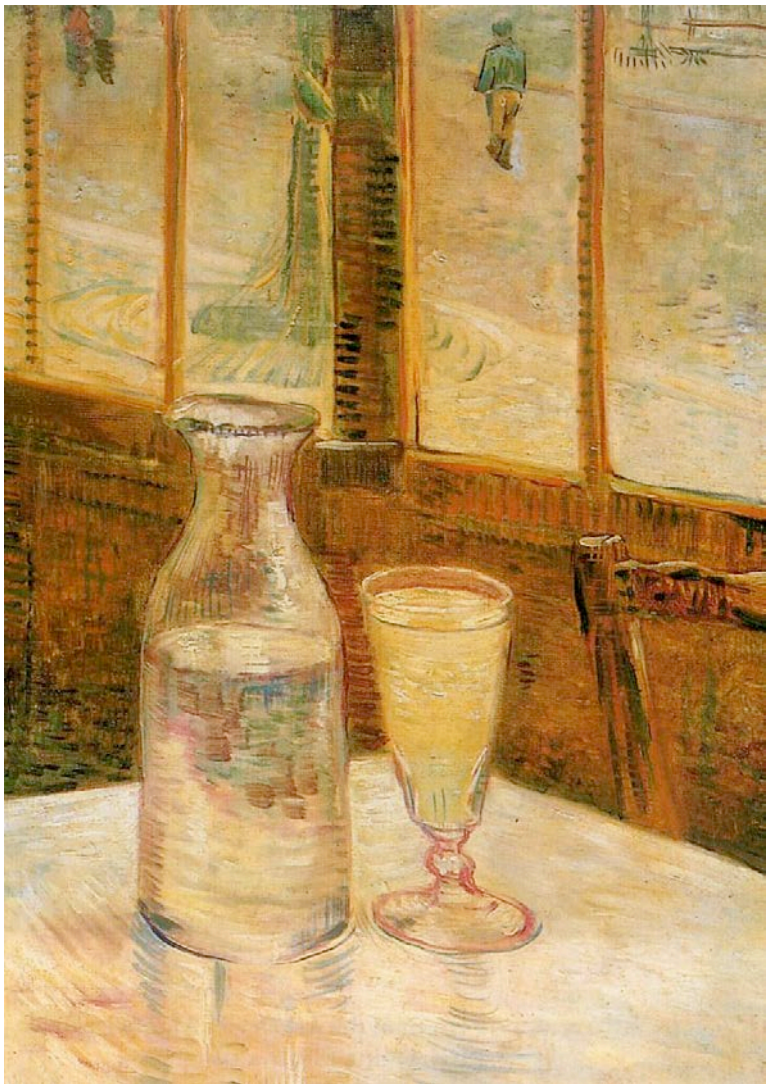


# **Estudo da Cinética do Ferro na Doença Hepática Alcoólica**

**Papel da Hepsidina e das Mutações HFE**

Luís Costa Matos





*"Natureza Morta com Absinto", óleo sobre tela, de Vincent van Gogh, 1887*



Aos faróis que me guiaram (os meus pais e os meus mestres)  
e às luzes da minha vida (a minha mulher e os meus filhos).



Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina  
da Universidade de Coimbra para prestação de  
Provas de Doutoramento em Medicina

Orientador: Prof. Doutor Armando de Carvalho





---

## PREFÁCIO

É lugar comum dizer-se que a vida é feita de escolhas. Cedo escolhi ser médico, e ainda antes de o ser, cedo escolhi ser Internista.

No serviço que me acolheu, a Medicina Interna 1 do então Hospital S. Teotónio de Viseu, desde cedo a sua grande força motriz, o Dr. Pedro P. Henriques, me direcionou para a descoberta de um dos ramos da medicina que lhe era mais caro, o das doenças hepáticas. Como não poderia deixar de ser, é a primeira "vítima" do meu agradecimento.

Fascinado, cedo escolhi ser hepatologista, se não de título, pelo menos de função. Criámos uma consulta específica para as "Doenças Hepáticas", que rapidamente ficou repleta de patologia, na sua maioria a doença hepática alcoólica, tão tristemente característica da nossa região.

Não o disse antes, mas com a escolha de iniciar a carreira médica na minha terra natal, pensei que teria de deixar para trás uma outra pequena escolha minha, a investigação universitária.

Felizmente assim não foi, e desde já agradeço ao Prof. Doutor Armando Porto e ao Prof. Doutor Armando de Carvalho o facto de me terem acolhido, de novo, na Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, possibilitando um nosso projeto de investigação na doença hepática alcoólica.

Agradeço também ao anterior e atual Conselho de Administração do meu hospital, pelo apoio prestado na elaboração deste trabalho e aos serviços de Cirurgia 1 e de Patologia Clínica, pela colaboração indispensável que tiveram ao longo destes anos.

Uma palavra também para a Dra. Maria Augusta Cipriano, do Serviço de Anatomia Patológica dos Hospitais da Universidade de Coimbra, a nossa referência em termos de histopatologia hepática, e para a Doutora Conceição Egas e Doutora Maria José Simões do BIOCANT, um marco da biotecnologia em Portugal.

Termino, apercebendo-me que tenho tendência a fazer as minhas escolhas de vida muito cedo. Para além de muitas estarem, provavelmente, ainda por fazer, move-me o facto de, apesar de raramente conseguirmos ser os melhores, podermos sempre escolher ser o melhor possível.

---

## Glossário

4-HNE - 4-Hidroxinonal

ADH - Álcool Desidrogenase

ADN - Ácido Desoxirribonucleico

ADRP - *Adipose Differentiation-Related Protein*

ALDH - Acetaldeído Desidrogenase

ALT - Alanina Aminotransferase

ANA - Anticorpos Antinucleares

ARFI - *Acoustic Radiation Force Impulse Elastography*

ARNm - Ácido Ribonucleico mensageiro

ASH - *Alcoholic Steatohepatitis*

AST - Aspartato Aminotransferase

bFGF - *Basic Fibroblast Growth Factor*

BMP - Proteínas Morfogénicas do Osso

Ca<sup>2+</sup> - íão Cálcio

CAT - Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos

CHOP - *CCAAT/enhancer-binding protein Homologous Protein*

CID - Classificação Internacional de Doenças

CREBH - *Cyclic AMP Response Element – Binding protein H*

CTGF - *Connective Tissue Growth Factor*

CTLA-4 - *Cytotoxic T-lymphocyte Antigen-4*

CYP - Citocromo P450

DcytB - Citocromo B Duodenal

DHA - Doença Hepática Alcoólica

DII - Doença Inflamatória Intestinal

DIOS - *Dysmetabolic Iron-Overload Syndrome*

DMT1 - Transportador de Metais Bivalentes

EGF - *Epidermal Growth Factor*

ELISA - *Enzyme-linked Immunoassay*

ERK1/2 - *Extracellular Signal Regulated Kinases*

Fe<sup>2+</sup> - Ferro ferroso

Fe<sup>3+</sup> - Ferro férrico

FOG - *Friend of GATA*

FPN-1- Ferroportina-1

GDF15 - *Growth Differentiation Factor 15*

GGT - Gama-Glutamiltransferase

HCP-1 - Proteína Transportadora do Heme

HDL - *High Density Lipoprotein*

HER - Radicais Hidroxietilo

HGF - *Hepatocyte Growth Factor*

HIF's - Fatores de Transcrição Mediados pela Hipóxia

HII - *Hepatic Iron Index*

IC-TOD-MS - *Immunocapture Time-Of-Flight Mass Spectrometry*

ICAM-1 - *Inter-Cellular Adhesion Molecule 1*

IGFBP3 - *Insulin-like Growth Factor Binding Protein 3*

IL - Interleucinas

IRIDA - *Iron-Refractory Iron Deficiency Anemia*

JAK's - Cinases de Janus

JNK - *Jun N-terminal Kinase*

KGF - *Keratinocyte Growth Factor*

LAEE - Éster Etilico do Ácido Linolénico

LBP - *Lipopolysaccharide-Binding Protein*

LEAP-1 - *Liver-Expressed Antimicrobial Peptide*

LPS - Lipopolissacarídeos

MAA - Adutos MDA-acetaldeído-proteínas

MALDI-TOF-MS - *Matrix-assisted laser desorption/ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry*

MCP-1 - Proteína Quimiotática dos Monócitos

MDA - Malondialdeído

MEF-2 - *Myocyte Enhancer Factor-2*

MELD - *Model for End-stage Liver Disease*

MEOS - *Microsomal Ethanol Oxidizing System*

MFAP-4 - *Microfibril-Associated Glycoprotein 4*

Mig - *Monokine Activated by Interferon  $\gamma$*

MMP - Metaloproteinases da Matriz

MRE's - *Metal Response Elements*

MTF-1 - *MRE-binding Transcription Factor-1*

MW - Macroglobulinemia de Waldenström

N2-Et-dG - N2-Etil-desoxiGuanosina

NAD - *Nicotinamide Adenine Dinucleotide*

NADP - *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate*

NASH - *Non-Alcoholic Steatohepatitis*

NF- $\kappa$ B - Fator nuclear  $\kappa$ B

NGF - *Nerve Growth Factor*

NK - *Natural Killer*

NRAMP-1 - *Natural Resistance-Associated Macrophage Protein-1*

OMS - *Organização Mundial de Saúde*

PdG - *1,N(2)-propano-2'-desoxiguanosina*

PDGF - *Platelet Derived Growth Factor*

PICP - *Procollagen type I Carboxy-terminal Peptide*

PIIINP - *Procollagen type III amino-terminal Peptide*

PON-1 - *Paraoxonase 1*

PPAR- $\alpha$  - *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\alpha$*

RGM - *Repulsive Guidance Molecules*

RIA - *Rádio-imuno-ensaio*

RMN - *Ressonância Magnética Nuclear*

RNS - *Reactive Nitrogen Species*

SELDI-TOF-MS - *Surface-Enhanced Laser Desorption/ Ionization Time-Of-Flight  
Mass Spectrometry*

SMAD - *Sma and Mothers Against Decapentaplegic homolog*

SOCS - *Suppressor Of Cytokine Signaling*

SQUID - *Superconducting Quantum Interference Device*

SREBP-1 - *Sterol Regulatory Element Binding Protein 1*

STAT3 - *Signal Transducer and Activator of Transcription 3*

STEAP - *Six Transmembrane Epithelial Antigen of the Prostate*

TAC - *Tomografia Axial Computadorizada*

Tf - *Transferrina*

TIMP - *Inibidores Teciduais das Metaloproteinases*

TNF- $\alpha$  - *Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$*

TRB3 - *Tribbles-related Protein 3*

TWSG1 - *Twisted Gastrulation Protein Homolog 1*

VCAM-1 - *Vascular Cell Adhesion Molecule 1*

VEGF - *Vascular Endothelial Growth Factor*

VGM - Volume Globular Médio

VHB - Vírus da Hepatite B

VHC - Vírus da Hepatite C

VIH - Vírus da Imunodeficiência Humana

VLDL - *Very Low Density Lipoprotein*

WCX-TOF-MS - *Weak Cation Exchange Time-Of-Flight Mass Spectrometry*

$\epsilon$ dA - 1,N6-etenodesoxiadenosina

$\epsilon$ dC - 2-N4-etenodesoxicitidina





## Índice Geral

---

1. Introdução	1
1.1. A Relação Entre o Homem e o Álcool	3
1.2. Consumo de Álcool e as Suas Consequências	5
2. Metabolismo do Álcool	9
2.1. Introdução	11
2.2. Álcool Desidrogenases	12
2.3. Sistema de Oxidação Microsomal do Etanol	12
2.4. Catalase	13
2.5. Acetaldeído Desidrogenase	13
2.6. Vias Não-Oxidativas para o Metabolismo do Álcool	13
3. Doença Hepática Alcoólica (DHA)	15
3.1. Introdução	17
3.2. Esteatose ou Fígado Gordo Alcoólico	19
3.2.1. Diagnóstico e Classificação	19
3.3. Esteatohepatite Alcoólica / Hepatite Alcoólica Aguda	23
3.3.1. Diagnóstico e Classificação	23
3.3.2. Fisiopatologia da Esteatohepatite Alcoólica	24
3.3.2.1. Acetaldeído, Stress Oxidativo e Peroxidação Lipídica	24
3.3.2.2. Mecanismos autoimunes	27
3.3.2.3. Endotoxinas, Células de Kupffer e Citocinas	28
3.3.2.4. Sobrecarga Tecidual de Ferro	29
3.3.2.5. Fatores de Risco Individuais	30

3.4. Fibrose e Cirrose	33
3.4.1. Introdução	33
3.4.2. Diagnóstico	34
3.4.3. Mecanismos da fibrose hepática	36
3.4.3.1. Células de Kupffer	36
3.4.3.2. Células Estreladas Hepáticas (CEH)	36
3.4.3.3. Resolução da Fibrose Hepática	38
4. Metabolismo do Ferro e Doença Hepática Alcoólica	41
4.1. Introdução	43
4.2. Mecanismos de Lesão Tecidual pelo Ferro	47
4.3. Absorção Intestinal do Ferro	51
4.4. Transporte e Distribuição do Ferro	55
4.5. Armazenamento do Ferro	59
4.6. Metabolismo Hepático do Ferro	63
4.7. Regulação do Metabolismo do Ferro: Modelo de Programação das Criptas Intestinais	67
4.8. Regulação do Metabolismo do Ferro: Hepsidina	71
4.8.1. Introdução e Caracterização	71
4.8.2. Regulação da síntese de Hepsidina pelo fígado	79
4.8.3. Hepsidina e Outras Doenças Não Relacionadas com Sobrecarga Hepática de Ferro	95
4.8.3.1. Insuficiência Renal Crónica	95
4.8.3.2. Doenças Cardiovasculares	96
4.8.3.3. Doenças Hematológicas	98

4.8.3.4. Doença Inflamatória Intestinal	99
4.8.3.5. Doenças Infeciosas	100
4.8.3.6. Doentes Críticos	101
4.8.3.7. Neoplasias	103
4.8.4. Métodos Laboratoriais para Determinação da Hepsidina	105
4.8.5. Potencial Terapêutico da Hepsidina	109
4.9. Doenças Genéticas com Sobrecarga Hepática de Ferro	113
4.9.1. Hemocromatose Tipo I	115
4.10. Doenças Adquiridas com Sobrecarga Hepática de Ferro	119
4.10.1. Síndromes Mielodisplásicos	119
4.10.2. Doenças Hepáticas Crônicas	119
4.11. Ferro e Álcool	125
4.11.1. Relação Entre Consumo Alcoólico e Sobrecarga de Ferro	125
4.11.2. Fisiopatologia da Sobrecarga de Ferro na DHA	126
4.11.3. Contribuição da Sobrecarga de Ferro para a Evolução da DHA	130
5. Trabalho Experimental	133
5.1. Objetivos	135
5.2. Materiais e Métodos	137
5.3. Alterações do Metabolismo do Ferro na Doença Hepática Alcoólica e Relação com Mutações do Gene HFE	149
5.3.1. Introdução e Objetivos	149
5.3.2. Material e Métodos	149
5.3.3. Resultados	150

5.3.4. Discussão e Conclusões	157
5.4. Avaliação dos Depósitos de Ferro na Doença Hepática Alcoólica	161
5.4.1. Introdução e Objetivos	161
5.4.2. Material e Métodos	163
5.4.3. Resultados	164
5.4.4. Discussão e Conclusões	169
5.5. Subpopulações Linfocitárias na Doença Hepática Alcoólica	171
5.5.1. Introdução e Objetivos	171
5.5.2. Material e Métodos	174
5.5.3. Resultados	175
5.5.4. Discussão e Conclusões	183
5.6. A Expressão de ARNm da Hepsidina é Inapropriadamente Baixa na Doença Hepática Alcoólica	187
5.6.1. Introdução e Objetivos	187
5.6.2. Material e Métodos	189
5.6.3. Resultados	189
5.6.4. Discussão e Conclusões	207
6. Conclusões e Comentários Finais	213
Bibliografia	223

## Índice de Figuras

---

Figura 1. Consumo de álcool em Portugal e na Europa.	7
Figura 2. Vias de metabolização do etanol.	14
Figura 3. Acetaldeído e stress oxidativo na DHA.	26
Figura 4. Ativação das células estreladas hepáticas.	40
Figura 5. Transporte intestinal do ferro.	53
Figura 6. Utilização do ferro nos precursores eritroides.	57
Figura 7. Fagocitose dos eritrócitos senescentes pelas células do sistema retículo-endotelial e reutilização do ferro a partir do heme.	58
Figura 8. Metabolismo do ferro no hepatócito.	65
Figura 9. Metabolismo do ferro no organismo e a sua regulação pela hepcidina.	78
Figura 10. Regulação da transcrição da hepcidina no hepatócito.	93
Figura 11. ARN total de duas amostras de tecido hepático.	146
Figura 12. Determinação do nível de expressão hepática de hepcidina usando sondas TaqMan de real-time PCR com fluorescência.	146
Figura 13. Risco relativo de apresentar pelo menos uma mutação HFE e ferritina superior ao normal, atividade necroinflamatória, fibrose significativa e depósitos de ferro significativos.	155
Figura 14. Risco relativo de apresentar ferritina sérica superior ao normal e pelo menos uma mutação HFE; e alcoolismo ativo.	156
Figura 15. Imagens de RMN - ponderações usadas pelo protocolo da Universidade de Rennes num doente com uma concentração de	

ferro hepático de 120 $\mu\text{mol/g}$ .	163
Figura 16. Risco relativo de apresentar ferritina sérica superior ao normal e atividade necroinflamatória significativa; alcoolismo ativo.	168
Figura 17. Subpopulações linfocitárias - comparação entre casos e controlos.	177
Figura 18. Subpopulações linfocitárias - comparação entre casos com alcoolismo ativo e sem cirrose e controlos.	178
Figura 19. Subpopulações linfocitárias - comparação entre casos com cirrose e controlos.	181
Figura 20. Subpopulações linfocitárias - comparação entre casos com e sem fibrose significativa.	183
Figura 21. Expressão genética relativa da hepcidina - casos vs controlos.	193
Figura 22. Expressão genética relativa da hepcidina - casos vs controlos.	194
Figura 23. Relação entre expressão da hepcidina e ferritina sérica - casos vs controlos.	195
Figura 24. Comparação da expressão genética relativa da hepcidina - grau de atividade necroinflamatória.	196
Figura 25. Comparação da expressão genética relativa da hepcidina - Esteatose.	196
Figura 26. Comparação da expressão genética relativa da hepcidina - genótipos <i>wt/wt</i> vs genótipos com pelo menos uma mutação.	197
Figura 27. Comparação da expressão genética relativa da hepcidina - casos sem fibrose em ponte ou cirrose vs casos com fibrose em ponte ou cirrose.	198

Figura 28. Comparação da expressão genética relativa da hepcidina - casos com consumos alcoólicos inferiores a 100 g / dia vs casos com consumos alcoólicos superiores a 100 g / dia.	203
Figura 29. Expressão genética relativa da hepcidina - casos sem cirrose e com alcoolismo ativo vs controlos.	205
Figura 30. Relação entre expressão da hepcidina e ferritina sérica - casos com alcoolismo ativo e sem cirrose vs controlos.	206
Figura 31. Comparação da expressão genética relativa da hepcidina - casos sem cirrose com consumos alcoólicos inferiores a 100 g / dia vs casos sem cirrose com consumos alcoólicos superiores a 100 g / dia.	207





## Índice de Tabelas

---

Quadro I. Fatores de risco individuais para desenvolvimento de DHA.	31
Quadro II. Características das doenças genéticas com sobrecarga de ferro.	114
Quadro III. Doenças adquiridas com sobrecarga hepática de ferro.	123
Quadro IV. Critérios de inclusão de casos no estudo clínico “Estudo da Cinética do Ferro na DHA”.	137
Quadro V. Critérios de inclusão de controlos no estudo clínico “Estudo da Cinética do Ferro na DHA”.	139
Quadro VI. Comparação clínica e laboratorial entre casos e controlos (Alterações do Metabolismo do Ferro na Doença Hepática Alcoólica e Relação com Mutações do Gene HFE).	152
Quadro VII. Frequência das mutações HFE.	153
Quadro VIII. Comparação clínica e laboratorial entre casos com e sem mutações HFE.	154
Quadro IX. Comparação entre doentes sem e com alcoolismo ativo (Avaliação dos Depósitos de Ferro na Doença Hepática Alcoólica).	166
Quadro X. Comparação clínica e laboratorial entre casos e controlos (Subpopulações Linfocitárias e Doença Hepática Alcoólica).	176
Quadro XI. Comparação clínica e laboratorial entre casos com alcoolismo ativo e sem cirrose e controlos.	179
Quadro XII. Comparação clínica e laboratorial entre casos com cirrose e sem alcoolismo e controlos.	180
Quadro XIII. Comparação clínica e laboratorial entre casos com e sem	

fibrose hepática significativa.	182
Quadro XIV. Características clínicas e laboratoriais de casos e controlos (A Expressão de ARNm da Hepsidina é Inapropriadamente Baixa na Doença Hepática Alcoólica).	191
Quadro XV. Achados histológicos na biopsia hepática (casos).	192
Quadro XVI. Subgrupos dos casos : sem fibrose em ponte ou cirrose <i>vs</i> com fibrose em ponte ou cirrose.	200
Quadro XVII. Modelo de regressão linear.	201
Quadro XVIII. Casos sem cirrose e com alcoolismo ativo <i>vs</i> controlos.	204

## RESUMO

---

**Introdução e Objetivos:** O ferro é um micronutriente essencial ao metabolismo humano. Há cerca de uma década, foi identificado um péptido de síntese hepática, denominado hepcidina, sendo este o principal regulador da libertação do ferro dos enterócitos, hepatócitos e células do sistema retículo-endotelial para o plasma, através da inibição do único exportador celular de ferro conhecido, a ferroportina-1.

Posteriormente, descobriu-se que a expressão da hepcidina correlacionava-se positivamente com a concentração hepática de ferro, com os níveis de hemoglobina e com a função hepática, e concluiu-se que a regulação da síntese de hepcidina é extremamente complexa e ocorre apenas a nível transcricional. Os principais sinais estimuladores são a inflamação e a sobrecarga de ferro, enquanto que a anemia, a hipóxia, e a sinalização da atividade dos precursores eritroides a inibem.

No que respeita à relação entre consumo de álcool e sobrecarga de ferro, esta é bem conhecida há muitos anos. No entanto, o mecanismo exato pelo qual a sobrecarga de ferro ocorre na DHA nunca foi completamente caracterizado.

Recentemente, em trabalhos de experimentação animal, verificou-se que o etanol provocava uma diminuição da expressão da hepcidina. Ainda não existem dados disponíveis na literatura no que respeita ao ser humano.

Em vários trabalhos publicados sobre a relação entre polimorfismos do gene *HFE* e sobrecarga de ferro / evolução da DHA, as conclusões são díspares.

O objetivo principal do nosso estudo foi o de testar as seguintes hipóteses:

A fisiopatologia da sobrecarga de ferro na DHA em humanos resulta de:

- 1 - Presença de mutações do gene *HFE*;
- 2 - Alterações da transcrição da hepcidina.

Propusemo-nos a efetuar a avaliação destes parâmetros em doentes com DHA (casos), e a compará-los com controlos saudáveis.

**Materiais e Métodos:** Foram colhidas amostras de tecido hepático, quer em doentes com DHA, quer em indivíduos admitidos para colecistectomia eletiva por litíase vesicular não complicada. Procedeu-se à quantificação do ARN mensageiro da hepcidina por técnica de RT-PCR nessas amostras. As amostras dos casos foram também submetidas a exame histopatológico com avaliação semiquantitativa dos depósitos de ferro.

Efetuámos também um estudo laboratorial de rotina, com inclusão dos parâmetros da cinética do ferro, a genotipagem *HFE* e a quantificação das subpopulações linfocitárias por citometria de fluxo.

Nos casos, avaliámos a concentração de ferro hepático por RMN, usando o protocolo da Universidade de Rennes.

**Resultados e Conclusões:** Não encontramos diferenças significativas na distribuição das mutações *HFE* entre casos e controlos. Dividindo os casos em dois subgrupos, com pelo menos uma mutação *HFE*, e os restantes com genótipo *wild type*, verificámos que os primeiros apresentam depósitos significativos de ferro hepático com uma frequência mais elevada do que os *wild type*, para além de uma tendência para valores de ferritina mais elevados. Aquelas mutações não pareceram

contudo conferir qualquer risco acrescido para a existência de fibrose significativa ou atividade necroinflamatória.

Na aferição da concentração de ferro hepático por RMN, verificámos que os valores medidos por este método apresentaram uma alta força de associação com o grau histológico de depósitos de ferro e com a ferritina sérica. Dividindo os doentes em abstémios ou com alcoolismo ativo, verificámos que a atividade necroinflamatória era superior no segundo grupo, bem como a concentração de ferro hepático e a ferritina sérica. A existência de alcoolismo ativo foi a variável que maior risco relativo apresentou para a elevação da ferritina sérica.

Quanto à avaliação das subpopulações linfocitárias, encontrámos uma linfopenia significativa no grupo dos casos, comparativamente com os controlos. Verificámos nos casos uma redução muito significativa em todas as subpopulações ( $CD3^+$ ,  $CD4^+$ ,  $CD8^+$ ,  $CD19^+$ ), exceto nos linfócitos NK. Proporcionalmente, a maior redução foi encontrada nos linfócitos  $CD8^+$ , evidenciada por um aumento da relação  $CD4^+/CD8^+$  nos casos comparativamente com os controlos. Esta relação apresenta uma correlação significativa com o grau de fibrose hepática.

No que respeita às técnicas de RT-PCR, demonstrámos que a expressão genética relativa da hepcidina nos casos se encontrava significativamente diminuída comparativamente com os controlos, contrariamente aos valores de ferritina sérica e de saturação da transferrina, significativamente mais elevados.

Para avaliar se a expressão de hepcidina era afetada por uma diminuição da capacidade biossintética do fígado, subdividimos os casos consoante a existência de fibrose em ponte ou cirrose, ou graus de fibrose menos graves, verificámos que a transcrição da hepcidina é significativamente inferior nos doentes com fibrose mais avançada, o que foi confirmado em análise multivariada.

Para avaliar ainda o efeito que a ingestão de álcool tinha na expressão hepática da hepcidina, selecionámos apenas os casos com alcoolismo ativo e sem cirrose documentada histologicamente, com função hepática preservada, e comparámo-los com os controlos. Demonstrámos também neste grupo a diminuição da expressão da hepcidina em relação aos controlos.

Em conclusão, apesar do quadro de sobrecarga de ferro traduzido por níveis significativamente mais elevados de ferritina sérica e de saturação da transferrina, os casos apresentaram uma expressão inapropriadamente baixa de hepcidina a nível hepático. Isto traduz claramente uma falência do mecanismo homeostático de regulação do ferro corporal. Pensamos que quer a diminuição da capacidade biossintética do fígado, quer a ingestão ativa de bebidas alcoólicas, são responsáveis por uma diminuição da transcrição da hepcidina. Esta diminuição afigura-se-nos como o mecanismo principal para a sobrecarga de ferro na DHA.

## ABSTRACT

---

**Introduction and Aims:** Iron is an essential trace element in human metabolism. Nearly one decade ago, a liver synthesized peptide was identified and named hepcidin. It is the main regulator of iron release from enterocytes, hepatocytes and reticuloendothelial system cells to plasma, through the inhibition of the only known cellular iron exporter, ferroportin-1.

Hepcidin levels were found to correlate with hepatic iron stores, hemoglobin levels, and liver function. Hepcidin synthesis regulation is exceedingly complex and regulated at the transcriptional level by stimulatory signals – inflammation, iron load, and cellular stress – and inhibitory signals – hypoxia, anemia, and iron deficiency.

The relation between iron overload and alcoholic liver disease (ALD) has been well known for many years, however, the mechanism of iron overload in this disease is not clear.

Recently, in animal experiment studies, it was found that ethanol caused a decreased expression of hepcidin messenger RNA. There is no data available in the literature with regard to this mechanism in humans.

In several published studies on the relation between HFE polymorphisms and iron overload / ALD progression, conclusions are mixed.

The main objective of our study was to test the following hypotheses:

The pathophysiology of iron overload in DHA in humans is due to:

- 1 - Presence of HFE mutations;
- 2 - Changes in hepcidin transcription.

We set out to undertake an evaluation of these parameters in ALD patients and to compare them with healthy controls.

**Materials and Methods:** Liver samples were collected from ALD patients (cases) and from patients admitted for elective cholecystectomy because of noncomplicated gallstones (controls). Hepatic expression levels of hepcidin were determined by RT-PCR. Cases' liver samples underwent histopathological evaluation including semiquantitative iron stores assessment.

Cases and controls underwent a routine laboratory evaluation for liver diseases including blood iron parameters. HFE genotyping and lymphocyte population subsets measurement by flow cytometry were performed.

Liver iron content measurement by MRI, using University of Rennes' protocol, was performed in cases.

**Results and Conclusions:** With regard to HFE mutations, we found no significant differences in genotype distribution between cases and controls. Considering cases only, we divided them into two subgroups: those with at least one HFE mutation, and the remaining *wild type* genotypes. ALD patients with at least one HFE mutation presented significantly higher iron stores in liver biopsy. There was also a tendency to higher serum ferritin values. However, the presence of those mutations did not seem to have any influence on the disease severity, as there were not any differences in fibrosis grade or necroinflammatory activity.

Assessing iron deposits in ALD patients, we found that MR liver iron concentration measured values had a strong association with iron deposits histological grade and with serum ferritin values. The variable that was mostly



associated with elevated serum ferritin was the presence of active alcoholism. Dividing patients into 2 groups - without and with active alcoholism at the time of the study, we found that necroinflammatory activity presence, MRI measured liver iron concentration and serum ferritin were significantly higher in the second group.

We proceeded to compare lymphocyte population subsets between ALD patients and healthy controls. We found significant lymphopenia in patients. Analysing lymphocyte subpopulations, we found a significant reduction in all subsets ( $CD3^+$ ,  $CD4^+$ ,  $CD8^+$ ,  $CD19^+$ ), except in NK lymphocytes. This reduction was proportionally higher in  $CD8^+$  lymphocytes, evidenced by an increased  $CD4^+/CD8^+$  ratio. This ratio presents a significant association with fibrosis grade.

Evaluating hepcidin mRNA expression in liver samples has shown that gene expression was significantly lower in cases compared to controls. This was associated with significantly higher serum ferritin and transferrin saturation values in cases.

We subdivided patients group, according to the existence or not of histologically proven bridging fibrosis or cirrhosis, in order to assess if hepcidin expression was affected by impaired liver function. We found that hepcidin transcription was significantly lower in patients with advanced fibrosis. This was confirmed in multivariate analysis.

We intended to further evaluate the effect of alcohol intake in hepcidin liver expression. For that, we selected only cases with active alcoholism and without cirrhosis and no impaired liver function, and then compared them with controls. We again demonstrated that hepcidin expression was significantly reduced in that group.

In conclusion, considering that iron overload was significant, with elevated serum ferritin and transferrin saturation levels, patients hepcidin expression levels were inappropriate low, implying a failure in the homeostatic mechanism of iron regulation by allowing increased intestinal absorption. We believe that both the reduced liver biosynthetic capacity caused by fibrosis and active ingestion of alcohol are responsible for the reduction of hepcidin gene transcription. This decrease appears to us as the primary mechanism for iron overload in ALD.

---

*Capítulo 1.*

*Introdução*

---



---

## 1. Introdução

### 1.1. A Relação Entre o Homem e o Álcool

O consumo de bebidas alcoólicas e os efeitos da sua ingestão acompanham a humanidade desde há dezenas de milhar de anos.

A sua descoberta terá acontecido de forma acidental, pela fermentação do mel guardado em recipientes artesanais, ainda no paleolítico.<sup>1</sup>

No neolítico, já o fabrico da cerveja seria conhecido, enquanto que, posteriormente, egípcios, gregos e romanos terão desenvolvido processos de fabrico de outras bebidas alcoólicas. De facto, com a extensão do império romano, promoveu-se a cultura da vinha em regiões como a França e a Península Ibérica.<sup>1,2</sup>

O fabrico de bebidas de elevado teor alcoólico por destilação de vinho terá tido início pelo século XI na Europa, especialmente em França, tendo o alambique surgido no século XIII onde, inclusivamente, as bebidas destiladas começaram a ser usadas como medicamentos.<sup>1,2</sup>

No século XVI, com a colonização da África, América e Oriente por Portugal, Espanha, Inglaterra e Holanda, o consumo de bebidas alcoólicas foi dado a conhecer a praticamente todo o mundo.<sup>2</sup>

Apesar da longa história que ligava a humanidade ao álcool, pouca relevância era dada aos efeitos da ingestão crónica e continuada, sendo o ênfase colocado nos efeitos agudos, nomeadamente a embriaguez. A associação entre consumo de álcool e cirrose hepática remonta apenas a 1793, quando M. Baillie

publica “*The Morbid Anatomy of Some of the Most Important Parts of the Human Body*”.

O reconhecimento do alcoolismo como doença crónica aparece no século XIX, com a publicação do tratado “*Alcoolismus Chronicus*”, em 1851, por Magnus Huss.

É à OMS (Organização Mundial de Saúde) que se deve o grande empenhamento na definição atual da problemática ligada ao álcool. Com o aparecimento de alguns dados alarmantes sobre a prevalência do problema do alcoolismo na década de 1970, em 1980 a OMS manifestou as suas preocupações sobre o alcoolismo e os problemas ligados ao álcool, com a publicação regular, a partir de então, de conselhos científicos e técnicos sobre o tema - *WHO Expert Committee on Problems Related to Alcohol Consumption*.<sup>3,4</sup>

Para além dos problemas de saúde do bebedor excessivo, o álcool representa um risco para a saúde infantil e escolar; para a mulher e jovens; para a saúde e segurança no trabalho; para os acidentes rodoviários - o que motivou a designação comum de "Problemas Ligados ao Álcool".<sup>3</sup>

## 1.2. Consumo de Álcool e as Suas Consequências

Presentemente, a média mundial de consumo situa-se nos 6,13 litros de álcool puro *per capita*, por ano, considerando as pessoas maiores de 15 anos. Os níveis de consumo mais elevados são encontrados no mundo desenvolvido e nos países de rendimento *per capita* mais alto, especialmente no hemisfério norte, mas também na Argentina, Austrália e Nova Zelândia. Os consumos mais baixos encontram-se nos países do norte de África, África subsaariana, mediterrâneo oriental, Ásia do sul e na zona do Oceano Índico, onde se encontram populações maioritariamente de religião islâmica, com uma taxa de abstinência muito alta.<sup>5</sup>

Os padrões e tipo de bebida também sofrem alterações ao longo do tempo e consoante a área geográfica. Nos países europeus do mediterrâneo e do sul, e nos países produtores da América do Sul, o vinho representa a maior parte do álcool consumido, apesar de este representar apenas 8,6% do consumo a nível mundial. No norte da Europa, América do Norte, países africanos e Austrália, esse papel cabe à cerveja, representando 36,3% do consumo mundial. Contudo, as bebidas destiladas são as que percentualmente mais contribuem para a percentagem de álcool puro consumido a nível mundial (45%), quer devido ao teor de álcool, quer pela sua frequência de consumo na Ásia e Pacífico ocidental. Outros tipos de bebida (vinho de arroz, bebidas fermentadas de outros cereais) são consumidos principalmente em África e no Mediterrâneo Oriental, representando 10,5% do consumo global.<sup>5</sup>

A OMS estima que, a nível mundial, o consumo de álcool resulta em 2,5 milhões de mortes por ano. Destas, 320 000 correspondem a jovens entre os 15 e 29 anos, contribuindo com 9% da mortalidade neste grupo etário.<sup>5</sup>

Na Europa, 38% a 50% das cirroses são de origem alcoólica. Estima-se que os custos tangíveis totais anuais atribuíveis ao álcool rondem os 125 mil milhões de euros, devidos ao tratamento de doenças, absentismo, diminuição de produtividade, desemprego e mortes prematuras, o que corresponde a cerca de 1,3% do produto interno bruto europeu.<sup>6,7</sup>

O álcool é a terceira causa de carga de doença a nível mundial e a segunda na Europa. No mundo desenvolvido pode ser responsável por até 9,2% da perda de anos de vida ajustados à incapacidade; está associado com vários problemas sociais, incluindo violência, abuso, negligência de crianças e absentismo laboral.<sup>5,8</sup>

Em Portugal, a carga de doença atribuível ao álcool encontra-se também quantificada num estudo da Prof.<sup>a</sup> Doutora Helena Cortez-Pinto. Neste determinou-se que 3,8% da mortalidade total e 5% da perda de anos de vida ajustados à incapacidade estão relacionados com o álcool; desta perda, a doença hepática é responsável por 31,5%, os acidentes de viação por 28,2% e as neoplasias por 19,2%. No que respeita aos custos para o Serviço Nacional de Saúde, estes são estimados em 191 milhões de euros, repartidos de forma muito semelhante entre internamentos e ambulatório – isto representa 0,13% do PIB e 1,25% do total de gastos com a saúde.<sup>9</sup>

Num estudo anterior, publicado pelo mesmo grupo, tinha-se já verificado que as doenças hepáticas correspondiam a 1,8% de todas as causas de internamento em Portugal, em doentes relativamente jovens (média de idades de 57 anos). A mortalidade nestes internamentos revelava-se bastante elevada (17,6%). Sem surpresa, o álcool era a causa da doença hepática na maioria dos casos (63%).<sup>10</sup>



É um facto que a ingestão de bebidas alcoólicas é um hábito enraizado na nossa cultura. Estima-se que cerca de 60% dos portugueses ingiram bebidas alcoólicas regularmente, e 10% apresentem problemas ligados ao álcool.<sup>1</sup>

Entre 2003 e 2005, cada português com mais de 15 anos consumiu, em média, 14,6 litros de álcool puro por ano (contando com a produção caseira não registada), em comparação com uma média europeia de 12,2 litros/pessoa/ano (figura 1). Há um consumo predominante de vinho (55%) seguido da cerveja (31%), destilados (10%) e outras bebidas (4%). Apesar de tudo, a evolução do consumo é classificada de momento como estável, e tem diminuído ligeiramente ao longo dos anos - em 1966 era estimado um consumo de 20 litros de álcool/pessoa/ano - e o padrão de consumos mostra uma descida da percentagem de vinho no consumo total, juntamente com um aumento do consumo de cerveja e bebidas destiladas.<sup>11</sup>

### Consumo de álcool puro, em litros por ano, na população com mais de 15 anos (2003-2005)

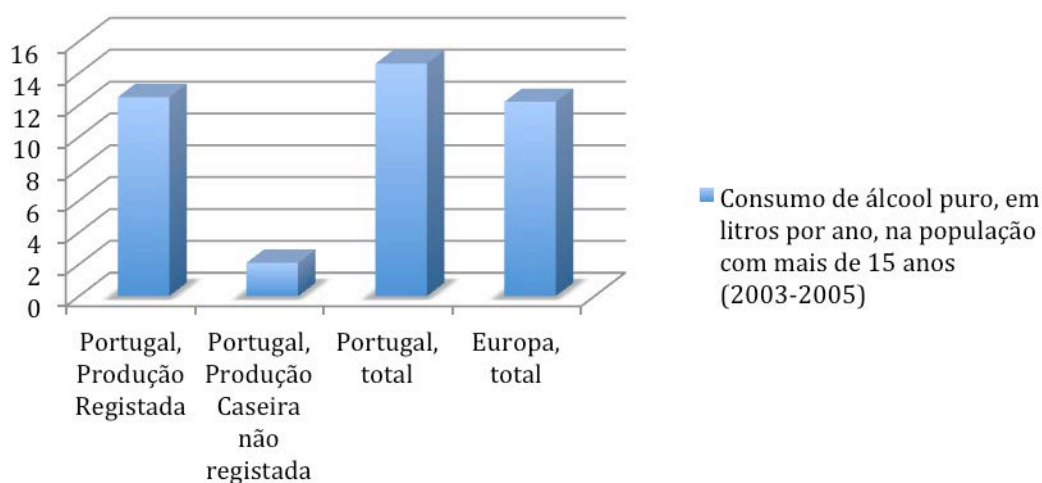


Figura 1. Consumo de álcool em Portugal e na Europa. Adaptado de *WHO European status report on alcohol and health 2010*.<sup>11</sup>

Em 2006, registaram-se 1362 óbitos em Portugal devido a Doença Crónica do Fígado e Cirrose (CID - Classificação Internacional de Doenças - 10: K70 e K73-K74), maioritariamente do sexo masculino (1029 homens e 333 mulheres). Estes correspondem a 14 655 anos potenciais de vida perdidos até aos 70 anos (por 100 000 habitantes). De notar que nesse ano, esses óbitos superaram em número as 1091 vítimas de Acidentes de Trânsito Com Veículos a Motor (CID 10: V02-V04; V09; V12-V14;V19-V79; V86-V89)<sup>12</sup> (e quantos destes terão sido por problemas ligados ao álcool), causa que, como sabemos, motiva numerosas campanhas de informação.

Consideramos pois, que o alcoolismo e a patologia ligada ao álcool são problemas graves no nosso país, quer a nível social, quer a nível de prestação de cuidados de saúde.

---

*Capítulo 2.*

*Metabolismo do Álcool*

---



---

## 2. Metabolismo do Álcool

### 2.1. Introdução

Uma dose habitual de bebida alcoólica (340 ml de cerveja, 115 ml de vinho, 45ml de bebidas destiladas) contém entre 10 a 15 g de álcool puro, e em média produz uma alcoolemia de 0,2 g/dL.<sup>13</sup>

Um entrave que desde logo se coloca em avaliar com rigor a quantidade de álcool ingerido é a pouca uniformidade das doses de bebida; quando se está a falar de um "copo de vinho", a dimensão deste pode diferir grandemente consoante a interpretação do médico ou do doente.<sup>14</sup>

Depois de ingerido, o álcool é absorvido na sua maior parte no estômago (30%) e no intestino delgado proximal (65%), sendo o restante absorvido quer nas membranas mucosas da boca e esófago, quer no cólon.<sup>1, 13</sup>

Não sofre digestão prévia, passando intacto para a circulação sanguínea. É uma molécula fracamente polarizada, rapidamente atingindo um equilíbrio entre plasma e tecidos; conseqüentemente é distribuído por todo o organismo em função da vascularização e conteúdo hídrico dos diferentes órgãos e tecidos - a sua concentração é maior no fígado, cérebro, rins, coração e músculo; e menor nos ossos e tecido adiposo.<sup>1</sup>

O fígado é o principal órgão implicado no metabolismo do álcool, através de vias oxidativas, o que poderá em parte explicar a sua suscetibilidade a lesões induzidas pelo álcool. É também o primeiro órgão a ser atingido pelo mesmo após a sua absorção gastrointestinal, através da circulação venosa portal.<sup>15, 16</sup>

Na metabolização do etanol podem intervir vários sistemas enzimáticos, descritos a seguir, e esquematizados na figura 2.

## **2.2. Álcool Desidrogenases**

A família das álcool desidrogenases (ADH) corresponde a um complexo conjunto de enzimas citoplasmáticas que são as principais responsáveis pelo metabolismo oxidativo do álcool no fígado.<sup>17</sup>

A álcool desidrogenase 1 (ADH1) é a enzima chave no metabolismo do álcool, sendo responsável por cerca de 70% do mesmo.<sup>18, 19</sup>

## **2.3. Sistema de Oxidação Microssomal do Etanol**

Um dos elementos constituintes do sistema de oxidação microssomal do etanol (MEOS) é o citocromo P450 2E1 (CYP 2E1), presente em diversas isoformas no retículo endoplasmático e na mitocôndria, sendo induzido pelo etanol, o que pode explicar a sua contribuição relativa aumentada em consumos crônicos de álcool, que pode variar desde 3-8% até 22%. Usa como cofator o NADPH, que é oxidado a  $\text{NADP}^+$  simultaneamente com o etanol, formando acetaldeído e duas moléculas de água. É uma fonte de produção de radicais livres.<sup>20, 21, 22</sup>

## 2.4. Catalase

A catalase está presente em vários tecidos, sendo abundante no fígado. Encontra-se nos peroxissomas, e, na presença de um sistema enzimático gerador de peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ), como a NADPH oxidase ou a xantina oxidase, poderá ter um papel na oxidação do etanol. Esta via produz duas moléculas de peróxido de hidrogénio por cada molécula de etanol oxidada, composto altamente reativo e tóxico.<sup>17,23</sup>

## 2.5. Acetaldeído Desidrogenase

O acetaldeído é o produto intermédio do metabolismo do álcool, sendo tóxico para o organismo. O passo final desse metabolismo é efetuado pela enzima acetaldeído desidrogenase (ALDH), que oxida o acetaldeído ( $CH_3CHO$ ) a acetato ( $CH_3COO$ ) com a redução de mais uma molécula de  $NAD^+$  a  $NADH$ .<sup>1</sup>

O acetato difunde-se para a circulação e é oxidado no ciclo dos ácidos tricarbóxicos (CAT) em  $CO_2$ , ocorrendo esta reação maioritariamente em tecidos como o coração, músculo esquelético e cérebro.<sup>15</sup>

## 2.6. Vias Não-Oxidativas para o Metabolismo do Álcool

Foram descritas duas vias não-oxidativas para o metabolismo do álcool; aparentemente apresentam uma contribuição mínima para a sua eliminação, e a sua relevância clínica é ainda desconhecida. Uma via leva á formação de ésteres etil de

ácidos gordos, que permanecem no plasma e nos tecidos por períodos prolongados de tempo. Outra envolve a enzima fosfolipase D, que converte fosfolídeos em ácido fosfatídico, um importante componente na transdução de sinais intracelulares; na presença de etanol, é formado fosfatidiletanol, que provavelmente pode interferir com essa mesma sinalização.<sup>17</sup>

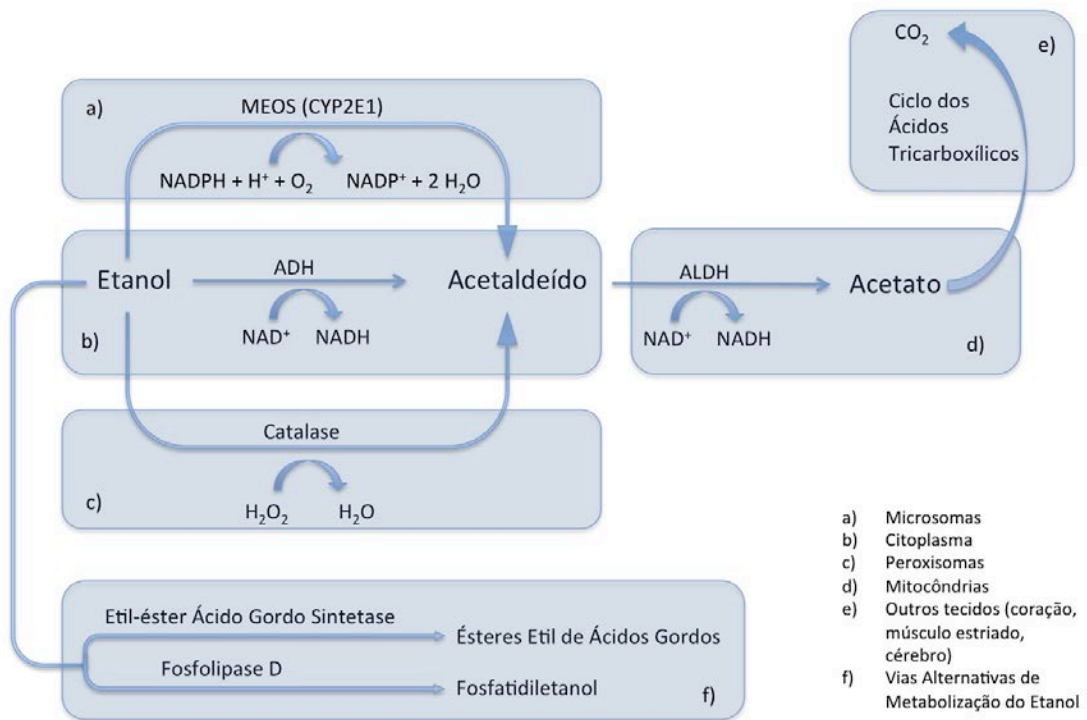


Figura 2. Vias de metabolização do etanol.



---

*Capítulo 3.*

*Doença Hepática  
Alcoólica*

---



---

## 3. Doença Hepática Alcoólica (DHA)

### 3.1. Introdução

Apesar da relação entre ingestão de álcool e doença hepática ser conhecida há mais de 200 anos, apenas 30-35% dos alcoólicos apresentam doença hepática alcoólica (DHA) clinicamente significativa (esteatohepatite e cirrose)<sup>24,25</sup> e apenas 10-15% dos alcoólicos crónicos apresentam cirrose comprovada em autópsias.<sup>26</sup> Em seguimentos de 10 a 20 anos em doentes com fígado gordo alcoólico, apenas em 5-15% se documenta cirrose.<sup>27,28,29</sup> Mesmo com consumos diários superiores a 120 g de álcool por dia, apenas 13,5% dos indivíduos desenvolvem cirrose.<sup>30</sup> A explicação para tais factos ainda não é clara; nitidamente o álcool é um fator necessário mas nem sempre suficiente para o desenvolvimento de cirrose.<sup>31</sup> Mesmo considerando uma população relativamente homogénea, como a francesa, para iguais quantidades de ingestão de álcool existem diferenças geográficas que conferem à população do norte um risco maior de desenvolver cirrose do que a população ao sul da linha "Bordéus-Estrasburgo", como foi descrito num interessante estudo de Sylvie Naveau.<sup>32</sup>

A relação entre consumos elevados (160 gramas/dia) e prolongados (8 anos) de álcool e cirrose hepática foi já bem documentada,<sup>33</sup> mas existem evidências de aumento do risco relativo de cirrose hepática desde valores tão baixos como 10 gramas/dia nas mulheres e 20 gramas/dia nos homens.<sup>34</sup>

Outro trabalho confirma um risco aumentado de cirrose hepática a partir de 30 gramas de álcool/dia ou um consumo total durante a vida de 100 kg de álcool.

