
42 management of patients with PCT, we do not systematically perform liver biopsies.  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
Liver biopsies (45 out of 81 patients) were mostly performed in patients diagnosed with  
PCT and persistent elevated liver enzymes.



1  
2  
3 The authors also pointed out the possibility that the presence of non-alcoholic  
4 steatohepatitis (NASH) may have caused both glucose metabolism alterations and  
5 hyperferritinemia in our patients and ask for the revealing of detailed liver biopsy  
6 findings in order to discriminate NASH from liver changes in PCT. NASH is related to  
7 excessive fat accumulation in the liver and is strongly associated with obesity and  
8 visceral adiposity.<sup>3</sup> Importantly, it is still controversial whether NASH is a cause or a  
9 consequence of insulin resistance.<sup>4</sup> In our cohort , in 84% of liver biopsies fat  
10 accumulation was mild or absent and only 16% of our patients with PCT had obesity  
11 (BMI > 30) (unpublished data). Therefore, NASH does not seem to be a major  
12 contributor to the development of GMA in our patients.  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## REFERENCES

- 1- Purnak T, Purnak S. Porphyria cutanea tarda and glucose metabolism alterations. *Brit J Dermatol* 2011.
- 2- Muñoz-Santos C, Guilabert A, Moreno N *et al.* The Association between Porphyria Cutanea Tarda and Diabetes Mellitus. *Br J Dermatol* 2011.
- 3- Perseghin G. Lipids in the wrong place: visceral fat and non-alcoholic steatohepatitis. *Diabetes Care* 2011; 34 (Suppl 2):S367-70.
- 4- Cohen JC, Horton JD, Hobbs HH. Human fatty liver disease: old questions and new insights. *Science* 2011; 332: 1519-23.