35

Atualmente, existe um relativo consenso sobre a dose hepatotóxica do etanol, ou seja, aquela que é suficiente para desencadear DHA, situando-se entre 7 a 13 doses de álcool por semana nas mulheres e entre 14 a 27 doses nos homens.<sup>36</sup> Isto corresponderá a um consumo médio diário de cerca de 20-40 gr de álcool por dia para as mulheres e 40-80 gr por dia para os homens, durante um período de 10 a 12 anos.<sup>29, 37</sup>

O padrão de ingestão alcoólica é relevante – a ingestão diária e continuada parece ser mais deletéria do que o consumo intermitente.<sup>31</sup>

Didaticamente, é usual a divisão da DHA nos três grupos histológicos clássicos: esteatose, hepatite alcoólica, cirrose e eventualmente como estágio mais avançado o carcinoma hepatocelular. No entanto, normalmente coexistem dois ou mais desses grupos, traduzindo o espectro da resposta hepática à agressão pelo álcool. Esta divisão é útil para encararmos a DHA como um contínuo evolutivo, com uma gravidade menor na esteatose, e, acima de tudo, o conceito de reversibilidade, que é total na esteatose pura e quase nula na cirrose hepática instalada.<sup>38, 39, 40</sup>

## 3.2. Esteatose ou Fígado Gordo Alcoólico

### 3.2.1. Diagnóstico e Classificação

A esteatose hepática ou fígado gordo alcoólico é a forma mais frequente de DHA, a mais previsível, e ao mesmo tempo a menos grave e a mais facilmente reversível.<sup>40</sup>

Contudo, não deve ser encarada como uma entidade completamente benigna, já que o grau de infiltração gorda nas biopsias em doentes alcoólicos é fator preditivo para o subsequente desenvolvimento de cirrose.<sup>28,29</sup>

Cerca de 90% dos indivíduos que consomem mais de 60 g de álcool por dia desenvolvem fígado gordo.<sup>41</sup> O aparecimento de esteatose pode dar-se em apenas 3 a 5 dias de ingestão alcoólica intensa; com abstinência alcoólica e dieta equilibrada, normalmente dá-se a remissão do quadro em 3 a 8 semanas.<sup>40</sup>

Histologicamente, encontra-se geralmente uma esteatose macrovesicular, envolvendo pelo menos mais de 5% dos hepatócitos da amostra,<sup>42</sup> podendo ser identificados grandes vacúolos lipídicos, que ocupam a maior parte do citoplasma dos hepatócitos, deslocando o núcleo e os outros organelos para a periferia. Estes vacúolos contêm triglicerídeos, ácidos gordos, monoglicerídeos e diglicerídeos. A quantificação é normalmente qualitativa, estimando-se a percentagem de hepatócitos afectados: menos de 25%, de 25 a 50%, de 50 a 75% e mais de 75%.<sup>31,</sup>

40

Menos frequente é o aparecimento de esteatose microvesicular (pequenos e múltiplos vacúolos lipídicos que não deslocam o núcleo do hepatócito), que

corresponde geralmente a uma manifestação de citopatia mitocondrial e ribossômica. Independentemente da causa, é um quadro que traduz um mau prognóstico, com risco elevado de morte por falência hepática.<sup>39, 43, 44</sup>

Ainda menos frequente é a entidade clínica denominada degeneração alcoólica espumosa, descrita pela primeira vez por Uchida e colaboradores em 1983. Histologicamente, a arquitetura lobular encontra-se preservada, com esteatose microvesicular, edema celular, megamitocôndrias e focos de apoptose, atingindo maioritariamente os hepatócitos perivenulares. Não há qualquer reação inflamatória presente e a recuperação é total com a abstinência.<sup>45</sup>

Inicialmente, supunha-se que o fígado gordo alcoólico era apenas consequência da malnutrição associada; em 1963 Lieber demonstrou que o fígado gordo alcoólico correspondia a um efeito tóxico direto do etanol.<sup>46</sup>

Ao longo de várias décadas, foram postulados vários mecanismos sobre a patogénese do fígado gordo, como a síntese aumentada de triglicerídeos e VLDL, metabolismo deficiente de lipoproteínas ricas em triglicerídeos, oxidação diminuída dos ácidos gordos e aumento da mobilização de gordura do tecido adiposo.<sup>47</sup>

Uma das primeiras hipóteses foi a da alteração do estado *redox* do fígado, causado pelo excesso de NADH produzido no metabolismo do álcool. De facto, foi demonstrado *in vitro* que o excesso de NADH inibe o ciclo de Krebs e a  $\beta$ -oxidação dos ácidos gordos, com aumento da síntese de triglicerídeos e VLDL, causando a acumulação de lípidos nos hepatócitos.<sup>46, 48</sup>

Contudo, estes mecanismos revelaram-se experimentalmente insuficientes para explicar completamente o início e a perpetuação do fígado gordo alcoólico. Mais recentemente, em consequência dos trabalhos de You e Crabb, foram dados mais alguns passos para a compreensão do metabolismo dos lípidos a nível

hepático.<sup>49</sup> A oxidação dos ácidos gordos depende de várias enzimas, e a regulação destas parece ser predominantemente efetuada por duas moléculas: o PPAR- $\alpha$  (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\alpha$* )<sup>50, 51, 52, 53</sup> e o SREBP-1 (*Sterol Regulatory Element Binding Protein 1*).<sup>54</sup>

Normalmente, o PPAR- $\alpha$  é ativado pela ligação de ácidos gordos livres, permitindo assim o aumento da metabolização destes quando a sua concentração intracelular sobe.

Foi demonstrado que o metabolismo do etanol, pela produção de acetaldeído, interfere com a atividade do PPAR- $\alpha$ .<sup>50, 55, 56</sup>

Para além da diminuição da degradação dos ácidos gordos induzida pelo álcool, também foi demonstrado que este aumenta a síntese de lípidos a nível hepático, através da indução do SREBP-1c.<sup>53, 57</sup>

Inicialmente considerada como uma entidade benigna, a esteatose é sem dúvida o ponto de partida para o desenvolvimento da DHA. O passo seguinte é a esteatohepatite / hepatite alcoólica aguda.<sup>58</sup>

Na maioria das situações, a progressão da esteatose é influenciada pela persistência e intensidade da causa primária do desenvolvimento do fígado gordo.<sup>59</sup>





### 3.3. Esteatohepatite Alcoólica

#### 3.3.1. Diagnóstico e Classificação

A esteatohepatite alcoólica (*Alcoholic SteatoHepatitis* - ASH) corresponde ao achado de esteatose, inflamação e sinais de lesão hepatocitária com consumos de álcool superiores a 20g por dia (mulheres) ou 30 g por dia (homens). De facto, o quadro histopatológico é muito semelhante ao da esteatohepatite não alcoólica (*Non-Alcoholic SteatoHepatitis* - NASH), sendo a distinção por vezes difícil e baseada em dados da história clínica, nomeadamente nos questionários de avaliação para o diagnóstico de alcoolismo.<sup>59</sup>

Assim, o diagnóstico histológico de esteatohepatite baseia-se no achado de:

- **Fígado gordo alcoólico** com o quadro de esteatose predominantemente macrovesicular, atrás descrito;

- **Infiltrado inflamatório**, geralmente presente em focos lobulares dispersos, podendo atingir os espaços porta, constituído por neutrófilos, linfócitos, plasmócitos e macrófagos. Normalmente o infiltrado portal é de menor extensão que o lobular; o contrário sugere outras etiologias que não o álcool, especialmente se existir hepatite de interface;<sup>60</sup>

- **Lesão hepatocitária**, sendo a mais frequente a chamada degenerescência em balão ou balonização dos hepatócitos, apresentando-se estes com um citoplasma volumoso (2 a 3 vezes maior que o normal) e mais descorado e irregular em comparação com as células adjacentes. Normalmente são mais proeminentes na

zona 3, onde se podem associar com fibrose perissinusoidal e com outros hepatócitos esteatósicos. Os corpos de Mallory-Denk configuram outro achado histológico comum. A presença de colestase canalicular, proliferação ductular, lesões venooclusivas e necrose hialina esclerosante são muito sugestivas da etiologia alcoólica da esteatohepatite.<sup>60</sup>

### **3.3.2. Fisiopatologia da Esteatohepatite Alcoólica**

Em seguida, abordaremos alguns mecanismos fisiopatológicos que levam ao início e perpetuação destes fenómenos inflamatórios no parênquima hepático, após a prévia formação de esteatose.

#### **3.3.2.1. Acetaldeído, Stress Oxidativo e Peroxidação Lipídica**

O acetaldeído é um composto altamente reativo e tóxico. Dada a sua natureza extremamente eletrofilica, forma ligações covalentes com muita facilidade, normalmente designadas por adutos (do latim *adductus*, "atraído") (figura 3).<sup>61</sup>

De facto, quer na mitocôndria, quer no citoplasma, o acetaldeído pode causar alterações de proteínas, lípidos e do ADN, pensando-se que estes eventos sejam importantes na patogenia da DHA.<sup>62, 63, 64</sup>

As ações do acetaldeído nas proteínas do citoesqueleto e na permeabilidade da membrana celular podem também ser relevantes para esse efeito.

<sup>65, 66</sup>

O stress oxidativo desencadeado pela metabolização do etanol parece também desempenhar um papel importante na DHA. O mecanismo central poderá ser a indução do citocromo P450 2E1 (CYP 2E1).<sup>67</sup>

Estas reações mediadas pelo CYP 2E1 podem resultar na produção de espécies reativas de oxigénio (*Reactive Oxygen Species* - ROS), nomeadamente radicais anião superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ), ou no caso específico do metabolismo do etanol, radicais hidroxietilo (HER).<sup>67,68</sup>

A capacidade dos ROS produzirem lesão celular resulta da alteração do equilíbrio entre a quantidade de ROS produzidos e a capacidade dos sistemas antioxidantes de defesa celular para os removerem.<sup>69</sup>

A presença de ROS induz a despolarização da membrana mitocondrial e alterações da sua permeabilidade, o que é um sinal para a indução da apoptose do hepatócito.<sup>70</sup>

De facto, com a presença de ROS, um fenómeno rapidamente observado é o da peroxidação lipídica da membrana celular e dos organelos.<sup>71</sup> Estas reações formam substâncias altamente electrofílicas e reativas como o malondialdeído (MDA) e o 4-hidroxinonenal (4-HNE).<sup>72</sup>

A presença simultânea do acetaldeído resultante da metabolização do etanol e dos aldeídos resultantes da peroxidação lipídica (MDA e 4-HNE) pode ainda levar à formação de adutos mistos ou híbridos, MDA-acetaldeído-proteínas, designados MAA, causando ainda mais dano celular.<sup>73</sup>

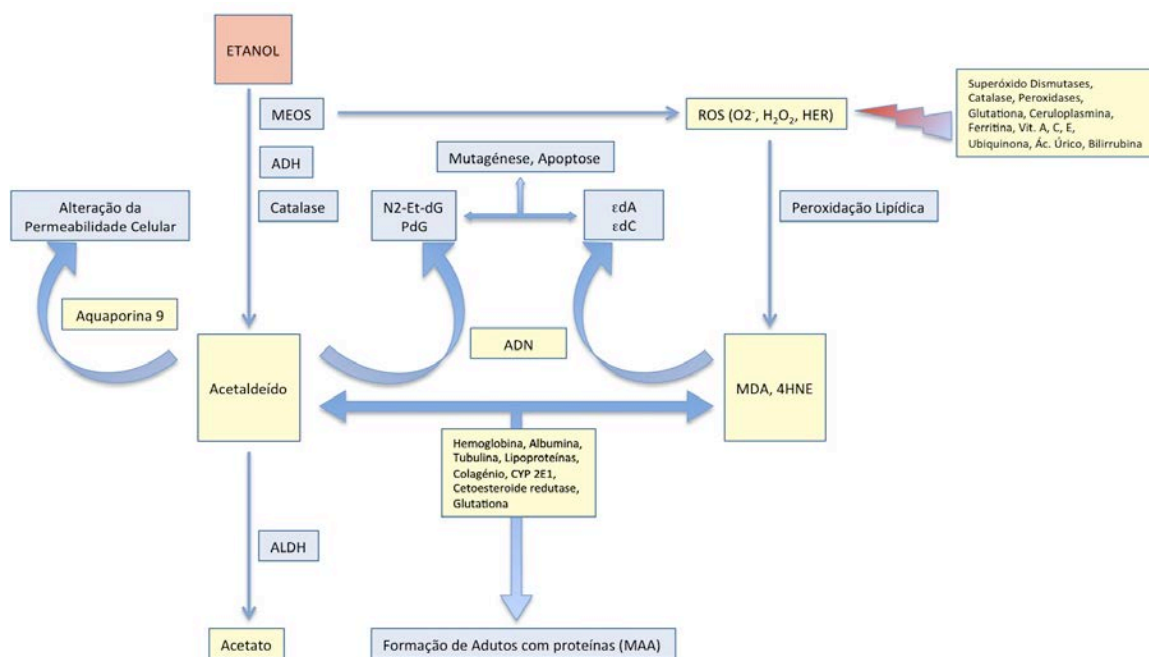


Figura 3. Acetaldeído e stress oxidativo na DHA. O acetaldeído pode formar adutos com proteínas, ADN e alterar a permeabilidade celular. O metabolismo do etanol pelo MEOS é uma fonte de ROS, que, por fenómenos de peroxidação lipídica, formam MDA e 4HNE. Estes compostos também formam adutos com o ADN e adutos mistos com o acetaldeído e proteínas (MAA). Vários sistemas enzimáticos e não enzimáticos, tais como as superóxido dismutases, catalase, peroxidases, glutatona, ceruloplasmina, ferritina, vitaminas A, C, E, ubiquinona, ácido úrico e bilirrubina, contribuem para proteger a célula dos ROS. MEOS - *Microsomal Ethanol Oxidizing System* - Sistema de Oxidação Microsossomal do Etanol; ROS - *Reactive Oxygen Species* - Espécies Reativas de Oxigénio; ADH - Álcool Desidrogenases; ALDH - Acetaldeído Desidrogenase; N2-Et-dG - N2-etil-desoxiguanosina; PdG - 1,N(2)-propano-2'-desoxiguanosina; εdA - 1,N6-etenodesoxiadenosina; εdC - 2-N4-etenodesoxicidina; CYP - Citocromo P450; MDA - Malondialdeído; 4-HNE - 4-Hidroxinonenal; MAA - MDA-acetaldeído-proteínas.

Apesar da comprovada importância das substâncias derivadas do metabolismo do álcool na patogenia da DHA, existem dados que indicam que uma parte significativa da agressão hepática é independente desse metabolismo; a inibição seletiva do CYP 2E1 em ratinhos não impede o estabelecimento e progressão das lesões de esteatohepatite, embora com menor gravidade.<sup>74</sup> Outros mecanismos patogénicos estarão certamente envolvidos.

### 3.3.2.2. Mecanismos autoimunes

Em numerosos trabalhos identificaram-se em até 25-50% de doentes com DHA vários auto-anticorpos, nomeadamente antifosfolípidos como a cardiolipina, <sup>75, 76, 77, 78</sup> e mesmo marcadores de autoimunidade característicos de outras patologias, como anticorpos antinucleares (ANA) em 22%, anti-músculo liso com uma frequência 8 vezes superior a controlos, anti-dsDNA ou ssDNA em 60%, crioglobulinas (IgM antilinfócitos) em 59,6% e fenómenos de linfocitotoxicidade em mais de 90%. <sup>79, 80</sup>

No caso dos anticorpos antifosfolípidos em circulação na DHA (anti-cardiolipina e anti- $\beta_2$ -glicoproteína 1), verificou-se experimentalmente que estes reconheciam quase exclusivamente fosfolípidos sujeitos a oxidação prévia, e menos a sua forma não modificada. <sup>81</sup>

Em relação com os fenómenos de peroxidação lipídica descritos anteriormente, verificou-se que a formação de adutos mistos (MAA) leva a uma potente resposta imune, com formação de auto-anticorpos contra o *self* modificado, mas que também podem reconhecer certas regiões de proteínas não modificadas, podendo eventualmente desencadear respostas inflamatórias contra proteínas do tecido hepático normal. <sup>63, 82</sup>

Esta ativação do sistema imunitário pode ocorrer de uma forma semelhante ao de algumas hepatites tóxicas, especialmente as idiossincráticas, onde um metabolito tóxico forma uma ligação covalente com estruturas celulares, formando haptenos, que são apresentados pelas células apresentadoras de antígenos aos linfócitos. <sup>83</sup>

Na sequência destes fenómenos de desregulação da imunidade, pensa-se que os auto-anticorpos que mais provavelmente poderão desempenhar um papel na patogenia da DHA são os anti-CYP 2E1 e os anti-HER.<sup>82, 84, 85, 86</sup>

### **3.3.2.3. Endotoxinas, Células de Kupffer e Citocinas**

As endotoxinas são lipopolissacarídeos (LPS) que têm origem na parede celular de bactérias Gram-negativas da flora comensal do intestino. Já há algumas décadas se discute o seu papel fulcral na iniciação e progressão da DHA.<sup>87</sup>

Foram documentados fenómenos de sobrecrecimento bacteriano em aspirados jejunais de doentes com DHA.<sup>88, 89, 90</sup> Pensa-se que este sobrecrecimento possa ter origem na hipocloridria, diminuição da secreção de IgA pela mucosa e má nutrição causados pelo álcool.<sup>91</sup>

Concomitantemente, verificou-se que a presença de endotoxinas em circulação era uma característica quer da DHA crónica, quer da ingestão aguda e abundante de bebidas alcoólicas em doentes sem doença hepática.<sup>92, 93</sup>

A administração enteral de etanol parece alterar a permeabilidade intestinal,<sup>94, 95</sup> o que pode explicar a maior facilidade da translocação das endotoxinas para a circulação enterohepática. Rapidamente se evidenciou que a endotoxémia não era apenas uma consequência inocente da ingestão alcoólica, mas sim um fator determinante na patogenia da DHA.<sup>96, 97, 98, 99</sup>

Estudos mais recentes confirmaram a relação entre evolução histológica da DHA e endotoxinas, evidenciando também que a administração exógena de LPS levava a um aumento significativo da expressão hepática de citocinas, nomeadamente o TNF- $\alpha$ , a IL-1 e a IL-6.<sup>100, 101</sup>

Era então evidente que a ativação das células de Kupffer pelas endotoxinas trazidas pela circulação portal representava um passo fundamental para o início da inflamação.<sup>102, 103</sup> Esta resposta inflamatória desproporcionada tem origem na estimulação das células de Kupffer por uma ligação direta do LPS a dois tipos de recetores: TLR-4 (*Toll-like Receptors-4*) e ao CD14 que atua como correceptor do primeiro.<sup>104</sup>

A ligação das endotoxinas a estes recetores vai então desencadear uma cascata de eventos, incluindo a ativação do fator nuclear kappa B (NF-κB), da proteína ativadora 1 (AP-1) e de fatores de regulação do interferão (IRF's), para além de alterações nas procaspases 3 e 8 e no JNK (*Jun N-terminal Kinase*), que culminam numa resposta imune local com produção de fator de necrose tumoral (TNF-α), interleucinas 1β, 6, 8, 12 e 18, prostaglandinas E<sub>2</sub> e D, TGF-β (*Transforming Growth Factor β*), leucotrienos, com recrutamento de polimorfonucleares, aumento de expressão de moléculas de adesão (VCAM-1 - *Vascular Cell Adhesion Molecule 1*, ICAM-1 - *Inter-Cellular Adhesion Molecule 1* e E-selectina), diminuição da resposta dos hepatócitos ao interferão-γ, aumento do stress oxidativo e do consumo de O<sub>2</sub>, aumento da expressão de HLA, estimulação de células estreladas hepáticas (CEH) e aumento de deposição de colagénio.<sup>104, 105,</sup>

<sup>106, 107, 108</sup>

#### **3.3.2.4. Sobrecarga Tecidual de Ferro**

Abordaremos mais à frente o metabolismo do ferro na DHA, objecto em particular deste trabalho de investigação.

### 3.3.2.5. Fatores de Risco Individuais

Como verificámos, são múltiplos e talvez sinérgicos os mecanismos pelos quais o álcool causa DHA. Apesar destes estarem relativamente bem esclarecidos, o facto de apenas uma relativamente pequena percentagem de alcoólicos desenvolver doença hepática permanece uma incógnita. Sem dúvida que fatores de suscetibilidade individual serão uma condicionante importante para a progressão da DHA (quadro I).<sup>109</sup>

As mulheres são mais suscetíveis à DHA, como é evidente pelos menores consumos médios de etanol necessários para o seu aparecimento. Elas atingem valores séricos mais elevados de etanol com consumos idênticos, quer por menor capacidade de metabolização da enzima álcool desidrogenase (a atividade da ADH gástrica é muito baixa nas mulheres), quer por um mais baixo volume de distribuição. Apesar do alcoolismo ser mais frequente no sexo masculino, ele tende a ser subdiagnosticado nas mulheres, apresentando-se estas geralmente com a doença mais avançada. As mulheres apresentam também um índice de recaída superior no tratamento do alcoolismo, e a progressão histológica para cirrose é mais frequente, mesmo com abstinência.<sup>31, 36, 110, 111, 112, 113</sup>

Para além do sexo, outros fatores individuais que parecem interferir com a suscetibilidade à DHA são: a raça, início de consumo na adolescência, consumo de diferentes variedades de bebidas alcoólicas, beber fora da refeição, carências nutricionais, obesidade e infeção concomitante com o vírus da hepatite C.<sup>30, 37, 114, 115, 116</sup>



Quadro I. Fatores de risco individuais para desenvolvimento de DHA.

---

Sexo Feminino

Raça (Hispânicos > Negroides > Caucasianos)

Início do consumo de bebidas alcoólicas na adolescência

Beber fora das refeições

Desnutrição

Obesidade

Infeção a VHC

---



## **3.4. Fibrose e Cirrose**

### **3.4.1. Introdução**

No corpo humano, a formação de fibrose é uma tentativa de reparação de uma lesão tecidual, muitas vezes procurando encapsular e isolar a origem dessa lesão.<sup>117</sup>

A fibrose representa um estágio avançado da DHA, e é consequência dessa tentativa malograda de reparação tecidual, em resposta a uma agressão hepática crónica (tipicamente meses a anos), através da deposição excessiva de componentes da matriz extracelular, particularmente o colagénio, devido a um aumento da sua produção e / ou diminuição da sua degradação. Na fase mais precoce dá-se o depósito desses componentes nos espaços subendoteliais (espaço de Disse), que corresponde à "capilarização" dos sinusoides hepáticos; este fenómeno correlaciona-se diretamente com a diminuição da função hepática. A deposição continuada destes componentes leva à cirrose, com formação de nódulos de hepatócitos rodeados de bandas fibróticas, acompanhada de uma marcada diminuição da função hepática e fenómenos de hipertensão portal sinusoidal.<sup>118, 119, 120, 121, 122</sup>

### 3.4.2. Diagnóstico

A fibrose hepática é rapidamente detetável ao exame histológico, contudo, por implicar um procedimento invasivo como o é a biópsia hepática, desde sempre existiu interesse nos biomarcadores indiretos de fibrose.<sup>123</sup>

Destes, salientam-se o PGA, o Fibrotest, o FibrometerA e o Hepascore. O que parece apresentar melhor precisão é o Fibrotest, com uma AUC de 0,84 para um score de fibrose  $F \geq 2$  e 0,95 para o diagnóstico de cirrose.<sup>124, 125, 126</sup>

Outros biomarcadores indiretos descritos, de maior ou menor complexidade, são a relação AST/ALT, o PGGA (adição da  $\alpha$ -2 macroglobulina ao PGA), o APRI (*AST-to-platelet ratio index*), o índice de Forns, o FIB-4, o Índice SHASTA, o FibroSpect II e o teste respiratório com  $^{13}\text{C}$ -metacetina.<sup>127</sup>

Mais difíceis de determinar, e geralmente só usados em trabalhos de investigação, são os biomarcadores diretos de fibrose hepática. Ainda assim, estes refletem fundamentalmente o grau do *turnover* da matriz extracelular e não apenas da deposição de tecido fibrótico, não são específicos do tecido hepático, e os níveis séricos podem depender do nível de eliminação, que pode estar alterada na insuficiência renal ou hepática. Até hoje, os descritos são: o PICP (*Procollagen type I Carboxy-terminal Peptide*), o PIIINP (*Procollagen type III amino-terminal Peptide*), as metaloproteinases (MMP's), os inibidores teciduais das metaloproteinases (TIMP's), o TGF- $\beta$ , o ácido hialurónico, o YKL-40, a laminina, o CTGF (*Connective Tissue Growth Factor*), a paraoxonase 1 (PON-1) e a MFAP-4 (*Microfibril-Associated Glycoprotein 4*).<sup>127, 128, 129, 130</sup>

Mais recentemente, a elastografia hepática transitória veio a revelar-se um ótimo avaliador não invasivo da fibrose hepática. Trata-se de um dispositivo com

um transdutor de ultrassons, baseado na elastografia transitória unidimensional, que mede a velocidade de propagação de ondas elásticas, a qual está diretamente relacionada com a elasticidade hepática. É um método rápido, indolor, reproduzível e pouco dependente do operador.<sup>131, 132</sup>

A ARFI (*Acoustic Radiation Force Impulse Elastography*) foi recentemente descrita, combinando a ultrassonografia convencional com a avaliação da rigidez hepática. Parece não ser superior à elastografia transitória na correlação com o grau de fibrose existente, mas apresenta vantagens, como a aparente independência da existência de esteatose ou esteatohepatite nos resultados, e poder ser efetuado com um aparelho de ultrassonografia convencional, apenas com software adaptado.<sup>127, 133</sup>

A RMN pode ser usada para medir a rigidez hepática e para detetar anomalias da difusão da água associada com a cirrose. Permite também avaliar com precisão a distribuição do material fibroso no fígado, podendo em alguns casos auxiliar na identificação da natureza da agressão hepática.<sup>127, 134</sup>

Com o avanço das técnicas não invasivas que permitem detetar com alguma precisão o grau de fibrose, permitindo fazer o estadiamento da doença, a indicação da biopsia hepática na DHA é cada vez mais debatida. Contudo, não nos podemos esquecer que é o único método capaz de afirmar a presença de esteatohepatite (fazer a gradação), que pode confirmar o diagnóstico em caso de dúvidas, apontar para outra causa de doença hepática que não a alcoólica, e ainda confirmar com alguma certeza a existência de ingestão continuada de álcool.<sup>135</sup>

### **3.4.3. Mecanismos da Fibrose Hepática**

#### **3.4.3.1. Células de Kupffer**

As células de Kupffer constituem 80-90% dos macrófagos teciduais integrados no sistema reticulo-endotelial e cerca de 15% do total da população celular hepática. São as primeiras células a serem expostas aos componentes absorvidos no aparelho gastrointestinal.<sup>136, 137</sup>

Como vimos anteriormente, a célula de Kupffer desempenha um papel de pivô importantíssimo no desencadear das respostas inflamatórias e fibróticas do fígado, provocadas fundamentalmente pela estimulação dos recetores TLR-4 pelo LPS proveniente da circulação portal. São a fonte principal de mediadores inflamatórios, nomeadamente citocinas, ROS, óxido nítrico, eicosanoides, quimiocinas e enzimas proteolíticas.<sup>136</sup>

Se as células de Kupffer são sem dúvida os sinalizadores para o início da inflamação e fibrose, os efetores da resposta fibrótica são as células estreladas hepáticas (CEH).<sup>138, 139</sup>

#### **3.4.3.2. Células Estreladas Hepáticas (CEH)**

As CEH representam cerca de 15% da população celular residente no fígado.<sup>140</sup> Encontram-se no espaço de Disse e representam os pericitos do fígado.

141

Fisiologicamente, as CEH armazenam retinoides no seu citoplasma, participam na síntese e degradação da matriz extracelular, produzem citocinas

(TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1, IL-6, IL-10), quimiocinas (M-CSF e MCP-1), apolipoproteínas, prostaglandinas, fatores de crescimento (fundamentalmente HGF e PDGF), moléculas de adesão (ICAM-1 e VCAM-1). Podem controlar o diâmetro dos sinusoides, através das suas propriedades contrácteis. Parecem desempenhar funções importantes na embriogénese hepática e na resposta regenerativa após uma agressão aguda no fígado adulto.<sup>142</sup>

Apesar de terem sido descritas pela primeira vez por Kupffer, que as designou por *Sternzellen* em 1876,<sup>142</sup> o seu papel como principais células produtoras de colagénio do fígado só foi exposto em 1985.<sup>143</sup>

A ativação das CEH é o evento fundamental no início da fibrogénese hepática (figura 4).<sup>140</sup> Os miofibroblastos portais (diferentes das CEH) e outros miofibroblastos de origem extra-hepática (mais concretamente da medula óssea e outros fibrócitos em circulação) também podem contribuir para a fibrogénese hepática.<sup>144, 145, 146</sup> Outro mecanismo recentemente descrito, designado EMT (*Epithelial Mesenchymal Transition*), envolve a transformação de hepatócitos e células epiteliais biliares em células mesenquimatosas, sendo independente das CEH. Desconhece-se a sua contribuição para a fibrogénese hepática.<sup>147</sup>

Essa ativação das CEH traduz a conversão de uma célula quiescente, que exprime marcadores característicos de adipócitos (PPAR- $\gamma$ , SREBP-1c e leptina), numa célula proliferativa, fibrogénica e contráctil, exprimindo marcadores miogénicos ( $\alpha$ -actina, c-myb e MEF-2 - *Myocyte Enhancer Factor-2*). De referir que a ativação das CEH representa um contínuo, que depende do tipo de agressão hepática, e das respostas inflamatórias desencadeadas.<sup>121, 142</sup>

### 3.4.3.3. Resolução da Fibrose Hepática

Cada vez mais, o conceito de irreversibilidade da fibrose é posto em causa, com descrições da regressão da fibrose após a retirada da sua etiologia;<sup>148</sup> nomeadamente após o atingimento de resposta virológica sustentada na hepatite C,<sup>149</sup> tratamento prolongado da hepatite B com um análogo dos nucleósidos,<sup>150</sup> e trabalhos experimentais em modelos animais de fibrose hepática provocada por CCl<sub>4</sub> intraperitoneal.<sup>151, 152</sup>

Após a suspensão do estímulo à lesão hepática, pode-se observar uma redução em 50% do número de CEH ativadas em apenas 72 horas, pela ausência de  $\alpha$ -actina; o número de CEH visíveis diminui rapidamente até ao 7º dia, mantendo-se essa tendência decrescente até ao 28º dia. Para além disso, verifica-se um aumento da atividade das MMP's, coincidindo com uma rápida e significativa diminuição da expressão de TIMP-1, TIMP-2 e procolagénio tipo I.<sup>151</sup>

As células de Kupffer, antes promotoras de inflamação e fibrose, desempenham agora um papel essencial na recuperação hepática após a retirada da causa da lesão; iniciam a produção de MMP-13<sup>153</sup> e frenam a atividade das CEH.<sup>154</sup>

Os produtos da degradação do colagénio (cadeias  $\alpha$ ), são rapidamente removidas através de um recetor de manose das células endoteliais dos sinusoides e transportadas para a circulação.<sup>155</sup>

Verificou-se, pois, que é possível uma fase de resolução ou regressão da fibrose hepática. Neste quadro, o passo mais importante é a apoptose das CEH.<sup>156</sup>

Esta pode ser induzida por diferentes mecanismos, sendo um dos mais importantes a atividade das células NK, potenciadas pelos interferão- $\alpha$ , interferão- $\beta$



e interferão- $\gamma$ .<sup>157, 158</sup> É de salientar que cerca de 30-50% da população linfocitária do fígado apresenta o fenótipo NK, pelo que esta será uma via certamente importante para a regulação da atividade das CEH.<sup>158, 159</sup> Experimentalmente, a administração de álcool aumenta consideravelmente a resistência das CEH à apoptose pela via das células NK/interferão- $\gamma$ .<sup>160, 161</sup>

Outros fatores indutores da apoptose das CEH são: o NGF (*Nerve Growth Factor*) produzido pelos hepatócitos em situação de stress,<sup>162</sup> as células de Kupffer,<sup>154</sup> e a estimulação dos recetores de canabinoides CB2 presentes nas CEH ativadas.<sup>163, 164</sup> O aumento da produção de HGF (*Hepatocyte Growth Factor*) promove também a resolução da fibrose, através da supressão do estímulo fibrogénico do TGF- $\beta$ .<sup>165</sup>

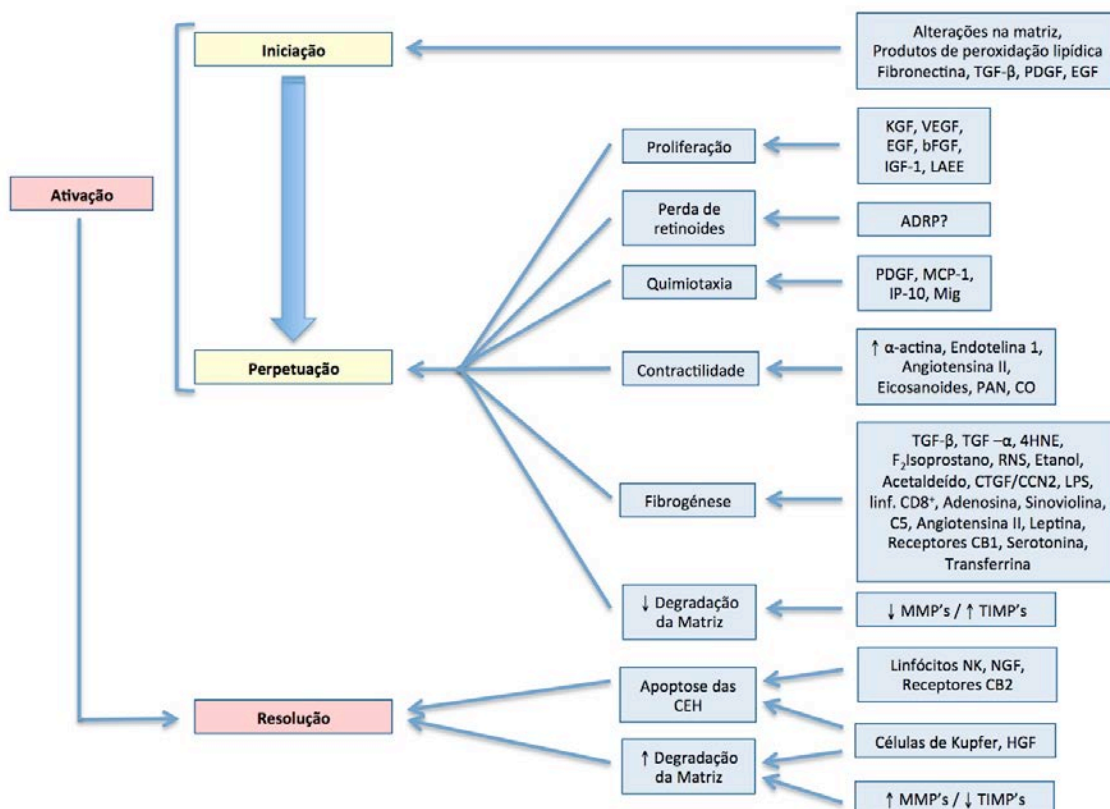


Figura 4. Ativação das células estreladas hepáticas (CEH). EGF - *Epithelial Growth Factor*; PDGF - *Platelet Derived Growth Factor*; KGF - *Keratinocyte Growth Factor*; VEGF - *Vascular Endothelial Growth Factor*; bFGF - *Basic Fibroblast Growth Factor*; ADRP - *Adipose Differentiation-Related Protein*; LAEE - *Éster Etilico do Ácido Linolénico*; MCP-1 - Proteína Quimiotática dos Monócitos; Mig - *Monokine Activated by Interferon  $\gamma$* ; PAN - Péptido Auricular Natriurético; CO - Monóxido de Carbono; RNS - *Reactive Nitrogen Species*; CTGF/CCN2 - *Connective Tissue Growth Factor*; LPS - Lipopolissacarídeos; C5 - Fator C5 do Complemento; Recetores CB - Recetores CB dos endocanabinóides; MMP - Metaloproteinases da Matriz; TIMP - Inibidores Teciduais das Metaloproteinases; NGF - *Nerve Growth Factor*; HGF - *Hepatocyte Growth Factor*.

---

*Capítulo 4.*

*Metabolismo do Ferro e  
Doença Hepática  
Alcoólica*

---



---

## 4. Metabolismo do Ferro e Doença Hepática Alcoólica

### 4.1. Introdução

O ferro é um micronutriente essencial ao metabolismo humano, devido à capacidade para facilmente aceitar e doar eletrões, permutando entre a forma férrica ( $\text{Fe}^{3+}$ ) e a ferrosa ( $\text{Fe}^{2+}$ ). Esta propriedade torna-o fundamental para integrar moléculas como os citocromos, os transportadores de  $\text{O}_2$  (hemoglobina e mioglobina), e muitas enzimas, envolvidas no metabolismo oxidativo de respostas imunes. Contudo, a grande reatividade do ferro torna-o especialmente agressivo para os tecidos. Dada esta dualidade, igualmente essencial e tóxico, a homeostasia do ferro requer uma regulação extremamente minuciosa.<sup>166, 167, 168, 169, 170</sup>

Uma forma de o organismo se proteger desta reatividade do ferro é a forma de transporte e armazenamento do mesmo, que normalmente ocorre sempre associado a proteínas, e nunca na sua forma livre. Na circulação, o ferro encontra-se ligado à transferrina (Tf), que é a principal molécula responsável pelo transporte do ferro no organismo.<sup>170</sup>

Uma pequena parte liga-se à lactoferrina, que é uma proteína quelante do ferro presente na maioria das secreções exócrinas e libertada pelos neutrófilos polimorfonucleares em situações de inflamação; é estruturalmente muito semelhante à transferrina, mas distingue-se por não se dissociar facilmente do ferro em meios ácidos, como são as zonas infetadas ou hipóxicas. Discute-se até a sua utilidade

como biomarcador de inflamação, nomeadamente na doença inflamatória intestinal, pancreatite e peritonite bacteriana espontânea.<sup>171, 172</sup>

Os isótopos de ferro normalmente presentes no organismo humano são o <sup>56</sup>Fe e o <sup>54</sup>Fe, numa relação que não é exatamente aquela presente nos alimentos. O significado desta diferença é incerto.<sup>173</sup>

Um homem adulto tem normalmente cerca de 35 a 50 mg de ferro por cada quilograma de peso corporal. As mulheres pré-menopausicas têm geralmente depósitos de ferro inferiores, devido às perdas regulares nos ciclos menstruais. A grande maioria do ferro corporal encontra-se incorporado na hemoglobina, quer na medula óssea, quer no sangue periférico, representando em média cerca de 2200 mg no total. A mioglobina muscular corresponde a cerca de 300 mg de ferro, o sistema retículo-endotelial contém 600 mg, o parênquima hepático cerca de 1000 mg. Em circulação, encontra-se normalmente menos de 3 mg de ferro livre.<sup>167</sup>

A dieta normal contém cerca de 10 a 20 mg por dia, provindo 43% de cereais, 22% de carne e peixe, 20% de vegetais e leguminosas, 3% de ovos, 3% de fruta, restando 9% de outras fontes alimentares variadas.<sup>174</sup>

Destes, são normalmente absorvidos 1 a 2 mg no intestino delgado proximal, correspondendo à perda diária normal, que ocorre fundamentalmente pela descamação passiva da mucosa gastrointestinal e do epitélio uro-genital.<sup>31</sup> Não existe, portanto, qualquer mecanismo ativo no homem para a excreção de ferro, mas a absorção intestinal pode aumentar em resposta a requerimentos aumentados de ferro, como no crescimento, gravidez ou perda de sangue.<sup>170</sup>

As maiores necessidades de ferro por parte do organismo são devidas à eritropoiese; cerca de 10<sup>11</sup> glóbulos vermelhos são renovados diariamente, o que corresponde a cerca de 20 a 30 mg de ferro. Como vimos, a absorção diária é muito

inferior, pelo que as necessidades diárias de ferro da medula óssea são supridas por um eficaz mecanismo de reaproveitamento dos constituintes dos glóbulos vermelhos senescentes, em que o sistema retículo-endotelial desempenha um papel importante.<sup>166, 175, 176</sup>





## 4.2. Mecanismos de Lesão Tecidual pelo Ferro

A necessidade absoluta do organismo conter o mínimo possível de ferro livre deve-se à facilidade com que este participa e perpetua reações de formação de radicais livres. A nível bioquímico, as mais conhecidas são a reação de Fenton:  $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \text{OH}^*$ , que pode também originar:  $\text{Fe}^{3+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{2+} + \text{OOH}^* + \text{H}^+$ ; e o ciclo de Haber-Weiss:  $\text{HO}^* + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2^{*-} + \text{H}^+$  e  $\text{O}_2^{*-} + \text{H}^+ + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + \text{HO}^* + \text{H}_2\text{O}$ , que é catalisado pelo ferro. Esta contínua formação de radicais livres leva a reações de peroxidação, que, como já vimos, facilmente atacam as membranas celulares, proteínas e ADN, para além de causarem a depleção intracelular das defesas antioxidantes, e interferirem com várias vias de sinalização, envolvidas na sobrevivência, proliferação e morte celular.<sup>177, 178, 179, 180</sup>

Para além do ADN nuclear, alterações do metabolismo do ferro (neste caso quer o excesso, quer a deficiência) foram associadas a disfunção mitocondrial e alterações a nível do ADN destes organelos.<sup>181</sup>

Trabalhos experimentais em modelos humanos de sobrecarga hepática de ferro (doentes com hemocromatose hereditária) evidenciaram desde logo o aumento do stress oxidativo, com formação de adutos MDA-proteínas, proteínas séricas modificadas por oxidação e formação de uma resposta imune contra os epitopos MDA-lisina, que poderão ser também fatores etiopatogénicos na esteatohepatite alcoólica. Havia também um aumento associado da expressão de TGF- $\beta$ 1. Quer os marcadores de stress oxidativo, quer o TGF- $\beta$ 1 diminuía após o início do tratamento com flebotomias e depleção de ferro.<sup>182</sup>

Foi ainda demonstrada a existência de recetores de transferrina na membrana celular das CEH, que quando ativados induzem a transcrição de  $\alpha$ -actina e pro-colagénio tipo I, podendo deste modo o excesso de ferro ter um efeito direto na fibrogénese hepática.<sup>183, 184, 185</sup>

As células de Kupffer podem também responder diretamente ao excesso de ferro. A exposição destes macrófagos ao ferro livre provoca um aumento na transcrição de TNF- $\alpha$ , aparentemente por ativação direta do NF- $\kappa$ B.<sup>186, 187, 188</sup>

No que respeita aos hepatócitos, a presença de ferro parece exacerbar a produção de ROS pelo CYP2E1, via que, como vimos, aumenta a sua atividade na metabolização do álcool aquando de consumos excessivos e crónicos.<sup>189</sup>

Os efeitos deletérios do ferro nos tecidos são evidentes pela sua associação à carcinogénese, que pode ocorrer quer na iniciação, pelos efeitos mutagénicos dos ROS no ADN, e pelos efeitos diretos na desregulação do ciclo celular através do aumento de expressão da ciclina D1; quer na promoção, por facilitar o crescimento das células neoplásicas e possivelmente por alterar as respostas imunes.<sup>190, 191</sup> Está também bem estabelecida a associação entre a intensidade e duração da sobrecarga de ferro hepática e o risco de carcinoma hepatocelular. O risco desta neoplasia é superior na hemocromatose hereditária comparativamente com outras doenças crónicas do fígado e parece estar relacionado sobretudo com mutações no gene p53; neste caso, está mesmo descrito o seu desenvolvimento em fígados não cirróticos.<sup>192, 193</sup>

A elevação da saturação da transferrina plasmática, presente em 2% da população norte-americana, correlaciona-se com um risco aumentado de todas as causas de mortalidade.<sup>194</sup>

Como é evidente, o fígado, responsável pela maior parte das reservas de ferro do organismo, é dos órgãos com lesões mais graves e precoces em situações de sobrecarga de ferro.<sup>195</sup> Mesmo em intoxicações agudas com suplementos orais de ferro, foram relatados quadros de citólise e insuficiência hepática.<sup>196</sup>

A importância da sobrecarga de ferro na doença hepática é bem evidente em trabalhos relatando que doentes transplantados com um índice de ferro hepático (descrito mais à frente) superior a 1,9 apresentavam uma mortalidade mais elevada,<sup>197</sup> e que o nível de ferritina sérica era fator preditivo de mortalidade em doentes em lista de transplante hepático.<sup>198</sup>



### 4.3. Absorção Intestinal do Ferro

A dieta ocidental típica contém cerca de 10% do ferro ligado ao heme e 90% na forma iónica  $\text{Fe}^{3+}$ , independente do heme. <sup>199</sup>

O local onde se dá a maior parte da absorção de ferro é o duodeno. Nos enterócitos duodenais, o  $\text{Fe}^{3+}$  é reduzido a  $\text{Fe}^{2+}$  por uma redutase férrica situada na bordadura em escova. Esta pertence à família dos citocromos (citocromo B duodenal ou DcytB) e usa o ácido ascórbico como coenzima. É transportado em seguida para o interior do enterócito, através de um transportador de metais bivalentes, denominado DMT1, que também transporta outros metais como o zinco, cobre e cobalto, através de um mecanismo de bomba de prótons. Esta forma de absorção de ferro é bastante diminuída pela toma de tetraciclinas, inibidores da bomba de prótons, antiácidos, fitatos, compostos fenólicos e infeção por *Helicobacter pylori*. <sup>170, 199, 200, 201, 202, 203</sup>

Já o ferro ligado ao heme é absorvido para o enterócito através de uma proteína transportadora do heme (HCP-1), ainda não completamente caracterizada, sendo depois o  $\text{Fe}^{2+}$  removido pela enzima hemeoxigenase-1, e posteriormente o seu transporte dentro do enterócito efetuado a partir daqui por uma via comum. <sup>170, 199, 203, 204, 205</sup> É ainda incerto se alguma quantidade de heme pode atravessar diretamente o enterócito, através de um exportador de heme, sendo então transportado por uma proteína denominada hemopexina e degradado no fígado. <sup>206</sup>

Poderá existir ainda uma terceira via de admissão do ferro ao interior do enterócito, mediada pela lipocalina-2, proteína que faz parte da imunidade inata nos

mecanismos de sequestro de ferro aos microrganismos patogénicos, mas cujo papel fisiológico no intestino está ainda por esclarecer. <sup>168, 207, 208</sup>

O  $\text{Fe}^{2+}$ , situado agora no citoplasma do enterócito, pode ser armazenado na forma de ferritina e nunca ser absorvido, sendo eliminado com a descamação celular, ou então ser transportado através da membrana basolateral, consoante as necessidades de ferro do organismo. Este transporte é efetuado através da proteína IREG-1 ou ferroportina 1 (FPN-1), que é o único exportador celular de ferro identificado até à data. A FPN-1 encontra-se também nos macrófagos, hepatócitos e no trofoblasto da placenta. <sup>168, 203, 209, 210</sup> Existem, contudo, duas isoformas de ferroportina, sendo a mais abundante nos enterócitos a FPN-1B, cujo gene não tem um elemento de resposta ao ferro que inibe a sua transcrição, enquanto que a FPN-1A, presente nos outros tecidos, contém esse elemento. <sup>211</sup>

Apesar de tudo, é ainda desconhecida em pormenor a estrutura da ferroportina, ou mesmo o modo pelo qual ela é capaz de transportar o ferro através da membrana citoplasmática. <sup>212, 213</sup>

Após o transporte, o  $\text{Fe}^{2+}$  é imediatamente oxidado a  $\text{Fe}^{3+}$  na superfície da membrana celular por uma enzima semelhante à ceruloplasmina plasmática, designada hefastina. O  $\text{Fe}^{3+}$  liga-se então à transferrina plasmática, que tem capacidade de transportar duas moléculas de ferro. <sup>168</sup>

A figura 5 esquematiza o processo atrás descrito.

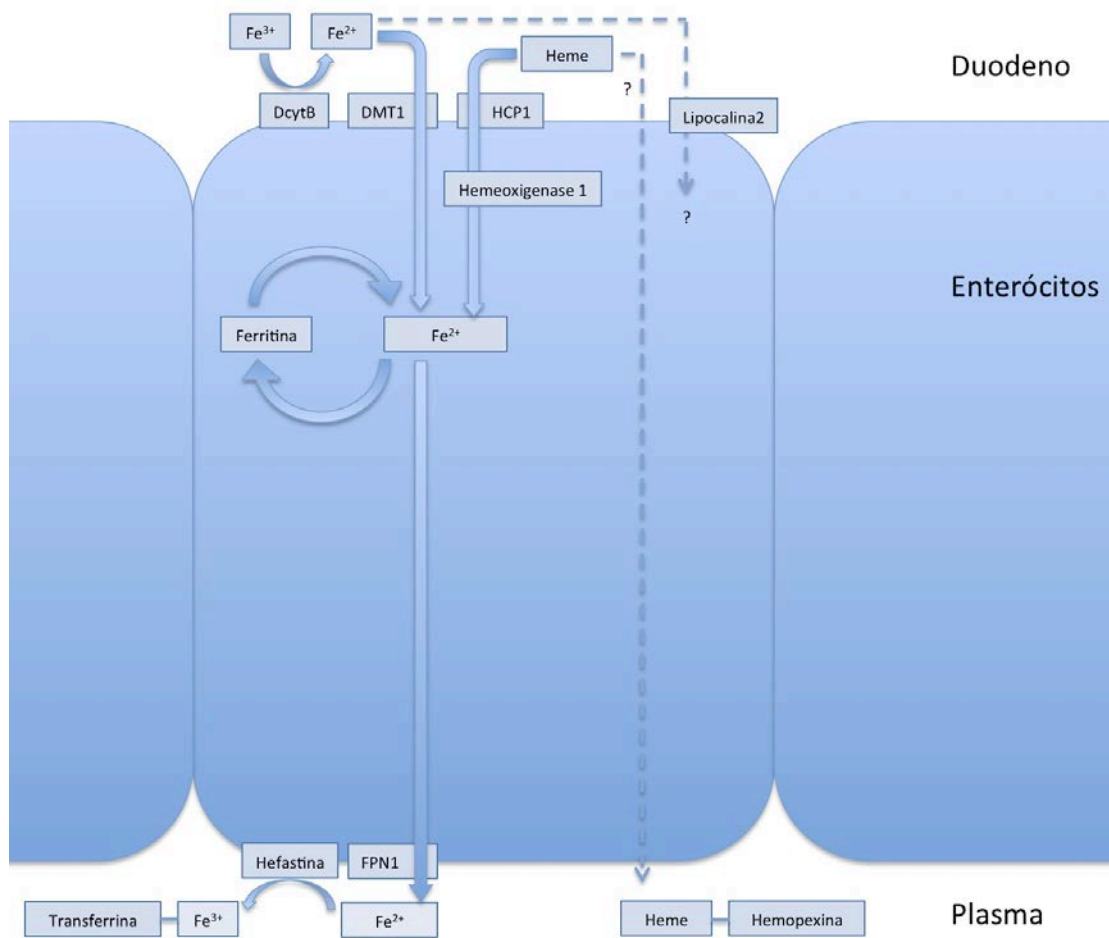


Figura 5. Transporte intestinal do ferro. DcytB - Citocromo B Duodenal; DMT1 -Transportador de Metais Bivalentes; HCP-1 - Proteína Transportadora do Heme; FPN-1- Ferroportina 1.





#### 4.4. Transporte e distribuição do ferro

A transferrina, uma proteína de 65000 kDa, pertence à classe das IGFBP-3 (*Insulin-like Growth Factor Binding Protein 3*). O seu gene encontra-se no cromossoma 3q21-q25.<sup>177</sup>

Ela é ativamente segregada pelos hepatócitos, sendo estas as células do organismo com expressão mais forte desta proteína. Para além destes, é também produzida na barreira hemato-testicular, células de Sertoli e na barreira hemato-encefálica.<sup>214</sup>

A ligação à transferrina sérica permite o transporte do ferro em circulação, de uma forma solúvel, ao mesmo tempo que impede que circule na sua forma livre, com as consequências atrás descritas. A molécula de transferrina é semelhante em todos os mamíferos, e é constituída por dois local de fixação do ferro, cada um capaz de ligar um átomo de  $Fe^{3+}$ . Conforme o número de locais de ligação ocupados, denomina-se apotransferrina (nenhum local), transferrina monoférrica (um) ou transferrina diférrica (dois).<sup>168, 203</sup>

Em condições fisiológicas normais, apenas 30-40% dos locais de fixação da transferrina se encontram ocupados, traduzindo uma taxa de saturação da transferrina normal. A passagem do ferro para os tecidos (células eritroides, do sistema imunitário e hepatócitos) é mediada pela expressão dos recetores da transferrina (TfR), que permitem a endocitose e o transporte deste metal em vesículas endossómicas.<sup>199</sup>

O recetor clássico da transferrina é o TfR-1, encontrando-se em maior quantidade nas células em rápida divisão, linfócitos ativados e precursores eritroides.<sup>214</sup>

A transferrina diférrica é a que se liga com maior afinidade ao TfR-1; após esta conexão, inicia-se então um processo de endocitose mediada por recetores, formando um endossoma revestido por clatrina, designado por siderosoma.<sup>199</sup>

No interior das células, a clatrina é removida, e os siderosomas são acidificados através de bombas de prótons mediadas por uma família de proteínas STEAP (*Six Transmembrane Epithelial Antigen of the Prostate*), provocando alterações na conformação quer da transferrina, quer do TfR-1, e promovendo a libertação do ferro ligado à transferrina, que é facilitada pelo pH ácido. A STEAP3 desempenha funções de redutase férrica, reduzindo o  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$ , que é então substrato para ser transportado para o citoplasma por uma DMT-1, num mecanismo similar ao da entrada para os enterócitos, auxiliada pelo baixo pH entretanto gerado no siderosoma.<sup>214</sup> A transferrina é entretanto reciclada e devolvida ao plasma.<sup>170</sup>

A grande maioria do ferro transportado deste modo tem como destino as células precursoras eritroides, onde é fundamental para a síntese do heme. Para esta síntese ser efetuada, o  $\text{Fe}^{2+}$  tem mais uma vez de atravessar uma membrana, desta vez a mitocondrial, para ser adicionado à protoporfirina IX pela ferroquelatase. Este transporte é efetuado através de uma proteína da membrana mitocondrial designada mitoferrina.<sup>214</sup>

Recentemente, foram também identificadas proteínas exportadoras do heme nos eritroblastos, quer da mitocôndria para o citoplasma (Abcb6), quer do citoplasma para a circulação (FLVCR, Bcrp/Abcg2), que parecem essenciais para a

eritropoiese, dado que a acumulação do heme em excesso é tóxica para a célula (figura 6).<sup>168, 209</sup>

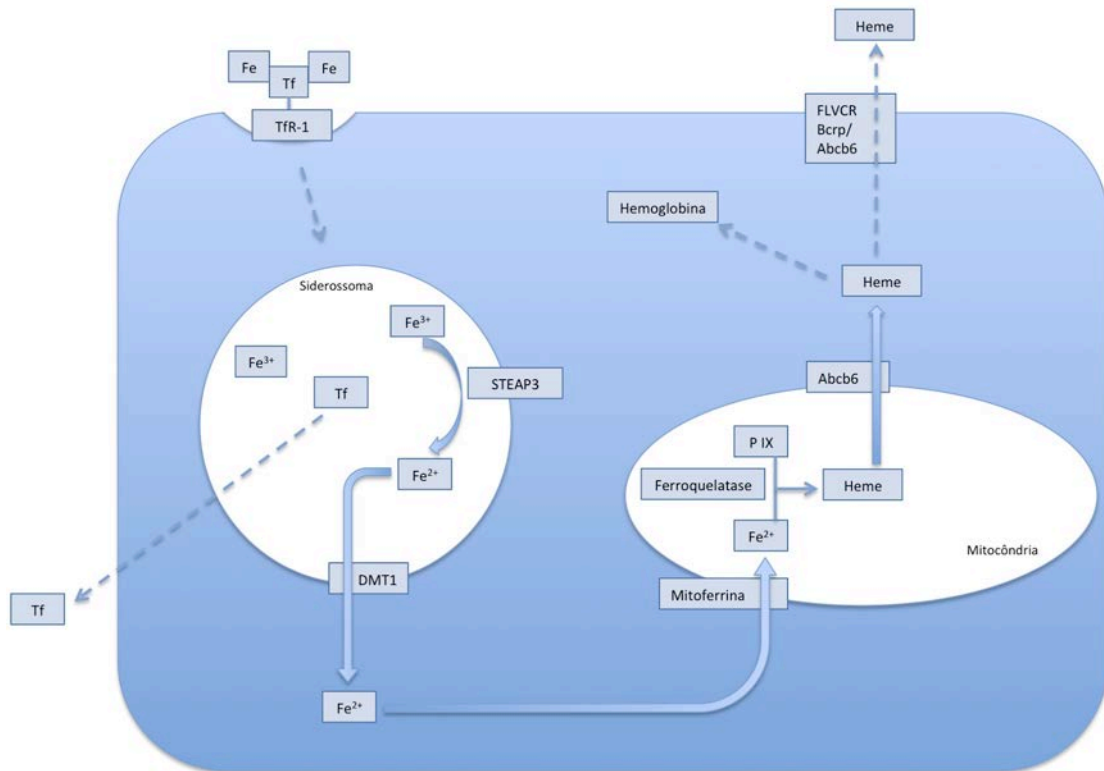


Figura 6. Utilização do ferro nos precursores eritroides. Tf - Transferrina; DMT1 -Transportador de Metais Bivalentes; P IX - Protoporfirina IX.

Como referimos atrás, os 20-30 mg de ferro necessários diariamente para a biossíntese do heme são provenientes da reciclagem efetuada pelas células do sistema retículo-endotelial, mais particularmente os macrófagos. Estes fagocitam os glóbulos vermelhos senescentes, e o heme é metabolizado nas vesículas fagocíticas pela hemoxygenase, libertando o  $Fe^{2+}$ . Este é transportado dessas vesículas para o citoplasma pela NRAMP-1 (*Natural Resistance-Associated Macrophage Protein-1*), proteína com funções muito similares à DMT-1.<sup>215</sup> Do citoplasma dos macrófagos, o  $Fe^{2+}$  é transportado para o plasma pela ferroportina-1, e novamente ligado à

transferrina, após sofrer oxidação a  $\text{Fe}^{3+}$  pela ceruloplasmina sérica; novamente um processo semelhante aquele que se passa no enterócito (figura 7).<sup>199, 209</sup>

Ligado à transferrina, o ferro fica então disponível para novo ciclo de transporte para outras células, nomeadamente para a eritropoiese, ou então para ser armazenado, através dos processos biológicos que vão ser discutidos a seguir.

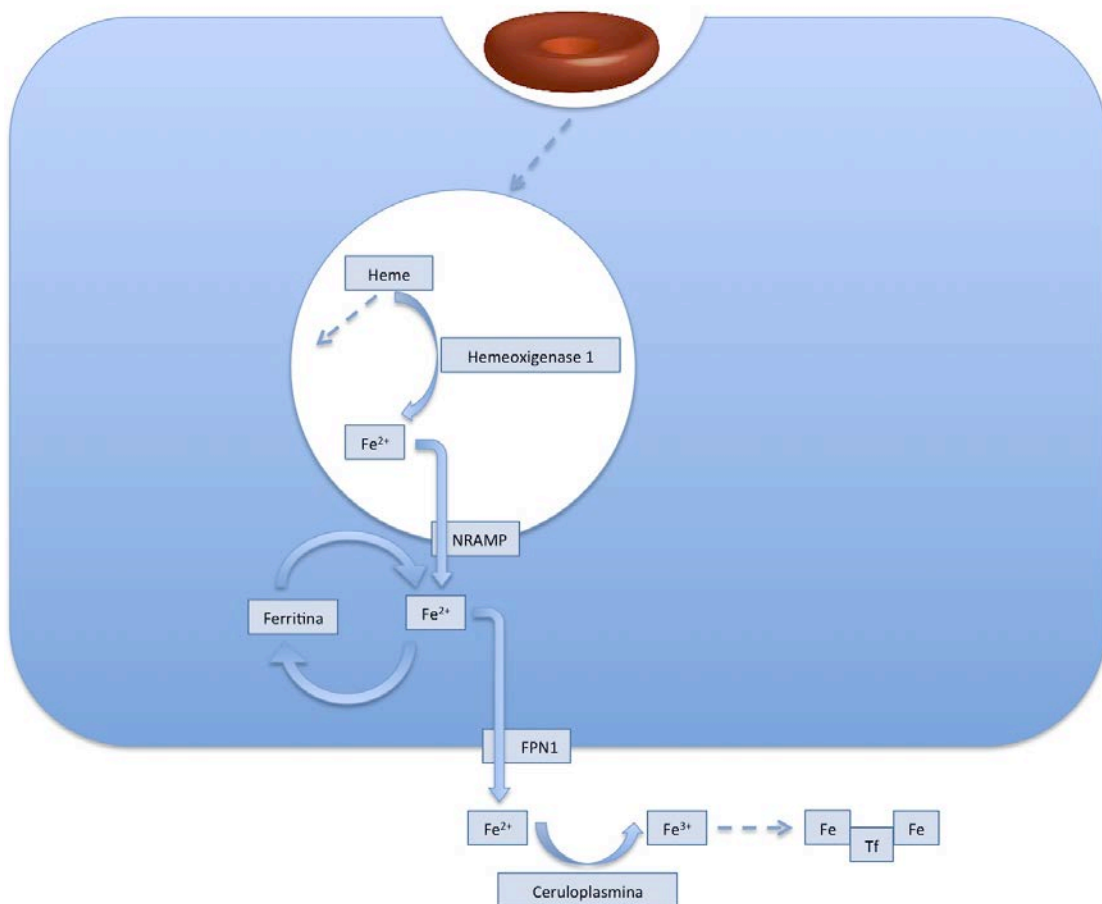


Figura 7. Fagocitose dos eritrócitos senescentes pelas células do sistema retículo-endotelial e reutilização do ferro a partir do heme. NRAMP - *Natural Resistance-Associated Macrophage Protein-1*; FPN1 - Ferroportina -1.

## 4.5. Armazenamento de Ferro

Quando o seu destino não é a utilização para a síntese do heme ou outros compostos dependentes do ferro, este deve ser armazenado numa forma estável e não reativa. Os dois principais locais de armazenamento são o fígado e o sistema reticulo-endotelial, e as duas principais formas nas quais o ferro é armazenado são a ferritina e a hemosiderina.<sup>214</sup>

A ferritina tem homólogos em todos os organismos vivos, exceto os fungos. A sua estrutura foi caracterizada pela primeira vez em 1967, tendo sido descrita como um heteropolímero de 24 subunidades (H ou L), capaz de armazenar 4500 átomos de ferro.<sup>216</sup>

Diferentes combinações dessas subunidades podem resultar em isoformas diferentes da ferritina, com funcionalidades distintas; a formação destas isoformas pode depender do tipo de célula, da fase do ciclo celular em que se encontra, e se há ou não uma doença inflamatória concomitante.<sup>217</sup>

Apresenta uma dupla função - de proteção celular, ao sequestrar o ferro numa forma inerte, e de armazenamento, podendo ser rapidamente mobilizado em períodos de carência. A captação do ferro pela ferritina envolve um processo enzimático de oxidação do  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$  pelas subunidades H seguido da sua migração para um núcleo no interior da molécula.<sup>218, 219</sup> Este processo parece ser auxiliado por uma proteína "dama de companhia" do ferro, presente no citoplasma, e designada por PCBP1.<sup>220</sup>

Essas subunidades H são cruciais à função e constituição da ferritina, uma vez que a sua ausência impede a formação de depósitos intracelulares de ferro, com a conseqüente maior exposição dos tecidos ao ferro livre.<sup>221</sup>

A maioria dos depósitos de ferritina encontra-se no fígado, baço e medula óssea.<sup>170</sup>

A maior parte da ferritina fica armazenada nas células, mas uma pequena parte é glicosilada e libertada na circulação; apesar de terem sido caracterizados recetores de ferritina nos linfócitos B, fígado e rins, o papel fisiológico da ferritina sérica não está bem esclarecido,<sup>214, 222, 223</sup> apesar de poder desempenhar também um papel de transporte, especialmente para o sistema nervoso central.<sup>224</sup>

A utilidade clínica do seu doseamento baseia-se no facto de estar correlacionada com as reservas corporais de ferro. Continua a ser o meio mais prático e rotineiro para as avaliar; contudo há que ter em conta que outros fatores podem influenciar os níveis séricos de ferritina, especialmente com elevações ligeiras a moderadas, como a inflamação crónica, a doença hepática crónica e neoplasias. Valores superiores a 5000 µg/L correspondem quase sempre a quadros de hemocromatose.<sup>170</sup>

É necessário sempre correlacionar o valor da ferritina com o da saturação da transferrina: a ferritina sérica pode estar aumentada por aumento da sua síntese, ou por libertação de ferritina por células destruídas, sendo que, nestas situações, não existe verdadeiramente sobrecarga tecidual de ferro. Aliás, há que ter em consideração que 90% dos doentes observados na prática clínica com aumento da ferritina sérica não apresentam essa sobrecarga.<sup>225</sup>

A hemosiderina resulta da degradação lisossómica da ferritina, sendo uma agregado heterogéneo de ferro, componentes lisossómicos e outros produtos da

degradação intracelular.<sup>226</sup> A hemosiderina representa uma pequena fração das reservas corporais de ferro, mas que pode aumentar bastante em situações de sobrecarga deste metal.<sup>168</sup>





## 4.6. Metabolismo Hepático do Ferro

O fígado desempenha um papel central no metabolismo do ferro, sendo que, dos habituais depósitos de ferro no corpo humano, 60% encontram-se neste local. Após o sistema reticulo-endotelial, é o segundo órgão responsável pela reciclagem do ferro, contribuindo com cerca de 8% do ferro plasmático ligado à transferrina. Os hepatócitos exprimem praticamente todas as proteínas envolvidas nesse metabolismo, provenientes de todos os genes que foram associados a doenças hereditárias envolvendo o ferro. É também um dos órgãos mais afectados por quadros de sobrecarga desse elemento.<sup>31, 227</sup>

O ferro é armazenado como ferritina e hemosiderina; para além destas formas clássicas, os hepatócitos contêm uma pequena quantidade no citoplasma na forma livre - LIP (*Labile Iron Pool*), que desempenha funções no metabolismo intracelular, nomeadamente em reações de oxidação / redução, proliferação e sinalização celular. A maioria do LIP encontra-se na forma férrica, ligado a citrato ou a adenosina difosfato (ADP), enquanto uma pequena parte encontra-se livre, na forma ferrosa.<sup>170</sup>

No que diz respeito ao ferro ligado à transferrina, existem três vias para a sua entrada no hepatócito:<sup>170</sup>

- A **via clássica**, mediada pelo Tfr1, em que há lugar à endocitose mediada por recetor, num processo em tudo semelhante ao descrito para os precursores eritoides;<sup>170</sup>

- Uma **via mediada pelo Tfr2**, que se exprime fundamentalmente no fígado; não são conhecidos tantos detalhes, mas pensa-se que envolve também

fenómenos de endocitose mediada pelo recetor e reciclagem da transferrina;<sup>170</sup> curiosamente, os hepatócitos exprimem dez vezes mais ARNm do TfR2 do que de TfR1 e este apresenta dos mais baixos níveis de expressão comparativamente com outros tecidos.<sup>228</sup>

- **Outra via** da qual não são conhecidos praticamente nenhuns detalhes, mas que foi já provada a sua existência, e que não envolve recetores da transferrina, nem a reciclagem desta.<sup>229</sup>

Ao contrário do TfR1, o TfR2 não é regulado pelo ferro sérico, mas antes pela saturação da transferrina, que aumenta a sua expressão em quadros de sobrecarga de ferro.<sup>170, 230, 231</sup> Aquando de situações de excesso de ferro, a expressão do TfR1 é severamente diminuída. Para além disso, o TfR2 tem uma afinidade 30 vezes inferior ao TfR1 para a transferrina diférrica, mas tem uma maior capacidade de transporte desta para dentro do hepatócito.<sup>201</sup> No entanto, em condições normais, não é responsável por mais de 20% do transporte total de ferro ligado à transferrina.<sup>232</sup>

Em ambos os casos, parece ser fundamental a formação de um complexo entre os TfR, a proteína HFE e a transferrina, para a internalização do mesmo.<sup>233</sup> Os hepatócitos são das células que mais fortemente expressam o ARNm da HFE.<sup>228</sup>

Para além do ferro ligado à transferrina, em condições de sobrecarga, os hepatócitos são também capazes de captar ferro não ligado ao seu transportador.<sup>234, 235</sup> Neste último caso, o ferro livre é captado pela DMT-1 na membrana celular do hepatócito,<sup>170</sup> e por uma outra proteína denominada ZIP14 (*Zrt-like, Irt-like Protein 14*), membro da família de transportadores de zinco, que é capaz de transportar também ferro. A sua expressão é aumentada pela IL-6.<sup>236, 237</sup>

Os canais de cálcio tipo L poderão também contribuir para o transporte de ferro ferroso para dentro do hepatócito; é certo que o fazem nos cardiomiócitos em situações de sobrecarga de ferro, no fígado o seu papel está ainda por esclarecer.<sup>227</sup>

O fígado é ainda capaz de captar ferro a partir da ferritina sérica, da lactoferrina, de complexos de hemoglobina-haptoglobina e de heme-hemopexina.

199, 227

O único processo de saída do ferro dos hepatócitos é mediado pela ferroportina / ceruloplasmina, como descrito atrás para os macrófagos (figura 8).<sup>199</sup>

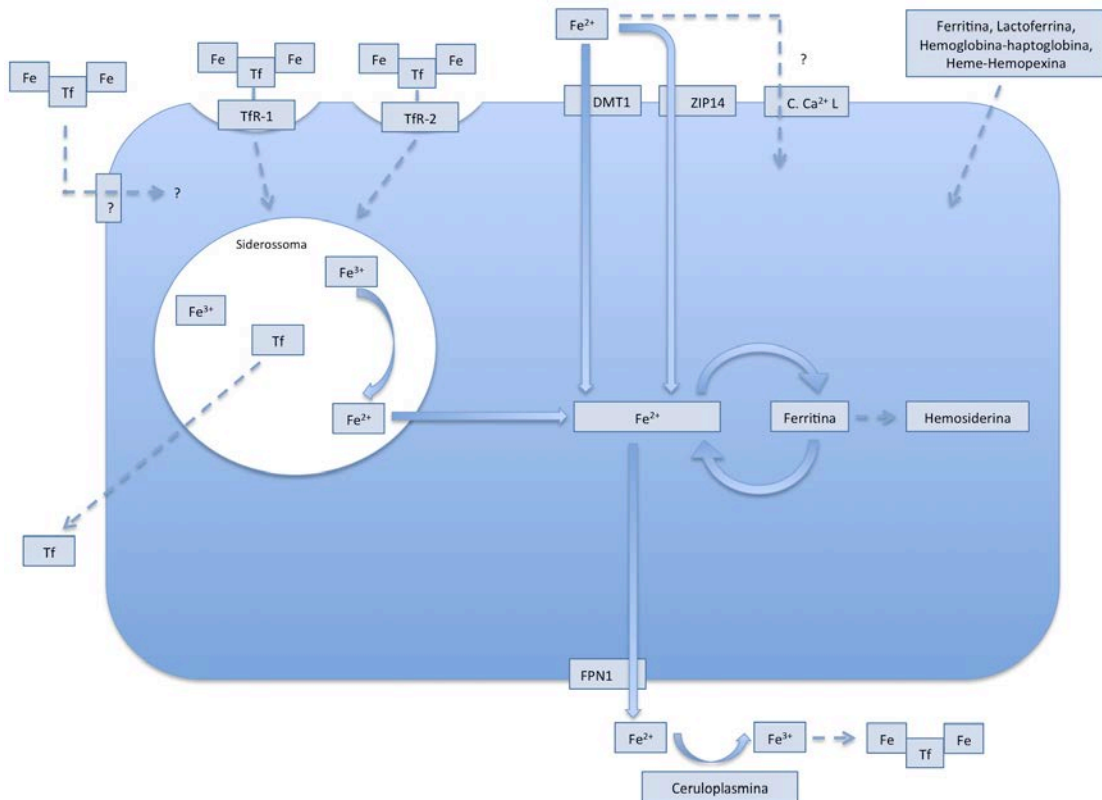


Figura 8. Metabolismo do ferro no hepatócito. DMT1 - Transportador de Metais Bivalentes; ZIP14 - *Zrt-like, Irt-like Protein 14*; C. Ca<sup>2+</sup> L - Canais de cálcio tipo L; FPN1 - Ferroportina -1.



## 4.7. Regulação do Metabolismo do Ferro: Modelo de Programação das Criptas Intestinais

Poucos campos da fisiologia humana sofreram um avanço tão grande na última década como a compreensão da regulação do metabolismo do ferro.<sup>214, 238</sup>

Uma vez que não existe qualquer mecanismo ativo no que respeita à sua excreção, o controlo da sua quantidade de ferro no organismo terá forçosamente de passar pela regulação da sua absorção.

A teoria geralmente aceite há pouco mais de uma década atrás (e que pode ainda desempenhar um papel acessório, mas importante, na regulação da absorção do ferro) era o modelo de programação das criptas intestinais.<sup>168, 239</sup>

Este modelo postulava que a regulação da absorção era efetuada nos enterócitos das criptas duodenais, local por excelência de absorção do ferro. Os níveis intracelulares de ferro do enterócito, nomeadamente a ferritina, refletiriam os depósitos de ferro do organismo; de facto, estas células possuem recetores TfR1 e TfR2 na superfície basolateral, permitindo a captação de moléculas de transferrina do plasma.<sup>168, 201</sup>

A proteína HFE, uma molécula do complexo major de histocompatibilidade tipo I, e como veremos, a responsável por alguns quadros de hemocromatose hereditária, associa-se à  $\beta$ 2-microglobulina e ao TfR1, facilitando a internalização da transferrina plasmática num siderosoma.<sup>168</sup> A HFE associa-se também aos TfR2, que, ao contrário dos ubíquos TfR1, se encontram quase exclusivamente nos enterócitos das criptas duodenais, células hematopoiéticas e nos hepatócitos, podendo este complexo representar uma via de sinalização para a quantidade de ferro extracelular.<sup>240, 241</sup> No entanto, este papel não é fundamental

para a homeostasia da absorção do ferro, pois a ablação específica do *HFE* no duodeno de animais de experimentação não parece provocar qualquer anomalia no processo.<sup>242</sup>

Os níveis de ferro intracelular nos enterócitos regulariam assim a interação, no citoplasma, entre proteínas reguladoras do ferro 1 e 2 (IRP - *Iron Regulatory Proteins*) e elementos reguladores do ferro (IRE - *Iron Regulatory Elements*), que atuariam como sensores de ferro e regulariam a transcrição e a estabilidade de vários tipos de ARN mensageiros. Quando os níveis de ferro são baixos, a IRP1 liga-se aos IRE's da TfR1, DMT-1 e ferroportina-1, promovendo a transcrição e tradução desses genes; por outro lado, liga-se também ao IRE da ferritina, bloqueando a transcrição deste gene. Deste modo, em situações de carência de ferro, a expressão das proteínas envolvidas na sua absorção era aumentada, enquanto que a síntese da ferritina era parada.<sup>168, 217, 243, 244, 245, 246</sup>

A anemia causa hipóxia relativa dos tecidos, levando à ativação de fatores de transcrição mediados pela hipóxia (HIF's). O HIF-2 $\alpha$  poderá estar relacionado com a absorção intestinal do ferro, a nível da superfície apical do enterócito, por aumento da transcrição do DMT-1 e do DcytB, podendo este ser outro mecanismo de regulação do enterócito.<sup>247, 248, 249</sup>

Outro alvo de atenção foram os recetores solúveis da transferrina (sTfR), que são resultantes da clivagem dos TfR presentes na membrana celular por uma metaloprotease; verificou-se que, independentemente do nível de reservas corporais, em situações de carência "funcional" de ferro, esta clivagem aumenta, e conseqüentemente também os níveis de sTfR circulantes. Pela sua capacidade de se ligarem à proteína HFE, especulava-se sobre o papel preponderante dos sTfR na regulação da absorção do ferro.<sup>250, 251</sup>

Foi também descrito um efeito de "bloqueio da mucosa", que consiste na capacidade de uma dose inicial de ferro ingerido bloquear a absorção de uma segunda dose dada 2 a 4 horas depois, podendo refletir um mecanismo endocítico dos transportadores de ferro nos enterócitos, destinado a diminuir a absorção intestinal de ferro durante períodos de ingestão abundante deste metal na alimentação.<sup>252</sup>

No entanto, observações posteriores revelaram que o papel principal na regulação da absorção intestinal de ferro era efetuado por uma proteína de síntese hepática, denominada hepcidina.





## 4.8. Regulação do Metabolismo do Ferro: Hepsidina

### 4.8.1. Introdução e Caracterização

Desde os trabalhos de McCance e Widdowson, e Hahn e Whipple na década de 1930, onde se verificou que a absorção intestinal de ferro era regulada, e aumentava em estados de carência deste metal, passando pela demonstração em 1953 por Finch e Saylor que a absorção de ferro era estimulada pela eritropoiese e inibida por transfusões de sangue, que se especulava sobre a forma como esta regulação ocorreria. Beutler, em 1960, formulou a hipótese da existência de um fator humoral que coordenaria a absorção de ferro com as necessidades da eritropoiese, regulando a sincronização do metabolismo do ferro nos diversos órgãos e tecidos. Apesar de há muito ser procurado, só no século XXI foi possível identificar definitivamente esse fator, quase por acaso; os estudos genéticos tinham-se revelado sempre inconclusivos. Em retrospectiva, isto terá ficado a dever-se ao reduzido tamanho do gene, à raridade das suas mutações e à ausência de sequências partilhadas com qualquer outra proteína envolvida no metabolismo do ferro.<sup>253</sup>

Em 2001, Park e colaboradores, do grupo de Tomas Ganz, publicaram um trabalho onde descreviam um péptido rico em cisteína presente em amostras de urina humana, tendo-o já registado na base de dados *Swiss Prot* em 1998, quando o isolaram inadvertidamente, ao tentarem purificar a proteína  $\beta$ -defensina 1. Esse péptido apresentava propriedades antimicrobianas contra a *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Streptococcus* do grupo B. Foram identificadas duas

formas predominantes, uma com 20 e outra com 25 aminoácidos, e traçou-se uma analogia com os péptidos antimicrobianos ricos em cisteína sintetizados pelos insetos. Determinou-se que o fígado era o órgão responsável pela sua síntese e que o gene responsável por essa proteína (*HAMP*) se encontrava no cromossoma 19 (19q13.1), sendo a sua estrutura altamente conservada entre os vertebrados. Dada a sua origem hepática e as suas propriedades antimicrobianas, foi-lhe atribuído o nome de hepcidina (Hepc). A hepcidina é traduzida como um pro-péptido de 84 aminoácidos (pré-pro-hepcidina).<sup>254, 255</sup>

Este péptido de 84 aminoácidos (pré-pro-hepcidina) é convertido noutro de 64 aminoácidos (pro-hepcidina) pela remoção de uma sequência de aminoácidos de sinalização durante a sua passagem para o interior do retículo endoplasmático.<sup>256</sup>

A pro-hepcidina é depois processada por convertases de pro-proteínas, nomeadamente a furina, PC5/6, PC7/LPC e PACE4, transformando-se num péptido de 25 aminoácidos, que é a forma biologicamente ativa.<sup>257, 258, 259, 260</sup>

Krause e colaboradores, no ano de 2000, numa investigação independente, identificaram em ultrafiltrado de sangue humano o mesmo péptido, rico em cisteína, com propriedades antimicrobianas, e designaram-no por LEAP-1 (*Liver-Expressed Antimicrobial Peptide*).<sup>261</sup>

O genoma humano contém apenas uma cópia do gene da hepcidina (*HAMP*), enquanto o do ratinho contém dois (*hepc1* e *hepc2*) que produzem péptidos ligeiramente diferentes. A *hepc1* é similar à humana, enquanto a *hepc2* parece não ter qualquer efeito ao nível do metabolismo do ferro.<sup>262</sup>

Foram já identificados dois polimorfismos do *HAMP*, o c.-153C>T, muito raro, e o c.-582A>G, que pode apresentar uma frequência de 22% na população ocidental.<sup>263</sup>

Usando técnicas de espectroscopia bidimensional com  $^1\text{H}$  NMR, caracterizou-se a estrutura da hepcidina 25; apresenta oito aminoácidos cisteína, com uma estrutura em forma de grampo, formando uma folha  $\beta$  distorcida com uma ansa. Quatro pontes dissulfureto entre as cisteínas estabilizam os dois ramos antiparalelos. A ponte disulfureto situada na crossa da ansa é pouco comum, parecendo ser essencial para a função da molécula. A hepcidina 25 tende a agregar-se, enquanto que a hepcidina 20 circula habitualmente em monómeros.<sup>264, 265, 266</sup>

Inicialmente, parecia apenas mais um péptido semelhante às defensinas, mas com a particularidade de ser a única a ser produzida pelo fígado, uma vez que todas as outras defensinas provêm de células epiteliais. Para além disso, era estranho o facto de ser uma proteína com estrutura altamente conservada nas diversas espécies de vertebrados, enquanto que as outras defensinas mostram grande variação.<sup>267</sup>

Rapidamente Christelle Pigeon e colaboradores estabeleceram uma ligação entre a hepcidina e o metabolismo do ferro, reportando um aumento da expressão do gene homólogo da hepcidina humana em ratinhos, aquando de uma sobrecarga experimental de ferro exógeno.<sup>268</sup> A primeira abordagem, contudo, não estaria de todo incorreta, uma vez que a hepcidina provavelmente refletirá uma evolução do sistema de defesas inatas no sentido de impedir que os patógenos usassem o ferro circulante.<sup>269</sup>

Essa ligação foi rapidamente confirmada por outros trabalhos, como a descoberta que ratinhos com um fenótipo (-/-) para o fator de transcrição *USF2* não apresentavam expressão de hepcidina, facto este associado a uma sobrecarga tecidual de ferro acentuada, fazendo lembrar os fenótipos (-/-) para o *HFE*, tendo imediatamente sido levantada a hipótese que a hepcidina poderia regular o

metabolismo do ferro na mesma via;<sup>270, 271</sup> a deleção do fator C/EBP $\alpha$  diminuía a expressão da hepcidina, levando à acumulação de depósitos de ferro;<sup>272</sup> a disrupção intencional do gene *HAMP* causava uma sobrecarga acentuada de ferro;<sup>273</sup> ratinhos transgênicos com uma alteração que leva à sobre-expressão de hepcidina sofriam de uma grave anemia ferripriva;<sup>274</sup> ou ainda a estimulação da transcrição da hepcidina em ratinhos transgênicos revertia o padrão da acumulação intracelular de ferro nos hepatócitos, apesar de serem *HFE* (-/-).<sup>275</sup>

A identificação por Roetto e colaboradores de duas famílias com uma forma rara de hemocromatose juvenil, que tinham em comum elementos homozigóticos para mutações não funcionais da hepcidina, confirmou sem margem para dúvidas que esta desempenhava um papel central na homeostasia do ferro no ser humano.<sup>276</sup>

Estava então estabelecida a relação entre a expressão de hepcidina e os níveis de ferro do organismo; a sobrecarga de ferro era um potente estímulo para a síntese, enquanto que a sua carência diminuía a expressão de hepcidina. Postulou-se assim uma regulação por um mecanismo de *feedback* negativo entre hepcidina e ferro.<sup>277, 278, 279</sup>

Entretanto, a investigação dirigiu-se no sentido de compreender a forma pela qual a hepcidina regula a absorção intestinal de ferro, sendo certo que a inibia de algum modo.<sup>280, 281, 282, 283</sup> A sua quase ausência no período de aleitamento dos mamíferos, explica, por exemplo, a enorme eficiência na absorção de ferro pelo intestino dos recém nascidos.<sup>284</sup>

Começaram a surgir alguns trabalhos em que se demonstrou uma relação entre a hepcidina e a ferroportina, quer a nível do intestino, quer a nível hepático.<sup>285, 286</sup>

A forma de interação entre as duas proteínas foi elucidada num elegante trabalho com uma linha celular de enterócitos, com a ferroportina marcada com uma proteína fluorescente. Verificou-se que a exposição dessas células à hepcidina causava a redistribuição da ferroportina da superfície celular para vesículas intracelulares; essa modificação era causada pela ligação direta da hepcidina à ferroportina e era irreversível, pois com a retirada da hepcidina do meio de cultura, a ferroportina não reaparecia na superfície celular, sofrendo degradação intracelular em lisossomas. A remoção da ferroportina da membrana celular impedia a exportação do ferro, levando à sua acumulação dentro dos enterócitos.<sup>287</sup> A normal conformação do peptídeo N-terminal da hepcidina 25 é crucial para esta interação, o que explica, provavelmente, porque apenas esta forma é biologicamente ativa.<sup>288</sup>

A ferroportina parece ser um dímero, e ambas as subunidades devem ligar-se à hepcidina; após esta ligação, dá-se a fosforilação da ferroportina através da ativação da JAK2, que inicia o processo de internalização.<sup>289</sup> Este local de ligação da ferroportina à hepcidina é altamente conservado entre os animais vertebrados, traduzindo a sua importância para o normal funcionamento da homeostasia do ferro.<sup>290</sup>

Curiosamente, a presença da subunidade H da ferritina parece ser crucial para esta interação, pois, em modelos experimentais, a ausência de ferritina H condicionava uma absorção aumentada de ferro, com sobrecarga hepática, apesar de níveis séricos apropriadamente altos de hepcidina.<sup>291, 292</sup>

Foi entretanto confirmado que a deficiência de hepcidina aumentava a quantidade de ferroportina, não só a nível duodenal, como também no baço e no fígado.<sup>293</sup>

Existem também algumas descrições onde a hepcidina inibiria a captação apical do ferro pelo enterócito, por diminuição do ARNm da DMT-1,<sup>294, 295, 296</sup> mas o seu significado *in vivo* está por esclarecer.

Nas outras células que expressam a ferroportina-1 (hepatócitos,<sup>297</sup> células do sistema retículo-endotelial, especialmente no baço e células de Kupffer no fígado<sup>298</sup> e também cardiomiócitos<sup>299</sup>), a regulação do transporte do ferro para fora da célula é efetuado da mesma forma pela hepcidina, que induz a fosforilação da ferroportina (mediada pela Jak-2), a internalização em vesículas e ubiquitinação para posterior degradação.<sup>233, 300, 301, 302, 303</sup> Um exemplo desse mecanismo de ação é o aumento paradoxal das reservas esplênicas de ferro em consequência dos níveis aumentados de hepcidina num modelo animal de sobrecarga secundária de ferro, quadro que é revertido com flebotomias.<sup>304</sup>

A rapidez de resposta à hepcidina parece ser dependente do tipo celular; as primeiras células a internalizar a ferroportina da membrana citoplasmática são os macrófagos,<sup>305</sup> e nestes a hepcidina pode mesmo regular a transcrição de ARNm da ferroportina, diminuindo-a, ao contrário do que acontece nos enterócitos.<sup>306</sup> A distribuição da ferroportina nas membranas celulares dos macrófagos parece concentrar-se em domínios designados por jangadas lipídicas, que poderão derivar de compartimentos vesiculares intracelulares. Na membrana celular, a ferroportina encontra-se associada ao marcador de superfície CD11b/Mac1. Estas diferenças em relação aos enterócitos podem traduzir mecanismos alternativos envolvidos na resposta diferenciada destas células à hepcidina.<sup>307, 308</sup>

Após a secreção pelos hepatócitos, a hepcidina inicia os seus efeitos em até quatro horas, de uma forma dose dependente. Circula no plasma ligada à  $\alpha$ 2-macroglobulina, tendo cada molécula quatro locais de ligação cooperativa para a

hepcidina. O pico de concentração sérica dá-se às seis horas, sendo depois excretada pelos rins.<sup>266, 309</sup> O processo de excreção renal não tem qualquer regulação aparente, mas comparando as concentrações séricas e urinárias de hepcidina, estima-se que apenas 5% da hepcidina sérica seja filtrada intacta na urina. Uma hipótese é que a hepcidina filtrada seja reabsorvida no túbulo contornado proximal e aí degradada, à semelhança de outras hormonas na forma de pequenos péptidos.<sup>310</sup>

Pelo exposto, é claro que a hepcidina, ao atuar na ferroportina, controla todos os principais efluxos de ferro das células para o plasma: dos enterócitos que absorvem o ferro da dieta; dos macrófagos, envolvidos na reciclagem do ferro a partir do heme dos eritrócitos senescentes; e dos hepatócitos, que constituem o maior depósito de reservas de ferro do organismo (figura 9).<sup>253, 311, 312</sup>

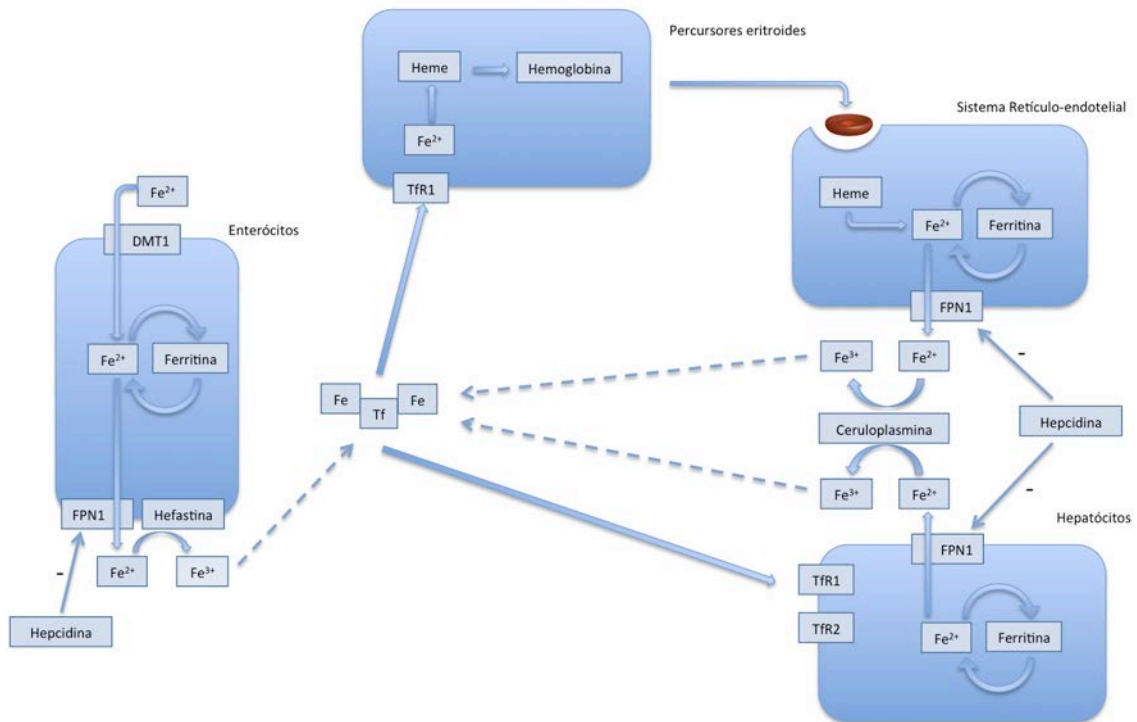


Figura 9. Metabolismo do ferro no organismo e a sua regulação pela hepcidina. Esta atua a nível das células que expressam a ferroportina, levando à sua internalização e impedindo a passagem do ferro intracelular para o plasma. DMT1 - Transportador de Metais Bivalentes; TFR - Recetores da transferrina; FPN1 - Ferroportina -1.

Demonstrou-se que o aminoácido histidina na posição 3 da hepcidina tem o potencial para ligar íões metálicos bivalentes. Curiosamente, a hepcidina 25 pode formar complexos com cobre, níquel e zinco, mas não o faz com o ferro, em qualquer das suas formas iónicas. A maior afinidade de ligação é para com o cobre, sendo incerto o significado deste facto; é possível que se venha a evidenciar que a hepcidina participa também no metabolismo do cobre.<sup>313</sup>

Foi também descrita a produção de pequenas quantidades de hepcidina em monócitos/macrófagos,<sup>314</sup> linfócitos,<sup>315</sup> adipócitos,<sup>316, 317</sup> rim,<sup>318</sup> miocárdio,<sup>319</sup> epitélio brônquico,<sup>320</sup> epitélio biliar,<sup>321</sup> células parietais gástricas,<sup>322</sup> células  $\beta$  pancreáticas<sup>323</sup> e sistema nervoso central.<sup>324</sup> Foi detetada a presença de hepcidina por radioimunoensaio na saliva, bÍlis, líquido ascítico e líquido pleural.<sup>325</sup>



Nestas células, a expressão da hepcidina parece ser bastante mais dependente da inflamação do que dos níveis de ferro no organismo. Ainda assim, esses níveis de expressão são muito baixos, comparativamente com os dos hepatócitos.<sup>326</sup>

Pelo menos nos monócitos, parece desempenhar um papel autócrino, induzindo a retenção de ferro aquando de um estado inflamatório,<sup>327</sup> e nos macrófagos poderá desempenhar um papel ativo no combate a infeções, nomeadamente por micobactérias.<sup>328</sup>

Foi ainda aventado um papel para a expressão da hepcidina no desenvolvimento e regeneração do fígado,<sup>329</sup> mas esta linha de investigação ainda não conheceu novos desenvolvimentos.

#### **4.8.2. Regulação da Síntese de Hepsidina pelo Fígado**

O órgão central da regulação do metabolismo do ferro não poderia deixar de ser o fígado, local de produção da hepcidina. Nos últimos anos, foram inúmeros os avanços sobre a compreensão desta regulação.<sup>330, 331, 332, 333</sup>

A regulação da síntese da hepcidina ocorre exclusivamente através da modulação da sua transcrição a partir do gene *HAMP*,<sup>334</sup> não existindo até ao momento evidência de outro tipo de controlo. Esta regulação é complexa e multifatorial, encontrando-se esquematizada na figura 10.

Essa modulação, no hepatócito, obedece a vários e distintos sinais estimulantes e inibidores:

### a) Sinais estimulantes:

- **Inflamação:** rapidamente foi estabelecida uma relação entre a expressão de hepcidina e a inflamação.<sup>335, 336</sup> A indução de um estado inflamatório crónico em várias espécies de animais - pela injeção subcutânea de óleo de terebintina,<sup>337, 338</sup> infeção por adenovírus,<sup>337</sup> exposição a *Micrococcus luteus* e *Escherichia coli*,<sup>339</sup> e ao adjuvante completo de Freund (micobactérias inativadas emulsionadas em óleo mineral)<sup>340</sup> - provocava um marcado aumento da expressão da hepcidina e diminuição da absorção de ferro, em linha com a função antimicrobiana originalmente descrita, tornando-se assim um apetecível mecanismo para explicar o surgimento da anemia das doenças crónicas.<sup>341, 342, 343, 344, 345</sup> Para além da inibição da absorção do ferro e da libertação deste para o plasma dos macrófagos e hepatócitos, existem evidências que a hepcidina pode inibir de algum modo a eritropoiese, causando assim todo o espectro das alterações da anemia das doenças crónicas.<sup>346</sup>

A indução da expressão da hepcidina em estados inflamatórios parece correlacionar-se diretamente com a elevação da IL-6, sendo esta um fator necessário e suficiente para tal.<sup>347</sup> Pelo contrário, o bloqueio dos recetores da IL-6 por um anticorpo monoclonal recombinante (tocilizumab) parece diminuir rapidamente os níveis séricos de hepcidina.<sup>348, 349</sup>

Desde logo se demonstrou que a ativação da transcrição da hepcidina pela IL-6 na resposta inflamatória era independente da via dos TfR e HFE.<sup>350</sup> A nível do hepatócito, a IL-6 associa-se ao seu recetor na membrana celular (IL-6R + gp130); a ativação deste provoca a fosforilação do fator de transcrição STAT3 através de cinases de Janus (JAK's). Após esta fosforilação, o STAT3 migra para o núcleo

celular, onde vai aumentar a transcrição de hepcidina através da ligação direta a um promotor proximal deste gene, numa região com 165 pares de bases.<sup>351, 352, 353, 354,</sup>

355

O TNF- $\alpha$ , a IL-10 e a via do óxido nítrico não apresentam qualquer relação com a síntese da hepcidina, levando a pensar que o eixo IL-6 / hepcidina é a causa principal da cinética do ferro de tipo inflamatório provocado pelas doenças inflamatórias crónicas.<sup>356, 357</sup> No entanto, as IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  libertadas pelos macrófagos podem também desempenhar um papel, mediando o aumento da transcrição da hepcidina em culturas celulares, por uma via independente da IL-6. É incerto se o fazem diretamente, estimulando os recetores da IL-1 tipo I (IL-1RI), via que pode levar à ativação do C/EBP $\alpha$ , ou indiretamente, através da modulação da libertação das proteínas morfogénicas do osso (BMP), descritas mais à frente.<sup>358, 359</sup>

Recentemente foi também descrito que a IL-22, uma citocina envolvida em respostas a infeções extracelulares, pode induzir a fosforilação do STAT3 de forma independente da IL-6; bem como a flagelina bacteriana, por interação com o TLR-5. Estes factos podem mostrar que ainda é mantida alguma relação entre a regulação da síntese da hepcidina e o sistema inato de resposta imune, de onde a hepcidina ao fim ao cabo parece ter evoluído.<sup>360</sup>

A oncostatina M, uma citocina produzida pelos eritroblastos na medula óssea e macrófagos ativados, foi inicialmente descrita pelas suas propriedades inibitórias da proliferação de células tumorais. Pertence à família da IL-6 e apresenta outras atividades biológicas, como a participação em fenómenos inflamatórios, hematopoiese, remodelação e diferenciação de tecidos. Observou-se que a oncostatina M induz fortemente a transcrição da hepcidina, em baixas concentrações, e com uma cinética diferente daquela observada com a IL-6, embora

também atue pela via da fosforilação do STAT3. O seu significado na regulação da hepcidina produzida pelos hepatócitos é ainda incerto.<sup>361</sup>

Existem algumas evidências que os macrófagos poderão desempenhar uma função importante na regulação da síntese de hepcidina pelo hepatócito, em situações de inflamação com fagocitose.<sup>362, 363</sup> Numa experiência com transplantes medulares entre ratinhos *HFE* (-/-) e *wild-type*, permitindo assim gerar quimeras com sistemas retículo-endoteliais com normal expressão *HFE*, mas com expressão deficitária em todos os outros tecidos, verificou-se que a sobrecarga hepática de ferro diminuía consideravelmente, paralelamente ao aumento dos níveis séricos de hepcidina. O papel exato da proteína HFE e o nível de interação dos macrófagos com os hepatócitos para induzir a síntese de hepcidina permanece desconhecido.<sup>364,</sup>

<sup>365</sup>

Também a nível dos leucócitos, que podem produzir hepcidina em baixas quantidades, o mecanismo de indução da transcrição da hepcidina pode ser algo diferente. O LPS e o TNF- $\alpha$  aumentam-na, ao contrário da IL-6, IL-1 e IFN- $\gamma$ . O mecanismo parece ser dependente do NF- $\kappa$ B e não do STAT3.<sup>366, 367, 368, 369</sup> O significado destas diferenças em relação ao hepatócito é desconhecido.

- **Stress do Retículo Endoplasmático (RE):** foi prestada uma especial atenção ao CREBH (*Cyclic AMP Response Element – Binding protein H*), que é um fator de transcrição específico do hepatócito, e que ativa a transcrição de diversas proteínas de fase aguda, incluindo a hepcidina. O CREBH é ativado por mecanismos de stress do RE, quando este acumula toxinas ou proteínas mal dobradas, ligando-se posteriormente à região promotora 5' do gene da hepcidina e aumentando a sua transcrição. As citocinas pró-inflamatórias e o LPS também

causam stress do RE. No mesmo estudo, verificou-se que a ativação do CREBH era independente da presença da proteína HFE, como se demonstrou em animais com fenótipo *HFE(-/-)*.<sup>370, 371, 372</sup>

Uma equipa de investigadores portugueses referiu uma outra via de sinalização do stress do RE, através do fator de transcrição CHOP (*CCAAT / enhancer-binding protein Homologous Protein*); este apresenta uma resposta bifásica ao stress do RE, aumentando transitoriamente de uma forma aguda e inibindo o C/EBP $\alpha$  (que como já referimos é um promotor da transcrição da hepcidina), mas diminuindo rapidamente com a persistência do estímulo do RE, facilitando com a sua ausência o aumento da transcrição da hepcidina pelo C/EBP $\alpha$ .<sup>371, 373</sup>

- **Sobrecarga de Ferro:** apesar da rápida associação da hepcidina ao metabolismo do ferro, só mais recentemente se começou a compreender com alguma profundidade o mecanismo de promoção da transcrição da hepcidina pelos níveis de ferro, que é um dos estímulos principais para a sua síntese.<sup>233</sup>

Uma das vias pelas quais o hepatócito recebe informação sobre o ferro circulante é através dos recetores da transferrina. Mais do que uma função "mecânica" de acoplagem à transferrina diférrica em circulação, permitindo a sua internalização celular, estes recetores poderão constituir uma via de sinalização para a síntese de hepcidina, especialmente o Tfr2, que parece localizar-se preferencialmente nos órgãos relacionados com o controlo do metabolismo do ferro, e ser sensível à saturação da transferrina plasmática.<sup>240, 241, 374, 375</sup>

O Tfr2 pode ser transcrito em duas isoformas: uma de comprimento integral ( $\alpha$ ) e outra de cadeia mais curta ( $\beta$ ). O  $\alpha$ -Tfr2 parece ser a isoforma

predominante no envolvimento do controlo da síntese da hepcidina, a nível do hepatócito; o  $\beta$ -TfR2 pode ser importante a nível extra-hepático, tendo-se verificado que pode modular também a transcrição da ferroportina-1 a nível esplénico.<sup>376</sup>

O TfR2 é um homólogo do TfR1, que também consegue ligar e promover a internalização da transferrina. Para este efeito, é necessária a sua ligação à proteína HFE, cuja distribuição da expressão se sobrepõe à dos TfR2, nomeadamente nos enterócitos das criptas duodenais, células hematopoiéticas e hepatócitos. Nestes, desde logo foi proposto que poderiam desencadear cascatas de sinalização intracelulares que levariam ao aumento da síntese da hepcidina.<sup>241, 377, 378, 379, 380</sup>

O TfR1 pode também participar nesta via de sinalização de um modo indireto; ao contrário do TfR2, a ligação da transferrina ao TfR1 compete com o mesmo sítio de ligação da HFE - este provavelmente é o mecanismo de diminuição da atividade do TfR1 hepático em resposta à sobrecarga de ferro, deslocando o HFE dos TfR1 e tornando-os inativos, ao mesmo tempo que a HFE livre intracelular pode ligar-se ao TfR2 e induzir a síntese de hepcidina.<sup>381, 382, 383, 384</sup>

Estes recetores podem estar envolvidos numa resposta rápida de modulação da síntese de hepcidina no fígado ao ferro proveniente da dieta, facilitada pela rápida chegada de transferrina, através da circulação portal, recentemente ligada ao ferro absorvido no intestino.<sup>253, 385</sup>

A via de sinalização dos recetores da transferrina e da proteína HFE para a transcrição da hepcidina permanece algo controversa, mas parece interagir com outra, a das proteínas morfogénicas do osso (BMP), descrita a seguir.<sup>386, 387</sup>

As BMP's, originalmente identificadas pela sua capacidade de induzir diferenciação do tecido ósseo, são membros da superfamília TGF- $\beta$ , que

compreende mais de 40 ligandos. Estes têm em comum a iniciação de cascatas de sinalização intracelular, após a ligação a recetores transmembranares serina-treonina cinase tipo I e tipo II. O recetor tipo I fosforila o recetor tipo II, que depois vai, por sua vez, fosforilar proteínas SMAD (*Sma and Mothers Against Decapentaplegic homolog*) intracelulares. Estas proteínas dirigem-se então ao núcleo para modular a expressão de genes, geralmente envolvidos em funções de proliferação celular, diferenciação e desenvolvimento tecidual e apoptose.<sup>388, 389, 390, 391</sup>

No caso das BMP's, estas foram associadas à modificação do metabolismo do ferro através do aumento da expressão da hepcidina.<sup>392, 393, 394</sup>

A mais importante no ser humano parece ser a BMP-6.<sup>389, 395</sup> A sua ligação aos recetores transmembranares leva à fosforilação do SMAD-1-5-8, que se liga ao mediador comum SMAD-4; este complexo ativa a transcrição do gene da hepcidina a nível do núcleo.<sup>396, 397, 398, 399</sup>

A produção da BMP-6 está aumentada quando os depósitos de ferro no fígado também o estão, levantando a hipótese das BMP's serem sinais que refletem a quantidade de ferro intracelular, contudo o modo como essa interação se processa é ainda desconhecido.<sup>253, 400</sup> Para além do mais, esse efeito parece verificar-se apenas ao nível dos hepatócitos, pois não há qualquer resposta a nível transcricional da BMP-6 nos enterócitos em relação com os depósitos de ferro no seu interior.<sup>401</sup>

Falámos anteriormente na via de sinalização dos Tfr2; a interação com a via das BMP's parece mediada pelas ERK-1/2 (*Extracellular Signal Regulated Kinases*). A ligação de transferrina diférrica aos Tfr2 ativa as ERK-1/2, que vão potenciar a fosforilação do SMAD-1-5-8.<sup>402</sup>

O SMAD-7 regula negativamente o SMAD-4, que, como dissemos atrás, se liga ao SMAD-1-5-8 fosforilado, indo o conjunto promover a transcrição da

hepcidina. O SMAD-7 parece ter uma via de regulação paralela à hepcidina, sendo a sua transcrição ativada pelas BMP's; é mais uma adição ao complexo controlo da transcrição da hepcidina no hepatócito.<sup>403, 404, 405</sup>

A hemojuvelina (HJV) é um membro da família RGM (*Repulsive Guidance Molecules*).<sup>406</sup> Esta proteína liga-se também aos recetores transmembranares serina-treonina cinase tipo I e tipo II, funcionando como correceptor da BMP-6, potenciando deste modo o aumento da expressão da hepcidina pela via das BMP's.<sup>389, 407, 408</sup> A sua deficiência, por mutação do gene denominado *HFE2*, causa 95% das formas de hemocromatose juvenil, pelo que é certo que desempenha um papel fundamental no metabolismo do ferro.<sup>391, 409</sup>

É sintetizada como um péptido de 426 aminoácidos, contendo na extremidade C uma âncora de glicosilfosfatidilinositol que pode ser removida *in vivo*, indicando que é possível a sua apresentação em duas formas - uma contendo a âncora, associada à membrana celular, e outra solúvel no plasma. De facto, a primeira forma é a que se encontra ligada aos recetores das BMP's, e a segunda circula no plasma, denominando-se hemojuvelina solúvel ou sHJV.<sup>233, 410</sup>

Curiosamente, a expressão de HJV não depende da concentração de ferro, mas o excesso deste inibe a libertação de sHJV, enquanto a sua deficiência promove a clivagem da HJV em sHJV.<sup>411</sup> A sHJV antagoniza a função da HJV membranar, pelo que por este meio a síntese da hepcidina é diminuída.<sup>392, 412, 413, 414, 415</sup>

A neogenina é uma proteína transmembranar, com uma grande extensão extracelular, onde apresenta quatro domínios semelhantes a imunoglobulinas. É um ligando das RGM, das quais a HJV faz parte. Expressa-se na maior parte dos tecidos, especialmente no sistema reprodutor, mas não no baço, pâncreas e timo. Demonstrou-se que estabiliza a HJV acoplada aos recetores transmembranares das



BMP's, diminuindo a quantidade de sHJV circulante, favorecendo assim a estimulação da hepcidina; a sua deficiência causa sobrecarga de ferro devido a uma marcada redução da hepcidina.<sup>416, 417, 418, 419, 420, 421</sup>

Não parece ser indiferente se o estímulo provocado pela sobrecarga de ferro é agudo ou crônico, sendo o primeiro provavelmente mediado pelo estímulo sérico da saturação da transferrina, pelas vias dos Tfr2, *HFE*, hemojuvelina e BMP-6, enquanto que na sobrecarga crônica parece ser importante um mecanismo distinto, não esclarecido, mas que pode envolver os níveis intracelulares dos depósitos de ferro nos hepatócitos.<sup>422</sup>

- **Zinco:** o ferro e o zinco são dois dos metais presentes em maior quantidade no organismo humano. Cada um deles afeta o outro em termos de redução da absorção e biodisponibilidade. Foi recentemente demonstrado que o gene da hepcidina contém três elementos de resposta a metais (MRE's - *Metal Response Elements*), que são ativados pelo MTF-1 (*MRE-binding Transcription Factor-1*). Este último, por sua vez, é ativado pelo zinco; experimentalmente, hepatócitos em cultura aumentam a transcrição da hepcidina quando expostos ao zinco, de uma forma dependente da presença do MTF-1. Este parece ser o mecanismo da inibição da absorção intestinal do ferro pelo excesso de zinco.<sup>423, 424</sup>

- **GATA-4:** as proteínas GATA são uma família de fatores de transcrição altamente conservados, assim denominados pela sua capacidade de se ligarem a sequências de ADN com a mesma sequência de bases (G-A-T-A). Foi recentemente identificada uma região de ligação GATA no promotor do gene *HAMP*, e reportada a estimulação da transcrição da hepcidina pela presença da proteína GATA-4,

enquanto que o seu cofator (FOG - *Friend of GATA*) suprime a mesma. A via de sinalização para a ativação da GATA-4 ou do FOG é ainda desconhecida.<sup>425,</sup>

- **Leptina:** a leptina é uma adipocina, cujos níveis plasmáticos estão relacionados com a quantidade de massa gorda do organismo. Os seus recetores na membrana citoplasmática apresentam uma estrutura semelhante aos recetores de citocinas da classe I, nos quais se inclui o complexo IL-6R-gp130. Com efeito, foi demonstrado que a exposição à leptina aumenta a transcrição de hepcidina por uma via relacionada com a JAK2/STAT3, portanto de modo similar à IL-6. Este efeito poderá explicar quadros de baixos níveis de ferro no organismo que foram já por diversas vezes associados à obesidade.<sup>426, 427</sup>

#### **b) Sinais inibidores:**

Os sinais inibidores, com vista à diminuição da hepcidina para permitir uma maior absorção intestinal de ferro e à libertação do mesmo dos hepatócitos e sistema retículo-endotelial, originam-se predominantemente a partir dos precursores eritroides, pois é uma prioridade a manutenção de um nível adequado de ferro ligado à transferrina sérica, para suprir as necessidades de cerca de 20 mg diárias para a eritropoiese. Talvez por isso, os sinais inibidores pareçam ser hierarquicamente dominantes em relação aos estimuladores, sobrepondo-se à indução da expressão da hepcidina por sobrecarga de ferro.<sup>233, 337</sup>

Apesar de tudo, o efeito destes sinais na diminuição da síntese de hepcidina parece não ser imediato; o já conhecido período de latência entre a

instalação de uma anemia aguda e o aumento de absorção intestinal de ferro deve-se a um atraso na supressão da síntese de hepcidina, que é em média de três dias.<sup>428</sup>

- **A hipóxia e a anemia** são potentes estímulos inibidores da expressão da hepcidina. Este efeito, desde logo, parecia ser mediado pela eritropoietina, produzida no rim, tendo-se verificado que esta molécula induz diretamente a quase supressão da transcrição do ARNm da hepcidina.<sup>341</sup>

A ação da eritropoietina ocorre através da ativação dos seus recetores (EpoR), tendo-se especulado que inibiria o fator de transcrição C/EBP $\alpha$ .<sup>429</sup> Entretanto foi relatado que a eritropoietina provoca a supressão da fosforilação do SMAD-1-5-8 e do STAT3, inibindo os estímulos das vias das BMP's e da IL-6, respetivamente.<sup>430</sup>

A resposta à eritropoietina parece ter um perfil bifásico, uma vez que nas primeiras horas, a resposta à injeção intravenosa de eritropoietina recombinante em voluntários saudáveis traduz-se por um aumento transitório da hepcidina plasmática, seguido então da sua redução abrupta 24 horas depois.<sup>431, 432</sup>

Entretanto, foram identificadas outras moléculas que também medeiam a frenação da hepcidina em resposta àqueles estímulos.

Os fatores de transcrição mediados pela hipóxia (HIF's) são elementos chave na resposta à hipóxia celular; esta pode ser provocada, por exemplo, pela privação de ferro e conseqüente anemia, com a oxigenação tecidual diminuída. Os HIF são heterodímeros cuja expressão é regulada na pós-transcrição, a partir de três subunidades: HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  e HIF-3 $\alpha$ . Na presença de oxigénio, estas subunidades são sinalizadas por proliil-hidroxilases dependentes de ferro (PHD's) ou oxigenases 2-oxoglutarato dependentes, para serem degradadas na via ubiquitina /

proteossoma. Em situações de hipóxia ou de deficiência de ferro, as PHD's são inibidas, as subunidades dos HIF podem-se agregar e formar HIF's heterodiméricos, que depois vão inibir a transcrição da hepcidina no núcleo.<sup>433, 434</sup> No entanto, existe pelo menos um trabalho que não conseguiu demonstrar um efeito direto dos HIF na inibição da transcrição da hepcidina.<sup>435</sup>

A própria hipóxia pode causar isquemia e produção de ROS; estes podem inibir o C/EBP $\alpha$  diretamente e assim diminuir a expressão de hepcidina; poderá ser outro mecanismo de resposta da supressão da hepcidina.<sup>436</sup>

É interessante o relato onde um modelo animal de isquemia parcial / reperfusão do fígado, ao contrário da isquemia sistêmica, aumenta a transcrição do ARNm da hepcidina.<sup>437</sup> Isto poderá estar relacionado com o eventual papel que a hepcidina desempenhe na reparação e regeneração hepática, atrás mencionado.

Recentemente, foi confirmada a via de regulação pela hipóxia em humanos, num estudo denominado HIGHCARE, onde se avaliou o efeito da altitude e consequente diminuição da pressão parcial de oxigénio inspirado na cinética do ferro, em 47 voluntários. A hepcidina sérica diminuiu 40 horas após exposição a 3400 metros de altitude, atingindo o seu máximo (80% de redução) aos 5400 metros.<sup>438</sup>

- **A Serina Protease Matriptase-2** (denominada também Tmprss6) é uma proteína transmembranar que pertence a um grupo de enzimas proteolíticas da superfície celular. Aparentemente, a sua expressão é apenas detetada nos hepatócitos. É sintetizada como um zimogénio inativo e auto-ativa-se por clivagem proteolítica. Tem a propriedade de inativar a HJV membranar, ligada aos recetores das BMP's, mas não tem atividade proteolítica sobre a sHJV. Pensa-se que é este o

mecanismo pelo qual interfere com a sinalização da via das BMP's, diminuindo assim marcadamente a síntese de hepcidina. <sup>439, 440, 441, 442, 443, 444</sup>

Mutações no gene *TMPRSS6* podem causar alterações no metabolismo do ferro, desde polimorfismos funcionais associados a uma discreta sobrecarga <sup>445</sup> ou deficiência de ferro, <sup>446, 447</sup> até um quadro de anemia refratária ao ferro (*IRIDA - Iron-Refractory Iron Deficiency Anemia*), onde a deficiência de matriptase-2 leva a níveis inapropriadamente altos de hepcidina em relação com as baixas reservas de ferro do organismo. <sup>448, 449, 450, 451, 452, 453, 454, 455</sup>

**- Moléculas de sinalização derivadas dos precursores eritroides:** para a supressão dos níveis de hepcidina durante um período de anemia, demonstrou-se que é essencial a existência de atividade eritropoiética, pelo que se tornou claro que os precursores eritroides participavam também na regulação da transcrição da hepcidina. <sup>456</sup>

O estudo de doentes com  $\beta$ -talassémia demonstrou que estes possuíam níveis inapropriadamente baixos de hepcidina, o que poderia explicar a sobrecarga tecidual de ferro característica desta patologia, muitas vezes agravada pelas múltiplas transfusões de concentrado eritrocitário. Com base neste facto, postulou-se que esta supressão da hepcidina poderia ter como causa moléculas de sinalização derivadas dos precursores eritroides, sintetizados em excesso em consequência da eritropoiese ineficaz. Com efeito, identificaram-se duas citocinas, produzidas por aqueles precursores - o *TWSG1 (Twisted Gastrulation Protein Homolog 1)* e o *GDF15 (Growth Differentiation Factor 15)*, que inibem significativamente a transcrição da hepcidina; pelo menos a *TWSG1* fá-lo através da inibição da

fosforilação dos SMAD's pelos recetores transmembranares das BMP's.<sup>457, 458, 459, 460, 461</sup>

O GDF15 parece desempenhar um papel semelhante na sobrecarga de ferro associada a alguns síndromes mielodisplásicos e na diseritropoiese congénita.<sup>462, 463</sup>

- **Heparina:** foi recentemente observado que doentes tratados com heparina para prevenir trombose venosa profunda apresentavam uma redução da hepcidina sérica, acompanhada de um aumento no ferro sérico. Em ratinhos, doses terapêuticas de heparina inibem a transcrição de hepcidina, presumivelmente por impedirem a fosforilação dos SMAD.<sup>464</sup> É desconhecido se o sistema de anti-coagulação endógeno, nomeadamente o sulfato de heparano produzido pelas células endoteliais, desempenha algum papel na regulação fisiológica do metabolismo do ferro.

- **Testosterona:** esta hormona sempre esteve associada a um aumento da eritropoiese, sem associação com um aumento na eritropoietina. Foi reportado que a administração de testosterona exógena a homens saudáveis provocava uma diminuição nos níveis de hepcidina plasmáticos.<sup>465</sup> Não foi claro se este facto é causado por uma regulação direta da testosterona no hepatócito, ou se é meramente secundário a uma estimulação dos precursores eritroides, que por sua vez sinalizam a diminuição da síntese da hepcidina hepática pelos GDF15, TWSG1, ou outro fator ainda desconhecido.

- **MicroARN's:** Os microARN's (miRNA's ou miR) são uma classe de ácidos ribonucleicos de pequena dimensão, não traduzidos, envolvidos na regulação da expressão genética após a transcrição. O miR-122 é um microARN específico do fígado, tendo sido descoberto que tem como propriedade a inibição da transcrição da *HAMP* e de vários genes relacionados com a estimulação da hepcidina, tais como o *HFE*, o *HJV*, e o do recetor das BMP's tipo Ia (*Bmpr Ia*). A depleção de miR-122 hepático causa, com efeito, um quadro de deficiência sistémica de ferro, compatível com elevados níveis de hepcidina.<sup>466</sup> Esta descoberta é mais uma confirmação da extrema complexidade da regulação da transcrição desta proteína.

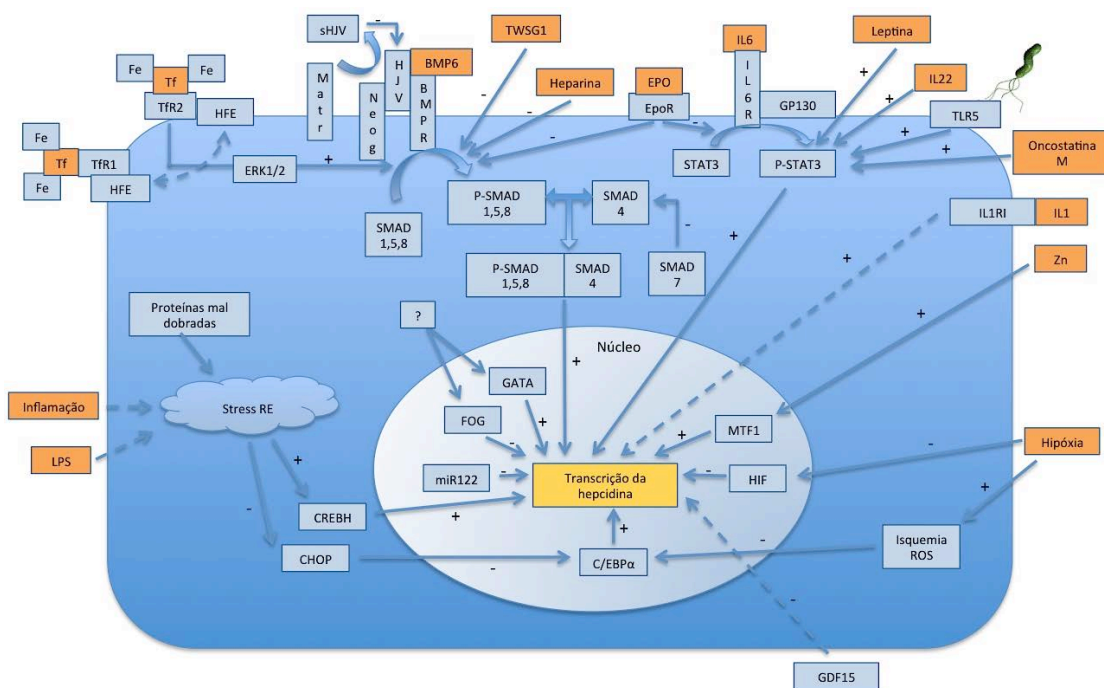


Figura 10. Regulação da transcrição da hepcidina no hepatócito. TfR – Recetores da transferrina; ERK1/2 - *Extracellular Signal Regulated Kinases*; Matr – Matriptase-2; Neog – Neogenina; HJV – Hemojuvelina; sHJV – Hemojuvelina solúvel; BMP - Proteínas Morfogénicas do Osso; BMPR – Recetores das BMP; TWSG1 - *Twisted Gastrulation Protein Homolog 1*; TWSG1 - *Twisted Gastrulation Protein Homolog 1*; EPO – Eritropoietina; EpoR – Recetor da eritropoietina; IL – Interleucinas; IL6R – Recetor da IL6; GP130 – Glicoproteína 130; TLR5 – *Toll-like Receptor 5*;

SMAD - *Sma and Mothers Against Decapentaplegic homolog*; P-SMAD – SMAD fosforilado; STAT3 - *Signal Transducer and Activator of Transcription 3*; P-STAT3 – STAT3 fosforilado; IL1RI – Recetor I da IL1; Zn – Zinco; MTF-1 - *MRE-binding Transcription Factor-1*; HIF's - Fatores de Transcrição mediados pela Hipóxia; ROS – *Reactive Oxygen Species*; GDF15 - *Growth Differentiation Factor 15*; LPS – Lipopolissacarídeos; CREBH - *Cyclic AMP Response Element – Binding protein H*; CHOP - *CCAAT/enhancer-binding protein Homologous Protein*; GATA – *Proteína GATA*; FOG - *Friend of GATA*; miR122 – micro ARN – 122; C/EBP $\alpha$  - Fator de transcrição C/EBP $\alpha$ .



### 4.8.3. Hecpidina e Outras Doenças Não Relacionadas com Sobrecarga Hepática de Ferro

#### 4.8.3.1. Insuficiência Renal Crónica

A doença renal crónica (DRC) está associada ao estabelecimento progressivo de anemia, tendo sido o mecanismo principal usado para explicar este facto a diminuição da síntese de eritropoietina pelo rim danificado. Contudo, mesmo após a generalização, na década de 1990, do uso de análogos da eritropoietina nos insuficientes renais crónicos, verificou-se que uma parte substancial dos doentes (10%) eram relativamente resistentes à terapêutica, mesmo com altas doses. Isto implica que, pelo menos num subgrupo de doentes, a anemia da insuficiência renal crónica é motivada por uma resistência ou falta de resposta à eritropoietina, e não à sua falta *per se*.<sup>467, 468, 469</sup>

Mais recentemente, a DRC passou a ser encarada como uma condição pró-inflamatória. Efetivamente, foi já demonstrado que marcadores inflamatórios, como a PCR, a IL-1, a IL-6, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , estão aumentados na presença de DRC.<sup>470</sup>

Já discutimos o facto de a inflamação, especialmente pela via da IL-6, ser um potente indutor da transcrição e síntese de hepcidina. A verdade é que os níveis de hepcidina nos doentes com DRC se encontram significativamente elevados, até mesmo sem evidência de inflamação, e aumentam progressivamente à medida que a taxa de filtração glomerular diminui.<sup>471, 472</sup> Curiosamente, a hemodiálise reduz os valores de hepcidina sérica, mas estes rapidamente regressam ao níveis prévios antes da próxima sessão.<sup>473, 474</sup>

Níveis elevados de hepcidina vão diminuir a absorção intestinal de ferro e a mobilização dos depósitos de ferro, criando um estado de carência marcial, absoluta ou relativa. Para além disso, demonstrou-se que diminuem a resposta aos análogos da eritropoietina.<sup>343</sup>

Inversamente, vimos atrás que a eritropoietina é também um potente estímulo frenador da síntese de hepcidina hepática,<sup>340, 429, 430</sup> e com efeito, a sua administração em humanos leva a uma supressão marcada e sustentada da hepcidina plasmática.<sup>432</sup>

Para além da regulação da cinética do ferro, especula-se que a hepcidina possa de algum modo estar ligada a várias complicações da DRC, como infeções bacterianas, aterosclerose acelerada e dismetabolismo ósseo.<sup>475</sup>

Do exposto, fica claro que a hepcidina poderá desempenhar um papel central na patogénese da anemia da DRC, e, na verdade, as abordagens usadas na prática clínica para a melhorar (análogos da eritropoietina, ferro endovenoso e tratamento anti-inflamatório), provavelmente fazem-no porque todos eles são bons supressores diretos ou indiretos da síntese de hepcidina hepática.<sup>467, 469</sup>

#### **4.8.3.2. Doenças Cardiovasculares**

O ferro tem ultimamente ganho alguma relevância como um elemento importante na patogénese da placa aterosclerótica.

Em 1992 foi demonstrada a presença de ferro em excesso nas placas ateroscleróticas de cadáveres humanos, o que não ocorre na parede arterial normal. Na altura foi enfatizado que o interior de lesões ateroscleróticas avançadas era "altamente pró-oxidante".<sup>476</sup>

Este achado foi posteriormente confirmado por outros trabalhos, onde se verificou que os grandes "transportadores" de ferro para dentro da placa aterosclerótica são os macrófagos; o ferro facilita a oxidação das LDL promovida por estas células, fundamentais para a patogénese da placa.<sup>477,478</sup> Outra parte do ferro macrofágico dentro das placas resultará de micro-hemorragias *in situ*.<sup>479</sup>

Começou-se a discutir o até então improvável papel da hepcidina na aterosclerose quando se verificou que os doentes com hemocromatose hereditária, ao contrário do que seria de esperar, não tinham incidência aumentada de lesões ateroscleróticas, e que a miocardiopatia da hemocromatose cursava geralmente sem qualquer lesão nas coronárias.<sup>480, 481</sup> A isto não seria alheio o facto que, na hemocromatose, os macrófagos caracteristicamente apresentam escassos depósitos de ferro.<sup>482</sup>

Foi proposto que a hepcidina pode promover a progressão da placa aterosclerótica por diminuir ou impedir a mobilização do ferro intramacrofágico, pela diminuição da ferroportina presente na membrana dos macrófagos. Quando as lesões ateroscleróticas evoluem para um estado instável, os fenómenos de inflamação associados poderão ser responsáveis por um ciclo de *feedback* positivo ao promoverem a síntese de hepcidina hepática pelos mediadores inflamatórios (especialmente a IL-6), que assim iria promover ainda mais a acumulação de ferro dentro dos macrófagos intralesionais.<sup>480</sup>

Referimos que a hepcidina pode ser sintetizada em pequenas quantidades pelo tecido cardíaco.<sup>319</sup> Foi descrito que a expressão da hepcidina nos cardiomiócitos aumenta significativamente em situações de miocardite e enfarte agudo do miocárdio.<sup>483</sup> Se isto ocorre pelo estímulo hipóxico e inflamatório, ou se desempenha outro papel na fisiopatologia daquelas doenças, está ainda por

determinar. Especula-se que o aumento da hepcidina possa diminuir localmente a quantidade de ferro libertada pelas células, protegendo a área hipóxica da formação de radicais livres até um certo ponto, e contribuindo para a redução da expansão do enfarte.<sup>484</sup>

Curiosamente, no enfarte, ocorre também uma elevação da hepcidina-20, a forma biologicamente inativa, o que poderá até ter interesse diagnóstico na isquemia aguda do miocárdio.<sup>485</sup>

#### **4.8.3.3. Doenças Hematológicas**

Já fizemos referência às  $\beta$ -talassémias, causadas por mutações no gene da  $\beta$ -globulina; estas causam uma síntese reduzida ou mesmo ausente, nos casos mais graves, com um excesso relativo de  $\alpha$ -globulina para a formação da hemoglobina, levando à apoptose dos precursores eritroides, com eritropoiese ineficaz, aparecimento de eritropoiese extramedular, com hepato-esplenomegalia e anemia.

<sup>486</sup>

Era já conhecida a sobrecarga de ferro nesta patologia, causada por uma combinação do aumento da absorção intestinal e das múltiplas transfusões necessárias. Foi neste contexto que se demonstrou a estreita relação entre a eritropoiese e a produção hepática de hepcidina, sendo esta inibida pela libertação do GDF15 e TWSG1 dos precursores eritroides.<sup>486, 487</sup>

No quadro clínico da macroglobulinemia de Waldenström (MW), a anemia é muitas vezes uma apresentação dominante. A hepcidina parece ter um papel importante nessa anemia, uma vez que os seus níveis se encontram aumentados na MW, correlacionando-se diretamente com a presença de

envolvimento medular, níveis de  $\beta$ 2-microglobulina e inversamente com o valor de hemoglobina, mas não com o estado das reservas de ferro. Mais importante, foi demonstrado que a hepcidina era produzida diretamente no clone neoplásico linfoplasmocitário,<sup>488</sup> o que poderá efetivamente configurar um síndrome de secreção inapropriada de hepcidina.

Outros casos descritos desta secreção inapropriada foram em anemias refratárias ao ferro em doentes com grandes adenomas hepáticos; verificou-se que estes adenomas eram produtores de grandes quantidades de hepcidina, que causava a deficiente absorção e mobilização do ferro.<sup>489</sup>

#### **4.8.3.4. Doença Inflamatória Intestinal**

Vários trabalhos abordaram já o estudo dos níveis de hepcidina na doença inflamatória intestinal (DII). Como seria de esperar, encontram-se aumentados, correlacionando-se com a atividade da doença e certamente contribuindo para a anemia de doença crónica que a caracteriza. A determinação da hepcidina urinária poderá mesmo vir a tornar-se um método não invasivo para diagnosticar a agudização da DII.<sup>490, 491, 492</sup>

Apenas um estudo reportou diminuição dos níveis de hepcidina na DII, provavelmente pela inclusão de doentes com ferritina baixa, com a consequente supressão da hepcidina pela baixa das reservas corporais de ferro.<sup>493</sup>

#### 4.8.3.5. Doenças Infeciosas

Dadas as suas origens evolutivas no sistema de defesas inatas, não é de estranhar as relações que têm sido estabelecidas entre a hepcidina e algumas doenças infecciosas.

Em situações inflamatórias / infecciosas da árvore biliar, as células do epitélio aumentam a síntese de hepcidina, provavelmente induzida pela IL-6 decorrente da inflamação. Na prática, pode ter o efeito de aumentar a capacidade antibacteriana da biliar segregada.<sup>321</sup>

Nos macrófagos alveolares, a síntese de hepcidina é estimulada pela exposição ao LPS; isto poderá ser um modo de regulação autócrina do metabolismo do ferro no macrófago, aquando de uma infeção bacteriana, por exemplo - impedindo a libertação para o exterior, diminui-se a concentração de ferro no meio extracelular, facto que só por si é bacteriostático; para além disso, o aumento do ferro intramacrofágico potencia as reações de oxidação nos fagossomas, mecanismo de combate à infeção.<sup>494</sup> De referir que as células epiteliais das vias aéreas podem também sintetizar hepcidina em resposta ao INF- $\gamma$ .<sup>320</sup>

A hepcidina poderá estar envolvida de alguma forma na patogénese do VIH-1 uma vez que se demonstrou que a exposição de macrófagos e linfócitos CD4<sup>+</sup> à hepcidina aumenta a replicação viral dentro destes. Provavelmente este facto está relacionado com a conservação do ferro dentro das células, uma vez que este potencia a replicação do VIH-1.<sup>495</sup>

Outra associação curiosa é com a infeção por *Helicobacter pylori*. Era já reconhecido que a infeção com este micro-organismo era ocasionalmente causa de

anemia ferripriva, mas com uma pouca clara resistência à administração de ferro oral; este quadro era revertido apenas pela erradicação do *Helicobacter pylori*.<sup>496</sup>

Foram aventadas algumas hipóteses, tais como a possível produção pela própria bactéria de um *hepcidinomimético*, de forma a modificar a regulação da absorção de ferro pelo hospedeiro, uma vez que o *Helicobacter pylori* é extremamente sensível á falta de ferro local para o seu desenvolvimento.<sup>497</sup>

Contudo, a produção de hepcidina nesta infecção é efetuada pelas células parietais gástricas, sendo induzida pelo próprio *Helicobacter*.<sup>498</sup>

Discute-se também uma nova função para a hepcidina, no sentido da mediação da resposta inflamatória aguda. Apesar de ser induzida pela IL-6, existem trabalhos que demonstram que a hepcidina poderá regular negativamente a transcrição desta citocina, bem como do TNF- $\alpha$ , constituindo assim uma mecanismo de *feedback* negativo na inflamação. Curiosamente, o pré-tratamento com hepcidina protege animais de experiência contra a administração de uma dose letal de LPS, o mesmo acontecendo com a administração de hepcidina no decorrer da resposta inflamatória sistêmica a essa dose de LPS.<sup>499</sup> A relevância desta descoberta está ainda por apurar.

#### **4.8.3.6. Doentes Críticos**

Recentemente, tem crescido o interesse sobre a hepcidina como forma de clarificar o metabolismo de ferro nos doentes em cuidados intensivos. Cerca de 65% dos doentes admitidos nestas unidades têm anemia, que sobe para 75% na altura da alta. A presença de anemia está associada a pior prognóstico, maior duração de internamento e recuperação.<sup>500</sup>

A indicação para transfusão de concentrado eritrocitário em cuidados intensivos é cada vez mais restrita, devido ao receio da indução de fenómenos de imunomodulação ou de edema pulmonar agudo associado a transfusão.<sup>500</sup>

Para além disso, esta anemia nos doentes críticos era considerada universalmente como de tipo inflamatório, muitas vezes com ferritina elevada e ferro sérico baixo.<sup>501</sup>

A verdade é que, muitas vezes, pode predominar um quadro misto de inflamação e carência de ferro. É necessário não esquecer que a perda de sangue nestes doentes por venopunção e procedimentos invasivos pode atingir uma média diária de 128 ml, o que corresponde a 64 mg de ferro perdidos. Nestes casos, os níveis de hepcidina plasmáticos estão diminuídos, e não elevados como seria de esperar numa anemia de características inflamatórias, pois como já vimos, os estímulos supressores da transcrição de hepcidina a nível hepático apresentarão uma dominância hierárquica em relação aos estimuladores.<sup>500, 502</sup>

O doseamento sérico da hepcidina nos doentes críticos permitiria identificar os que beneficiariam da administração de ferro endovenoso, e como tal diminuir a prevalência da anemia nas unidades de cuidados intensivos.<sup>503</sup>

Outra eventual utilidade da hepcidina em doentes críticos foi recentemente evidenciada em dois trabalhos. Cirurgias que envolvam derivação cardio-pulmonar estão associadas com uma ocorrência relativamente alta de lesão renal aguda no pós cirúrgico. Não existem até à data marcadores bioquímicos que permitam discriminar os doentes em risco para desenvolver este quadro, constatando-se apenas a sua presença após se ter instalado, pela diminuição da função renal. A medição da hepcidina urinária no pré-operatório e seis horas após a cirurgia parece ter um alto valor preditivo na identificação precoce destes doentes. Estes não apresentam



elevação da hepcidina urinária no pós-operatório em relação aos valores anteriores, nem um aumento da relação hepcidina / creatinina.<sup>504, 505</sup>

#### **4.8.3.7. Neoplasias**

Um interessante estudo sobre neoplasia da mama mostrou que o tecido mamário é capaz de produzir ferroportina e hepcidina. A expressão de ferroportina é substancialmente reduzida nas células neoplásicas. Curiosamente, a identificação de uma expressão elevada de ferroportina e baixa de hepcidina no tecido tumoral, apresenta um excelente prognóstico, com sobrevividas aos 10 anos superiores a 90%. O inverso é também verdade, e amostras de tecido tumoral com alta expressão de hepcidina identificavam subtipos muito mais agressivos, correlacionando-se com outros marcadores estabelecidos de mau prognóstico - ausência de recetores de estrogénio, alto grau histológico e atingimento de gânglios linfáticos.<sup>506, 507</sup>

No que respeita ao carcinoma hepatocelular, foi descrita uma supressão da transcrição da hepcidina no tecido tumoral, ao contrário do parênquima hepático adjacente, ao mesmo tempo que o ferro intracitoplasmático diminui, provavelmente pelo concomitante aumento na expressão da ferroportina. Este facto pode estar relacionado com algum passo na tumorigénese do carcinoma hepatocelular, mas o seu mecanismo e significado são incertos.<sup>508, 509</sup>



#### 4.8.4. Métodos Laboratoriais para Determinação da Hepcidina

Apesar da crescente importância que a hepcidina foi demonstrando na década passada como principal regulador do metabolismo do ferro, a sua determinação laboratorial como ferramenta de auxílio à prática clínica ainda não se generalizou.<sup>510</sup>

Os métodos imunohistoquímicos tradicionais enfrentam alguns problemas com este peptídeo: é formado por apenas 25 aminoácidos, tendo um tamanho pequeno e compacto, com poucos epitopos antigénicos; tende a formar agregados; para além disso, a sua estrutura é altamente conservada entre espécies, sendo difícil provocar uma resposta imune em animais; a produção sintética do antígeno em si (hepcidina) envolve métodos complexos.<sup>510</sup>

Os primeiros kits de ELISA (*Enzyme-linked Immunoassay*) disponíveis comercialmente detetavam a pro-hepcidina.<sup>511</sup> Contudo, este é um pró-peptídeo sem atividade intrínseca, e os seus níveis plasmáticos não se correlacionam diretamente com a absorção ou com os depósitos de ferro existentes no organismo.  
512, 513, 514, 515

Os primeiros trabalhos a aparecerem com a determinação sérica da hepcidina envolviam laboriosas técnicas de extração da urina por cromatografia e posterior quantificação por quimioluminescência com anticorpos produzidos em coelhos,<sup>356</sup> métodos que não são aplicáveis para uma técnica laboratorial de rotina.

Técnicas mais avançadas de espectrometria de massa, como a SELDI-TOF-MS (*Surface-Enhanced Laser Desorption / Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry*) permitem a determinação direta da molécula sem recurso a

anticorpos. Tem como desvantagem o facto de os resultados serem apenas expressos de uma forma semiquantitativa, e de não ser uma técnica facilmente disponível.<sup>516, 517, 518</sup> Recentemente, avanços nesta técnica, com o uso de um controlo de hepcidina sintética sem a asparagina n-terminal ou de hepcidina marcada,<sup>519, 520</sup> ou o uso de técnicas diferentes de espectrometria de massa, como a MALDI-TOF-MS (*Matrix-assisted laser desorption / ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry*),<sup>521</sup> WCX-TOF-MS (*Weak Cation Exchange Time-Of-Flight Mass Spectrometry*) e IC-TOD-MS (*Immunocapture Time-Of-Flight Mass Spectrometry*)<sup>522</sup> permitiram uma quantificação mais precisa da hepcidina.

Foram também desenvolvidas técnicas de radioimunoensaio (RIA - *Radioimmunoassay*), que aliás são bastante usadas para a determinação de valores de variadas hormonas séricas. Consiste na junção de uma quantidade determinada do antigénio tornado radioativo, normalmente por adição de um isótopo de iodo, com outra quantidade conhecida de anticorpo; é adicionado à mistura o soro com a quantidade de antigénio desconhecido, mas que compete com o antigénio radioativo pelos locais de ligação dos anticorpos, permitindo a sua determinação pela quantificação da radioatividade. Existe apenas um kit em comercialização, que não tem valores comparados com outras técnicas.<sup>523</sup>

Entretanto, foram desenvolvidas técnicas de ELISA mais apuradas, como ELISA em *sandwich*, usando 2 tipos de anticorpos monoclonais com excelente correlação com aferições por espectrometria de massa ( $r=0,98$ );<sup>524</sup> e técnicas com anticorpos policlonais induzidos em coelhos por hepcidina humana recombinante sintetizada por fungos, com também uma boa correlação com medições de espectrometria ( $r=0,863$ );<sup>525</sup> técnicas de ELISA competitiva (C-ELISA), devidamente aferidos e validados, permitindo a execução em laboratório de rotina

com o processamento de dezenas de amostras ao mesmo tempo, que irá permitir a sua utilização mais disseminada na clínica.<sup>310, 526</sup>

Uma das aplicações clínicas da medição sérica ou urinária de hepcidina seria o de clarificar o diagnóstico diferencial de situações de sobrecarga de ferro, para orientar o pedido dos testes genéticos, inevitavelmente mais caros;<sup>527</sup> ou então da deteção precoce de carências de ferro, antes das alterações hematológicas.<sup>528, 529</sup>

Entretanto, estudos recentes no doseamento de hepcidina sérica, na população em geral (n=2998), por métodos de C-ELISA, permitiram esclarecer dados relevantes, como o facto de a concentração mediana de hepcidina sérica nos homens ser constante ao longo dos anos (7,8 nMol/L), enquanto nas mulheres pré-menopausicas, esta é sensivelmente metade da dos homens (4,1 nMol/L), subindo para os valores semelhantes após a menopausa (8,5 nMol/L). Os valores correlacionam-se sempre linearmente com os da ferritina sérica em todos os grupos.

530

Foi também descrita uma técnica de ELISA para a aferição da hemojuvelina, com boa sensibilidade e especificidade.<sup>531</sup>



#### 4.8.5. Potencial Terapêutico da Hecpídina

Após a observação do papel central da hepcídina na regulação do metabolismo do ferro no organismo humano, não é difícil perceber o potencial terapêutico que encerra o desenvolvimento de agonistas e antagonistas deste péptido de origem hepática.<sup>532, 533</sup>

A síntese química de hepcídina é possível, apesar de morosa e complexa, mas a possibilidade de sintetizar hepcídina humana recombinante através de micro-organismos transgênicos é já uma realidade.<sup>525, 534</sup> Contudo, a via de administração e o efeito terapêutico seriam um problema, dado a pequena semivida da hepcídina plasmática *in vivo*.<sup>233, 535</sup>

As hemocromatoses hereditárias, em analogia com a diabetes tipo 1, poder-se-iam considerar doenças endócrinas, e serem controladas com a administração exógena da hormona em falta, neste caso a hepcídina, evitando-se o desconforto das flebotomias ou os efeitos secundários dos quelantes do ferro.<sup>233, 536, 537</sup>

As anemias com deficiente eritropoiese e sobrecarga de ferro, bem como as sobrecargas de ferro secundárias ao álcool, hepatite C crónica e NASH poderiam ser mais facilmente manejadas.<sup>538, 539, 540</sup>

A primeira abordagem a esta via terapêutica foi publicada em 2010, demonstrando-se que doses supra-fisiológicas de BMP-6 em ratinhos *HFE* (-/-) normalizavam a produção de hepcídina e melhoravam a sobrecarga de ferro nestes modelos animais de hemocromatose. Contudo, foram inviáveis terapêuticas prolongadas devido ao aparecimento de calcificações peritoneais, dadas as

propriedades indutoras de formação de osso das BMP's, pelas quais, aliás, foram inicialmente reconhecidas.<sup>541</sup> Apesar de tudo, é uma importantíssima prova de conceito que demonstra que é possível induzir a síntese de hepcidina atuando na via BMP-6 / SMAD.

Foi também já descrita a criação de um modelo de ratinhos transgênicos *HFE* *-/-*, mas com um modelo de indução da transcrição da hepcidina regulado pelas tetraciclinas; a administração destas revertia completamente o fenótipo hemocromatósico.<sup>275</sup>

Recentemente, um interessante trabalho descreveu a síntese de "minihepcidinas", que são péptidos sintetizados artificialmente, após ter sido identificada a estrutura mínima que retinha a capacidade de se ligar à ferroportina. Para além disso, foram introduzidas mais algumas modificações na estrutura proteica de modo a aumentar a resistência à proteólise e a biodisponibilidade após administração oral. De facto, a administração desses péptidos, quer por via parentérica, quer por via oral, resultou numa hipoferrémia significativa em ratinhos.<sup>542</sup> Este terá sido um avanço significativo para a descoberta de uma terapêutica oral da hemocromatose hereditária e de quadros de sobrecarga de ferro secundários a deficiências relativas ou absolutas de hepcidina.

Já o uso de antagonistas seria de extrema utilidade no tratamento da anemia associada à inflamação crónica. Seriam também o tratamento de eleição para situações mais raras como a IRIDA (anemia ferripriva resistente ao ferro por perda de função da Tmprss6) e grandes adenomas hepáticos irressecáveis produtores de hepcidina.<sup>233</sup>



O seu uso na anemia ligada à doença renal crónica permitiria a melhoria da qualidade de vida, necessidades transfusionais e a redução das doses de eritropoietina.<sup>543</sup>

A validade deste conceito foi já provada: A dorsomorfina, uma pequena molécula que inibe os recetores tipo I das BMP's, impede a resposta da hepcidina induzida pelo ferro;<sup>393</sup> um derivado da dorsomorfina, o LDN-193189 reverte a anemia ligada à inflamação;<sup>544, 545</sup> o tocilizumab, ao impedir a resposta à IL-6, inibe também a produção de hepcidina;<sup>349</sup> a administração de anticorpos monoclonais anti-hepcidina a ratinhos reverte a anemia associada à inflamação crónica por administração de antigénios de *Brucella abortus*;<sup>546</sup> a administração de hemojuvelina solúvel (sHJV) também diminui a síntese de hepcidina;<sup>392, 544, 545</sup> a administração de eritropoietina também a inibe;<sup>432</sup> bem como anticorpos monoclonais anti-BMP-6;<sup>545</sup> e recentemente foi também reportado que a heparina e derivados inibem a transcrição da hepcidina por interferência com a via BMP-6 / SMAD.<sup>464</sup>



## 4.9. Doenças Genéticas com Sobrecarga Hepática de Ferro

A primeira descrição de hemocromatose é atribuída a Trousseau, que no século XIX descreveu uma diabetes "bronzeada". O patologista Emile Troisier reportou também um caso de diabetes associada a cirrose hepática, com deposição de pigmento vermelho-acastanhado no fígado.<sup>547</sup>

O termo hemocromatose deve-se a von Recklinghausen, que identificou esse pigmento como proveniente do sangue. Seldon, em 1935, atribuiu pela primeira vez a causa da hemocromatose a um erro inato do metabolismo do ferro, referindo a sua associação familiar. Contudo, apenas em 1996 se identificou a causa mais frequente da hemocromatose hereditária em populações caucasianas, o gene *HFE*, originalmente denominado *HLA-H*.<sup>547</sup>

Entretanto, verificou-se que nem toda a sobrecarga tecidual de ferro configurava um quadro de hemocromatose.

A classificação mais atual dos quadros de sobrecarga hepática de ferro divide-os em dois grandes grupos: genéticos e adquiridos. Os quadros genéticos de sobrecarga de ferro dividem-se em hemocromatósicos e não hemocromatósicos (quadro II).<sup>269</sup>

Quadro II. Características das doenças genéticas com sobrecarga de ferro.

Doença	Gene	Cromossoma	Transmissão	Início	Expressão clínica
<b>Hemocromatóticas</b>					
Hemocromatose tipo I	<i>HFE</i>	6p21.3	Recessiva	Tardio	Articular e hepática
Hemocromatose tipo IIa	Hemojuvelina	1p21	Recessiva	Precoce	Cardíaca e endócrina
Hemocromatose tipo IIb	Hepcidina	19q13.1	Recessiva	Precoce	Cardíaca e endócrina
Hemocromatose tipo III	<i>TfR2</i>	7q22	Recessiva	Tardia	Hepática
Doença da Ferroportina tipo B	Ferroportina (SLC40A1)	2q32	Dominante	Tardia	Articular e hepática
<b>Não hemocromatóticas</b>					
Doença da Ferroportina tipo A	Ferroportina (SLC40A1)	2q32	Dominante	Tardia	Rara
Aceruloplasminemia	Ceruloplasmina	3q23-q25	Recessiva	Tardia	Neurológica
Atransferrinemia	Transferrina	3q21	Recessiva	Precoce	Hematológica
Deficiência DMT-1	<i>DMT-1</i>				
Relacionada com H-ferritina	Subunidade H da ferritina		Dominante	Precoce	Hepática
Síndrome Hereditário Hiperferritinemia-Cataratas	Subunidade L da ferritina		Dominante	Precoce	Ocular
Doenças genéticas com Eritropoiese ineficaz	Vários				

#### 4.9.1. Hemocromatose tipo I

Para uma sobrecarga hepática de ferro ser considerada como hemocromatósica, deve ter as seguintes características:<sup>269</sup>

- Doença hereditária com manifestações fenotípicas bem caracterizadas;
- Eritropoiese normal;
- Saturação da transferrina aumentada;
- Deposição parenquimatosa de ferro (predominantemente nos hepatócitos);
- Relacionada com alterações da produção, regulação ou atividade da hepcidina.

A hemocromatose tipo I é de longe a hemocromatose hereditária mais frequente, correspondendo a mais de 90% dos casos.<sup>269</sup>

A descoberta da proteína HFE e do gene que a codifica remonta apenas ao ano de 1996, quando Feder e colaboradores descobriram que a mutação 845G→A no então denominado gene *HLA-H*, em homozigotia, estava presente em cerca de 80% dos doentes com hemocromatose, levando à substituição da cisteína pela tirosina na posição 282 desta proteína (C282Y).<sup>548</sup>

A HFE é uma proteína expressada em quase todos os tecidos, e, como outras moléculas do complexo major de histocompatibilidade de classe I, tem a propriedade de se associar à  $\beta$ 2-microglobulina na membrana celular.<sup>549, 550</sup>

Este complexo é capaz de se ligar aos recetores da transferrina. As mutações do gene *HFE* responsáveis pela hemocromatose hereditária tipo I codificam uma proteína que não se associa corretamente à  $\beta$ 2-microglobulina,

tornando-se este complexo incapaz de ser transportado para a membrana citoplasmática e aí ligar-se aos recetores da transferrina, particularmente os TfR2, pelo que o hepatócito perde o seu sensor da saturação da transferrina plasmática; a expressão da hepcidina é afetada por diminuição do estímulo da via de sinalização BMP-6 / SMAD. <sup>551, 552, 553, 554, 555, 556</sup>

Com níveis de hepcidina inapropriadamente baixos para os níveis de ferro do organismo, a absorção intestinal fica desregulada e a ferroportina-1 não suprimida permite a passagem de quantidades substanciais de ferro da dieta para o plasma, levando à sobrecarga desse composto. <sup>557, 558, 559, 560</sup>

A mutação C282Y é por alguns considerada um polimorfismo tal a sua frequência na população caucasiana: 6,2% numa meta-análise de 36 estudos envolvendo mais de 127 000 doentes (com variações desde os 12,5% da Irlanda até valores entre 0 e 3,2% no sul da Europa). Para esta frequência alélica estima-se uma frequência de homozigotos C282Y de 0,39% ou 1/260 nessa população. O diagnóstico de hemocromatose hereditária relacionada com o *HFE* requer a presença desta homozigotia. <sup>561, 562, 563, 564</sup>

Fora da Europa ou em locais com populações não descendentes de europeus, a mutação C282Y é praticamente desconhecida. <sup>565, 566, 567, 568, 569</sup>

A presença da mutação em heterozigotia não parece conferir qualquer propensão ao aumento da absorção de ferro. <sup>570, 571</sup>

No que respeita a Portugal, a frequência alélica difere também entre as diversas regiões do país. O norte apresenta uma frequência alélica do C282Y de 5%, o centro, conjuntamente com Lisboa e vale do Tejo apresenta entre 3 a 5%, o Alentejo entre 1 a 3%, enquanto que os Algarvios apresentam uma frequência alélica inferior a 1%, <sup>572</sup> curiosamente esta semelhante à encontrada na Ilha da Madeira. <sup>573</sup>

Outros polimorfismos do *HFE* são o H63D, com uma frequência alélica de 14%, e com pouca variação geográfica, e o mais raro S65C, com uma frequência de 0,5%. A interpretação da presença destas mutações requer alguma reserva. Por exemplo, como já vimos, enquanto a homozigotia C282Y está presente em 80% dos casos de hemocromatose, a heterozigotia composta C282Y/H63D é encontrada em apenas 5,3% dos casos, comparada com a sua prevalência de 1,3% na população em geral. A homozigotia H63D não é condição suficiente para causar sobrecarga de ferro, e a presença da mutação S65D parece ter apenas relevância quando herdada em conjunto com a homozigotia C282Y, parecendo agravar o quadro de sobrecarga de ferro.<sup>561, 574</sup>

De facto, os heterozigotos compostos C282Y/H63D, ou os homozigotos H63D, apesar de poderem apresentar aumentos discretos da saturação da transferrina e da ferritina sérica, não desenvolvem doença clínica, pelo que, quando aparecem manifestações de lesão tecidual associada a sobrecarga de ferro, é mandatório procurar outras causas associadas.<sup>575, 576, 577, 578, 579, 580</sup>

De salientar a muito maior homogeneidade da distribuição da mutação H63D, estimando-se que possa ter aparecido no território que é agora o País Basco, onde a prevalência do H63D chega a atingir os 27,4%.<sup>581, 582</sup> Na Ilha da Madeira esta também parece ser elevada, com 20,5%.<sup>573</sup>

Pouco depois de ter sido identificado o gene *HFE*, em estudos familiares, foi notado que nem todos os casos de homozigotia apresentavam expressão clínica da doença.<sup>583, 584</sup>

De facto, mesmo nos homozigotos C282Y, a penetrância da doença clínica é muito baixa - 13,5%, levando a pensar que outros cofatores estarão associados para a manifestação clínica da hemocromatose hereditária.<sup>561, 585, 586, 587</sup> Num estudo

prospetivo em mais de 30 000 pessoas com seguimento a 12 anos, dos homozigotos, apenas 28,4% dos homens e 1,2% das mulheres desenvolveram doenças relacionadas com a sobrecarga de ferro.<sup>588</sup>

Um dos fatores que mais contribuirá para a sobrecarga de ferro e evolução para cirrose hepática nos homozigotos C282Y será o alcoolismo concomitante.<sup>589,</sup>  
590

A apresentação clássica da doença ocorre na meia-idade, com hepatomegalia, cirrose de origem desconhecida, pele bronzeada, diabetes, artrite, hipogonadismo, insuficiência e perturbações do ritmo cardíaco. Hoje em dia é muito raro a hemocromatose ser diagnosticada com um quadro tão florido, pois o estudo de doentes em fases mais precoces, que se apresentam com fadiga, mal-estar inespecífico, artralguas e hepatomegalia rapidamente leva à descoberta de valores aumentados de ferritina e de saturação da transferrina.<sup>554, 591, 592, 593, 594</sup>

A associação com carcinoma hepatocelular é também frequente, tendo sido reportado um risco relativo 200 vezes superior em relação à população em geral.<sup>595, 596</sup>

Neste momento, o achado da homozigotia C282Y num doente com evidência analítica de sobrecarga de ferro é suficiente para estabelecer o diagnóstico de hemocromatose hereditária associada ao *HFE*. A biopsia pode revelar-se necessária nos casos em que é preciso demonstrar a sobrecarga de ferro, quando existe apenas hiperferritinemia, por exemplo, ou para avaliar a existência de fibrose, cirrose ou de outra patologia hepática concomitante.<sup>561, 597, 598</sup>

Deve-se ter em conta que valores de ferritina inferiores a 1000 µg/L e AST normal, na ausência de hepatomegalia, tem um forte valor preditivo negativo para a existência de fibrose importante ou cirrose.<sup>599, 600, 601</sup>



## **4.10. Doenças Adquiridas com Sobrecarga Hepática de Ferro**

Este grupo corresponde a um leque heterogéneo de doenças, entre as quais se integra a DHA, que pela sua importância neste trabalho se abordará isoladamente noutra capítulo. Entre outras que valerá a pena mencionar, estão (quadro III):

### **4.10.1. Síndromes Mielodisplásicas**

As mielodisplasias adquiridas geralmente causam eritropoiese ineficaz e anemia, tendendo a causar sobrecarga de ferro pelos mesmos mecanismos das anemias hereditárias.<sup>463</sup>

### **4.10.2. Doenças Hepáticas Crónicas**

Todas as doenças crónicas do fígado apresentam o potencial para causar sobrecarga hepática de ferro. Por um lado, a necroinflamação crónica leva à libertação de grandes quantidades de ferritina dos hepatócitos, que posteriormente é fagocitada e armazenada nas células de Kupffer, causando uma redistribuição nos depósitos de ferro característica das doenças hepáticas crónicas. Para além disso, especula-se que os estádios tardios de cirrose hepática, com diminuição da capacidade sintética de muitas das proteínas do plasma, incluindo a transferrina e a hepcidina, poderão levar a um aumento de absorção de ferro e consequente deposição nos hepatócitos.<sup>279, 602, 603</sup>

*À posteriori*, a distinção entre uma cirrose causada por hemocromatose e por outras causas pode mesmo ser difícil, no entanto a distinção pode-se geralmente

fazer pela ausência de mutações ligadas às hemocromatoses, pela distribuição heterogénea do ferro no parênquima, e pela ausência de depósitos de ferro nos septos fibrosos.<sup>707</sup>

Outras doenças hepáticas apresentam alguns mecanismos em particular que facilitam a deposição de ferro no fígado, e que vale a pena referir:

a) A **hepatite C crónica** (HCC) está associada com alterações da homeostasia do ferro, com aumento da ferritina sérica e dos depósitos de ferro hepático em cerca de 50% dos doentes. Este facto é muito mais frequente do que na hepatite B crónica, por exemplo, e desde logo não se encontrou nenhuma associação com a presença de polimorfismos do *HFE*, sugerindo que um outro mecanismo, específico desta infeção, pudesse condicionar essa sobrecarga de ferro.<sup>604, 605, 606, 607</sup>

A ferritina sérica e os depósitos hepáticos de ferro correlacionam-se com a progressão da doença, com o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular, e podem estar relacionados com a resposta ao tratamento com interferão e ribavirina. Alguns estudos demonstraram que a realização de flebotomias pode melhorar a função hepática e a histologia.<sup>608, 609, 610, 611, 612</sup>

Com efeito, demonstrou-se que a expressão de hepcidina na HCC se encontra bastante diminuída, especialmente em comparação com a hepatite B crónica. Estudos experimentais suportam a hipótese de que este facto seja consequência de uma inibição direta do promotor *C/EBP- $\alpha$*  por espécies reativas de oxigénio (ROS) induzidas pela replicação do HCV, pois os valores de hepcidina não se correlacionavam com a simples presença de inflamação, aferida pela presença de IL-6.<sup>613, 614</sup> Outro possível mecanismo que foi recentemente reportado é a modulação pelo vírus da hepatite C de supressores da sinalização das citocinas

(SOCS - *Suppressor Of Cytokine Signaling*), que são reguladores negativos das JAK cinases. A sobre-expressão do SOCS 1 e SOCS 3 está relacionada com a supressão do STAT3 e consequente diminuição da transcrição do *HAMP*.<sup>615</sup>

Demonstrou-se também que após uma resposta virológica sustentada a expressão da hepcidina, previamente diminuída, volta ao normal, confirmando o efeito direto do vírus na indução da sobrecarga de ferro.<sup>616, 617</sup>

**b) Sobrecarga Exógena de Ferro** - a suplementação não controlada com ferro oral pode causar aumento da concentração do ferro hepático e da ferritina sérica, como foi já demonstrado em atletas de alta competição.<sup>618</sup> Múltiplas transfusões (cada unidade de sangue contém 200-250mg) e administração endovenosa de ferro podem causar também sobrecarga, como por exemplo em doentes em programa de hemodiálise.<sup>619</sup>

**d) Esteatose / Esteatohepatite Não Alcoólica** - Tinha já sido descrito em 1997 uma ligeira sobrecarga hepática de ferro, não associada ao *HFE*, que se encontrava em associação com a obesidade, dislipidemia, diabetes e hipertensão.<sup>620</sup> A associação com quadros de resistência à insulina rapidamente se fez notar,<sup>621</sup> especialmente em associação com a existência de fígado gordo não alcoólico.<sup>622,</sup><sup>623</sup> Foi na altura designado por síndrome dismetabólico de sobrecarga de ferro (*Dysmetabolic Iron-Overload Syndrome* - DIOS).<sup>624, 625</sup>

De facto, cerca de 30% dos doentes com fígado gordo não alcoólico apresentam sobrecarga de ferro, traduzida por valores elevados de ferritina em circulação.<sup>621, 626, 627</sup>

Curiosamente, foi já demonstrado que os níveis de expressão de hepcidina nos diabéticos tipo 2 e em doentes com DIOS são mais elevados do que o normal.<sup>628, 629, 630</sup> Portanto, ou ainda assim a elevação da hepcidina não apresenta uma magnitude apropriada para o nível de sobrecarga de ferro, ou existe um mecanismo de resistência à ação da hepcidina.<sup>269</sup>

Os adipócitos são também um local de síntese de hepcidina, normalmente em níveis 150 vezes mais baixos do que no fígado. Este valor sobe significativamente em casos de grande obesidade, especialmente quando a massa gorda ultrapassa em 20 vezes a do fígado;<sup>631</sup> no entanto, o papel fisiológico desta síntese periférica de hepcidina não está bem esclarecido, até porque parece haver um mecanismo de sinalização entre o tecido adiposo e o fígado, já que a hipóxia dos adipócitos leva a um aumento de hepcidina hepática.<sup>632, 633</sup>

**e) Hemocromatose Neonatal:** Esta doença apresenta-se com insuficiência hepática grave, que se inicia ainda *in utero*, associada a siderose hepática e noutros tecidos, especialmente no sistema retículo-endotelial. Normalmente causa a morte poucos dias após o nascimento por falência multiorgânica. A sua fisiopatologia é desconhecida, tendo-se proposto um eventual mecanismo de gestão defeituosa do transporte do ferro pela placenta; mais recentemente a hipótese mais considerada é a de se tratar de uma doença aloimune da gravidez, com anticorpos contra um antigénio do fígado fetal.<sup>619, 634, 635</sup>

**f) Doença Hepática Alcoólica** - será abordada em mais detalhe a seguir.

Quadro III. Doenças adquiridas com sobrecarga hepática de ferro.

---

Síndromes mielodisplásicas

Doenças hepáticas crônicas:

DHA

Hepatite C

Esteatose / esteatohepatite não alcoólica

Sobrecarga exógena de ferro

Hemocromatose neonatal

---



## 4.11. Ferro e Álcool

### 4.11.1. Relação Entre Consumo Alcoólico e Sobrecarga de Ferro

A relação entre aumento de depósitos de ferro e doença hepática alcoólica é já bem conhecida desde há muitos anos. Em 1896, Gilbert e Grenet afirmavam que a hemocromatose não era mais que uma variante da cirrose alcoólica - "cirrose alcoólica hipertrófica pigmentada". Com o aparecimento da biopsia hepática percutânea, este conceito ganhou força, pois o aparecimento de depósitos de ferro nos fígados cirróticos era comum, especialmente nos casos de cirrose alcoólica. Mesmo já em 1964, o conceituado patologista Richard MacDonald persistia em afirmar que a hemocromatose era uma forma de cirrose alcoólica, provindo o ferro da dieta e do vinho tinto.<sup>636, 637</sup>

Cerca de 33% dos alcoólicos apresentam depósitos de ferro aumentados no fígado,<sup>638</sup> excedendo esta percentagem os 50% em casos de doença hepática alcoólica terminal.<sup>639</sup> Ainda assim, os depósitos de ferro hepáticos nunca atingem a mesma intensidade da hemocromatose hereditária, e estes tendem a ser mistos, parenquimatosos e retículo-endoteliais - por contraponto com a hemocromatose, onde são essencialmente parenquimatosos.<sup>640, 641</sup> Para além do fígado, pode ser detetada uma sobrecarga de ferro noutros órgãos na DHA: os mais comuns são o coração e o pâncreas.<sup>642</sup>

O ferro sérico e a ferritina aumentam progressivamente consoante o consumo diário de álcool; o consumo de cerveja parece estar relacionado com uma

superior absorção de ferro, talvez devido à elevada concentração deste metal que alguns tipos de cerveja possuem.<sup>643</sup>

É também sabido que a ferritina sérica é mais elevada na DHA, em comparação com outras doenças hepáticas crónicas, como doenças autoimunes ou hepatite crónica a vírus C. Durante a abstinência alcoólica, os valores de ferritina baixam rapidamente.<sup>644, 645</sup>

O consumo de álcool é mesmo uma das principais causas do aumento da ferritina sérica na população em geral.<sup>646, 647</sup>

Mesmo consumos ligeiros parecem afetar de algum modo a regulação do metabolismo de ferro pelo organismo. A partir de duas bebidas por dia, existe uma diferença significativa na ferritina sérica e saturação da transferrina em relação a não bebedores. Ainda com consumos inferiores a duas bebidas por dia, existe uma diminuição do risco de anemia ferripriva de 40%.<sup>648</sup>

Para além da elevação da ferritina e da saturação da transferrina nos alcoólicos, encontram-se evidências de um aumento no plasma de ferro livre, não ligado à transferrina (em 83,7% dos consumidores ativos contra 21,2% dos abstémios), mesmo naqueles com saturações de transferrina inferiores a 45%.<sup>649</sup>

Vimos já que esta forma de ferro livre é altamente reativa, e de facto encontra-se no plasma de doentes com DHA um aumento de marcadores de stress oxidativo, como a tioredoxina.<sup>650</sup>

#### **4.11.2. Fisiopatologia da Sobrecarga de Ferro na DHA**

Na DHA, coexistem diversos fatores que podem ser responsáveis pela sobrecarga de ferro: aumento no aporte, absorção intestinal aumentada, sobre-



expressão do TfR1 hepático, hemólise, hiperesplenismo, eritropoiese ineficaz devido a carências vitamínicas e toxicidade medular direta, e hipóxia devido a shunts intrapulmonares e porto-sistêmicos.<sup>640</sup>

Sabia-se já que a desregulação intestinal da absorção de ferro tinha certamente um papel na sobrecarga de ferro associada à DHA, tendo-se demonstrado, por técnicas de medicina nuclear, uma maior absorção de <sup>59</sup>Fe por alcoólicos crônicos - cerca do dobro em relação ao normal.<sup>651</sup> Este efeito tinha já sido verificado e associado, na altura, a uma deficiência concomitante de ácido fólico.<sup>652</sup>

Evidenciaram-se entretanto, com a ingestão de álcool, alterações a nível duodenal, com um aumento da passagem do ferro férrico intraluminal a ferro ferroso, aumento do DMT-1 na membrana apical dos enterócitos, e da ferroportina-1 na membrana basolateral.<sup>640</sup>

Objetivou-se também um aumento da expressão de recetores da transferrina TfR1 nos hepatócitos, levando a pensar que a captação do ferro pelo fígado, apesar da sobrecarga já existente, estava aumentada na DHA.<sup>653, 654</sup>

Após a descoberta da hepcidina e do seu papel fundamental na regulação do metabolismo do ferro, particularmente da sua absorção, as atenções viraram-se para o efeito do etanol na síntese hepática dessa proteína.

Sem surpresa, verificou-se experimentalmente que o etanol provocava uma diminuição da expressão do ARNm da hepcidina, de uma forma independente da ativação das células de Kupffer e da expressão de TNF- $\alpha$ , quer *in vitro*, quer *in vivo*. O efeito não era dependente do etanol em si, mas do seu metabolismo, pois com a administração concomitante de 4-metilpirazol, um inibidor específico das enzimas metabolizadoras do álcool, não se verificava qualquer alteração da

transcrição. Para além disso, o acetaldeído isolado era também capaz de inibir a transcrição da hepcidina. Verificou-se que a redução da transcrição da hepcidina era provocada pela inibição quer do promotor do *HAMP*, quer do fator de transcrição C/EBP $\alpha$ .<sup>655, 656, 657</sup>

Em humanos com DHA, foi também demonstrada uma diminuição dos níveis séricos de pro-hepcidina em relação a controlos.<sup>658</sup>

Estes achados implicavam que, provavelmente, o promotor do *HAMP* e o C/EBP $\alpha$  eram inibidos pelo stress oxidativo das vias de metabolização do álcool, com o aumento da relação NADH/NAD<sup>+</sup> e a formação de ROS. Esta hipótese era corroborada pela ausência de inibição do C/EBP $\alpha$  com a adição de antioxidantes.<sup>655</sup> Aliás, a regulação da transcrição dos genes causada pelo nível de stress oxidativo celular tinha sido já bem descrita.<sup>659</sup>

Esta parece ser uma via comum partilhada pelo álcool, hepatite C crónica e NASH no que respeita à diminuição da hepcidina com a consequente sobrecarga de ferro que caracteriza estas doenças.<sup>660</sup>

Para além disso, o álcool parece diminuir a resposta da transcrição de hepcidina ao estímulo da IL-6<sup>661</sup> e da sobrecarga de ferro.<sup>662</sup> Provavelmente, isto acontece devido à inibição dos recetores das BMP, bem como dos SMAD-1 e SMAD-5, que recentemente se demonstrou ocorrer com a administração de álcool.<sup>663</sup>

Deste modo, é fácil de compreender que o metabolismo de quantidades elevadas de etanol, de forma continuada, pode levar a uma espiral de supressão da hepcidina com consequente aumento da sobrecarga hepática de ferro.<sup>664</sup>

Após transplante hepático por DHA foi já documentada a elevação dos níveis de hepcidina ao mesmo tempo que diminuía a ferritina sérica.<sup>665</sup>

A relação entre polimorfismos do *HFE* e sobrecarga de ferro / evolução da DHA é também controversa.<sup>666, 667</sup>

A administração de álcool a ratinhos com mutações *HFE* (homozigotos e heterozigotos) levou a um subsequente aumento da absorção intestinal e dos níveis de ferro, associado a uma diminuição ainda maior dos níveis de hepcidina.<sup>668, 669</sup>

Numa população espanhola com DHA avançada, o achado de polimorfismos H63D foi mais frequente do que na população em geral. Estimou-se um risco relativo de 1,66, com um intervalo de confiança a 95% de 1,10-2,52 (p=0,01). Não se encontrou relação com a mutação C282Y.<sup>670</sup>

Em Portugal, foi também encontrada esta associação entre a presença de uma mutação H63D e a ocorrência de doença hepática nos alcoólicos. Num grupo com consumo superior a 80 g de álcool por dia e com doença hepática comprovada por biopsia ou por descompensação clínica, a prevalência dessa mutação era superior a outro grupo com consumos alcoólicos equivalentes, mas sem evidência de doença hepática; o risco relativo era de 1,57, com um intervalo de confiança a 95% de 1,02-2,40 (p=0,02).<sup>671</sup>

Contudo, na maior parte dos estudos que abordaram este tema, não foi encontrada qualquer relação entre a heterozigotia para as mutações *HFE* e o risco de desenvolver doença hepática alcoólica.

Um estudo inglês em Newcastle, envolvendo 257 doentes com DHA e 117 controlos não detetou qualquer associação entre a presença de mutações *HFE* e a concentração de ferro hepática ou o risco de fibrose avançada.<sup>672</sup> Um outro, em Sheffield, também não mostrou diferenças na frequência das mutações *HFE* entre dois grupos de alcoólicos, uns com cirrose e outros sem doença hepática.<sup>673</sup>

Outro trabalho numa população espanhola, pesquisou a existência de mutações C282Y e H63D em três grupos, com cirrose alcoólica, cirrose por hepatite C crônica e controles saudáveis. Não foram contudo detetadas diferenças na frequência entre os grupos, apesar de a heterozigotia C282Y ser muito mais frequente (20,9%) num subgrupo de doentes com cirrose alcoólica e carcinoma hepatocelular, do que naqueles sem tumor.<sup>674</sup>

Na Suíça também não foi possível associar a heterozigotia C282Y ao maior risco de cirrose alcoólica.<sup>675</sup> Na Nova Zelândia, num contexto de internamento para tratamento da dependência alcoólica, a prevalência das mutações *HFE* também não foi diferente da população em geral, nem se encontrou nenhuma relação entre *HFE* e função hepática ou níveis de depósitos de ferro.<sup>676</sup> Na Austrália os resultados foram similares,<sup>639, 677</sup> bem como na Polónia.<sup>678</sup>

#### **4.11.3. Contribuição da Sobrecarga de Ferro para a evolução da DHA**

A quantidade de ferro intra-hepático na DHA correlaciona-se com o risco de desenvolver fibrose;<sup>679</sup> na cirrose alcoólica, a presença de depósitos de ferro hepático correlaciona-se inversamente com a sobrevida.<sup>680</sup>

O aumento do ferro nos hepatócitos poderá ser um fator envolvido no desenvolvimento e progressão da esteatohepatite alcoólica, pelo aumento do stress oxidativo.<sup>643, 681, 682</sup>

Um paradigma da sinergia entre álcool e ferro no estabelecimento da doença hepática é a hemocromatose. Quando associada a consumos alcoólicos excessivos, a expressão fenotípica da doença aumenta, traduzida pela elevação do ferro, ferritina e saturação de transferrina, e maior hiperpigmentação da pele.<sup>683</sup>

Esta associação condiciona uma maior incidência de cirrose e carcinoma hepatocelular.<sup>684, 685</sup> Com efeito, doentes com hemocromatose hereditária relacionada com o *HFE* que ingerem mais de 60 g de álcool por dia têm um risco 9 vezes superior de desenvolver cirrose hepática do que aqueles que ingerem quantidades inferiores.<sup>589</sup>

Quando a capacidade de transporte / armazenamento é superada, o ferro livre pode lesar o hepatócito, aumentando significativamente o stress oxidativo, causando morte celular, reações inflamatórias e fibrogénese.<sup>686, 687</sup>

Mesmo sem causar lesão direta, pensa-se que o ferro pode, por si só, ativar respostas inflamatórias. Foi demonstrado experimentalmente que este elemento, nomeadamente o ferro livre intracitoplasmático – LIP, é capaz de atuar como mensageiro intracelular, induzindo através de uma proteína sensível ao estado redox (fator nuclear  $\kappa$ B) a transcrição de ARNm de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- $\alpha$  e a IL-6. A adição de quelantes do ferro, por seu lado, diminuía significativamente a produção destas citocinas.<sup>188, 688, 689, 690</sup> Este mecanismo pode ter relevância no desencadear da esteatohepatite alcoólica, uma vez que o aumento da concentração de ferro nos macrófagos agrava esse quadro.<sup>691</sup>

Foi já demonstrado experimentalmente que a fibrogénese hepática na DHA pode ser exacerbada pela administração concomitante de ferro por 16 semanas. Esta provoca uma concentração hepática de ferro 2 a 3 vezes superior aos controlos com administração isolada de etanol, bem como um aumento 2 vezes superior das aminotransferases e de produtos de peroxidação lipídica, como o MDA e 4-HNE, o que evidencia o aumento do stress oxidativo.<sup>692</sup>

Histologicamente, menos de 30% desses ratinhos a que só foi administrado etanol apresentavam fibrose focal, enquanto que todos os que foram

suplementados com ferro apresentavam fibrose hepática (com fibrose em ponte em 60% dos casos e cirrose micronodular em 17%). Para além disso, este grupo apresentava acentuadas elevações de ARNm de pro-colagénio tipo I e TGF- $\beta$ 1.<sup>692</sup>

As CEH, efetores principais do processo de fibrogénese hepática, apresentam recetores específicos, de alta afinidade, para a transferrina, que induzem a transcrição da  $\alpha$ -actina e pro-colagénio tipo I e para a ferritina.<sup>693, 694</sup>

Com efeito, foi demonstrada a existência de ativação das CEH acima de concentrações de ferro hepático superiores a 60  $\mu$ mol/g, com um aumento da expressão de  $\alpha$ -actina correlacionado com o valor dessas concentrações; esta ativação era revertida com a remoção progressiva do ferro por flebotomias.<sup>695</sup>

Apesar da remoção do ferro em excesso parecer uma terapêutica racional, a verdade é que estudos das décadas de 1960 e 1970 sobre a flebotomia na DHA nunca encontraram nenhum benefício.<sup>696, 697, 698</sup>

No entanto, essa era uma época em que a distinção entre as diversas causas de sobrecarga hepática não era muito clara. Estudos experimentais mais recentes usando quelantes do ferro, como a deferroxamina<sup>699, 700</sup> e a deferiprona<sup>188, 689</sup> mostram um claro benefício; no entanto, a sua aplicabilidade em humanos para este fim é muito limitada, dada a complexidade de administração e efeitos tóxicos. Talvez o quelante de uso clínico mais recente, o deferasirox, encontre uma aplicação neste campo; um recente trabalho na NASH mostrou algum benefício.<sup>701</sup>

---

*Capítulo 5.*

*Trabalho Experimental*

---





---

## 5. Trabalho Experimental

### 5.1. Objetivos

Como já descrevemos, a sobrecarga de ferro está, desde há longa data, associada à DHA, com cerca de um terço dos alcoólicos crónicos a apresentarem uma elevação dos depósitos hepáticos de ferro.<sup>638</sup> Na última década, a compreensão da regulação do metabolismo do ferro no organismo aumentou exponencialmente, após a demonstração do papel central da hepcidina nessa matéria.

Nos estádios tardios de cirrose hepática, a diminuição da capacidade sintética de muitas das proteínas do plasma, incluindo a hepcidina, pode levar a um aumento de absorção de ferro e consequente deposição nos hepatócitos.<sup>279</sup> Apesar disso, a sobrecarga de ferro, na DHA, aparece muito antes da fase de insuficiência hepática.

Foi evidenciado em modelos animais que o metabolismo do etanol causa uma diminuição da expressão do ARNm da hepcidina no fígado,<sup>655, 656, 657</sup> mas, até à data, não encontramos na literatura nenhum trabalho demonstrando essa relação em tecido hepático humano proveniente de doentes com DHA. Foi apenas demonstrada uma diminuição dos níveis séricos de pro-hepcidina em doentes alcoólicos, comparativamente com controlos, com as limitações que esta pro-hormona tem, nomeadamente a falta de correlação com as reservas de ferro, ao contrário da hepcidina.

A contribuição dos diversos polimorfismos do gene *HFE* para a sobrecarga de ferro nos alcoólicos, e para o favorecimento da progressão da DHA, como também descrevemos, é muito controversa, tal os resultados díspares dos vários estudos efetuados neste campo.<sup>666, 667</sup>

Formulámos então as hipóteses de que a fisiopatologia da sobrecarga de ferro na DHA em humanos resulta de:

- 1 - Presença de mutações do gene *HFE*;
- 2 - Alterações da transcrição da hepcidina.

Propusemo-nos a testar estas hipóteses, avaliando estes parâmetros em doentes com DHA por nós seguidos em consulta de Doenças Hepáticas, e comparando-os com controlos saudáveis. Foram também efetuadas comparações entre doentes com várias fases da DHA.

Para além disso, tentámos verificar a adequação da determinação da concentração de ferro hepático na DHA por RMN e caracterizar as alterações das subpopulações linfocitárias que ocorrem nestes doentes.

## 5.2. Materiais e Métodos

O trabalho de investigação clínica e laboratorial foi efetuado no Centro Hospitalar Tondela-Viseu E.P.E., com a colaboração dos serviços de Medicina Interna 1, Cirurgia Geral 1 e Patologia Clínica. A avaliação histológica das amostras das biopsias hepáticas decorreu no serviço de Anatomia Patológica dos Hospitais da Universidade de Coimbra.

As técnicas de biologia molecular em tecido hepático foram efetuadas no BIOCANT – Centro de Investigação em Biotecnologia – em Cantanhede.

Este trabalho foi autorizado pelo Conselho de Administração e Comissão de Ética do, à altura, Hospital S. Teotónio E.P.E, bem com pela Comissão de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

Os casos foram selecionados entre doentes com DHA, seguidos na Consulta de Doenças Hepáticas do Serviço de Medicina Interna 1.

No quadro IV referem-se os critérios de inclusão usados.

Quadro IV. Critérios de inclusão de casos no estudo clínico “Estudo da Cinética do Ferro na DHA”.

---

Doentes com DHA em qualquer estágio de evolução (esteatose/esteatohepatite/cirrose);  
Com alcoolismo ativo ou não;  
Ambos os sexos;  
Idade compreendida entre os 18 e os 80 anos;  
Com indicação para realização de biopsia hepática (percutânea ou transjugular);  
Sem história de hemorragia digestiva nos últimos 3 meses e com ferritina sérica acima do limite inferior da normalidade, correspondente à técnica laboratorial usada;  
Sem história de transfusão de concentrado eritrocitário no último ano;  
Sem outra patologia hepática ou sistémica relevantes;  
Que aceitassem participar no estudo, do qual foram devidamente esclarecidos, tendo assinado consentimento escrito.

---

Durante o tempo de duração do estudo, foram recrutados 73 doentes que cumpriam os critérios de inclusão. Foram excluídos 4 doentes *à posteriori*: dois por apresentarem histologia hepática compatível com hepatite autoimune, que se veio a verificar ser a doença principal; um por apresentar um quadro de sarcoidose, não conhecido até à data; e o último por se ter verificado que, na admissão para biopsia hepática, apresentava uma ferritina sérica inferior ao normal.

Quanto aos controlos, colocava-se o problema ético e técnico de obter amostras de tecido hepático normal. A solução encontrada passou por incluir como controlos os doentes com indicação para serem submetidos a colecistectomia eletiva por litíase vesicular não complicada, sem outras doenças concomitantes, no serviço de Cirurgia 1 do Hospital S. Teotónio em Viseu. A razão para seleccionar estes doentes como controlos prendeu-se com a hipótese de minimizar o desconforto local decorrente da realização da biopsia hepática, uma vez que seria indistinguível daquela atribuída à intervenção cirúrgica, o que de facto se veio a verificar. Estes foram abordados no sentido de permitirem a colheita de uma pequena amostra de fígado durante o procedimento, tendo também assinado consentimento informado. Os critérios de inclusão encontram-se no quadro V.

Quadro V. Critérios de inclusão de controlos no estudo clínico “Estudo da Cinética do Ferro na DHA”.

---

Doentes admitidos para colecistectomia eletiva por litíase vesicular não complicada;

Ambos os sexos;

Com consumos de álcool inferiores a 20 g por dia nas mulheres e 40 g nos homens;

Idade compreendida entre os 18 e os 80 anos;

Sem anemia e com ferritina sérica acima do limite inferior da normalidade, correspondente à técnica laboratorial usada;

ALT, AST, GGT, FA < 3x o limite superior da normalidade;

Sem outra patologia hepática ou sistémica relevantes;

Sem evidência de estado inflamatório (VS e PCR);

Que aceitassem participar no estudo, do qual foram devidamente esclarecidos, tendo assinado consentimento escrito.

---

Os controlos foram submetidos aos mesmos testes laboratoriais dos casos e determinação do ARNm da hepcidina do mesmo modo. Não foi efetuado exame histológico nem quantificação da concentração de ferro hepático por RMN, por se presumir da sua normalidade em pessoas saudáveis sem alterações significativas das provas de função hepática.

Foram recrutados 55 controlos, tendo sido excluídos três – dois por elevação superior a três vezes o limite superior do normal das transaminases, e um por serologia positiva para vírus da hepatite C. Destes, não foi possível, por razões técnicas, efetuar colheita de tecido hepático em 9; dos 43 restantes, apenas foi conseguida a validação da técnica de RT-PCR para determinação do ARNm da hepcidina em 20 controlos.

Os casos foram submetidos aos seguintes procedimentos:

- **História clínica** detalhada, sinais e sintomas de doença hepática, comorbilidades, estimativa de quantidade de álcool ingerida, tipo de bebida.

- **Avaliação laboratorial:** hemograma com leucograma e plaquetas, PTT, protrombinemia, INR, glicose, ureia, creatinina, ionograma, CPK, LDH, ALT, AST, fosfatase alcalina, GGT, bilirrubina total e direta, proteinograma eletroforético, IgA, IgG, IgM, colesterol total, HDL, LDL e triglicédeos, ácido úrico, T3l, T4l, TSH, sumária de urina tipo 2,  $\alpha$ -fetoproteína, AgHBs, anticorpo anti-VHC, ceruloplasmina,  $\alpha$ 1-antitripsina, ferro, ferritina e saturação da transferrina. Todas estas determinações foram efetuadas através das técnicas de rotina comumente usadas no serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar Tondela-Viseu E.P.E.

- **Genotipagem *HFE*:** algumas amostras, na fase inicial do estudo, foram enviadas para o Centro de Genética Médica Preditiva e Preventiva, do Instituto de Biologia Molecular e Celular da Universidade do Porto, por indisponibilidade desta técnica no nosso hospital. A genotipagem era efetuada usando um método de deteção baseado no princípio de hibridização reversa em passos sucessivos: o ADN era isolado de sangue total; os exões 2 e 4 do gene *HFE* eram amplificados simultaneamente (*multiplex*) por PCR; os produtos amplificados eram hibridizados em suporte contendo sondas específicas para as 3 mutações mais comuns (H63D, S65C e C282Y). As sequências ligadas (biotilinas) eram então detetadas pelo sistema de estreptavidina-fosfatase alcalina.

Entretanto, foi possível começar a efetuar essa técnica no nosso laboratório de patologia clínica. A maioria das genotipagens foi então efetuada com o kit *Haemochromatosis StripAssay A* (Vienna Lab). Foi usado sangue fresco colhido em tubos com EDTA, procedendo-se ao isolamento do ADN com *Lysis Solution* (Vienna Lab) e GEN<sup>X</sup>TRACT (Vienna Lab), seguido de amplificação *in vitro* por PCR usando *Taq DNA polymerase*, *Taq Dilution Buffer* e *Amplification Mix*

(Vienna Lab), hibridização com DNAT e *Hybridization Buffer* (Vienna Lab), inserção das fitas teste e lavagem com *Wash Solution A* (Vienna Lab), coloração com *Conjugate Solution* (Vienna Lab) e nova lavagem com *Wash Solution B* (Vienna Lab), seguido de *Color Developer* (Vienna Lab), sendo então possível a interpretação dos resultados consoante as tiras coradas para cada mutação: *Mutant line* (homozigótico), *Wild Type Line* (normal) ou ambas (heterozigótico).

Este teste identifica também mutações mais raras do *HFE* (E168Q, E168X, V59M, H63H, P160delC, Q127H, Q283P, V53M, W164X), bem como mutações do gene da ferroportina-1 e do recetor da transferrina 2.

- **Subpopulações linfocitárias:** também na fase inicial do estudo, não dispúnhamos desta técnica no nosso hospital, sendo esta análise efetuada por citometria de fluxo, no Centro de Histocompatibilidade do Centro, Coimbra. Entretanto, a aquisição pelo serviço de Patologia Clínica do nosso hospital de um citómetro *EPICS XL-MCL* (Coulter), permitiu que a maioria das amostras fossem processadas neste aparelho.

- **Técnicas de ELISA:** as técnicas de ELISA foram efetuadas no serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar Tondela-Viseu E.P.E. com o autoanalisador de microELISA *MAGO PLUS* (Diamedix Corporation):

- **Interleucina 6:** foi usado o kit IL-6-EASIA-CE (DIAsource). Os poços da placa de microtitulação eram revestidos com anticorpos monoclonais dirigidos contra diversos epitopos da IL-6. Os calibradores, controlos e amostras foram incubados durante 60 minutos, seguindo-se a lavagem, e posterior adição de

conjugado anti-IL-6-HRP. Após nova incubação e lavagem, adicionava-se a solução cromogénica, sendo posteriormente medida a absorvância.

- **TNF- $\alpha$** : Foi determinado com o kit TNF- $\alpha$ -EASIA KAP1751 (DIAsource). Os poços da placa de microtitulação eram revestidos com anticorpos monoclonais dirigidos contra diversos epitopos do TNF- $\alpha$ . Os calibradores, controlos e amostras foram incubados durante 60 minutos, seguindo-se a lavagem, e posterior adição de conjugado anti-TNF- $\alpha$ -HRP. Após nova incubação e lavagem, adicionava-se a solução cromogénica, sendo posteriormente medida a absorvância.

- **RMN (1,5 Tesla)** com quantificação de ferro hepático pelo protocolo da Universidade de Rennes. Por não existir um aparelho de ressonância magnética com uma potência de 1,5 tesla no nosso hospital, os doentes foram encaminhados inicialmente para a Imacentro, em Coimbra, e posteriormente para a SIMX, em Viseu, consoante os protocolos acordados com o Hospital S. Teotónio para a realização de exames no exterior.

- **Biopsia hepática** percutânea ou transjugular. As amostras foram fixadas em formaldeído, e posteriormente embebidas em parafina e cortadas. Foram coradas com hematoxilina e eosina (H&E) e com o Azul da Prússia (Perls).

Dada a inexistência de um *score* histológico devidamente validado para a DHA, optámos por usar uma adaptação das características histológicas do *score* estabelecido para a NASH.<sup>42</sup>

Consoante os relatórios histológicos, foram então atribuídas a cada doente as seguintes variáveis - **esteatose** (ausente, ligeira, moderada, grave), **atividade**



**necroinflamatória** (ausente, ligeira, moderada, grave), **fibrose** (ausente, periportal ou perissinusoidal, periportal e perissinusoidal, em ponte, cirrose) e **depósitos de ferro**. Para a avaliação destes últimos, foi usado o método de coloração de Perls, permitindo uma avaliação semiquantitativa. Para este efeito, foi usado o sistema de pontuação de Scheuer. O grau 0 corresponde a grânulos de ferro ausentes ou praticamente não discerníveis com uma ampliação de 400x; o grau 1 a grânulos observados a 400x; o grau 2 a grânulos observados a 100x; o grau 3 a 25x; e o grau 4 a massas de grânulos de ferro visíveis a 10x, ou mesmo a olho nu.<sup>702, 703, 704</sup>

- **Determinação da expressão de ARNm da Hepsidina (*HAMP*)** no tecido hepático por técnica de RT-PCR. As amostras de tecido de biopsia hepática eram colocadas em *RNAlater RNA Stabilization Reagent* (Qiagen) para estabilização dos tecidos e armazenadas a 5°C. No processamento, a homogeneização das amostras era efetuada por duas vezes num *Tissue Lyser* (Qiagen) durante 2 minutos a 30 Hz. Posteriormente, procedia-se ao isolamento do ARN total com *RNeasy Mini Kit* (Qiagen) e eliminação do DNA genómico com *RNase-Free DNase* (Qiagen). A concentração de cada amostra foi determinada por absorvância a um comprimento de onda de 260 nm com um espectrofotómetro *Nanodrop* (Thermo Scientific). A integridade do RNA foi confirmada por electroforese em gel de agarose a 1%, por visualização das bandas 28S e 18S. Uma banda 28S aproximadamente duas vezes mais intensa do que a 18S confirmava essa integridade (figura 11).

Procedia-se então à síntese de ADNc a partir de 1 µg do ARN total, por transcrição inversa usando o *Omniscript RT kit* (Qiagen) usando *primers* oligo-DT. Era então determinado o nível de expressão hepática de hepcidina usando sondas

*TaqMan* de *real-time PCR* com fluorescência (figura 12). Estas sondas são oligonucleótidos lineares contendo um fluoróforo na extremidade 5' e um supressor na extremidade 3'. Desde que a sonda esteja intacta, este supressor absorve a fluorescência da extremidade 5', dado a sua proximidade. Quando a sonda se hibridiza com a sequência genética alvo, é hidrolizada pela atividade de exonuclease da polimerase *TaqDNA*, resultando a separação do fluoróforo do supressor e consequente emissão de fluorescência.

O ADNc servia então de modelo para a reação de PCR usando *primers* específicos e sondas *TaqMan* para a hepcidina e também para a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase - GAPDH - gene *housekeeping*. Era possível fazer essa determinação na mesma reação devido ao uso de sondas com fluoróforos de diferentes comprimentos de onda.

O uso de um gene *housekeeping* como normalizador é necessário para a obtenção de quantificações precisas. A expressão genética destes genes não é suposto diferir entre as amostras, permitindo a normalização dos resultados com a quantidade do ADNc inicial.

O ADNc sintetizado, 2 µl por amostra, era usado num sistema de amplificação de 25 µl contendo sondas *TaqMan* e *primers* com sequências diretas e inversas para a hepcidina e para a GAPDH, *TaqMan Gene Expression Master Mix* (Applied Biosystems) e água livre de RNase. Os *primers* e as sondas *TaqMan* foram desenvolvidas e produzidas pela Applied Biosystems (*Taqman Gene Expression Assays*). Os ensaios foram efetuados em triplicado num sistema de *Real-Time PCR* 7500 da Applied Biosystems, usando as seguintes condições de amplificação: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10min, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto.

Neste sistema, o sinal de fluorescência é detetado durante cada ciclo de PCR, sendo acumulado durante o ensaio. A quantidade inicial de material genético pode ser quantificada através do método de ciclo limite - *threshold cycle* (Ct). Ct é definido pelo número de ciclos requeridos para o sinal de fluorescência ser detetável; o Ct é inversamente proporcional ao logaritmo da quantidade inicial da sequência genética das transcrições pesquisadas. Quanto maior for a quantidade presente inicialmente, menos ciclos se tornam necessários para a fluorescência se tornar detetável acima do sinal de fundo.

A expressão relativa da hepcidina foi calculada usando o método de Ct comparativo. Este determina a diferença na expressão da sequência genética da hepcidina nas amostras dos casos em relação a um calibrador, ou, neste caso, em relação às amostras que serviram de controles. Os valores de Ct de ambos os grupos eram previamente normalizados para a expressão do gene *housekeeping*.

O método Ct comparativo é também conhecido como o método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , onde  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{sample}} - \Delta Ct_{\text{control}} = (Ct_{\text{target}} - Ct_{\text{reference}})_{\text{sample}} - (Ct_{\text{target}} - Ct_{\text{reference}})_{\text{control}}$ .  $\Delta Ct_{\text{sample}}$  é o valor de Ct para cada caso, e o  $\Delta Ct_{\text{control}}$  é o valor de Ct para os controles, ambos previamente normalizados. Neste caso, o  $\Delta Ct_{\text{control}}$  corresponde à média dos controles do estudo. Os dados foram então analisados usando o software *Relative Quantification Study* v2.0.4 (Applied Biosystems).

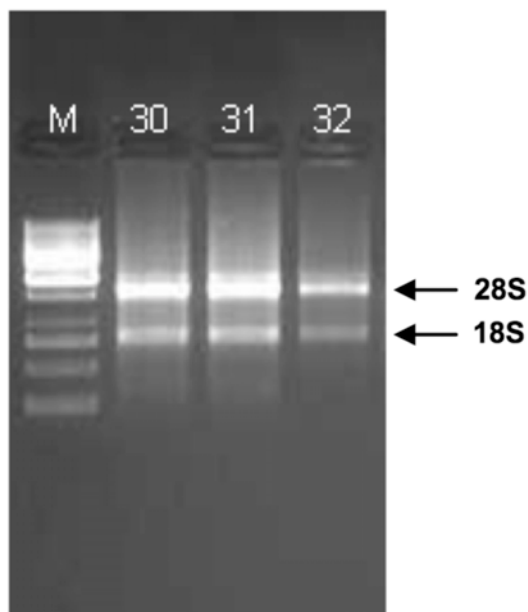


Figura 11. ARN total de três amostras de tecido hepático (150,1 ng/μl, 121,34 ng/μl e 39,8 ng/μl). As bandas 28S e 18S do ARN ribossômico foram visualizadas, confirmando a integridade do ARN total. M: Marcador do tamanho do peso molecular.

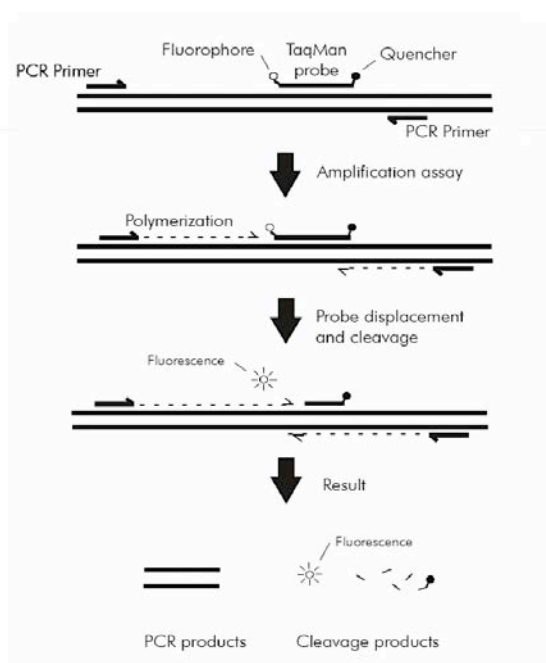


Figura 12. Determinação do nível de expressão hepática de hepcidina usando sondas *TaqMan* de *real-time PCR* com fluorescência.

- **Avaliação estatística dos dados:** A avaliação estatística da expressão gênica da hepcidina usando o método Ct comparativo ou método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  foi efetuada com o software REST 2009 v2.0.13 (Qiagen).

Toda a restante avaliação foi efetuada com o software *SPSS Statistics Data Editor* 20 (IBM). Caracterizaram-se as populações com estatística descritiva, com médias, desvio padrão e percentagens. As variáveis nominais foram analisadas com

o teste do *qui* quadrado (corrigido ou com o teste exato de Fischer, quando apropriado). Determinou-se a normalidade ou não da distribuição das variáveis contínuas com o teste de Shapiro-Wilk, e efetuou-se a comparação de médias entre dois grupos com o teste T de Student ou com o teste não paramétrico de Mann-Whitney U, conforme apropriado. Para comparar médias entre mais de dois grupos, foi usado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis *1 way* ANOVA.

O cálculo do risco relativo foi efetuado através de regressões logísticas multivariadas, descritas caso a caso. Nas correlações mencionadas foi usado o coeficiente de correlação de Spearman. No estudo da hepcidina, tentou-se construir um modelo explicativo para os níveis de expressão da hepcidina através de uma análise multivariada de regressão linear.

Por motivos técnicos e logísticos, nem sempre foi possível efetuar a totalidade dos exames, mas tal facto foi sempre tido em conta no processamento estatístico dos dados. Devido a esta limitação, optámos por dividir o trabalho em vários sub-estudos, consoante os objetivos traçados, onde cada população disponível é caracterizada individualmente. O *n* dos casos / controlos difere entre esses estudos por esta razão.



### **5.3. Alterações do Metabolismo do Ferro na Doença Hepática Alcoólica e Relação com Mutações do Gene *HFE***

#### **5.3.1. Introdução e Objetivos**

Neste trabalho pretendemos avaliar a prevalência de mutações *HFE* e a cinética do ferro em doentes com DHA comparativamente com controlos saudáveis; e se a presença de mutações *HFE* na DHA condiciona uma maior sobrecarga de ferro, atividade necroinflamatória e fibrose.

#### **5.3.2. Material e Métodos**

Foi pesquisada a existência das mutações *HFE* C282Y, H63D e S65C em 63 casos e 52 controlos. Comparámos as frequências dos genótipos *HFE* entre os casos e os controlos.

Em seguida, considerámos apenas os casos e dividimos estes em dois grupos: aqueles com pelo menos uma mutação *HFE* e aqueles com genótipo *wild type*. Efetuámos uma comparação dos parâmetros clínicos e laboratoriais entre estes dois grupos, particularmente dos parâmetros laboratoriais da cinética do ferro e da histologia hepática com a avaliação semiquantitativa dos depósitos de ferro e a gradação e estadiamento da DHA. Neste sentido, foi efetuada uma análise multivariada de regressão logística, usando como co-variáveis a idade, sexo, índice de massa corporal, presença de alcoolismo ativo, MELD, hemoglobina, PCR,

ferritina sérica, saturação da transferrina e presença de pelo menos uma mutação *HFE* para calcular o risco relativo. Este, com intervalos de confiança a 95%, foi determinado para os desfechos: depósitos de ferro hepático < grau 2 (escala semiquantitativa de Scheuer para a coloração de Perls) vs depósitos de ferro hepático  $\geq$  grau 2; existência de atividade necroinflamatória significativa (moderada ou grave) vs ausência de atividade necroinflamatória significativa (ausente ou ligeira); fibrose significativa (perissinusoidal e portal/peripoortal, fibrose em ponte ou cirrose), vs fibrose não significativa (ausência, fibrose perissinusoidal ou portal/peripoortal).

Foi também pesquisada a existência de correlações significativas entre as diversas variáveis.

### **5.3.3. Resultados**

Apresenta-se no quadro VI a comparação clínica e laboratorial entre casos (com DHA) e controlos saudáveis. Verificamos que a idade média era semelhante. A percentagem de indivíduos do sexo masculino foi superior no grupo dos casos (característico dos doentes com DHA), comparativamente com os controlos. Dos doentes, 61,9% apresentavam consumo ativo de bebidas alcoólicas, tendo-se verificado ao exame histológico da biopsia hepática que 61,5% apresentavam fibrose significativa e 41,3% apresentavam já cirrose.

O MELD médio era de 7,7. O consumo médio diário reportado pelos casos foi de 100,8 gramas de álcool por dia.



Apesar da diferença na distribuição dos sexos, o valor de hemoglobina médio foi ligeiramente superior no grupo de controlos, apesar de não ser estatisticamente significativa.

A creatinina era ligeiramente mais alta no grupo dos casos, mas ambos dentro de valores normais, mesmo considerando os desvios padrões.

Também não houve diferenças significativas entre a contagem de leucócitos e PCR, de modo a excluir estados inflamatórios / infecciosos que pudessem modificar a cinética do ferro.

A ferritina sérica e a saturação da transferrina eram significativamente superiores nos casos (450,24 ng/mL vs 160,64 ng/mL,  $p < 0,0001$  e 39,4% vs 30,12%,  $p = 0,035$ ).

Quadro VI. Comparação clínica e laboratorial entre casos e controlos.

	<b>Casos (n=63)</b>	<b>Controlos (n=52)</b>	<b>p</b>
<b>Idade</b>	53,2+/-10,7	48,4+/-15,4	NS
<b>% homens</b>	84,1%	28,8%	<0,0001
<b>Alcoolismo ativo</b>	61,9%	-	-
<b>Consumo diário (g)</b>	100,8+/-88,4	-	-
<b>Consumo total (Kg)</b>	2227,6+/-1044,3	-	-
<b>Fibrose significativa *</b>	65,1%	-	-
<b>Existência de cirrose</b>	41,3%	-	-
<b>MELD</b>	7,6+/4,6	-	-
<b>Leucócitos (x10<sup>9</sup>/L)</b>	6,0+/-2,1	6,4+/-1,7	NS
<b>Hemoglobina (g/L)</b>	13,5+/-1,1	13,9+/-1,1	NS
<b>Creatinina (mg/dl)</b>	0,9+/-0,3	0,8+/-0,2	0,036
<b>Ferro (ug/dL)</b>	115,6+/-58,4	97,1+/-37,1	NS
<b>Ferritina (ng/mL)</b>	450,2+/-404,6	160,6+/-131,2	<0,0001
<b>Saturação transferrina %</b>	39,4+/-19,9	30,1+/-11,8	0,035
<b>PCR (mg/dL)</b>	1,0+/-1,6	0,5+/-0,7	NS

\*fibrose perissinusoidal e portal/peripoportal, em ponte ou cirrose

No que respeita à pesquisa de mutações *HFE*, foram apenas encontradas as C282Y, H63D e S65C. Nenhuma das outras mutações *HFE*, da ferroportina-1 ou do recetor da transferrina 2 foram detetadas nas populações estudadas.

Não encontramos diferenças significativas na distribuição dos genótipos entre casos e controlos (quadro VII). Apesar de apenas terem sido encontradas mutações C282Y em heterozigotia simples ou em heterozigotia composta com o H63D nos casos, a prevalência de genótipos *wild type* (*wt/wt*) ser ligeiramente inferior, e a existência de qualquer mutação *HFE* ligeiramente superior nos casos, nenhuma destas diferenças apresentou significância estatística. Já o genótipo mais frequente entre os não *wild type*, a heterozigotia simples H63D (*wt/H63D*) encontra-

se identicamente distribuído entre os 2 grupos, e o genótipo *wt/S65C* foi até ligeiramente mais frequente nos controlos.

Quadro VII. Frequência dos genótipos *HFE*.

	Casos (n=63)	Controlos (n=52)	p
<i>wt/wt</i>	61,9%	65,4%	NS
<i>wt/C282Y</i>	1,6%	0%	NS
<b>C282Y/H63D</b>	3,2%	0%	NS
<i>wt/H63D</i>	27%	26,9%	NS
<b>H63D/H63D</b>	3,2%	1,9%	NS
<i>wt/S65C</i>	1,6%	5,8%	NS
<b>H63D/S65C</b>	1,6%	0%	NS
<b>Existência de qualquer mutação <i>HFE</i></b>	38,1%	32,7%	NS

Considerando apenas os casos (quadro VIII), dividimos estes em dois subgrupos: aqueles que apresentam pelo menos uma mutação *HFE*, e os restantes com genótipo *wild type*. Foram consideradas as variáveis: idade, % de homens, índice de massa corporal (IMC), % de alcoolismo ativo, consumo diário e total ao longo da vida de álcool (g), existência de fibrose significativa (considerada como fibrose periportal e perissinusoidal, fibrose em ponte ou cirrose), existência de atividade necroinflamatória moderada ou grave, presença de depósitos de ferro significativos (grau 2 ou superior), ferro, ferritina, saturação da transferrina séricos, hemograma, função hepática e PCR.

Verificámos que os doentes que possuem pelo menos uma mutação *HFE* apresentam depósitos significativos de ferro na biopsia hepática (grau 2 ou superior) com uma frequência mais elevada do que os *wild type* (37,5% vs 12,8%, p=0,031). Existe também uma tendência no grupo das mutações *HFE* para valores de ferritina

sérica mais elevada (512,3 ng/mL vs 412,1 ng/mL). Todas as outras variáveis não apresentaram diferenças significativas.

Quadro VIII. Comparação clínica e laboratorial entre casos com e sem mutações HFE.

	<b>Existência de pelo menos uma mutação HFE (n=24)</b>	<b>Sem qualquer mutação HFE (wt/wt) (n=39)</b>	<b>p</b>
<b>Idade</b>	52,0+/-10,8	53,9+/-10,8	NS
<b>% homens</b>	79,2%	87,2%	NS
<b>IMC</b>	26,6+/-3,0	26,8+/-3,4	NS
<b>Alcoolismo ativo</b>	54,2%	66,7%	NS
<b>Consumo diário (g)</b>	89,2+/-87,2	108,3+/-89,4	NS
<b>Consumo total (Kg)</b>	2277,6+/-1127,5	2196,9+/-1003,8	NS
<b>Existência de fibrose *</b>	58,3%	69,2%	NS
<b>Atividade necroinflamatória **</b>	20,8%	30,8%	NS
<b>Depósitos de ferro ***</b>	37,5%	12,8%	0,031
<b>Ferro sérico (ug/dL)</b>	118,5+/-58,0	113,8+/-59,3	NS
<b>Ferritina (ng/mL)</b>	512,3+/-469,5	412,1+/-360,3	NS
<b>Saturação transferrina %</b>	41,1%+/-22,3	38,4%+/-18,5	NS
<b>MELD</b>	7,1+/-4,4	8,0+/-4,7	NS
<b>Leucócitos (x10<sup>9</sup>/L)</b>	6,2+/-2,1	5,9+/-2,1	NS
<b>Neutrófilos (x10<sup>9</sup>/L)</b>	3,9+/-1,8	3,7+/-1,6	NS
<b>Linfócitos (x10<sup>9</sup>/L)</b>	1,6+/-0,5	1,5+/-0,6	NS
<b>Hemoglobina (g/L)</b>	13,9+/-2,0	13,2+/-2,0	NS
<b>Plaquetas (x10<sup>9</sup>/L)</b>	148,7+/-74,2	152,4+/-94,7	NS
<b>VGM (fL)</b>	98,6+/-7,5	96,7+/-6,3	NS
<b>INR</b>	1,2+/-0,2	1,2+/-0,3	NS
<b>Albumina (g/dL)</b>	4,0+/-0,6	3,6+/-0,9	NS
<b>Fosfatase Alcalina (UI/L)</b>	104,9+/-46,0	128,7+/-70,0	NS
<b>GGT (UI/L)</b>	172,2+/-164,8	252,6+/-271,4	NS
<b>ALT (UI/L)</b>	38,8+/-14,7	44,1+/-36,0	NS
<b>AST (UI/L)</b>	58,8+/-46,3	60,1+/-33,4	NS
<b>Bilirrubina total (mg/dL)</b>	2,0+/-3,8	1,6+/-1,3	NS
<b>Creatinina (mg/dL)</b>	0,9+/-0,2	0,9+/-0,3	NS
<b>PCR (mg/dL)</b>	1,3+/-2,3	0,8+/-0,8	NS

\* fibrose perissinusoidal e portal/peripoportal, em ponte ou cirrose; \*\* Relatada como moderada ou grave; \*\*\* Depósitos de ferro grau 2 ou superior

Efetuada a análise multivariada de regressão logística descrita, verificámos que o risco relativo de ter pelo menos uma mutação *HFE* e depósitos de ferros hepáticos de grau 2 ou superior era de 17,23 com um intervalo de confiança a 95% (CI 95%) de 2,09-142,34,  $p=0,008$ .

No entanto, a presença de pelo menos uma mutação *HFE* não estava associada a um risco aumentado de fibrose significativa (risco relativo 0,60, CI 95% 0,14-2,67) ou de existência de atividade necroinflamatória moderada ou grave (risco relativo 0,42 CI 95% 0,07-2,68) (figura 13).

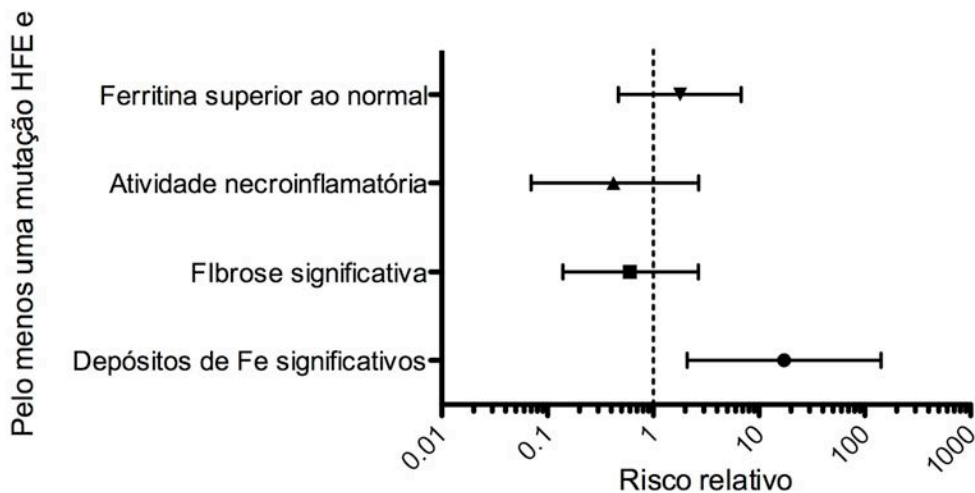


Figura 13. Risco relativo de apresentar pelo menos uma mutação *HFE* e ferritina superior ao normal (322 ng/mL), atividade necroinflamatória (relatada como moderada ou grave), fibrose significativa (perissinusoidal e portal/periportal, em ponte ou cirrose) e depósitos de ferro significativos (grau 2 ou superior).

O fator mais determinante para ter uma ferritina sérica superior ao normal (322 ng/ml nos valores de referência do nosso laboratório) foi a existência de alcoolismo ativo, com um risco relativo de 8,87 (95% CI: 2,11-34,78,  $p=0,003$ ). De facto, a existência de pelo menos uma mutação *HFE*, depois de ajustada para as

outras variáveis, não mostrou um risco significativamente aumentado para apresentar uma elevação da ferritina (risco relativo 1,79, CI 95% 0,47-6,79) (figura 14).

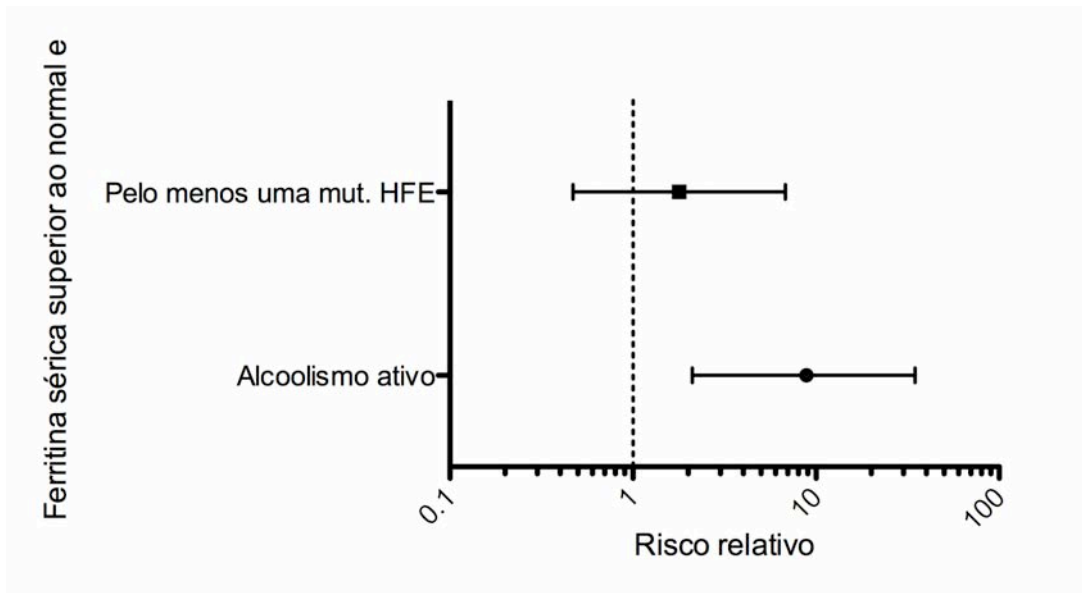


Figura 14. Risco relativo de apresentar ferritina sérica superior ao normal (322 ng/mL) e pelo menos uma mutação *HFE*; e alcoolismo ativo.

A ferritina sérica tem uma associação significativa com o grau de depósitos de ferro na biopsia hepática ( $r_s=0,542$ ,  $p<0,0001$ ). Correlaciona-se também com o grau de atividade necroinflamatória ( $r_s=0,343$ ,  $p=0,006$ ), com a GGT ( $r_s=0,374$ ,  $p=0,003$ ) e com a ALT ( $r_s=0,265$ ,  $p=0,36$ ) mas não com a AST sérica, ou o grau de esteatose ou de fibrose na histologia.

A variável que melhor se correlacionou com o grau histológico de fibrose foi o consumo total de álcool estimado ao longo da vida ( $r_s=0,302$ ,  $p=0,016$ ).

#### 5.3.4. Discussão e Conclusões

Como vimos anteriormente, dos nove trabalhos publicados sobre a eventual associação das mutações *HFE* com a DHA, dois relataram uma maior frequência da mutação H63D em grupos de alcoólicos com doença hepática mais grave,<sup>670, 671</sup> enquanto que os restantes falharam em evidenciar qualquer associação.<sup>672, 673, 674, 675, 676, 677, 678</sup>

Os resultados do nosso estudo começam por evidenciar a realidade do problema do alcoolismo na nossa população: doentes ainda relativamente jovens (média de 53 anos), maioritariamente do sexo masculino, com consumos de álcool significativos, muitas vezes desde a infância. A percentagem de alcoolismo ativo elevada e a significativa presença de fibrose encontrada são também indicativos da gravidade da DHA no grupo recrutado para o estudo.

O grupo de controlo, escolhido entre indivíduos saudáveis inscritos para colecistectomia eletiva, apresenta o problema previsível de ser composto maioritariamente por mulheres, ao contrário dos casos de DHA. Isto pode ter provocado um viés na comparação dos valores da cinética do ferro (ferro, ferritina e saturação da transferrina), que se tentou minimizar pela exclusão de todos os casos com hemoglobina e ferritina abaixo do normal ou com evidência analítica de inflamação. Demonstrou-se, contudo, o que é tido por evidente: um grupo de indivíduos com DHA apresenta valores de ferritina sérica e de saturação da transferrina mais elevados do que a população em geral. A transmissão de mutações *HFE* não tem ligação ao sexo.

Quanto à comparação entre os diversos genótipos *HFE*, não parece existir qualquer diferença nas percentagens encontradas entre os grupos. Apesar do número

de casos e controlos não ser muito elevado, verificamos que o genótipo mais frequente a seguir ao *wt/wt*, o *wt/H63D*, foi encontrado com idêntica frequência nos dois grupos.

Não se evidenciou, portanto, que um grupo de indivíduos com DHA apresente com mais frequência mutações do *HFE* do que uma amostra de controlos "normais", pelo que achamos que a sobrecarga de ferro característica da DHA não é causada pela existência dessas mutações; esta leitura é, claro está, limitada dada a relativamente pequena dimensão das amostras, mas está de acordo com a maioria da literatura disponível.

Mais interessante é a divisão dos casos em dois grupos, entre genótipos *wt/wt* e os outros apresentando qualquer mutação *HFE*. Estes grupos são sobreponíveis em termos de idade, sexo, IMC, percentagem de alcoolismo ativo e consumos diário e cumulativo de etanol.

Verificámos que a presença de qualquer mutação *HFE* em doentes com DHA confere um aumento do risco relativo para o achado de depósitos de ferro significativos na histologia; no entanto, a presença dessas mutações não parece ter qualquer impacto na gravidade laboratorial ou histológica da DHA, como pudemos constatar pela igualdade da gravidade da fibrose, atividade necroinflamatória, MELD e provas de função hepática. Com efeito, depois de ajustada para as outras variáveis, não existe aumento do risco de existência de fibrose hepática ou de atividade necroinflamatória significativas.

A presença de pelo menos uma mutação *HFE* não aumenta o risco da existência de uma ferritina elevada (superior ao limite superior do normal) ao contrário da existência de ingestão ativa de bebidas alcoólicas.



O achado da associação entre mutações *HFE* e depósitos de ferro hepáticos, mas não entre estas e elevação da ferritina sérica é intrigante, podendo eventualmente equacionar-se a relevância dessa mutações a nível da sobrecarga de ferro hepático *vs* a sobrecarga sistémica de ferro, por exemplo.

Dado que a ferritina sérica apresenta uma correlação significativa com a atividade necroinflamatória, é possível que a sobrecarga de ferro na DHA possa contribuir para a agressão hepática, ainda que esta seja indissociável do facto de existir consumo ativo de álcool.

Confirmou-se também que o fator determinante para a evolução da DHA é o total cumulativo do consumo alcoólico ao longo da vida.

Apesar da multiplicidade de trabalhos que tentaram pesquisar a associação entre a presença de mutações *HFE* e a gravidade da doença hepática alcoólica, e aos quais acrescentamos agora o nosso, a verdade é que todos apresentam uma limitação, que é o número reduzido de doentes / controlos, e o uso de diferentes metodologias para a inclusão dos doentes em diferentes subgrupos, pelo que será sempre difícil chegar a uma conclusão definitiva.

Com estes resultados, rejeitamos parcialmente a hipótese 1 que tínhamos colocado. Não existem diferenças na prevalência de mutações *HFE* entre casos e controlos. No entanto, existe uma tendência para valores de ferritina mais elevados, e demonstrámos que nos doentes com pelo menos uma mutação *HFE* são encontrados mais vezes depósito de ferro hepático significativos (Perls grau 2 ou superior). Deste modo, não é de excluir alguma contribuição da existência dessas mutações para o agravamento do quadro de sobrecarga de ferro.



## 5.4. Avaliação dos Depósitos de Ferro na Doença Hepática Alcoólica

### 5.4.1. Introdução e Objetivos

Para demonstrar a sobrecarga de ferro no fígado, a biopsia hepática era o *gold standard* para a avaliação quer da concentração de ferro, quer da sua distribuição nos hepatócitos.

O método de coloração mais usado é o de Perls, permitindo uma avaliação semiquantitativa. Para este efeito, o sistema de pontuação de Scheuer, na sua forma original, ou na modificada por Rowe ou Searle, é o mais usado, pela sua simplicidade.<sup>703, 704</sup>

A análise quantitativa de ferro numa amostra de tecido hepático pode-se efetuar com um espectrofotómetro de absorção atómica de grafite. Os valores normais são de 7,2–39,4  $\mu\text{mol}$  (400–2200  $\mu\text{g}$ ) por grama de peso seco nos homens e 1,8–28,6  $\mu\text{mol}$  (100–1600  $\mu\text{g}$ ) nas mulheres. Valores superiores a 283  $\mu\text{mol/g}$  estão associados ao aparecimento de cirrose hepática. O conceito de índice hepático de ferro (HII - *Hepatic Iron Index*) baseia-se na acumulação de ferro progressiva ao longo dos anos e é útil para interpretar sobrecargas ligeiras a moderadas; é calculado dividindo o valor da concentração de ferro hepática em  $\mu\text{mol}$  pela idade em anos do doente. Um HII de 1,9 ou superior era usado para o diagnóstico de hemocromatose antes de ser identificado o *HFE*, e identifica principalmente os doentes em risco de doença sintomática.<sup>703, 705</sup>

Um dos problemas apontados em quantificar o ferro hepático por meio de uma biopsia percutânea é o sempre possível erro de amostragem; idealmente,

deveriam ser avaliadas várias amostras de diferentes locais do fígado, mas tal não é ética e tecnicamente aceitável.<sup>706</sup>

Nos últimos anos, a RMN tem-se revelado um bom método não invasivo para a avaliação da concentração de ferro hepático, especialmente quando aferida em aparelhos com uma potência de 1,5 Tesla. Os coeficientes de correlação entre o sinal na RMN e a concentração de ferro hepático variam entre -0,74 e -0,98, permitindo detetar com precisão valores entre 50-350  $\mu\text{mol/g}$  com uma sensibilidade entre 84 e 91% e com uma especificidade de 80 a 100%.<sup>707, 708, 709, 710</sup>

A deteção do ferro baseia-se na interação de moléculas contendo este metal (fundamentalmente ferritina e hemosiderina) com os núcleos de hidrogénio da água tecidual, levando a um encurtamento do tempo de relaxamento T2, o que é traduzido por uma diminuição da intensidade do sinal nesta ponderação (figura 15). A medição da concentração de ferro hepático baseia-se na comparação da intensidade do sinal entre o parênquima e os músculos para-espinais (que não desenvolvem siderose), ou por determinação direta do tempo de relaxamento (relaxometria), ou então por combinação entre as duas técnicas (método híbrido).<sup>711, 712</sup>

O método mais comumente usado é o protocolo da Universidade de Rennes, que usa a comparação de sinal de mais de 1  $\text{cm}^2$  do parênquima hepático com os músculos para-espinais,<sup>707</sup> e que está disponível em <http://www.radio.univ-rennes1.fr/Sources/EN/Hemo.html>. Já foi extensamente validado, apresentando uma boa correlação com a avaliação por biopsia hepática ( $r=0,86$ ).<sup>713</sup>

Outro método não invasivo de avaliação do ferro hepático é o susceptómetro SQUID (*Superconducting Quantum Interference Device*) que

consegue medir o grau de magnetização desse ferro. Contudo, é uma metodologia apenas disponível em centros de investigação e não foi ainda validado na hemocromatose hereditária.<sup>714, 715</sup>

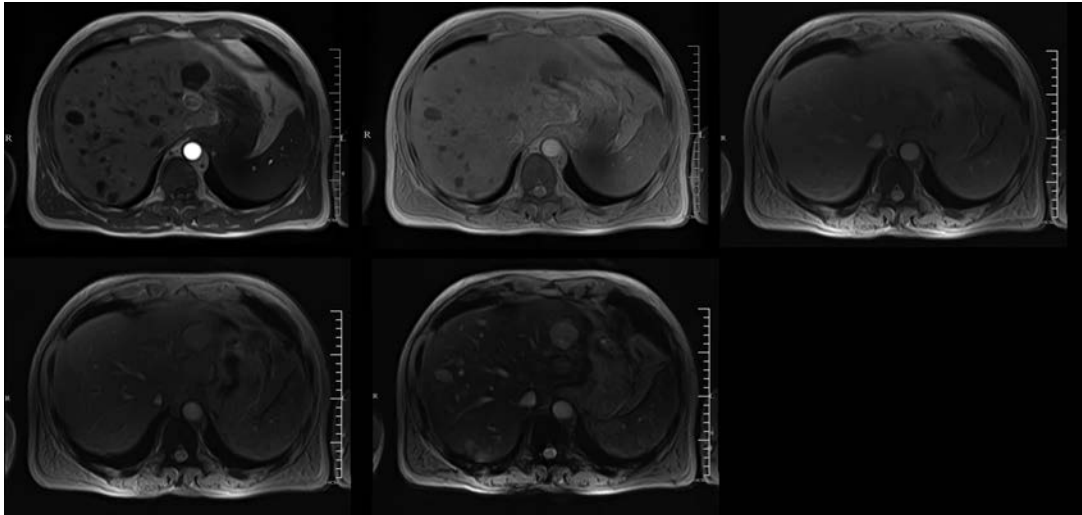


Figura 15. Imagens de RMN - ponderações usadas pelo protocolo da Universidade de Rennes num doente deste estudo com uma concentração de ferro hepática de 120  $\mu\text{mol/g}$ : T1: GRE 120 / 4 / 90°; PD : GRE 120 / 4 / 20°; T2 : GRE 120 / 9 / 20°; T2+ : GRE 120 / 14 / 20°; T2++ : GRE 120 / 21 / 20°. Note-se a diminuição do sinal do parênquima hepático, especialmente na ponderação T2.

Pretendemos com este trabalho avaliar os depósitos de ferro hepáticos em doentes com DHA e aferir a medição da concentração de ferro hepático por RMN em relação com os depósitos de ferro encontrados na biopsia hepática.

#### 5.4.2. Material e Métodos

Efetuámos RMN em 58 casos, usando aparelhos com potência de 1,5 Tesla. A concentração de ferro hepático foi calculada usando o protocolo da Universidade de Rennes. Dividimos os casos consoante reportassem estar abstémios

ou com alcoolismo ativo à data do estudo - grupo 1 e grupo 2, respetivamente - avaliando as diferenças encontradas entre eles.

Para calcular o risco relativo, foi efetuada uma análise multivariada de regressão logística, usando como covariáveis a idade, sexo, índice de massa corporal, presença de alcoolismo ativo, MELD, hemoglobina, PCR. Este, com intervalos de confiança a 95%, foi determinado para os desfechos: ferritina sérica superior ao normal (322 ng/mL) vs ferritina sérica normal; existência de atividade necroinflamatória moderada ou grave vs atividade necroinflamatória ausente ou ligeira.

Foi ainda pesquisada a presença de correlações significativas entre as diversas variáveis.

### **5.4.3. Resultados**

Apresenta-se no quadro IX a comparação entre os grupos referidos: casos sem ou com alcoolismo ativo à data do estudo - grupo 1 e grupo 2, respetivamente.

Verificámos que a idade média, a percentagem de indivíduos do sexo masculino, o IMC e o MELD são semelhantes. Ambos os grupos apresentavam uma ingestão cumulativa de álcool puro ao longo da vida muito elevada, superior a 2000 kg por doente. A ingestão média diária estimada no grupo 2 era de 164,4 g de álcool.

No grupo 1, 78,3% apresentavam fibrose significativa. No grupo 2, esta percentagem era também elevada - 60%. A diferença entre os dois grupos não atingiu significância estatística.

Considerando a existência de atividade necroinflamatória moderada ou grave no exame histológico, esta apenas se verificou em 4,3% dos doentes do grupo 1, comparativamente com 40,0% no grupo 2 ( $p=0,002$ ).

Quadro IX. Comparação entre doentes sem e com alcoolismo ativo.

	Sem Alcoolismo Ativo (n=23)	Alcoolismo Ativo (n=35)	p
<b>Idade</b>	55,3+/-10,4	51,8+/-10,9	NS
<b>% homens</b>	82,6%	82,9%	NS
<b>IMC</b>	27,5+/-3,3	26,0+/-3,2	NS
<b>Consumo diário (g)</b>	-	164,4 +/-51,5	-
<b>Consumo total (Kg)</b>	2263,0+/-1146,3	2176,6+/-958,7	NS
<b>Existência de fibrose significativa *</b>	78,3%	60%	NS
<b>Atividade necroinflamatória **</b>	4,3%	40%	0,002
<b>Depósitos de ferro ***</b>	13%	28%	NS
<b>Existência de pelo menos uma mutação HFE</b>	43,5%	34,3%	NS
<b>Ferro hepático - RMN (µmol/g)</b>	24,3+/-38,2	40,1+/-40,0	0,024
<b>Ferro sérico (ug/dL)</b>	104,8+/-50,8	124,2+/-63,2	NS
<b>Ferritina (ng/mL)</b>	253,1+/-261,0	560,6+/-421,9	0,001
<b>Saturação transferrina %</b>	32,9%+/-13,4	43,6%+/-22,1	NS
<b>MELD</b>	7,7+/-3,9	8,0+/-4,8	NS
<b>Leucócitos (x10<sup>9</sup>/L)</b>	5,4+/-1,9	6,2+/-2,0	NS
<b>Neutrófilos (x10<sup>9</sup>/L)</b>	3,3+/-1,5	3,9+/-1,5	NS
<b>Linfócitos (x10<sup>9</sup>/L)</b>	1,4+/-0,5	1,5+/-0,6	NS
<b>Hemoglobina (g/L)</b>	13,7+/-1,9	13,2+/-2,2	NS
<b>Plaquetas (x10<sup>9</sup>/L)</b>	124,9+/-77,2	155,3+/-85,7	NS
<b>VGM (fL)</b>	93,8+/-5,3	99,3+/-6,4	0,001
<b>INR</b>	1,2+/-0,2	1,2+/-0,2	NS
<b>Albumina (g/dL)</b>	3,9+/-0,7	3,6+/-0,9	NS
<b>Fosfatase Alcalina (UI/L)</b>	114,4+/-39,0	124,9+/-75,8	NS
<b>GGT (UI/L)</b>	72,4+/-45,3	308,8+/-249,1	<0,0001
<b>ALT (UI/L)</b>	31,5+/-7,7	48,7+/-37,3	0,013
<b>AST (UI/L)</b>	40,4+/-10,9	71,3+/-43,4	0,002
<b>Bilirrubina total (mg/dL)</b>	1,4+/-1,4	2,0+/-3,2	NS
<b>Creatinina (mg/dL)</b>	0,9+/-0,2	0,9+/-0,3	NS
<b>PCR (mg/dL)</b>	0,5+/-0,6	1,0+/-1,4	NS

\* perissinusoidal e portal/periportal, em ponte ou cirrose; \*\* Relatada como moderada ou grave;

\*\*\* Depósitos de ferro grau 2 ou superior.



Comparando os grupos para a existência de pelo menos uma mutação *HFE*, também não existem diferenças significativas entre eles (43,5% vs 34,3%).

Ponderando a avaliação semiquantitativa dos depósitos de ferro hepáticos pela escala de Scheuer, considerámos os mesmos significativos com um grau 2 ou superior. Dividindo os grupos com este critério, verificámos uma tendência para os depósitos de ferro significativos serem mais elevados no grupo 2 (28% vs 13%). No entanto, comparando as médias dos valores da concentração de ferro hepático aferidos por RMN, verificamos que esta é significativamente mais elevada no grupo com alcoolismo ativo - 40,1  $\mu\text{mol/g}$  vs 24,3  $\mu\text{mol/g}$ ,  $p=0,024$ .

Considerando os parâmetros analíticos do metabolismo do ferro, a ferritina é significativamente mais elevada no grupo 2 - 560,6 ng/mL vs 253,1 ng/mL,  $p=0,001$ . Quanto ao ferro sérico e à saturação da transferrina, apenas conseguimos demonstrar uma tendência para valores mais elevados neste grupo.

Previsivelmente, os valores de VGM, GGT, ALT e AST são significativamente mais elevados no grupo 2.

Quanto aos restantes parâmetros laboratoriais aferidos (hemograma, INR, albumina, fosfatase alcalina, bilirrubina total, creatinina e PCR), não existem diferenças significativas entre os 2 grupos.

Considerando os doentes na sua totalidade (grupo 1 e grupo 2), e avaliando as correlações entre as diferentes variáveis, verificamos que os valores da concentração de ferro hepático medidos por RMN apresentam uma elevada associação com o grau histológico de depósitos de ferro -  $r_s=0,706$ ,  $p<0,0001$ .

A ferritina sérica apresenta uma associação moderada com os valores aferidos por RMN ( $r_s=0,615$ ,  $p<0,0001$ ) e com o grau histológico de depósitos de ferro ( $r_s=0,546$ ,  $p<0,0001$ ). Correlaciona-se também com o grau de atividade

necroinflamatória, ( $r_s=0,313$ ,  $p=0,017$ ) contudo esta é indissociável da existência de alcoolismo ativo, uma vez que o risco relativo de apresentar ferritina sérica superior ao normal e atividade necroinflamatória significativa (moderada ou grave), uma vez corrigido para a idade, sexo, IMC, existência de alcoolismo ativo, hemoglobina e PCR (através de uma análise multivariada de regressão logística), não se encontra significativamente aumentado - 3,51, mas com um IC 95% de 0,57-21,56 (figura 16).

A variável que melhor se associou com a elevação da ferritina sérica foi, mais uma vez, a existência de alcoolismo ativo. O risco relativo de apresentar ingestão ativa de álcool e ferritina acima do limite superior do normal (322 ng/mL no nosso laboratório), nesta população, é de 10,96, com um intervalo de confiança a 95% de 2,47-48,58 (figura 16).

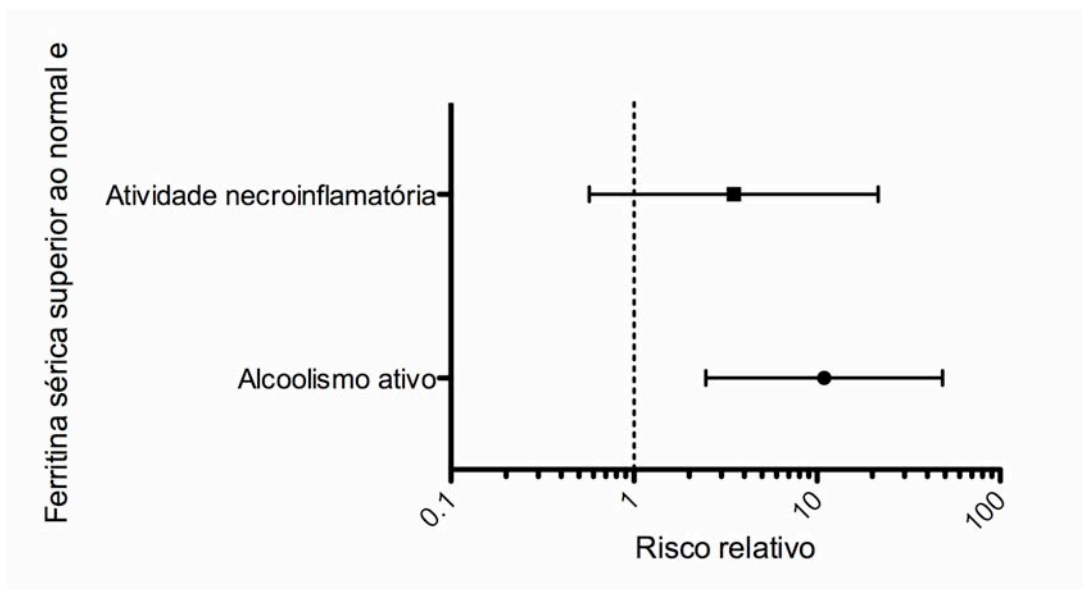


Figura 16. Risco relativo de apresentar ferritina sérica superior ao normal (322 ng/mL) e atividade necroinflamatória significativa (moderada ou grave); alcoolismo ativo.

#### 5.4.4. Discussão e Conclusões

Demonstrámos que a ingestão ativa de bebidas alcoólicas em doentes com DHA, para além de associada a uma maior atividade da doença, traduzida por uma maior frequência de atividade necroinflamatória e valores mais elevados de GGT e transaminases, é um fator determinante para o quadro de sobrecarga de ferro, com um aumento significativo da concentração de ferro hepático e dos valores de ferritina no sangue. A igualdade de ambos os grupos em termos de idade, sexo, IMC, leucograma, hemoglobina, e funções hepática e renal permite-nos assegurar que a cinética do ferro não se encontrava alterada devido a outros fatores, como o sexo, a existência de inflamação, insuficiência renal ou anemia.

Dado que a ferritina sérica apresenta aqui, mais uma vez, uma correlação significativa com a atividade necroinflamatória, é possível que a sobrecarga de ferro na DHA possa contribuir para a agressão hepática, ainda que esta seja novamente indissociável do facto de existir consumo ativo de álcool. Esta sim, mais uma vez, é a variável que melhor se associa com a sobrecarga de ferro nestes doentes.

Quanto aos métodos não invasivos de avaliação dos depósitos de ferro hepáticos, a quantificação por RMN, em doentes com DHA, mostrou uma ótima correlação com o grau de depósitos de ferro da histologia, traduzindo uma associação elevada e muito significativa entre as duas variáveis. Aliás, a força dessa associação é da mesma ordem de grandeza a que se chegou na validação do método da Universidade de Rennes, apresentando este uma boa correlação com a avaliação do ferro em biopsias hepáticas por espectrofotometria de absorção atómica em forno de grafite ( $r=0,86$ ).<sup>716</sup> Esta técnica não foi usada no nosso trabalho, pois, para além de limitações financeiras, e de não ser este o objetivo principal do mesmo,

implicaria a colheita de mais volume de tecido hepático, já que a técnica de espectrofotometria de absorção atômica seria efetuada em local diferente da avaliação histopatológica. Uma parte significativa da amostra de tecido hepático colhida por biopsia era já destinada à medição do ARNm da hepcidina. Deste modo, considerámos não ser ético sujeitar os doentes a riscos e desconforto acrescido para efetuar mais passagens da agulha de biopsia, atendendo ao pouco ganho previsível para o doente, com uma relação risco/benefício claramente desfavorável.

No entanto, concluímos que a técnica semiquantitativa da coloração de Perls continua a dar uma imagem bastante fidedigna da sobrecarga hepática de ferro.

Confirmámos também que a ferritina sérica apresenta uma boa correlação com a quantificação de ferro hepático por RMN e com o grau histológico de depósitos de ferro. Apesar da força de associação mais baixa, pensamos que a medição da ferritina sérica continua a ser um bom método, indireto, mas simples, custo-efetivo e não invasivo, da avaliação da sobrecarga hepática de ferro na DHA.

Concluímos que a aferição da concentração de ferro hepático por RMN em doentes com DHA é um bom método, no entanto, dado que a maioria destes apresentam apenas sobrecarga de ferro moderada, provavelmente não será justificável a sua medição por rotina por RMN; no entanto, se esta for solicitada para avaliação da morfologia hepática, a medição da concentração de ferro do parênquima é bastante simples, não requerendo equipamento ou software adicional, estando a calculadora disponível e de acesso gratuito *online*.

## 5.5. Subpopulações Linfocitárias e Doença Hepática Alcoólica

### 5.5.1. Introdução e Objetivos

O papel dos linfócitos na DHA, como doença que envolve inflamação hepática, foi já alvo de diferentes linhas de investigação. O álcool causa alterações significativas nas subpopulações linfocitárias, alterações estas de significado incerto. Os resultados publicados sobre este tema não são totalmente concordantes.

Um dos primeiros trabalhos nesta área descreveu um quadro de linfopenia e elevação da relação  $CD4^+/CD8^+$  em doentes com insuficiência hepática por cirrose alcoólica.<sup>717</sup> Outro não mostrou alterações no número total de linfócitos, mas também descreveu uma elevação da relação  $CD4^+/CD8^+$  na DHA.<sup>718</sup>

Posteriormente, em doentes alcoólicos sem manifestações de doença hepática, foi descrito um pequeno mas significativo aumento nos linfócitos T, principalmente à custa de linfócitos  $CD8^+$  ativados.<sup>719</sup>

Arosa e colaboradores identificaram um aumento relativo de linfócitos T  $CD8^+ CD28^-$  e outros com algumas cadeias variáveis dos recetores das células T, nomeadamente os  $CD8^+ TcrVbeta5.2^+$ , mas não dos linfócitos  $CD4^+ CD28^-$ , num grupo de alcoólicos, em comparação com controlos saudáveis. Não foram descritas diferenças significativas entre o número total de linfócitos  $CD4^+$  ou  $CD8^+$  entre os dois grupos.<sup>720</sup>

Outros trabalhos identificaram uma linfopenia significativa, com diminuição do número de linfócitos T  $CD4^+$  e  $CD8^+$ , quer em doentes com alcoolismo ativo sem DHA,<sup>721</sup> quer em doentes com cirrose alcoólica.<sup>722, 723</sup> A

redução do número de linfócitos T CD3<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup> foi também correlacionada com a gravidade da cirrose hepática.<sup>724</sup>

Para além da alteração do número, várias alterações funcionais dos linfócitos T têm sido descritas na DHA.<sup>725, 726</sup> A capacidade de ativação dos linfócitos T e células apresentadoras de antígenos encontra-se diminuída, com a consequente depressão da imunidade em resposta a infeções bacterianas e virais; verifica-se muitas vezes o aumento da incidência de tuberculose, pneumonia e aumento da suscetibilidade à infeção VIH (Vírus da Imunodeficiência Humana) e VHC (Vírus da Hepatite C) nos doentes com alcoolismo crónico. O álcool altera também os níveis séricos de imunoglobulinas, as relações quantitativas entre os diferentes tipos de linfócitos e células NK (*Natural Killer*), a atividade endocítica e fagocítica dos polimorfonucleares e a expressão de citocinas.<sup>727, 728</sup>

Foi descrita uma associação entre um polimorfismo no gene CTLA-4 (*Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*) e a gravidade da DHA.<sup>729</sup>

Uma nova subpopulação de linfócitos CD4<sup>+</sup> efetores foi recentemente descrita e designada por Th17; estes encontram-se aumentados no fígado com DHA, e o seu número correlaciona-se com o grau de fibrose encontrado. O seu papel é ainda incerto.<sup>730</sup>

Na DHA, a expressão de diversas integrinas dos linfócitos T (CD2<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>) encontra-se também aumentada, nomeadamente o CD29, VLA-3, VLA-4 e VLA-5.<sup>731</sup>

Foram também encontradas alterações nos linfócitos B, com uma diminuição significativa em doentes alcoólicos com DHA, particularmente nos linfócitos B CD5<sup>+</sup> e CD45RA<sup>hi</sup>; isto conduzia a uma alteração da composição desta população linfocitária, passando a predominar as células CD19<sup>+</sup>CD5<sup>-</sup>CD45RA<sup>lo</sup>,

características da produção de anticorpos IgM. Especula-se sobre a possível contribuição desta alteração nos fenómenos de autoimunidade e imunodeficiência.

732

A interação das células estreladas hepáticas com células do sistema imunitário é também objecto de pesquisa. A  $\alpha$ -quimiocina dos linfócitos T induzida pelo interferão pode estar envolvida na ativação das CEH. <sup>733</sup>

Uma diminuição da atividade dos linfócitos NK foi também descrita na DHA. <sup>734</sup> Como explanámos anteriormente, a regressão da fibrose hepática pode ser induzida por diversos mecanismos, sendo um dos mais importantes a atividade dos linfócitos NK. Este mecanismo é fortemente reprimido pela ingestão de álcool. <sup>157,</sup>

158, 159, 160, 161

Sabe-se que a diminuição da relação  $CD4^+/CD8^+$  e a diminuição das células NK estão relacionadas com o aumento da fibrose hepática nas hepatites víricas. Foram descritos fenómenos de fagocitose de linfócitos  $CD8^+$  pelas CEH, em relação com a sua ativação, mas o seu significado é ainda incerto. <sup>735</sup> De qualquer maneira, os linfócitos  $CD8^+$  parecem estar envolvidos no estímulo fibrogénico às CEH, <sup>736</sup> e um dos mecanismos da ativação linfocitária parece estar relacionado com a libertação de ativadores do plasminogénio. <sup>737</sup>

Foi também associado um baixo número de linfócitos  $CD8^+$  (principalmente os  $CD8^+ CD28^+$ ), bem como anomalias da função dos mesmos, à hemocromatose hereditária, eventualmente pela transmissão conjunta de um polimorfismo *HLA*, junto ao gene *HFE*, que interfere no controlo das subpopulações linfocitárias, bem como na diferenciação dos  $CD8^+$  no seu fenótipo mais maduro.

<sup>738, 739, 740, 741, 742, 743, 744</sup> O número dos linfócitos  $CD8^+$  no sangue periférico correlaciona-se significativamente com a quantidade de linfócitos presente nos

lóbulo hepáticos; tem uma correlação inversa com a sobrecarga de ferro, sendo esta mais grave quanto menor for o número desses linfócitos.<sup>745, 746</sup>

O objetivo deste trabalho foi o de comparar as subpopulações linfocitárias entre doentes com DHA e controlos saudáveis. Para além disso, pretendíamos avaliar os efeitos da ingestão alcoólica ativa e do grau de fibrose hepática nos linfócitos do sangue periférico.

### **5.5.2. Material e Métodos**

Foram caracterizadas por citometria de fluxo as subpopulações linfocitárias do sangue periférico em 56 casos e 27 controlos. Foram então comparadas as diferenças entre casos e controlos no que respeita a vários parâmetros clínicos e laboratoriais, com particular incidência no leucograma e subpopulações linfocitárias (CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, relação CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup> e linfócitos NK).

Para avaliar os efeitos do alcoolismo ativo e da fibrose hepática nos linfócitos, seleccionámos vários subgrupos de casos: com alcoolismo ativo mas sem cirrose; com cirrose mas sem alcoolismo ativo; com ou sem fibrose significativa (sendo a fibrose significativa definida arbitrariamente como fibrose perissinusoidal e portal/periportal, em ponte ou cirrose *vs* graus inferiores de fibrose).

Foi também pesquisada a existência de correlações significativas entre variáveis.



### 5.5.3. Resultados

Apresenta-se no quadro X a comparação clínica e laboratorial entre casos (com DHA) e controlos saudáveis. A idade média foi superior nos casos. A percentagem de indivíduos do sexo masculino é bastante mais elevada. Em 66,1% dos doentes existia consumo ativo de bebidas alcoólicas, tendo-se verificado ao exame histológico da biopsia hepática que 66,1% apresentavam fibrose significativa, considerada como a presença de fibrose perissinusoidal e portal/perportal, em ponte ou cirrose. Em 39,3%, era já evidente cirrose. O consumo médio diário, reportado pelos casos, foi de 107,5 gramas de álcool por dia. O consumo total cumulativo médio era de 2211 Kg de álcool puro. O MELD médio era de 7,6.

Apesar da diferença na distribuição dos sexos, o valor de hemoglobina médio não foi estatisticamente diferente. O número de eritrócitos foi mais baixo nos doentes com DHA, relacionado com o aumento do VGM.

O número de plaquetas encontrava-se significativamente diminuído nos casos. Não existiram diferenças significativas na função renal e nos níveis de PCR.

Quadro X. Comparação clínica e laboratorial entre casos e controles.

	<b>Casos (n=56)</b>	<b>Controles (n=27)</b>	<b>p</b>
<b>Idade</b>	53,7+/-10,9	47,4+/-14,4	0,036
<b>% homens</b>	83,9%	14,8%	<0,0001
<b>Alcoolismo ativo</b>	66,1%	-	-
<b>Consumo diário (g)</b>	107,5 +/-88,3	-	-
<b>Consumo total (Kg)</b>	2211,6+/-992,4	-	-
<b>Existência de fibrose*</b>	66,1%	-	-
<b>Existência de cirrose</b>	39,3%	-	-
<b>Child-Pugh</b>	6,2+/-1,7	-	-
<b>MELD</b>	7,6+/-4,7	-	-
<b>Leucócitos (x10<sup>9</sup>/L)</b>	6,2+/-2,1	6,1+/-1,4	NS
<b>Neutrófilos (x10<sup>9</sup>/L)</b>	3,9+/-1,7	3,4+/-1,2	NS
<b>Linfócitos (x10<sup>9</sup>/L)</b>	1,5+/-0,5	2,1+/-0,5	<0,0001
<b>Linfócitos CD3<sup>+</sup> (/mm<sup>3</sup>)</b>	1013,0+/-406,2	1523,0+/-364,6	<0,0001
<b>Linfócitos CD4<sup>+</sup> (/mm<sup>3</sup>)</b>	713,5+/-284,7	992,4+/-274,7	<0,0001
<b>Linfócitos CD8<sup>+</sup> (/mm<sup>3</sup>)</b>	262,3+/-140,4	478,9+/-164,6	<0,0001
<b>Relação CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup></b>	3,1+/-1,3	2,3+/-0,9	0,013
<b>Linfócitos CD19<sup>+</sup> (/mm<sup>3</sup>)</b>	120,6+/-76,1	264,6+/-88,0	<0,0001
<b>Linfócitos NK (/mm<sup>3</sup>)</b>	151,5+/-134,9	178,7+/-210,0	NS
<b>Eritrócitos (x10<sup>12</sup>/L)</b>	4,0+/-0,7	4,5+/-0,4	0,006
<b>Hemoglobina (g/L)</b>	13,4+/-2,0	13,9+/-1,2	NS
<b>VGM (fL)</b>	97,9+/-6,5	90,8+/-4,0	<0,0001
<b>Plaquetas (x10<sup>9</sup>/L)</b>	149,0+/-82,0	231,0+/-36,0	<0,0001
<b>INR</b>	1,2+/-0,2	1,0+/-0,1	<0,0001
<b>Creatinina (mg/dl)</b>	0,9+/-0,3	0,8+/-0,1	NS
<b>Albumina (g/dL)</b>	3,7+/-0,8	3,9+/-0,6	NS
<b>Albumina/Globulina</b>	1,0+/-0,4	1,4+/-0,3	<0,0001
<b>Fosfatase Alcalina (UI/dL)</b>	119,2+/-64,5	68,3+/-14,0	<0,0001
<b>GGT (UI/dL)</b>	221,6+/-218,8	37,9+/-33,1	<0,0001
<b>ALT (UI/dL)</b>	43,2+/-30,7	29,4+/-15,3	<0,0001
<b>AST (UI/dL)</b>	60,9+/-29,4	25,1+/-7,9	<0,0001
<b>Bilirrubina total (mg/dL)</b>	1,8+/-2,7	0,7+/-0,3	<0,0001
<b>IgA (mg/dL)</b>	583,4+/-288,2	259,0+/-146,7	<0,0001
<b>IgG (mg/dL)</b>	1484,3+/-514,4	1061,1+/-210,0	<0,0001
<b>IgM (mg/dL)</b>	167,8+/-87,8	117,6+/-43,3	0,008
<b>Ig total (mg/dL)</b>	2035,4+/-790,5	1437,7+/-312,0	<0,0001
<b>Ferro (ug/dL)</b>	115,7+/-59,7	93,8+/-34,1	NS
<b>Ferritina (ng/mL)</b>	474,6+/-416,0	126,9+/-109,8	<0,0001
<b>Saturação transferrina %</b>	39,6+/-19,9	29,6+/-10,8	0,052
<b>PCR (mg/dL)</b>	1,1+/-1,6	0,7+/-0,7	NS

\* perissinusoidal e portal/periportal, em ponte ou cirrose

Quanto ao leucograma, as diferenças de leucócitos totais e de neutrófilos segmentados não foram relevantes, o que já não aconteceu com o número total de linfócitos, sensivelmente diminuído nos casos.

Analisando as subpopulações linfocitárias, verificamos nos casos uma redução muito significativa em todas as subpopulações ( $CD3^+$ ,  $CD4^+$ ,  $CD8^+$ ,  $CD19^+$ ), exceto nos linfócitos NK (figura 17). Proporcionalmente, a maior redução foi encontrada nos linfócitos  $CD8^+$ , evidenciada por um aumento da relação  $CD4^+/CD8^+$  nos casos comparativamente com os controles (3,1 vs 2,3,  $p=0,013$ ).

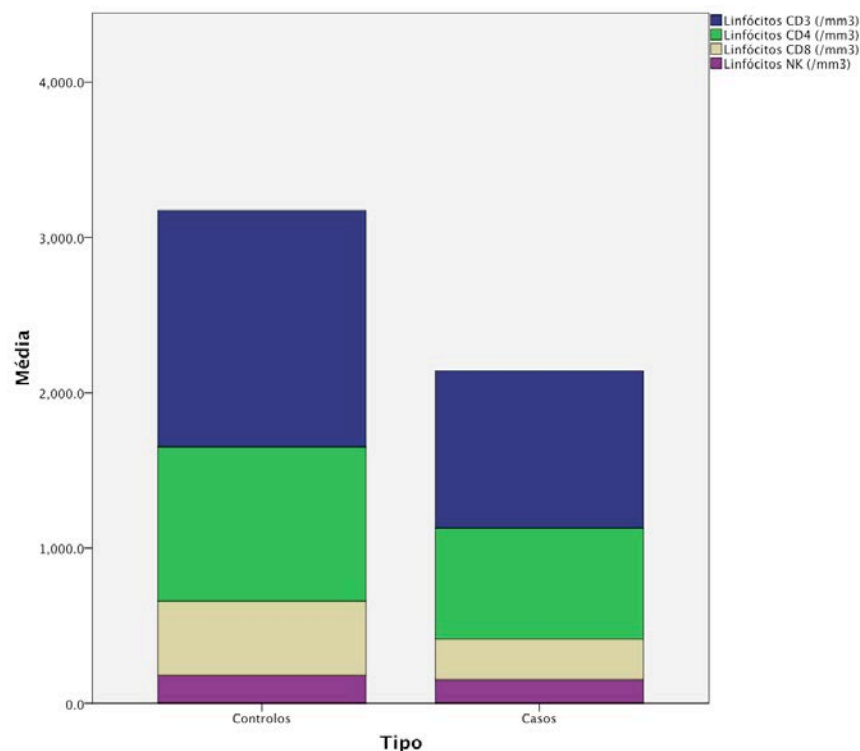


Figura 17. Subpopulações linfocitárias - comparação entre casos e controles.

Nos outros parâmetros laboratoriais, foram encontradas diferenças significativas características da DHA: elevação do INR, fosfatase alcalina, GGT, aminotransferases, bilirrubina, todas as classes de imunoglobulinas e ferritina. A albumina sérica apresentou uma tendência para valores mais baixos nos casos, enquanto que a saturação da transferrina apresentou tendência para valores mais elevados.

No entanto, como a população dos casos apresentava alguma heterogeneidade, optámos por seleccionar e comparar alguns subgrupos.

Se considerarmos apenas os doentes com alcoolismo ativo e sem cirrose hepática (n=26), em comparação com os controlos saudáveis, voltámos a verificar uma linfopenia relativa com redução acentuada das subpopulações linfocitárias, exceto dos linfócitos NK, e uma elevação dos valores de todas as classes de imunoglobulinas. Neste subgrupo não foi possível evidenciar um aumento significativo da relação  $CD4^+/CD8^+$  (figura 18 e quadro XI).

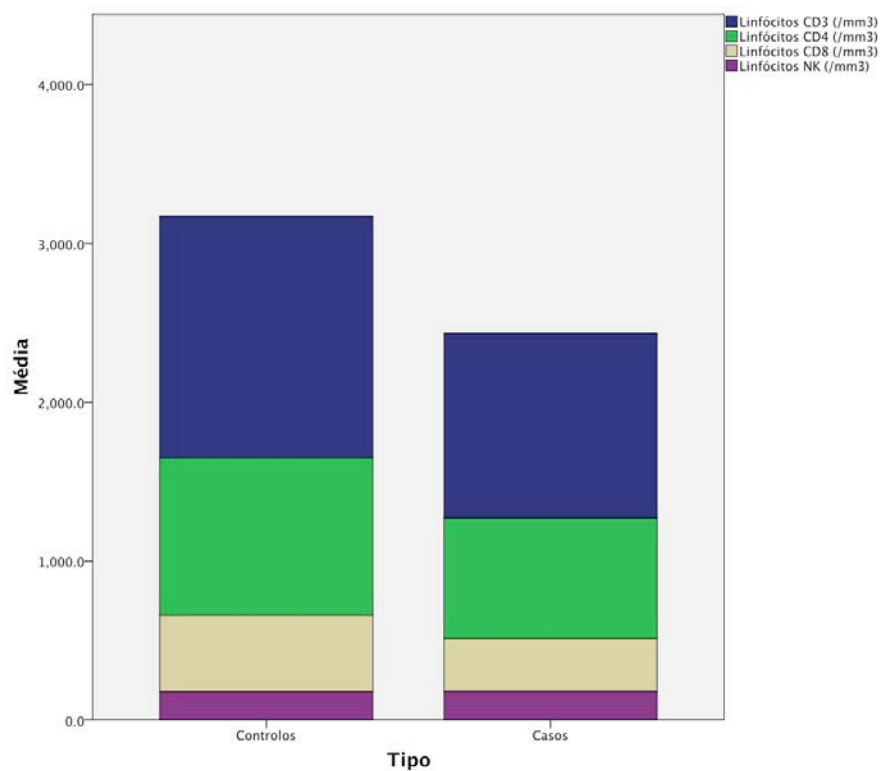


Figura 18. Subpopulações linfocitárias - comparação entre casos com alcoolismo ativo e sem cirrose e controlos.

Quadro XI. Comparação clínica e laboratorial entre casos com alcoolismo ativo e sem cirrose e controlos.

	<b>Casos (n=26)</b>	<b>Controlos (n=27)</b>	<b>p</b>
<b>Idade</b>	44,4+/-14,4	47,4+/-14,4	NS
<b>% homens</b>	88,5%	14,8%	<0,0001
<b>Leucócitos (x10<sup>9</sup>/L)</b>	6,9+/-1,8	6,1+/-1,4	NS
<b>Neutrófilos (x10<sup>9</sup>/L)</b>	4,3+/-1,5	3,4+/-1,2	0,011
<b>Linfócitos (x10<sup>9</sup>/L)</b>	1,8+/-0,3	2,1+/-0,5	0,018
<b>Linfócitos CD3<sup>+</sup> (/mm<sup>3</sup>)</b>	1164,7+/-376,6	1523,0+/-364,6	0,001
<b>Linfócitos CD4<sup>+</sup> (/mm<sup>3</sup>)</b>	759,8+/-265,0	992,4+/-274,7	0,003
<b>Linfócitos CD8<sup>+</sup> (/mm<sup>3</sup>)</b>	330,9+/-156,3	478,9+/-164,6	0,002
<b>Relação CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup></b>	2,5+/-1,1	2,3+/-0,9	NS
<b>Linfócitos CD19<sup>+</sup> (/mm<sup>3</sup>)</b>	107,8+/-64,2	264,6+/-88,0	<0,0001
<b>Linfócitos NK (/mm<sup>3</sup>)</b>	180,2+/-169,0	178,7+/-210,0	NS
<b>Eritrócitos (x10<sup>12</sup>/L)</b>	4,1+/-0,7	4,5+/-0,4	NS
<b>Hemoglobina (g/L)</b>	14,0+/-4,0	13,9+/-1,2	NS
<b>VGM (fL)</b>	99,9+/-5,9	90,8+/-4,0	<0,0001
<b>Plaquetas (x10<sup>9</sup>/L)</b>	204,7+/-84,6	231,0+/-36,0	NS
<b>INR</b>	1,1+/-0,2	1,0+/-0,1	NS
<b>Creatinina (mg/dl)</b>	0,9+/-0,2	0,8+/-0,1	NS
<b>Albumina (g/dL)</b>	4,0+/-0,5	3,9+/-0,6	NS
<b>Albumina/Globulina</b>	1,4+/-0,3	1,4+/-0,3	NS
<b>Fosfatase Alcalina (UI/dL)</b>	102,3+/-74,1	68,3+/-14,0	NS
<b>GGT (UI/dL)</b>	297,8+/-33,1	37,9+/-33,1	<0,0001
<b>ALT (UI/dL)</b>	55,8+/-41,6	29,4+/-15,3	<0,0001
<b>AST (UI/dL)</b>	72,2+/-52,8	25,1+/-7,9	<0,0001
<b>Bilirrubina total (mg/dL)</b>	1,1+/-0,6	0,7+/-0,3	0,027
<b>PCR (mg/dL)</b>	1,1+/-2,0	0,7+/-0,7	NS

Se compararmos com os controlos apenas os doentes com cirrose demonstrada e sem ingestão ativa de bebidas alcoólicas, verificámos que este subgrupo continua a apresentar uma linfopenia evidente, aqui sim com uma elevação significativa da relação CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> (quadro XII, figura 19).

Quadro XII. Comparação clínica e laboratorial entre casos com cirrose e sem alcoolismo e controles.

	<b>Casos (n=11)</b>	<b>Controlos (n=27)</b>	<b>p</b>
<b>Idade</b>	56,8+/-9,0	47,4+/-14,4	0,03
<b>% homens</b>	100%	14,8%	<0,0001
<b>MELD</b>	10,5+/-4,6	-	
<b>Leucócitos (x10<sup>9</sup>/L)</b>	5,4+/-2,5	6,1+/-1,4	NS
<b>Neutrófilos (x10<sup>9</sup>/L)</b>	3,4+/-2,0	3,4+/-1,2	NS
<b>Linfócitos (x10<sup>9</sup>/L)</b>	1,3+/-0,6	2,1+/-0,5	<0,0001
<b>Linfócitos CD3<sup>+</sup> (/mm<sup>3</sup>)</b>	954,5+/-547,4	1523,0+/-364,6	0,003
<b>Linfócitos CD4<sup>+</sup> (/mm<sup>3</sup>)</b>	745,2+/-389,0	992,4+/-274,7	0,032
<b>Linfócitos CD8<sup>+</sup> (/mm<sup>3</sup>)</b>	233,9+/-120,0	478,9+/-164,6	<0,0001
<b>Relação CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup></b>	3,5+/-1,3	2,3+/-0,9	0,01
<b>Linfócitos CD19<sup>+</sup> (/mm<sup>3</sup>)</b>	150,8+/-108,4	264,6+/-88,0	0,001
<b>Linfócitos NK (/mm<sup>3</sup>)</b>	99,5+/-54,5	178,7+/-210,0	NS
<b>Eritrócitos (x10<sup>12</sup>/L)</b>	4,5+/-0,4	4,5+/-0,4	0,005
<b>Hemoglobina (g/L)</b>	12,9+/-2,1	13,9+/-1,2	NS
<b>VGM (fL)</b>	97,0+/-6,0	90,8+/-4,0	0,001
<b>Plaquetas (x10<sup>9</sup>/L)</b>	103,5+/-39,4	231,0+/-36,0	<0,0001
<b>INR</b>	1,4+/-0,3	1,0+/-0,1	<0,0001
<b>Creatinina (mg/dl)</b>	0,9+/-0,3	0,8+/-0,1	NS
<b>Albumina (g/dL)</b>	3,4+/-0,7	3,9+/-0,6	0,003
<b>Albumina/Globulina</b>	0,9+/-0,3	1,4+/-0,3	<0,0001
<b>Fosfatase Alcalina (UI/dL)</b>	124,9+/-32,6	68,3+/-14,0	NS
<b>GGT (UI/dL)</b>	84,2+/-55,5	37,9+/-33,1	0,005
<b>ALT (UI/dL)</b>	32,6+/-7,6	29,4+/-15,3	NS
<b>AST (UI/dL)</b>	46,9+/-10,9	25,1+/-7,9	<0,0001
<b>Bilirrubina total (mg/dL)</b>	2,2+/-2,0	0,7+/-0,3	<0,0001
<b>PCR (mg/dL)</b>	1,1+/-1,5	0,7+/-0,7	NS

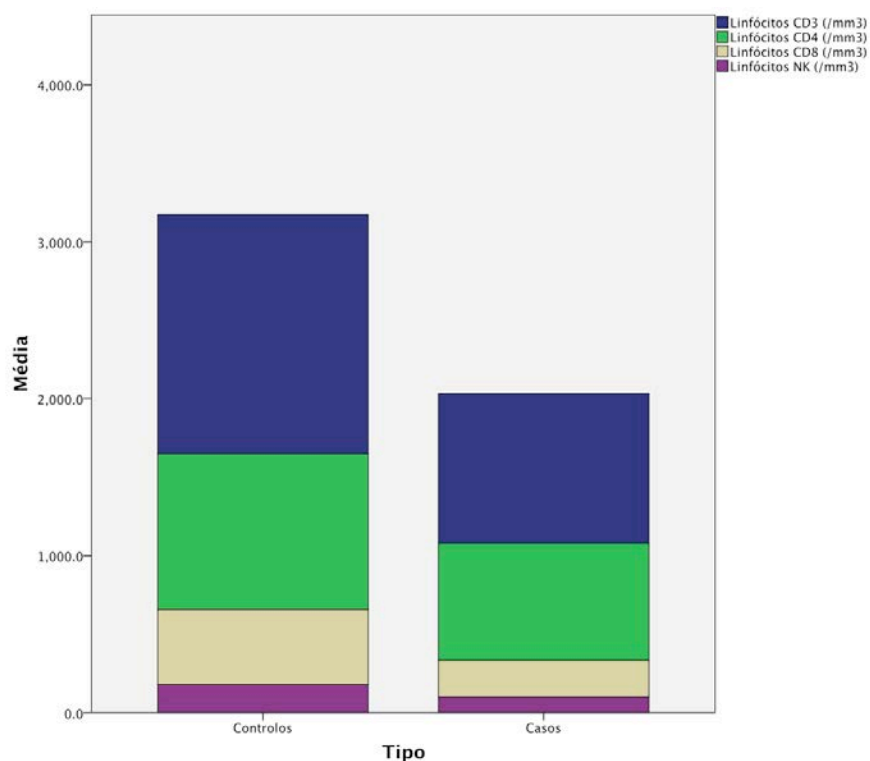


Figura 19. Subpopulações linfocitárias - comparação entre casos com cirrose, mas sem alcoolismo ativo e controles.

Subdividindo os casos em doentes sem fibrose significativa (ausência ou com fibrose perissinusoidal **ou** portal/peripoortal) e com fibrose significativa (fibrose perissinusoidal e portal/peripoortal, em ponte ou cirrose), podemos verificar que as idades são sobreponíveis e a diferença entre sexos nos dois grupos não é estatisticamente significativa (quadro XIII). O MELD é previsivelmente mais elevado no grupo com fibrose mais acentuada. Não há diferenças entre os leucócitos totais e os neutrófilos, mas o número de linfócitos é significativamente mais baixo no grupo com fibrose significativa, bem como o número de linfócitos CD3<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>. Os CD4<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup> e NK são também menos, mas sem significância (figura 20). A relação CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> é novamente mais elevada no grupo com fibrose significativa.

Estes apresentavam também uma fosfatase alcalina, bilirrubina e INR mais elevados e uma albumina sérica mais baixa.

Com efeito, considerando todos os doentes, a relação CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> apresenta uma correlação com o grau de fibrose ( $r_s=0,342$ ,  $p=0,01$ ) e com o score de Child-Pugh ( $r_s=0,482$ ,  $p=0,02$ ), enquanto o número de linfócitos totais apresenta uma correlação negativa com o mesmo ( $r_s=-0,398$ ,  $p=0,002$ ).

O número de linfócitos CD8<sup>+</sup> correlaciona-se também com os níveis de ferritina sérica ( $r_s=0,345$ ,  $p=0,009$ ).

Quadro XIII. Comparação clínica e laboratorial entre casos com e sem fibrose hepática significativa.

	Sem fibrose* (n=19)	Com fibrose** (n=37)	p
<b>Idade</b>	53,4+/-11,0	53,8+/-11,0	NS
<b>% homens</b>	94,7%	78,4%	NS
<b>MELD</b>	4,6+/-2,4	9,1+/-4,8	<0,0001
<b>Leucócitos (x10<sup>9</sup>/L)</b>	6,7+/-1,7	5,9+/-2,3	NS
<b>Neutrófilos (x10<sup>9</sup>/L)</b>	4,1+/-1,4	3,7+/-1,9	NS
<b>Linfócitos (x10<sup>9</sup>/L)</b>	1,7+/-0,5	1,4+/-0,6	0,021
<b>Linfócitos CD3<sup>+</sup> (/mm<sup>3</sup>)</b>	1183,1+/-359,9	925,7+/-405,2	0,029
<b>Linfócitos CD4<sup>+</sup> (/mm<sup>3</sup>)</b>	763,0+/-250,0	688,1+/-301,1	NS
<b>Linfócitos CD8<sup>+</sup> (/mm<sup>3</sup>)</b>	327,8+/-157,1	228,6+/-119,8	0,012
<b>Relação CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup></b>	2,5+/-1,2	3,3+/-1,3	0,019
<b>Linfócitos CD19<sup>+</sup> (/mm<sup>3</sup>)</b>	127,4+/-64,0	117,1+/-82,2	NS
<b>Linfócitos NK (/mm<sup>3</sup>)</b>	174,7+/-111,6	139,6+/-145,4	NS
<b>Fosfatase Alcalina (UI/dL)</b>	77,1+/-34,2	140,8+/-66,0	<0,0001
<b>GGT (UI/dL)</b>	206,2+/-158,2	229,5+/-245,8	NS
<b>ALT (UI/dL)</b>	54,8+/-46,7	37,2+/-15,4	NS
<b>AST (UI/dL)</b>	62,0+/-53,0	60,4+/-31,1	NS
<b>Bilirrubina Total (mg/dL)</b>	0,9+/-0,4	2,2+/-3,2	0,006
<b>INR</b>	1,0+/-0,1	1,3+/-0,2	<0,0001
<b>Albumina (g/dL)</b>	4,3 +/-0,6	3,5+/-0,8	<0,0001

\* Ausência de fibrose ou com fibrose perissinusoidal ou portal/peripoportal; \*\* fibrose perissinusoidal e portal/peripoportal, em ponte ou cirrose



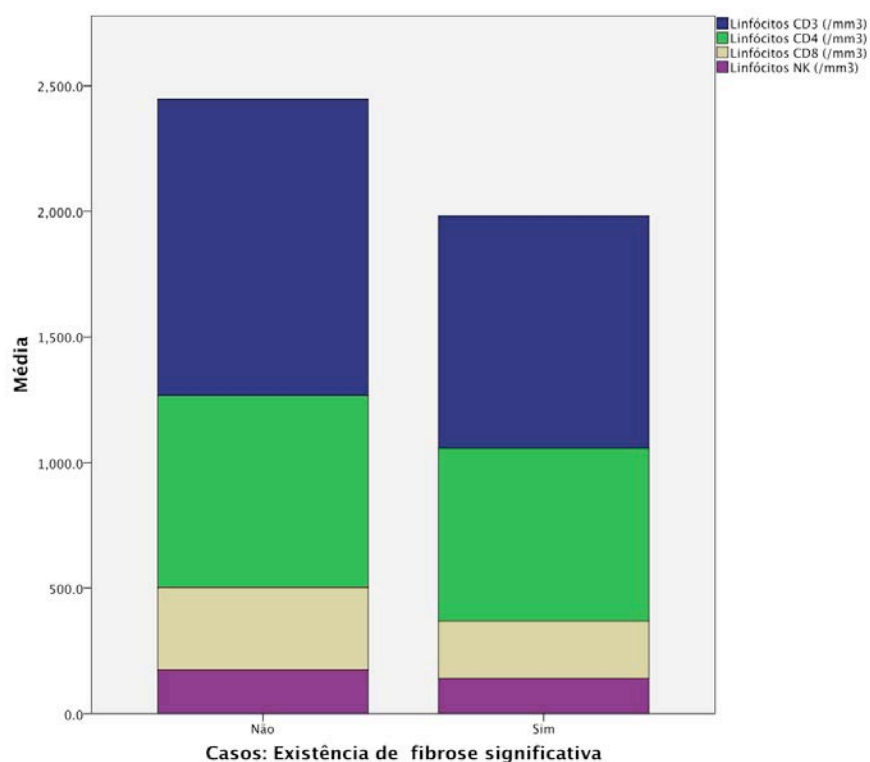


Figura 20. Subpopulações linfocitárias - comparação entre casos com e sem fibrose significativa.

#### 5.5.4. Discussão e Conclusões

Mais uma vez, este subgrupo de doentes mostra o impacto do alcoolismo na nossa população, com um grupo de doentes relativamente jovens, com uma elevada percentagem de consumidores ativos de bebidas alcoólicas e com uma elevada prevalência de fibrose avançada nas biopsias hepáticas.

No nosso trabalho, o grupo de controlo é composto maioritariamente por mulheres. Ainda assim, encontrámos na literatura trabalhos com grupos de controlo semelhantes, sendo que as diferenças de sexo não parecem afetar o número e o tipo de linfócitos em circulação no sangue periférico.<sup>720</sup>

Os casos evidenciaram alterações analíticas características da DHA - macrocitose, alteração da coagulação, diminuição das plaquetas, elevação das provas de função hepática, de todas as classes de imunoglobulinas e da ferritina sérica.

Analisando os leucogramas, verificámos uma linfopenia significativa nos doentes com DHA em comparação com os controlos saudáveis, inclusivamente se considerarmos apenas os doentes com alcoolismo ativo, como já reportado noutros trabalhos.<sup>721, 722</sup>

Essa linfopenia traduz uma redução do número de todas as subpopulações linfocitárias (apenas nos linfócitos NK não conseguimos demonstrar uma diferença com significância estatística). A relação  $CD4^+/CD8^+$  encontrava-se significativamente aumentada nos casos, o que demonstra que a redução no número de linfócitos  $CD8^+$  foi proporcionalmente superior do que a dos  $CD4^+$ .

No entanto, analisando os vários subgrupos em que dividimos os doentes, e atendendo à associação positiva entre aquela relação e o grau de fibrose, é evidente que só nos doentes com fibrose mais grave a relação  $CD4^+/CD8^+$  se encontra significativamente mais elevada, mesmo sem consumo ativo de bebidas alcoólicas.

A linfopenia, essa sim, foi sempre significativa em todos os subgrupos, com gravidade crescente consoante a progressão da fibrose, conforme sugerido pela correlação com uma associação inversa entre o número de linfócitos totais e o grau de fibrose presente.

Portanto, os resultados do nosso trabalho estão de acordo com as descrições prévias de linfopenia na DHA.<sup>717, 721, 722, 723, 732</sup> Também a elevação da relação  $CD4^+/CD8^+$ <sup>717, 718</sup> tinha sido previamente apenas encontrada em doentes

com fibrose mais evoluída, que de facto constituíam as populações dos dois estudos das referências anteriores, com DHA avançada.

A associação positiva entre  $CD4^+/CD8^+$  e grau de fibrose encontrada no nosso trabalho, e já previamente descrita, parece ser específica da DHA, já que o inverso foi verificado em doentes com hepatites víricas.<sup>735</sup> Essa relação poderá eventualmente contribuir para um painel de marcadores não invasivos de avaliação e estadiamento da fibrose na DHA.

Será necessária mais investigação para perceber a exata natureza da relação das subpopulações linfocitárias e fibrogénese hepática; no entanto esta descida mais acentuada no número dos linfócitos  $CD8^+$  parece ser um reflexo do grau de fibrose e não a sua causa, já que essa linfopenia seletiva não se verificou nos casos que ainda não tinham fibrose avançada.

Ao contrário da hemocromatose hereditária, o número de linfócitos  $CD8^+$  correlaciona-se diretamente com a sobrecarga de ferro, traduzida pela ferritina sérica. Esta associação, que atingiu significância estatística, não é fácil de explicar, dado que não existem trabalhos publicados sobre a relação das subpopulações linfocitárias e a sobrecarga de ferro na DHA.

O mecanismo de alteração das subpopulações linfocitárias parece pois ser distinto na DHA, envolvendo provavelmente um mecanismo etiopatogénico diferente das outras doenças referidas.



## **5.6. A Expressão de ARNm da Hecpidina é Inapropriadamente Baixa na Doença Hepática Alcoólica**

### **5.6.1. Introdução e Objetivos**

Como já discutimos, a hepcidina é um péptido com 25 aminoácidos, rico em cisteína, codificado pelo gene *HAMP*, localizado no cromossoma 19 (19q13.1), e sintetizado predominantemente no fígado. A sua descoberta foi relatada por dois grupos independentes em 2000 e 2001.<sup>254, 261</sup>

Inicialmente, a hepcidina foi descrita como um péptido antimicrobiano relacionado com a família das defensinas, mas o seu papel fulcral no metabolismo do ferro rapidamente foi identificado.<sup>268</sup>

A sobrecarga de ferro é um potente estímulo para a síntese de hepcidina, enquanto a ferropenia leva à sua supressão.<sup>277,278</sup> A hepcidina interage com a ferroportina-1, o único exportador transmembranar de ferro conhecido, promovendo a sua internalização e degradação, impedindo deste modo a absorção de ferro dos enterócitos para o plasma.<sup>287</sup>

A expressão de hepcidina correlaciona-se positivamente com os depósitos de ferro hepáticos, níveis de hemoglobina e função hepática.<sup>279</sup> A regulação da síntese hepática de hepcidina é extremamente complexa e regulada a nível transcricional por sinais estimulantes - inflamação, sobrecarga de ferro e stress celular - e por sinais inibidores - hipóxia, anemia e deficiência de ferro.<sup>233</sup>

A sobrecarga de ferro característica da DHA é conhecida desde há longa data, no entanto o mecanismo exato pelo qual ela acontece ainda não foi identificado.<sup>636</sup>

Os dados sobre a expressão de hepcidina em tecido hepático humano são escassos, não existindo nenhuma descrição sobre este tema na DHA. Ohtake e colaboradores relataram que a prohepcidina sérica, bem como a relação prohepcidina/ferritina, se encontravam diminuídas comparativamente com controlos normais;<sup>658</sup> no entanto a prohepcidina é um propéptido inativo, e não se demonstrou que os seus níveis estivessem relacionados com as reservas de ferro corporal.<sup>513</sup>

O nosso conhecimento atual sobre a relação entre expressão genética da hepcidina e sobrecarga de ferro na DHA é baseado apenas em modelos celulares e animais. Trabalhos experimentais descreveram uma diminuição da expressão do ARNm da hepcidina *in vivo* e *in vitro* como consequência do metabolismo do etanol.<sup>655, 656, 657, 661, 662</sup> No entanto, era incerto se estes dados poderiam ser extrapolados para o ser humano, já que o genoma do ratinho contém dois genes altamente similares para a hepcidina (*hepc1* e *hepc2*), enquanto o genoma humano apenas contém uma cópia do gene equivalente (*HAMP*). O *hepc1* parece codificar uma proteína similar à hepcidina humana, enquanto a função do *hepc2* é desconhecida.<sup>262</sup>

Pretendemos avaliar a expressão hepática de ARNm da hepcidina em doentes com DHA, e quais os fatores que contribuem para a sua eventual diminuição. Apresentamos um estudo observacional, de casos / controlos sobre o tema.

### **5.6.2. Material e Métodos**

Foi avaliada a expressão genética da hepcidina em 61 casos e 20 controles saudáveis, usando as técnicas descritas no início deste capítulo.

Comparámos então a expressão de ARNm de hepcidina entre os dois grupos, bem como vários outros parâmetros clínicos e laboratoriais.

Avaliámos também a expressão genética da hepcidina consoante os graus de atividade necroinflamatória, esteatose, fibrose e existência de mutações HFE.

Através de uma análise multivariada de regressão linear, tentou-se construir um modelo explicativo para os níveis de expressão da hepcidina.

Para avaliar o efeito da ingestão do álcool, independentemente da função hepática, selecionou-se um grupo de casos sem cirrose e com função hepática preservada, comparando a expressão de hepcidina com os controles.

### **5.6.3. Resultados**

No quadro XIV podemos observar as características clínicas e laboratoriais dos casos e controles.

O grupo dos casos apresentou uma idade média ligeiramente mais elevada e era constituído predominantemente por homens. O alcoolismo ativo estava presente em 60,7% dos casos. A ingestão diária média reportada era de 120,3 g de álcool, e a ingestão total cumulativa ao longo da vida era de 2258,6 Kg.

Foi encontrada cirrose ao exame histológico em 41,0% dos doentes, englobando-se no total de 62,3% que apresentaram fibrose significativa (fibrose

perissinusoidal e portal/periportal, em ponte ou cirrose). Os restantes achados histológicos estão descrito no quadro XV.

Curiosamente, a maior parte dos doentes apresentava esteatose ligeira (59%) ou ausente (26,2%). Os graus de atividade necroinflamatória encontraram-se amplamente distribuídos, sendo esta ausente em 59% dos casos, ligeira em 31,1%, moderada em 16,4% e grave em 8,2%.

Os depósitos de ferro estavam ausentes em 59%, sendo de grau 1 em 21,3%, grau 2 em 16,4% e grau 3 em 3,3%.

O *score* MELD médio era de 7,6.

Mais uma vez, não foram encontrados genótipos *HFE* diagnósticos de hemocromatose, e a distribuição das diferentes mutações não foi significativamente diferente entre casos e controlos.

Também não foram encontradas diferenças significativas entre as médias do número de leucócitos e valores de hemoglobina, creatinina, PCR, IL-6 and TNF- $\alpha$ . Pelo contrário, as provas de função hepática estavam significativamente alteradas nos casos, exceto a albumina. Mais uma vez se verificou uma linfopenia relativa nos casos com um aumento significativo da relação CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>.

Os valores da ferritina sérica (455,9 ng/mL vs 115,7 ng/dL, p<0,0001) e da saturação da transferrina (39,6% vs 27,8% p=0,047) foram mais elevados nos casos.



Quadro XIV. Características clínicas e laboratoriais de casos e controles.

	<b>Casos (n=61)</b>	<b>Controles (n=20)</b>	<b>p</b>
<b>Idade</b>	53,8+/-10,8	46,35+/-12,5	0,017
<b>% homens</b>	85,2%	25,0%	<0,0001
<b>Alcoolismo Ativo</b>	60,7%	-	-
<b>Consumo diário (g)</b>	120,3 +/-11,3	-	-
<b>Consumo total (Kg)</b>	2258,6+/-1048,6	-	-
<b>Fibrose significativa*</b>	62,3%	-	-
<b>Cirrose</b>	41,0%	-	-
<b>MELD</b>	7,6+/-4,7	-	-
<b>Leucócitos (x10<sup>9</sup>/L)</b>	6,0+/-2,1	7,0+/-1,8	NS
<b>Linfócitos (x10<sup>9</sup>/L)</b>	1,5+/-0,5	2,3+/-0,8	<0,0001
<b>Relação CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup></b>	3,1+/-1,3	2,0+/-0,7	0,014
<b>Hemoglobina (g/dL)</b>	13,5+/-2,0	14,0+/-1,1	NS
<b>INR</b>	1,2+/-0,2	1,0+/-0,1	<0,0001
<b>Albumina (g/dL)</b>	3,8+/-0,8	3,9+/-0,4	NS
<b>Fosfatase Alcalina (UI/dL)</b>	118,3+/-64,0	59,3+/-14,0	<0,0001
<b>GGT (UI/L)</b>	206,7+/-226,4	33,3+/-28,1	<0,0001
<b>ALT (UI/L)</b>	41,5+/-30,0	31,4+/-17,8	0,023
<b>AST (UI/L)</b>	58,2+/-38,5	24,6+/-8,1	<0,0001
<b>Bilirrubina Total (mg/dL)</b>	1,7+/-2,6	0,8+/-0,3	0,005
<b>Creatinina (mg/dL)</b>	0,9+/-0,3	0,8+/-0,2	NS
<b>PCR (mg/dL)</b>	0,9+/-1,6	0,6+/-0,8	NS
<b>IL-6 (pg/ml)</b>	43,0+/-63,0	29,9+/-53,6	NS
<b>TNF-<math>\alpha</math> (pg/ml)</b>	5,5+/-4,6	3,8+/-2,4	NS
<b>Ferro sérico (ug/dL)</b>	116,6+/-59,0	87,7+/-39,2	NS
<b>Ferritina (ng/mL)</b>	455,9+/-410,0	115,7+/-81,8	<0,0001
<b>Saturação transferrina %</b>	39,6%+/-20,2	27,8+/-12,8	0,047
<b>Relação Ferritina/Hepcidina</b>	4,3x10 <sup>-3</sup> +/- 6,0x10 <sup>-3</sup>	1,1x10 <sup>-1</sup> +/- 3,0x10 <sup>-1</sup>	<0,0001

\*fibrose perissinusoidal e portal/peripoortal, em ponte ou cirrose.

Quadro XV. Achados histológicos na biopsia hepática (casos).

	<b>Casos (n=61)</b>
<b>Fibrose</b>	
Ausente	18,0
Perissinusoidal ou portal/perportal	8,2%
Perissinusoidal e portal/perportal	11,5%
Fibrose em ponte	21,3%
Cirrose	41,0%
<b>Esteatose</b>	
Ausente	26,2%
Ligeira (<25%)	59,0%
Moderada (25-50%)	11,5%
Grave(>50%)	3,3%
<b>Atividade necroinflamatória</b>	
Ausente	44,3%
Ligeira	31,1%
Moderada	16,4%
Grave	8,2%
<b>Depósitos de ferro hepáticos (Escala de Scheuer com coloração de Perls)</b>	
Ausente	59%
Grau 1	21,3%
Grau 2	16,4%
Grau 3	3,3%
Grau 4	0%

A expressão genética relativa da hepcidina dos casos, normalizada para a expressão correspondente de GAPDH, comparativamente com os controlos, está descrita na figura 21. Em média, a diferença foi de  $-0,67$  ( $\log_{10} 2^{-\Delta\Delta CT}$ ),  $p < 0,001$ , traduzindo uma diminuição significativa da expressão da hepcidina no grupo de doentes com DHA.

## Casos vs Controlos

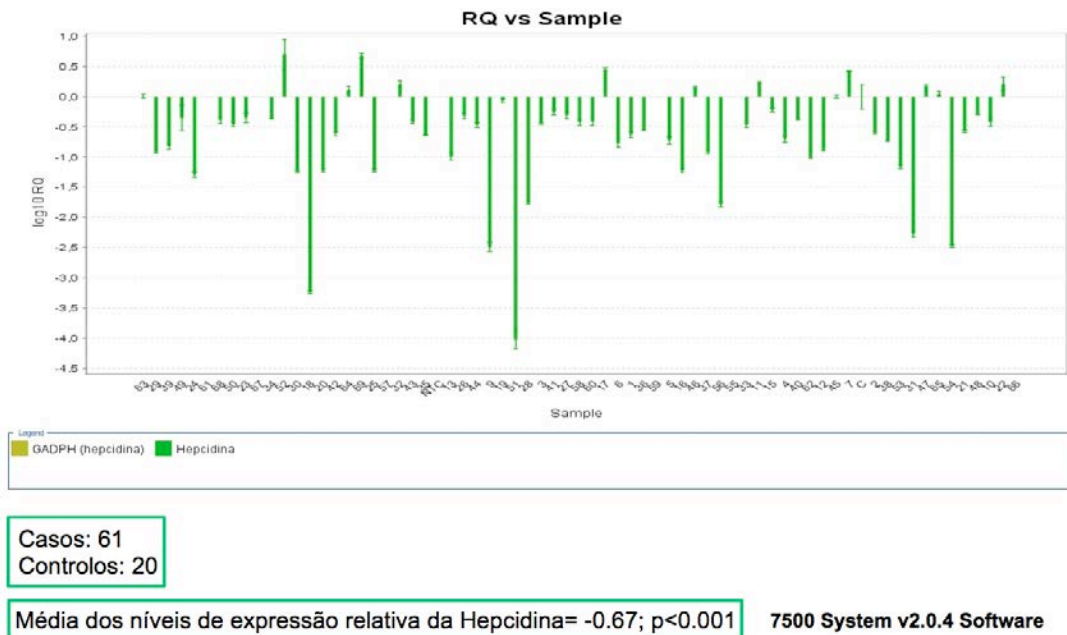


Figura 21. Expressão genética relativa da hepcidina - casos vs controlos. C - média + desvio padrão da expressão genética da hepcidina nos controlos. RQ - *Relative Quantities* - quantidades relativas de expressão genética. Cada barra representa um caso individual, comparado com a expressão média de hepcidina de todos os controlos.

Apresentado os resultados de outra forma, e com um teste estatístico diferente, considerando a média dos resultados de  $2^{-CT}$  de cada grupo, continuamos a verificar uma significativa diminuição da expressão da hepcidina, relativamente à da GAPDH, nos casos (8,3 vs 1,6,  $p = 0,002$ ) (figura 22).

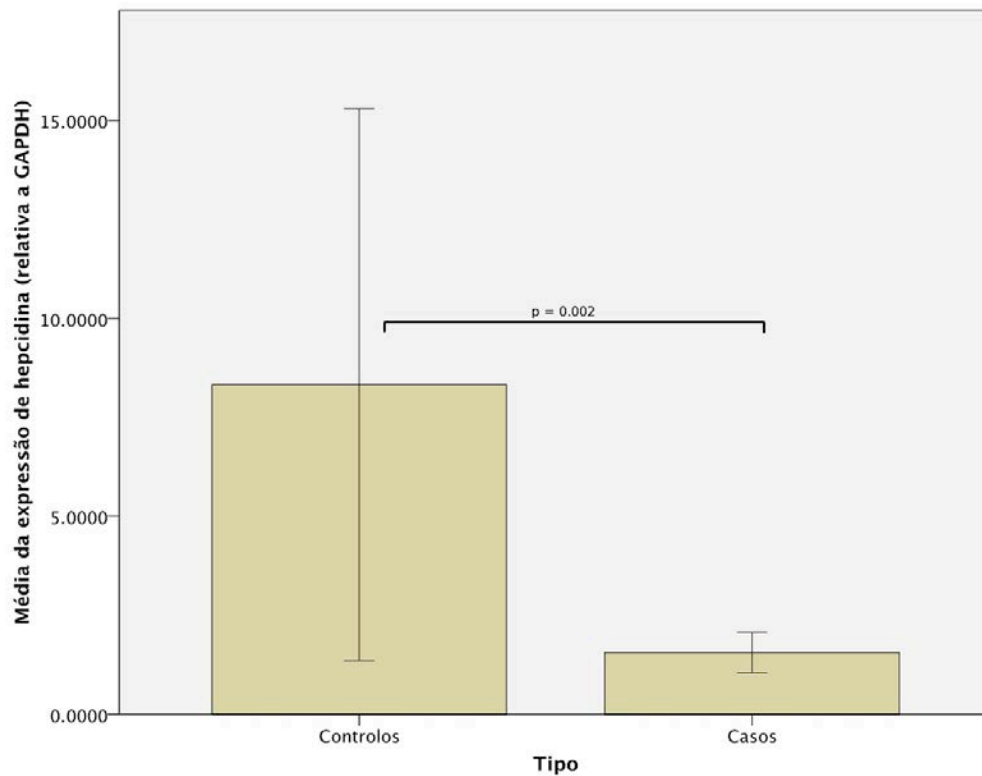


Figura 22. Expressão genética relativa da hepcidina - casos vs controlos.

Para além disso, a relação entre a expressão da hepcidina e os níveis de ferritina sérica encontra-se profundamente diminuída nos casos, comparativamente com os controlos ( $4,3 \times 10^{-3} \pm 6,0 \times 10^{-3}$  vs  $1,1 \times 10^{-1} \pm 3,0 \times 10^{-1}$ ,  $p < 0,0001$ ) (figura 23).

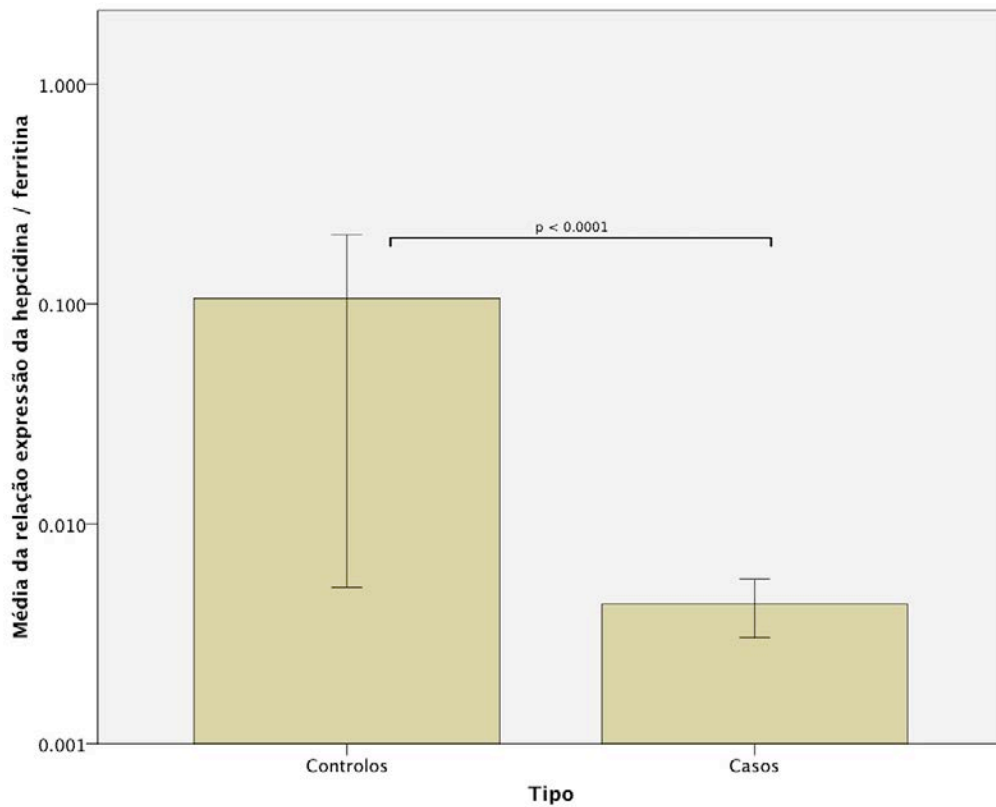


Figura 23. Relação entre expressão da hepcidina e ferritina sérica - casos *vs* controlos. Escala logarítmica.

Analisando a expressão da hepcidina consoante os grupos da atividade neuroinflamatória, esteatose e genótipos *HFE*, não foram encontradas diferenças relevantes (figuras 24, 25, 26).

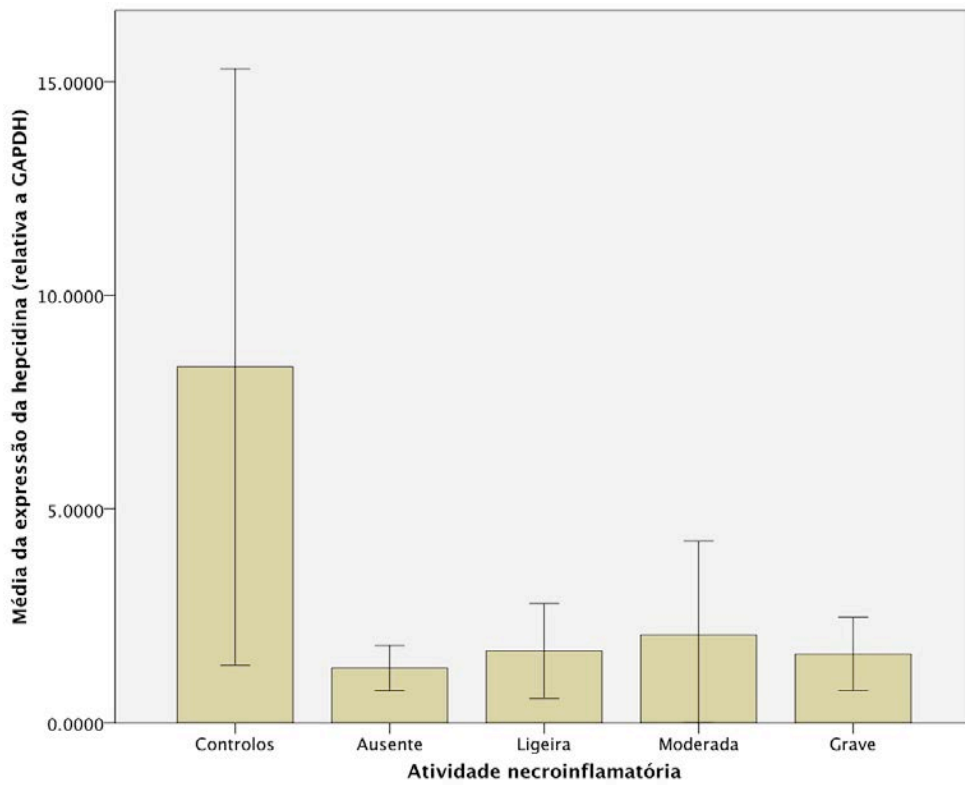


Figura 24. Comparação da expressão genética relativa da hepcidina - grau de atividade necroinflamatória. Não há diferenças significativas entre os casos.

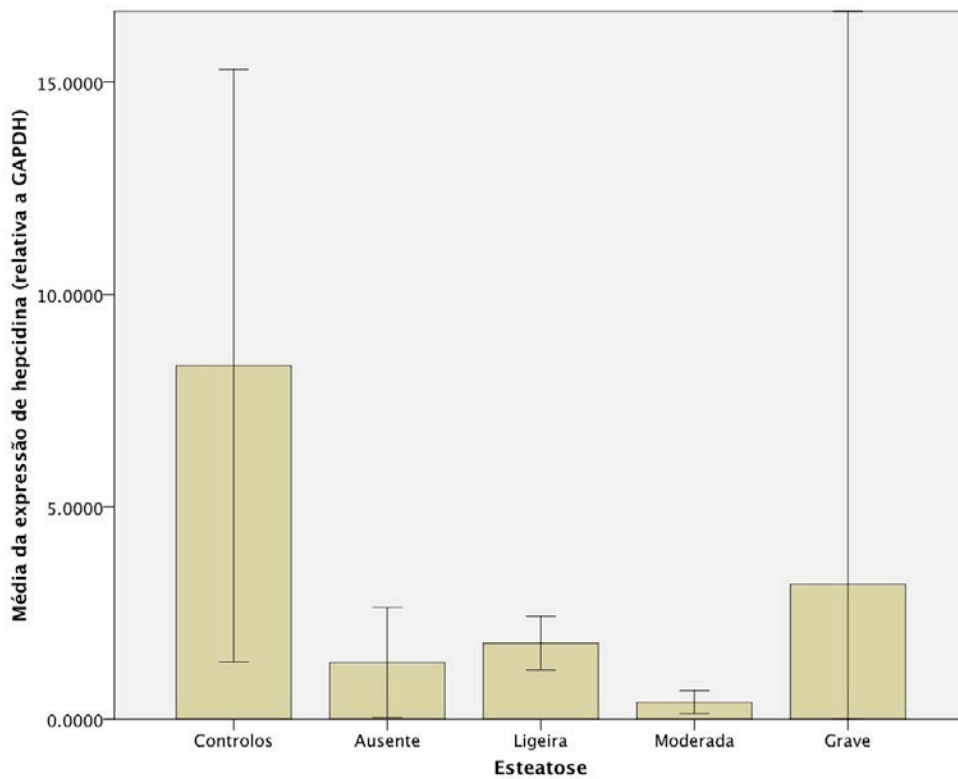


Figura 25. Comparação da expressão genética relativa da hepcidina - esteatose. Não há diferenças significativas entre os casos.

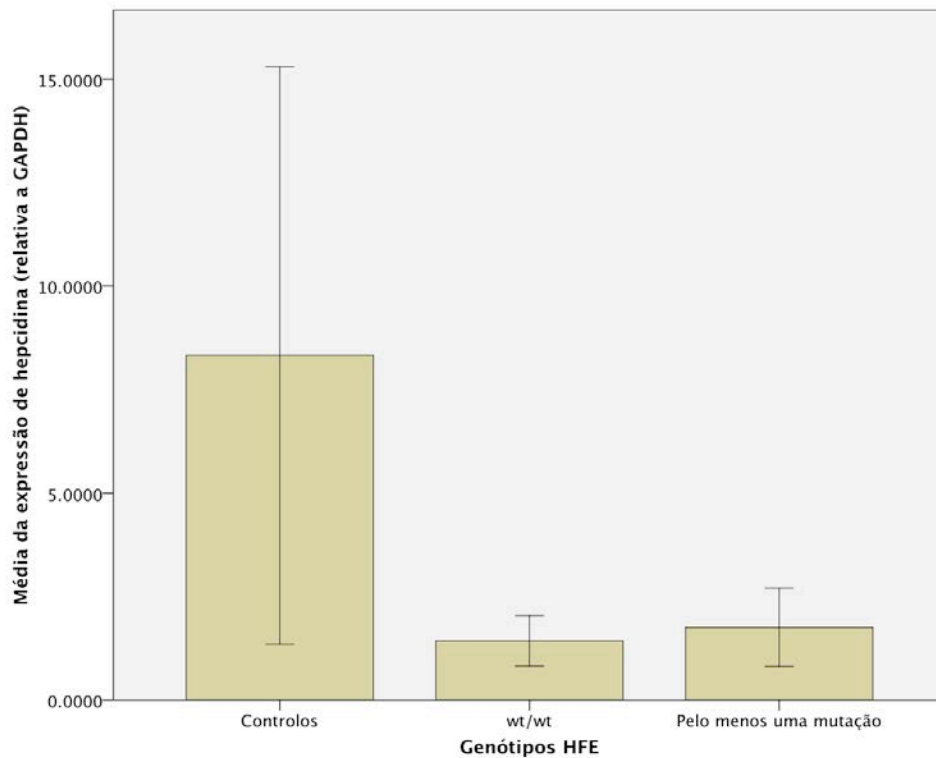


Figura 26. Comparação da expressão genética relativa da hepcidina - genótipos *wild type* (wt/wt) vs genótipos com pelo menos uma mutação. Não há diferenças significativas entre os casos.

Considerando os casos e dividindo-os consoante a fibrose encontrada na biopsia hepática, verificámos que a expressão de hepcidina era significativamente mais baixa no subgrupo de doentes com fibrose mais avançada (fibrose em ponte ou cirrose) comparativamente com os outros casos ( $p = 0,006$ ) (figura 27).

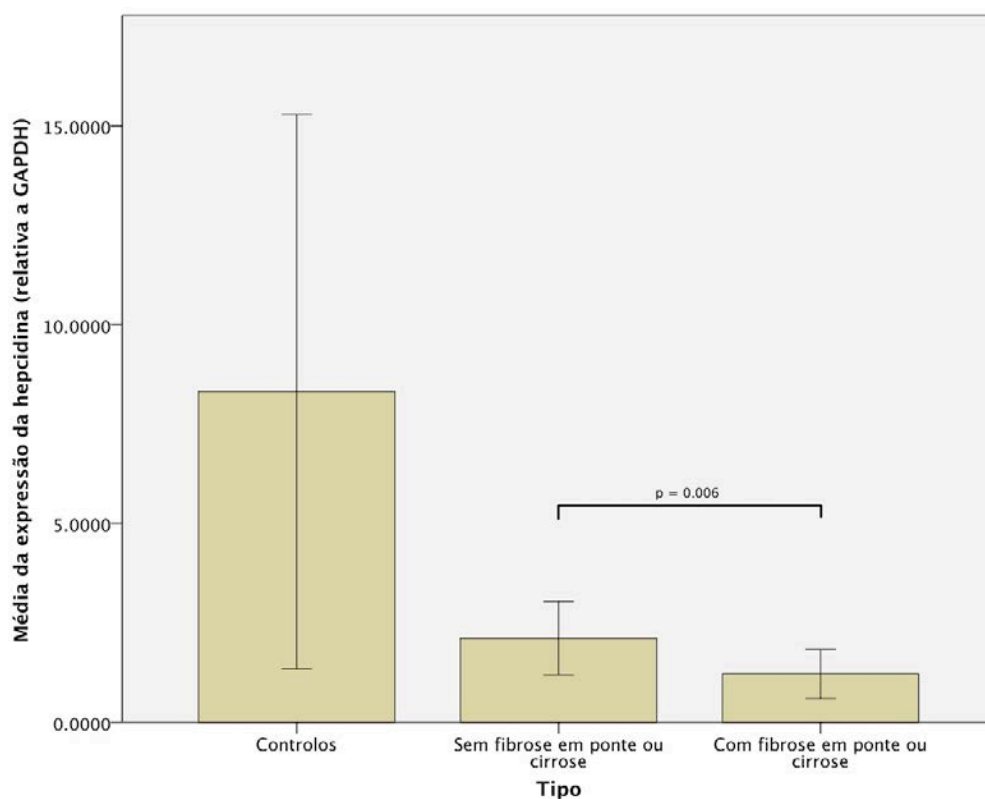


Figura 27. Comparação da expressão genética relativa da hepcidina - casos sem fibrose em ponte ou cirrose vs casos com fibrose em ponte ou cirrose.

A idade média e a distribuição por sexos era semelhante, nestes grupos. Existe uma percentagem superior de alcoolismo ativo no grupo sem fibrose em ponte ou cirrose (78,3% vs 52,6%,  $p=0,041$ ) (quadro XVI).

O consumo diário médio reportado nos dois grupos não apresentou diferenças significativas, no entanto o consumo cumulativo total ao longo da vida foi significativamente superior no grupo com maior grau de fibrose (1888,7 Kg vs 2414,6 Kg,  $p=0,037$ ).

O *score* MELD, o INR, a fosfatase alcalina e a bilirrubina total foram significativamente mais altos nos doentes com fibrose em ponte ou cirrose, enquanto o inverso se passou com os valores de hemoglobina e de albumina, o número de eritrócitos, de linfócitos, e de plaquetas. Também aqui se pôde verificar



que os valores mais baixos de linfócitos e os mais altos da relação  $CD4^+/CD8^+$  correspondem aos doentes com graus de fibrose mais avançados.

Comparando os valores da cinética do ferro, verificámos não existirem diferenças na saturação da transferrina nem no ferro sérico, contudo os valores de ferritina são mais baixos no grupo com fibrose em ponte ou cirrose (513,7 ng/mL vs 386,9,  $p=0,025$ ).

Não se encontraram diferenças significativas em termos de prevalência de mutações *HFE*, leucócitos totais e neutrófilos, VGM, creatinina, GGT, transaminases e PCR.

Quadro XVI. Subgrupos dos casos: sem fibrose em ponte ou cirrose vs com fibrose em ponte ou cirrose.

	<b>Sem fibrose em ponte ou cirrose (n=23)</b>	<b>Com fibrose em ponte ou cirrose (n=38)</b>	
<b>Idade</b>	53,1+/-11,6	53,7+/-10,7	NS
<b>% homens</b>	95,7%	78,9%	NS
<b>Alcoolismo Ativo</b>	78,3%	52,6%	0,041
<b>Consumo diário (g)</b>	115,2+/-77,9	93,4+/-95,6	NS
<b>Consumo total (Kg)</b>	1888,7+/-793,4	2414,6+/-1085,3	0,037
<b>MELD</b>	4,5+/-2,3	9,3+/-4,7	<0,0001
<b>Existência de pelo menos uma mutação <i>HFE</i></b>	47,8%	34,2%	NS
<b>Leucócitos (x10<sup>9</sup>/L)</b>	6,5+/-1,6	5,7+/-2,4	NS
<b>Neutrófilos (x10<sup>9</sup>/L)</b>	4,0+/-1,3	3,6+/-1,9	NS
<b>Linfócitos (x10<sup>9</sup>/L)</b>	1,7+/-0,4	1,4+/-0,6	0,008
<b>Relação CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup></b>	2,5+/-1,2	3,4+/-1,3	0,015
<b>Eritrócitos (x10<sup>12</sup>/L)</b>	4,5+/-0,6	3,8+/-0,7	0,001
<b>Hemoglobina (g/L)</b>	14,7+/-1,3	12,7+/-2,0	0,001
<b>VGM (fL)</b>	96,3+/-6,7	97,5+/-6,5	NS
<b>Plaquetas (x10<sup>9</sup>/L)</b>	224,4+/-83,0	113,1+/-60,5	<0,0001
<b>INR</b>	1,0+/-0,1	1,3+/-0,2	<0,0001
<b>Creatinina (mg/dl)</b>	0,9+/-0,1	0,9+/-0,3	NS
<b>Albumina (g/dL)</b>	4,3+/-0,5	3,4+/-0,8	<0,0001
<b>Fosfatase Alcalina (UI/dL)</b>	75,2+/-32,2	144,7+/-64,2	<0,0001
<b>GGT (UI/dL)</b>	179,9+/-154,8	232,4+/-262,6	NS
<b>ALT (UI/dL)</b>	50,1+/-43,8	36,0+/-14,5	NS
<b>AST (UI/dL)</b>	56,3+/-49,6	59,7+/-30,6	NS
<b>Bilirrubina total (mg/dL)</b>	0,9+/-0,4	2,2+/-3,1	0,001
<b>Ferro sérico (ug/dL)</b>	123,6+/-59,0	110,2+/-58,7	NS
<b>Ferritina (ng/mL)</b>	513,7+/-345,0	386,9+/-408,6	0,025
<b>Saturação transferrina %</b>	39,6+/-18,3	38,6+/-20,5	NS
<b>PCR (mg/dL)</b>	0,9+/-2,1	0,9+/-0,9	0,007

Considerando apenas os casos, ao procurarmos associações entre as variáveis, verificamos que a expressão da hepcidina apresentou uma associação

positiva significativa com os níveis de ferro séricos ( $r_s=0,280$ ,  $p=0,029$ ) ferritina sérica ( $r_s=0,519$ ,  $p<0.0001$ ), saturação da transferrina ( $r_s=0,315$ ,  $p=0,013$ ), grau de depósitos de ferro hepáticos ( $r_s=0,402$   $p=0,001$ ) e albumina sérica ( $r_s=0,254$ ,  $p=0,048$ ). A expressão da hepcidina correlacionou-se inversamente com os valores de INR ( $r_s=-0,401$ ,  $p=0,001$ ) e grau de fibrose ( $r_s=-0,260$ ,  $p=0,043$ ).

Dada a falta de emparelhamento entre casos e controlos, nomeadamente ao nível da idade e do sexo, e também de alguma heterogeneidade dos casos, principalmente ao nível da ingestão ativa de álcool ou não, função hepática, grau de fibrose, tentou-se construir um modelo explicativo para os níveis de expressão da hepcidina através de uma análise multivariada de regressão linear.

Foi usada como variável dependente o logaritmo da hepcidina, numa tentativa de diminuir o efeito dos valores mais extremos.

Considerando um modelo de regressão linear (quadro XVII), há significância de género, de tipo de paciente (caso ou controlo), da ferritina sérica e da presença de fibrose avançada ( $r^2=0,312$ ). A idade não foi relevante para o modelo estatístico, não apresentando significância.

Quadro XVII. Modelo de regressão linear (backward).

Modelo	Coeficientes <sup>a</sup>				
	Coeficientes não estandardizados		Coeficientes estandardizados	t	Sig.
	B	Erro Padrão	Beta		
(Constante)	-0,836	0,295		-2,834	0,006
Tipo (Caso/Controlo)	0,943	0,300	0,451	3,148	0,002
Sexo	0,635	0,234	0,322	2,713	0,008
Ferritina	0,001	0,000	0,258	2,461	0,016
Fibrose em ponte ou cirrose	-0,437	0,209	-0,242	-2,085	0,040

a. Variável dependente: log\_hepcidina.

Apesar da limitação do número de doentes e controlos, este modelo permite-nos afirmar que:

- A expressão de hepcidina é superior nos controlos, independentemente do género e dos níveis de ferritina;
- A expressão de hepcidina é superior nos homens, independentemente de ser caso ou controlo;
- O aumento da ferritina conduz a um aumento da expressão de hepcidina, independentemente de ser controlo ou paciente, e do género;
- Os doentes com os dois graus mais avançados de fibrose têm significativamente menos hepcidina independentemente da ferritina e do género.

Deste modo, confirmam-se os achados das análises univariadas e das correlações encontradas, quando se aplica um modelo estatístico que permite o ajuste das outras variáveis.

A existência de alcoolismo ativo e a quantidade de álcool ingerida não foram incluídas neste modelo; a adição da primeira variável apresentava valores não significativamente diferentes de redução da hepcidina para as duas situações (sem e com alcoolismo ativo, embora com uma redução mais acentuada nestes últimos), mas não acrescentava nenhum poder explicativo das variáveis independentes - o  $r^2$  apresentava um valor semelhante. A quantidade de álcool ingerida não apresentou significância para o modelo, mas em análise univariada, dividindo os bebedores ativos em dois grupos com consumos inferiores e superiores a 100 g de álcool por dia, observámos que este último grupo apresentava níveis mais reduzidos de mRNA de hepcidina ( $p=0,035$ ) (figura 28).

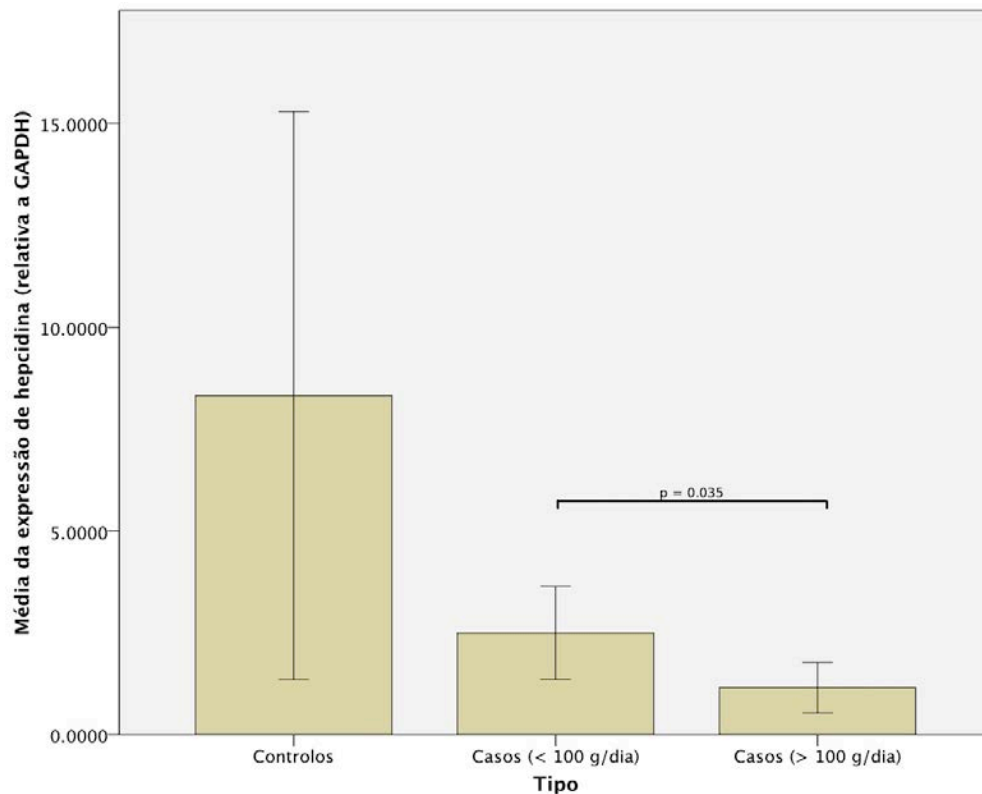


Figura 28. Comparação da expressão genética relativa da hepcidina - casos com consumos alcoólicos inferiores a 100 g / dia vs casos com consumos alcoólicos superiores a 100 g / dia.

Confrontados com estes resultados, para avaliar o efeito que a ingestão de álcool tinha na expressão hepática da hepcidina seleccionámos apenas os casos com alcoolismo ativo e sem cirrose documentada histologicamente, e comparámo-los com os 20 controlos já mencionados (quadro XVIII).

Verificámos que este subgrupo continua a ser algo mais velho que os controlos e predominantemente do sexo masculino.

Clinica e analiticamente, não se encontrou evidência de diminuição da função hepática, como podemos comprovar pela ausência de diferenças significativas no INR, albumina e bilirrubina total entre casos e controlos. Também semelhantes entre os dois grupos foram os valores de hemoglobina, creatinina e PCR.

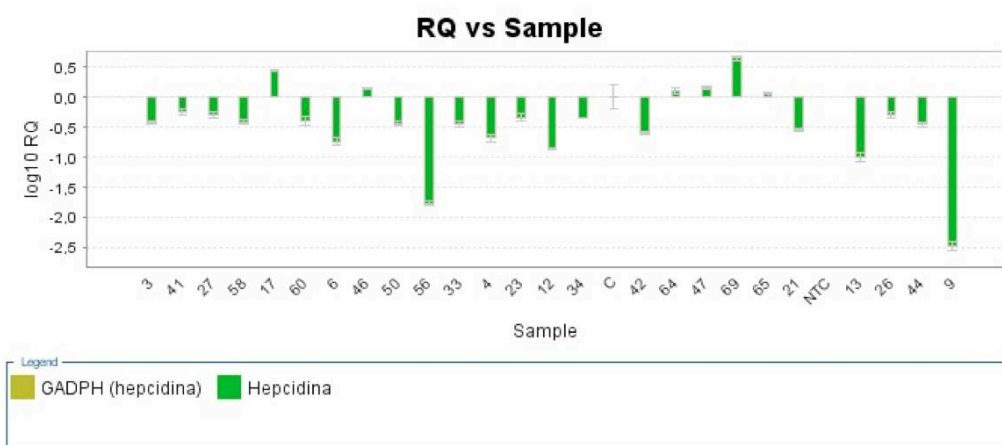
Com diferenças significativas, salientam-se os valores da fosfatase alcalina (102,1 UI/dL vs 59,3 UI/dL, p=0,012), GGT (288,8 UI/dL vs 33,3 UI/dL, p<0,0001), ALT (53,8 UI/dL vs 31,4 UI/dL, p=0,005), AST (72,1 UI/dL vs 24,6 UI/dL, p<0,0001), ferritina sérica (618,1 ng/mL vs 115,7 ng/mL, p<0,0001) e saturação da transferrina (39,7% vs 27,8%, p=0,024).

Quadro XVIII. Casos sem cirrose e com alcoolismo ativo vs controles.

	<b>Casos (n=25)</b>	<b>Controlos (n=20)</b>	<b>P</b>
<b>Idade</b>	54,3+/-11,6	46,4+/-12,5	0,029
<b>% homens</b>	92,0%	25,0%	<0,0001
<b>Consumo diário (g)</b>	154,0 +/-51,5	-	-
<b>Consumo total (Kg)</b>	2111,7+/-884,8	-	-
<b>Existência de pelo menos uma mutação HFE</b>	40,0%	25,0%	NS
<b>MELD</b>	6,9+/-1,8	-	NS
<b>Hemoglobina (g/L)</b>	14,0+/-1,8	14,0+/-1,1	NS
<b>INR</b>	1,1+/-0,2	1,0+/-0,1	NS
<b>Creatinina (mg/dl)</b>	0,8+/-0,2	0,8+/-0,2	NS
<b>Albumina (g/dL)</b>	3,9+/-0,7	3,9+/-0,4	NS
<b>Fosfatase Alcalina (UI/dL)</b>	102,1+/-76,9	59,3+/-14,0	0,012
<b>GGT (UI/dL)</b>	288,8+/-236,2	33,3+/-28,1	<0,0001
<b>ALT (UI/dL)</b>	53,8+/-43,2	31,4+/-17,8	0,005
<b>AST (UI/dL)</b>	72,1+/-54,1	24,6+/-8,1	<0,0001
<b>Bilirrubina total (mg/dL)</b>	1,1+/-0,6	0,8+/-0,3	NS
<b>Ferro sérico (ug/dL)</b>	121,4+/-69,3	87,7+/-39,2	NS
<b>Ferritina (ng/mL)</b>	618,1+/-436,0	115,7+/-81,8	<0,0001
<b>Saturação transferrina %</b>	39,7+/-20,9	27,8+/-12,8	0,024
<b>PCR (mg/dL)</b>	1,1+/-2,0	0,6+/-0,8	NS

Analisando a expressão genética da hepcidina neste grupo (figura 29), verificamos que também se encontra significativamente diminuída relativamente aos controlos, com uma ordem de grandeza de -0,44 log 10 (p=0,009).

## Casos sem cirrose e com alcoolismo ativo vs Controlos



Casos sem cirrose e com alcoolismo ativo: 25  
Controlos: 20

Média dos níveis de expressão relativa da Heparidina = -0.44;  $p=0.009$  7500 System v2.0.4 Software

Figura 29. Expressão genética relativa da hepcidina - casos sem cirrose e com alcoolismo ativo vs controlos. RQ - *Relative Quantities* - quantidades relativas de expressão genética. Cada barra representa um caso individual, comparado com a expressão média de hepcidina de todos os controlos.

Verificámos também que neste subgrupo de doentes a relação entre a expressão da hepcidina e a ferritina sérica se encontra significativamente diminuída em relação aos controlos (figura 30).

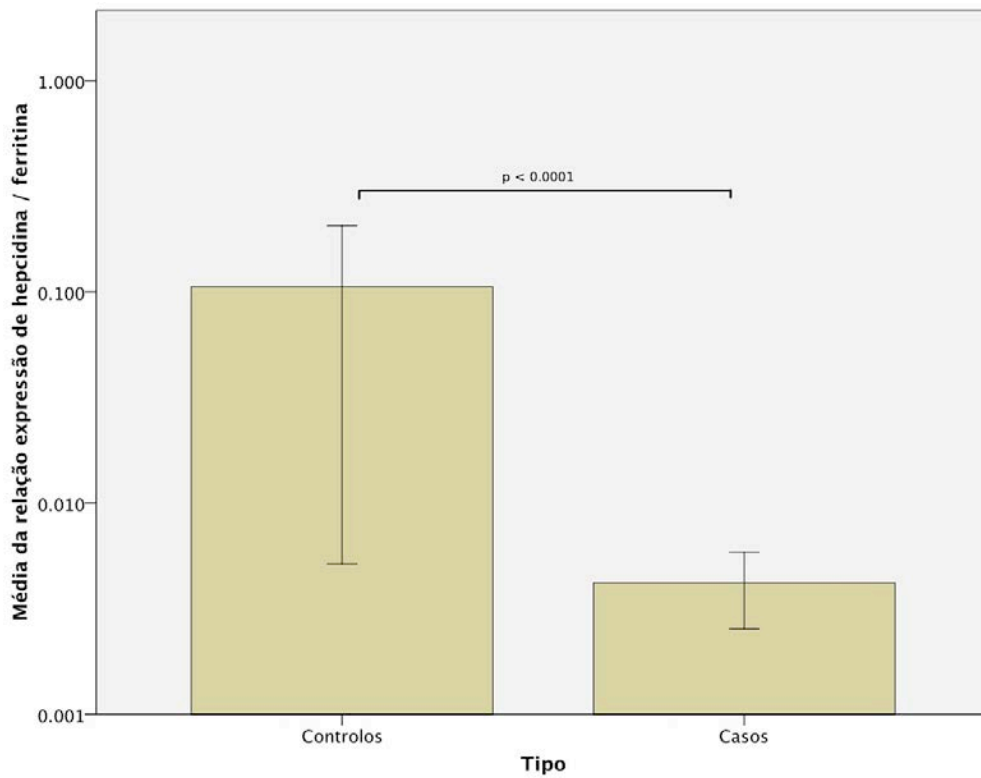


Figura 30. Relação entre expressão da hepcidina e ferritina sérica - casos com alcoolismo ativo e sem cirrose vs controlos. Escala logarítmica.

Nestes doentes verificou-se também uma tendência para menores níveis de expressão de hepcidina naqueles com consumos alcoólicos superiores a 100g diários (figura 31).



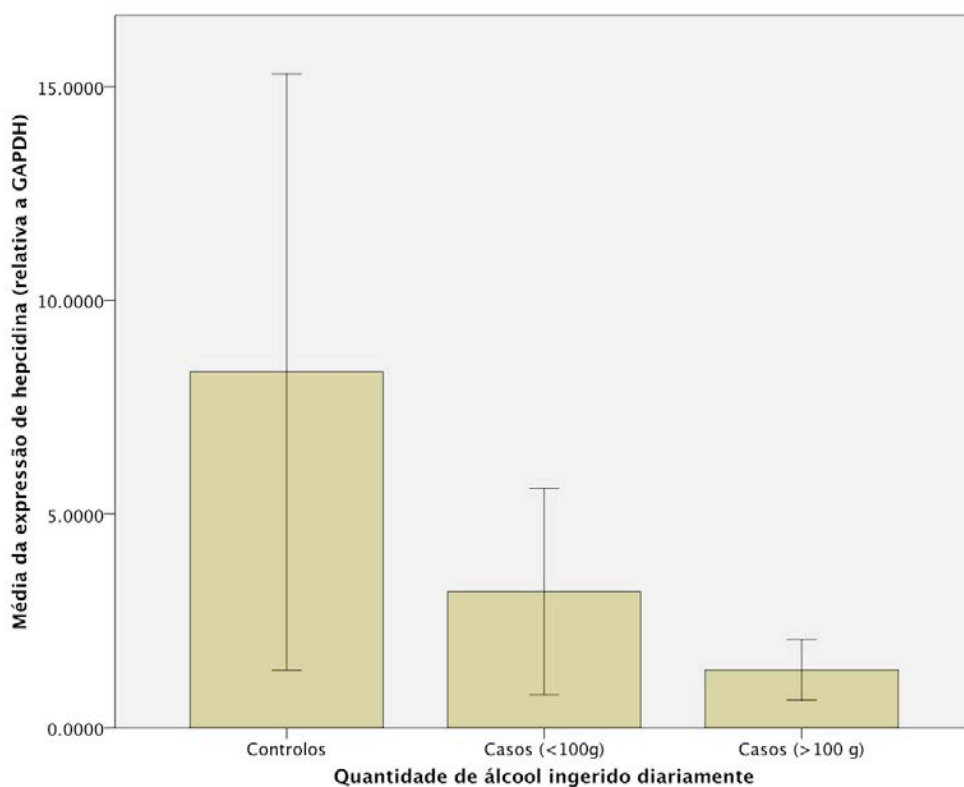


Figura 31. Comparação da expressão genética relativa da hepcidina - casos sem cirrose com consumos alcoólicos inferiores a 100 g / dia vs casos sem cirrose com consumos alcoólicos superiores a 100 g / dia.

### 5.6.3. Discussão e Conclusões

Tanto quanto é do nosso conhecimento, este é o primeiro trabalho de investigação que avalia a expressão genética da hepcidina em doentes com DHA, usando amostras de fígado humano.

O conhecimento, até à data, da influência do álcool na regulação da transcrição de hepcidina no fígado, provém de escassos trabalhos de experimentação animal, como anteriormente descrito.

Os nossos doentes, apesar do quadro de sobrecarga de ferro traduzido por níveis significativamente mais elevados de ferritina sérica e de saturação da

transferrina, apresentaram uma expressão inapropriadamente baixa de hepcidina a nível hepático, sendo inferior aos controlos que apresentavam parâmetros normais da cinética do ferro. Isto traduz claramente uma falência do mecanismo homeostático de regulação do ferro corporal.

Ainda assim, o estímulo positivo para o aumento da transcrição da hepcidina parece estar de algum modo presente, como foi evidenciado pela associação significativa entre a sua expressão relativa e os níveis de ferritina e de saturação da transferrina. Contudo, a sua magnitude parece ser claramente insuficiente para prevenir a absorção intestinal de ferro num quadro já de sobrecarga, o que se torna evidente com a comparação da relação da expressão da hepcidina / ferritina.

Considerando que o estudo foi desenhado para uniformizar, tanto quanto possível entre casos e controlos, outros fatores que influenciam a transcrição da hepcidina, como a inflamação, hipóxia, anemia, deficiência de ferro e outras doenças hepáticas ou sistémicas, ficaria a questão se o próprio álcool seria responsável pela inibição dessa transcrição ou se a produção de hepcidina se encontrava simplesmente afetada de igual modo à de outras proteínas em quadros de insuficiência hepática.

Pelas subanálises que efetuámos posteriormente, pensamos que ambos os fatores poderão estar implicados na produção comprometida de hepcidina pelo fígado.

A principal limitação do nosso trabalho foi a disparidade em relação ao sexo entre os grupos de casos e controlos. Isto ficou-se a dever à escolha da população a abordar para o grupo de controlo, dado que a litíase biliar é bastante mais frequente no sexo feminino. A juntar a isto, de referir que a maioria dos

potenciais controlos do sexo masculino abordados relatavam consumos alcoólicos superiores a 40 g por dia, sendo excluídos à partida.

De facto, como já referimos na revisão bibliográfica, os níveis de hepcidina nos homens são relativamente constantes ao longo da vida, idênticos aos das mulheres pós-menopáusicas; as mulheres em idade fértil têm valores mais baixos de hepcidina, como mecanismo compensatório de aumentar a absorção intestinal em resposta às perdas menstruais.

Para minimizar este viés, excluímos à partida todos os controlos com valores anormais de hemoglobina, ferro, ferritina e saturação de transferrina.

A aplicação de uma análise multivariada de regressão linear permitiu, no entanto, o ajustamento para as variáveis não emparelhadas entre casos e controlos. Ajustados para o sexo e idade, confirmou-se que a expressão de hepcidina era superior nos controlos e que os doentes com fibrose mais avançada têm significativamente menos hepcidina independentemente da ferritina e do género.

Confirmou-se também que, como descrito na literatura, a expressão de hepcidina é superior nos homens, independentemente de ser doente ou não.

Demonstrámos que, quer considerando todos os doentes, quer considerando apenas os casos sem cirrose e com alcoolismo ativo, existe uma diminuição bastante significativa ( $p < 0,001$  e  $p = 0,009$ , respetivamente) da expressão genética da hepcidina em relação aos controlos. Quando muito, o excesso de mulheres no grupo de controlo poderá eventualmente ter induzido um viés negativo, com uma determinação mais baixa do "zero" para aferição da expressão relativa da hepcidina nos casos.

Como vimos, não foi possível incluir a variável de alcoolismo ativo no modelo estatístico de regressão linear. Atribuímos este facto à falta de fiabilidade

das respostas dos doentes quando inquiridos sobre a abstinência alcoólica, assumindo que a categorização dos doentes como não bebedores pode inevitavelmente ter sido feita com imprecisão, e com dados pouco fidedignos não é possível construir um modelo estatístico estável.

Decidimos então, para avaliar a influência do alcoolismo ativo na expressão da hepcidina, considerar apenas os doentes que afirmavam beberem - não é expectável que um alcoólico que assume que bebe esteja a faltar à verdade, enquanto o inverso não será certamente um dado adquirido.

Excluimos também todos os doentes com cirrose documentada histologicamente, para eliminar o viés da insuficiência hepática.

Os 25 doentes que apresentavam essas características foram os que evidenciaram parâmetros analíticos de sobrecarga de ferro mais elevados, ao mesmo tempo que os valores de hemoglobina, os parâmetros de avaliação da capacidade biossintética do fígado (INR, albumina, bilirrubina) e os de inflamação (número de leucócitos, PCR) não foram significativamente diferentes dos controlos. Deste modo, a variável em jogo é praticamente só a existência de ingestão alcoólica excessiva.

Como vimos, demonstrámos que também neste subgrupo, a expressão de hepcidina se encontra significativamente diminuída em relação aos controlos, o que nos leva a concluir que, tal como tinha sido demonstrado em ratinhos, o álcool inibe fortemente a transcrição do *HAMP*, sendo provavelmente este o mecanismo causal principal para a sobrecarga de ferro na DHA, dada a insuficiência relativa de hepcidina. Na doença mais evoluída, a diminuição da capacidade biossintética do fígado poderá também contribuir para a fisiopatologia deste quadro.

Pelo exposto, aceitamos como verdadeira a hipótese 2, de como a sobrecarga de ferro na DHA tem como base fisiopatológica a diminuição da síntese de hepcidina, através da diminuição da transcrição do seu ARN mensageiro.



---

*Capítulo 6.*

*Conclusões e Comentários  
Finais*

---





---

## 6. Conclusões e Comentários Finais

A escolha do tema desta tese foi quase incontornável, dada a experiência da nossa prática clínica numa região do país fustigada pelos problemas ligados ao álcool. A incidência particular da investigação sobre a cinética do ferro nestes doentes foi motivada, na altura, pelos recentes avanços no que respeita à fisiologia da homeostasia do ferro no organismo humano.

De facto, a existência de sobrecarga de ferro na doença hepática alcoólica era um dos temas da medicina, em que havia evidência desde há longa data, mas sem uma sólida e cabal explicação das bases fisiopatológicas na origem dessas alterações.

Iniciámos a apresentação dos resultados do nosso trabalho pela pesquisa da relação entre mutações do gene *HFE* e sobrecarga de ferro na doença hepática alcoólica. Desde a sua descoberta, este gene é incontornável em matéria relacionada com alterações do metabolismo do ferro, já que a combinação de mutações atrás descritas resultam no quadro genético da hemocromatose hereditária.

Este tema tinha já sido abordado em alguns trabalhos disponíveis na literatura, e apesar de dois estudos terem conseguido relacionar uma maior frequência da mutação H63D em grupos de alcoólicos com doença hepática mais grave, o nosso corrobora as conclusões da maioria: não existe uma frequência mais elevada de mutações *HFE* nos doentes alcoólicos do que na população em geral, pelo que estas não poderão ser responsáveis pela sobrecarga de ferro evidenciada naqueles doentes; e os doentes com DHA que apresentam pelo menos uma mutação *HFE* não têm doença mais evoluída, nem com maior atividade, pois em análise

multivariada não se evidenciou um risco aumentado de existência de fibrose mais avançada ou de atividade necroinflamatória na biopsia hepática, comparativamente ao grupo de doentes com DHA sem qualquer mutação *HFE*.

No entanto, a análise multivariada de regressão logística descrita verificou que o risco relativo de ter pelo menos uma mutação *HFE* e depósitos de ferro hepático de grau 2 ou superior era de 17,23 com um intervalo de confiança a 95% (CI 95%) de 2,09-142,34,  $p=0,008$ , em relação aos doentes *wild-type*. Esta é a novidade que este trabalho introduz em relação à literatura existente, pois tal facto ainda não tinha sido descrito.

Curiosamente, não conseguimos demonstrar que a presença de pelo menos uma mutação *HFE* estivesse associada a um risco superior de apresentar uma ferritina sérica superior ao normal, ao contrário da existência da ingestão ativa de bebidas alcoólicas, variável que conferiu um risco relativo de 8,87 (95% CI: 2,11-34,78,  $p=0,003$ ).

Sem surpresa, a variável que melhor se correlacionou com o grau histológico de fibrose foi o consumo total de álcool estimado ao longo da vida ( $r_s=0,302$ ,  $p=0,016$ ).

Descrevemos em seguida a aplicabilidade da medição da concentração de ferro hepático por RMN em doentes com DHA, usando o protocolo da Universidade de Rennes. Gostaríamos de ter tido a comparação com a aferição com um espectrofotómetro de absorção atómica de grafite, mas tal não foi técnica e economicamente viável, pelo que considerámos a avaliação semiquantitativa dos depósitos de ferro hepáticos pela escala de Scheuer na coloração de Perls.

Dividimos os doentes que efetuaram RMN em dois grupos, com e sem alcoolismo ativo. Verificámos que a atividade da doença era maior no grupo com

alcoolismo ativo, com uma presença de atividade necroinflamatória significativa na biópsia de 40,0%, comparativamente com apenas 4,3% do grupo que reportava não fazer ingestão de bebidas alcoólicas ( $p=0,002$ ). Os valores da concentração de ferro hepático aferidos por RMN foram significativamente mais elevados no grupo com alcoolismo ativo - 40,1  $\mu\text{mol/g}$  vs 24,3  $\mu\text{mol/g}$ ,  $p=0,024$ , bem como a ferritina sérica - 560,6 ng/mL vs 253,1 ng/mL,  $p=0,001$ .

Avaliando as correlações entre as diferentes variáveis, verificámos que os valores da concentração de ferro hepático medidos por RMN apresentavam uma elevada associação com o grau histológico de depósitos de ferro -  $r_s=0,706$ ,  $p<0,0001$ .

A ferritina sérica apresentava uma associação moderada com os valores aferidos por RMN ( $r_s=0,615$ ,  $p<0,0001$ ) e com o grau histológico de depósitos de ferro ( $r_s=0,546$ ,  $p<0,0001$ ).

Neste grupo ligeiramente diferente de doentes, voltámos a verificar, através de análise multivariada semelhante à anterior, que o risco relativo de apresentar ingestão ativa de álcool e ferritina acima do limite superior do normal era de 10,96, com um intervalo de confiança a 95% de 2,47-48,58.

Apesar de não existirem trabalhos a validar o emprego da RMN na medição da concentração de ferro hepático na DHA, pelos nossos dados concluímos que poderá ser um método bastante fiável. No entanto, dado que a maioria desses doentes apresentam apenas sobrecarga de ferro moderada, provavelmente não será justificável a sua medição por rotina por RMN; no entanto, se esta for solicitada para avaliação da morfologia hepática, a medição da concentração de ferro do parênquima é bastante simples, não requerendo equipamento ou software adicional, estando a calculadora disponível e de acesso gratuito *online*.

Analisámos também a variação das subpopulações linfocitárias na DHA. Os nossos dados confirmam aqueles já publicados na maioria da literatura: é notória a existência de linfopenia na doença hepática alcoólica, sendo esta evidente quer em doentes alcoólicos e sem cirrose, quer em doentes com cirrose estabelecida, mas já sem consumos ativos. Portanto, quer o álcool, quer a existência de cirrose hepática parecem ser fatores que condicionam o aparecimento de linfopenia, o que está de acordo com trabalhos já publicados.

No entanto, no nosso estudo, a elevação da relação entre linfócitos CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> só é evidente nos casos com fibrose mais avançada.

Com efeito, a relação CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> apresenta uma correlação com o grau de fibrose ( $r_s=0,342$ ,  $p=0,01$ ) e com o score de Child-Pugh ( $r_s=0,482$ ,  $p=0,02$ ), enquanto o número de linfócitos totais apresenta uma correlação negativa com o mesmo ( $r_s=-0,398$ ,  $p=0,002$ ).

O número de linfócitos CD8<sup>+</sup> correlaciona-se também com os níveis de ferritina sérica ( $r_s=0,345$ ,  $p=0,009$ ).

Verificámos que, inversamente ao que está descrito em doentes com hepatites víricas, existiu uma associação positiva entre CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> e grau de fibrose na DHA, e especulamos que essa relação poderá eventualmente contribuir para um painel de marcadores não invasivos de avaliação e estadiamento da fibrose. Também ao contrário do reportado na hemocromatose hereditária, o número de linfócitos CD8<sup>+</sup> correlaciona-se diretamente com a sobrecarga de ferro, traduzida pela ferritina sérica.

O mecanismo de alteração das subpopulações linfocitárias parece pois ser distinto na DHA, envolvendo provavelmente um mecanismo etiopatogénico

diferente das outras doenças referidas, pelo que mais estudos focando especificamente esta área serão necessários para elucidar estes achados.

Finalmente, demonstrámos que um grupo de doentes com DHA apresentava uma diminuição da expressão hepática do ARN mensageiro da hepcidina, de  $-0,67$  ( $\log_{10} 2^{-\Delta CT}$ ),  $p < 0,001$ , conjuntamente com parâmetros laboratoriais compatíveis com sobrecarga de ferro - ferritina sérica ( $455,9$  ng/mL vs  $115,7$  ng/dL,  $p < 0,0001$ ) e saturação da transferrina ( $39,6\%$  vs  $27,8\%$   $p = 0,047$ ) - quando comparados com controlos saudáveis. Para além disso, a relação entre a expressão da hepcidina e os níveis de ferritina sérica encontra-se profundamente diminuída nos casos, comparativamente com os controlos ( $4,3 \times 10^{-3} \pm 6,0 \times 10^{-3}$  vs  $1,1 \times 10^{-1} \pm 3,0 \times 10^{-1}$ ,  $p < 0,0001$ ), o que traduz claramente uma falência do mecanismo homeostático de regulação do ferro corporal na DHA.

Os principais fatores responsáveis por esta supressão inadequada da expressão da hepcidina parecem ser dois:

- A ingestão ativa de bebidas alcoólicas, como se demonstrou na comparação entre doentes com alcoolismo ativo e sem cirrose ou indicadores laboratoriais de insuficiência hepática, que novamente apresentam valores diminuídos de expressão de hepcidina ( $-0,44 \log_{10} 2^{-\Delta CT}$ ,  $p = 0,009$ ), concomitantemente com valores elevados de ferritina e saturação da transferrina;

- A existência de fibrose avançada e insuficiência hepática, como se verificou quer em análise univariada, onde os doentes com fibrose em ponte ou cirrose apresentam significativamente menos expressão de hepcidina do que aqueles com fibrose menos evoluída, quer em análise multivariada num modelo de regressão linear, corrigida para o tipo de doente, sexo e ferritina sérica, onde a

existência de fibrose em ponte e cirrose condicionava uma diminuição da expressão da hepcidina.

Este é o primeiro trabalho de investigação que avalia a expressão genética da hepcidina em doentes com DHA, usando amostras de fígado humano. Através dos dados apresentados, pensamos ter demonstrado que a principal causa da sobrecarga de ferro na DHA é a supressão da expressão hepática da hepcidina, o que vai permitir a absorção intestinal descontrolada de ferro, traduzida depois pela sobrecarga tecidual. Numa fase inicial da doença, o principal fator inibitório da expressão da hepcidina parece ser a ingestão alcoólica excessiva, confirmando em seres humanos o mecanismo fisiopatológico que tinha já sido demonstrado pela inibição, quer *in vitro* quer *in vivo*, da expressão do seu ARNm pelo stress oxidativo do metabolismo do etanol. Numa fase mais tardia, a diminuição da capacidade biossintética do fígado pela existência de fibrose avançada e insuficiência hepática poderá também desempenhar um papel, provocando uma diminuição da expressão e síntese da hepcidina, o que permite também explicar a frequente presença de depósitos de ferro aumentados no fígado de doentes com DHA terminal.

Depois do incrível avanço no conhecimento da fisiopatologia da regulação do metabolismo do ferro no organismo humano que ocorreu na última década, resta-nos aguardar pelo potencial terapêutico que o desenvolvimento futuro de agonistas e antagonistas da hepcidina poderá trazer. A sobrecarga de ferro causada pela carência primária (como a hemocromatose hereditária) ou secundária (categoria onde demonstrámos que a DHA se inclui) poderá ser tratada com análogos como as minihepcidinas recentemente descritas. Seria interessante avaliar experimentalmente se administração desses análogos na DHA poderia atrasar a

evolução da doença para formas mais graves, dado o papel que a sobrecarga de ferro eventualmente desempenha na lesão hepática.

Já o uso de antagonistas revolucionaria o tratamento da anemia associada à inflamação crónica, da qual a doença renal terminal é um forte exemplo, provavelmente reduzindo as necessidades de eritropoietina desses doentes e aumentando a qualidade de vida.

"O futuro dependerá daquilo que fazemos no presente." - Mohandas Gandhi.





---

# *Bibliografia*

---



## Bibliografia

---

<sup>1</sup> Álcool e problemas ligados ao álcool em Portugal. M<sup>a</sup> Lucília Mercês de Mello et al. Direção Geral de Saúde 2001. ISBN 972-9425-93-0

<sup>2</sup> Franco C. Álcool e o Homem. Ser Saúde. 2007; 2:70-89

<sup>3</sup> WHO Expert Committee on Problems related to alcohol consumption, 1980. Technical Report Series 650. [http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO\\_TRS\\_650.pdf](http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_650.pdf)

<sup>4</sup> WHO Expert Committee on Problems Related to Alcohol Consumption. Second Report. WHO Technical Report Series 944. [http://www.who.int/entity/substance\\_abuse/expert\\_committee\\_alcohol\\_trs944.pdf](http://www.who.int/entity/substance_abuse/expert_committee_alcohol_trs944.pdf)

<sup>5</sup> WHO Global Status Report on Alcohol and Health 2011. [http://www.who.int/entity/substance\\_abuse/publications/global\\_alcohol\\_report/msbgsruprofiles.pdf](http://www.who.int/entity/substance_abuse/publications/global_alcohol_report/msbgsruprofiles.pdf)

<sup>6</sup> WHO European status report on alcohol and health 2010. [http://www.euro.who.int/\\_\\_data/assets/pdf\\_file/0004/128065/e94533.pdf](http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0004/128065/e94533.pdf)

<sup>7</sup> Corrao G, Ferrari P, Zambon A, Torchio P. Are the recent trends in liver cirrhosis mortality affected by the changes in alcohol consumption? Analysis of latency period in European countries. *J Stud Alcohol*. 1997; 58:486-494.

<sup>8</sup> Ezzati M, Lopez A, Rodgers A, Vander Hoorn S, Murray CJ. The Comparative Risk Assessment Collaborating Group. Selected major risk factors and global and regional burden of disease. *Lancet*. 2002; 360:1347-1360.

<sup>9</sup> Cortez-Pinto H, Gouveia M, dos Santos Pinheiro L, Costa J, Borges M, Vaz Carneiro A. The burden of disease and the cost of illness attributable to alcohol drinking - results of a national study. *Alcohol Clin Exp Res*. 2010; 34:1442-9.

<sup>10</sup> Cortez-Pinto H, Marques-Vidal P, Monteiro E. Liver disease-related admissions in Portugal: clinical and demographic pattern. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2004; 16:873-7.

<sup>11</sup> WHO European status report on alcohol and health 2010. [http://www.euro.who.int/\\_\\_data/assets/pdf\\_file/0004/128065/e94533.pdf](http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0004/128065/e94533.pdf)

<sup>12</sup> Risco de morrer em Portugal 2006, disponível em [www.dgs.pt](http://www.dgs.pt)

<sup>13</sup> Alcohol and Alcoholism. In Harrison's Principles of Internal Medicine. 17<sup>th</sup> Edition. McGraw-Hill

<sup>14</sup> Ferner RE, Chambers J. Alcohol intake: measure for measure. *BMJ*. 2001 Dec; 323:1439-40.

<sup>15</sup> Zakhari S, Li TK. Determinants of alcohol use and abuse: Impact of quantity and frequency patterns on liver disease. *Hepatology*. 2007; 46:2032-9.

<sup>16</sup> Crabb DW. First pass metabolism of ethanol: gastric or hepatic, mountain or molehill? *Hepatology*. 1997; 25:1292-4.

<sup>17</sup> Zakhari S. Overview: how is alcohol metabolized by the body? *Alcohol Res Health*. 2006; 29:245-54.

<sup>18</sup> Crow, KE, Batt RD. In: Regulation, Enzymology, and Metabolites of Ethanol, Human Metabolism of Alcohol; Crow, K.E., Batt, R.D., Eds.; CRC Press Inc.: Boca Raton, FL, USA, 1989; Volume 2, pp. 3-16.

<sup>19</sup> Deltour L, Foglio MH, Duyster G. Metabolic deficiencies in alcohol dehydrogenase Adh1, Adh3 and Adh4 null mutant mice. *J. Biol. Chem*. 1999; 274:16796-16801.

<sup>20</sup> Lieber CS. Cytochrome P-450E1: its physiological and pathological role. *Physiol Rev*. 1997; 77:517-44.

<sup>21</sup> Song BJ. Ethanol-inducible cytochrome P450 (CYP2E1): biochemistry, molecular biology and clinical relevance: 1996 update. *Alcohol Clin Exp Res*. 1996; 20:138A-146A.

- 
- <sup>22</sup> Upadhyaya SC, Tirumalai PS, Boyd MR, Mori T, Ravindranath V. Cytochrome P4502E (CYP2E) in brain: constitutive expression, induction by ethanol and localization by fluorescence in situ hybridization. *Arch Biochem Biophys.* 2000; 373:23-34.
- <sup>23</sup> Lieber CS. Biochemical and molecular basis of alcohol-induced injury to liver and other tissues. *N Engl J Med.* 1988; 319:1639-50.
- <sup>24</sup> Grant BF, Dufour MC, Harford TC. Epidemiology of alcoholic liver disease. *Semin Liver Dis.* 1988; 8:12-25
- <sup>25</sup> McCullough AJ, O'Connor JF. Alcoholic liver disease: proposed recommendations for the American College of Gastroenterology. *Am J Gastroenterol.* 1998; 93: 2022-2036.
- <sup>26</sup> Pequignot G, Cyrulnik F. Chronic disease due to overconsumption of alcoholic drinks (excepting neuropsychiatric pathology) in *International Encyclopaedia of Pharmacology and Therapeutics*, vol II. Pergamon Press, Oxford 1970, pp. 375-412
- <sup>27</sup> Leevy CM. Fatty liver: a study of 270 patients with biopsy proven fatty liver and review of the literature. *Medicine* 1962; 41: 249-276.
- <sup>28</sup> Sorensen TI, Orholm M, Bentsen KD, Høybye G, Eghøj K, Christoffersen P. Prospective evaluation of alcohol abuse and alcoholic liver injury in men as predictors of development of cirrhosis. *Lancet* 1984; 2:241-244.
- <sup>29</sup> Teli MR, Day CP, Burt AD, Bennett MK, James OF. Determinants of progression to cirrhosis or fibrosis in pure alcoholic fatty liver. *Lancet.* 1995; 346:987-990.
- <sup>30</sup> Bellentani S, Saccoccio G, Costa G, Tiribelli C, Manenti F, Sodde M et al. Drinking habits as cofactors of risk for alcohol induced liver damage. The Dionysos Study Group. *Gut.* 1997; 41:845-850.
- <sup>31</sup> Sheila Sherlock & James Dooley, *Diseases of the Liver and Biliary System*, 11<sup>a</sup> edição, Blackwell Publishing
- <sup>32</sup> Naveau S, Giraud V, Ganne N, Perney P, Hastier P, Robin E et al. Maladies alcooliques du foie hospitalisées en Hépatogastroentérologie. *Gastroenterol Clin Biol.* 2001; 25:131-6.
- <sup>33</sup> Lelbach WK. Cirrhosis in the alcoholic and its relation to the volume of alcohol abuse. *Ann N Y Acad Sci.* 1975; 252:85-105
- <sup>34</sup> Mann RE, Smart RG, Govoni R. The epidemiology of alcoholic liver disease. *Alcohol Res Health.* 2003; 27:209-19.
- <sup>35</sup> Bellentani S, Tiribelli C. The spectrum of liver disease in the general population: lesson from the Dionysos study. *J Hepatol.* 2001; 35:531-7
- <sup>36</sup> Becker U, Deis A, Sørensen TI, Grønbaek M, Borch-Johnsen K, Müller CF et al. Prediction of risk of liver disease by alcohol, intake, sex, and age: a prospective population study. *Hepatology.* 1996; 23:1025-1029.
- <sup>37</sup> Mandayam S, Jamal MM, Morgan TR. Epidemiology of alcoholic liver disease. *Semin Liver Dis.* 2004; 24:217-32.
- <sup>38</sup> MacSween RN, Burt AD. Histologic spectrum of alcoholic liver disease. *Semin Liver Dis.* 1986; 6:221-232.
- <sup>39</sup> Lefkowitz JH. Morphology of alcoholic liver disease. *Clin Liver Dis.* 2005; 9:37-53.
- <sup>40</sup> Costa Matos L. Doença Hepática Alcoólica. *Med-Interna.* 2006; 13:207-216
- <sup>41</sup> Crabb DW. Pathogenesis of alcoholic liver disease: newer mechanisms of injury. *Keio J Med.* 1999; 48:184-188.
- <sup>42</sup> Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW et al. Design and validation of a histologic scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2005; 41:1313-21.

- 
- <sup>43</sup> Fromenty B, Pessayre D. Inhibition of mitochondrial beta-oxidation as a mechanism of hepatotoxicity. *Pharmacol Ther.* 1995; 67:101-54.
- <sup>44</sup> Sherlock S. Acute fatty liver of pregnancy and the microvesicular fat diseases. *Gut.* 1983; 24:265-9.
- <sup>45</sup> Uchida T, Kao H, Quispe-Sjogren M, Peters RL. Alcoholic foamy degeneration - a pattern of acute alcoholic injury of the liver. *Gastroenterology.* 1983; 84:683-92.
- <sup>46</sup> Lieber CS. Alcoholic fatty liver: its pathogenesis and mechanism of progression to inflammation and fibrosis. *Alcohol.* 2004; 34:9-19
- <sup>47</sup> Lakshman MR. Some novel insights into the pathogenesis of alcoholic steatosis *Alcohol.* 2004; 34:45-48
- <sup>48</sup> Lieber CS. Medical disorders of alcoholism. *N Engl J Med.* 1995; 333:1058-65
- <sup>49</sup> Sozio M, Crabb DW. Alcohol and lipid metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2008; 295: E10-E16.
- <sup>50</sup> Gyamfi MA, Wan YJ. Pathogenesis of alcoholic liver disease: the role of nuclear receptors. *Exp Biol Med (Maywood);* 235:547-60.
- <sup>51</sup> Rotman N, Wahli W. Fatty acid synthesis and PPARalpha hand in hand *Chem Biol.* 2009; 16:801-2.
- <sup>52</sup> Crabb DW, Galli A, Fischer M, You M. Molecular mechanisms of alcoholic fatty liver: role of peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *Alcohol.* 2004; 34:35-38
- <sup>53</sup> You M, Crabb DW. Recent Advances in Alcoholic Liver Disease II. Minireview: molecular mechanisms of alcoholic fatty liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2004; 287:G1-G6.
- <sup>54</sup> You M, Crabb DW. Molecular mechanisms of alcoholic fatty liver: role of sterol regulatory element-binding proteins. *Alcohol.* 2004; 34:39-43
- <sup>55</sup> Motomura K, Ohata M, Satre M, Tsukamoto H. Destabilization of TNF-alpha mRNA by retinoic acid in hepatic macrophages: implications for alcoholic liver disease. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2001; 281:E420-9.
- <sup>56</sup> Fischer M, You M, Matsumoto M, Crabb DW. Peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  (PPAR  $\alpha$ ) agonist treatment reverses PPAR  $\alpha$  dysfunction and abnormalities in hepatic lipid metabolism in ethanol-fed mice. *J Biol Chem.* 2003; 278: 27997-28004.
- <sup>57</sup> Yin HQ, Kim M, Kim JH, Kong G, Kang KS, Kim HL et al. Differential gene expression and lipid metabolism in fatty liver induced by acute ethanol treatment in mice. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2007; 223:225-233.
- <sup>58</sup> Day CP, James OF. Hepatic steatosis: innocent bystander or guilty party? *Hepatology.* 1998; 27:1463-6.
- <sup>59</sup> Reddy JK, Rao MS. Lipid Metabolism and Liver Inflammation. II. Fatty liver disease and fatty acid oxidation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2006; 290:G852-G858.
- <sup>60</sup> Yerian L. Histopathological evaluation of fatty and alcoholic liver diseases. *J Dig Dis.* 2011; 12:17-24.
- <sup>61</sup> Compendium of Chemical Terminology, 2nd Ed, 1997, by the International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC). Online version <http://old.iupac.org/publications/compendium/A.html>
- <sup>62</sup> Cederbaum AI. Effects of alcohol on hepatic mitochondrial function and DNA. *Gastroenterology.* 1999; 117:265-9
- <sup>63</sup> Tuma DJ. Role of malondialdehyde-acetaldehyde adducts in liver injury. *Free Radic Biol Med.* 2002; 32:303-8.
- <sup>64</sup> Brooks PJ, Theruvathu JA. DNA adducts from acetaldehyde: implications for alcohol-related carcinogenesis. *Alcohol.* 2005; 35:187-93.

- 
- <sup>65</sup> Donohue TM Jr. Autophagy and ethanol-induced liver injury. *World J Gastroenterol.* 2009; 15:1178-85.
- <sup>66</sup> French BA, Oliva J, Bardag-Gorce F, French SW. The immunoproteasome in steatohepatitis: its role in Mallory-Denk body formation. *Exp Mol Pathol.* 2011; 90:252-6.
- <sup>67</sup> Lu Y, Cederbaum AI. CYP2E1 and oxidative liver injury by alcohol. *Free Radic Biol Med.* 2008; 44:723-38.
- <sup>68</sup> Brooks PJ. DNA damage, DNA repair, and alcohol toxicity-a review. *Alcohol Clin Exp Res.* 1997; 21:1073-82.
- <sup>69</sup> Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev.* 1994; 74:139-62.
- <sup>70</sup> Adachi M, Ishii H. Role of mitochondria in alcoholic liver injury. *Free Radic Biol Med.* 2002; 32:487-91.
- <sup>71</sup> Kurien BT, Scofield RH. Autoimmunity and oxidatively modified autoantigens. *Autoimmun Rev.* 2008; 7:567-73.
- <sup>72</sup> Meagher EA, Barry OP, Burke A, Lucey MR, Lawson JA, Rokach J et al. Alcohol-induced generation of lipid peroxidation products in humans. *J Clin Invest.* 1999; 104:805-13.
- <sup>73</sup> Tuma DJ, Thiele GM, Xu D, Klassen LW, Sorrell MF. Acetaldehyde and malondialdehyde react together to generate distinct protein adducts in the liver during long-term ethanol administration. *Hepatology.* 1996; 23:872-880.
- <sup>74</sup> Ronis MJ, Korourian S, Blackburn ML, Badeaux J, Badger TM. The role of ethanol metabolism in development of alcoholic steatohepatitis in the rat. *Alcohol.* 2010; 44:157-69.
- <sup>75</sup> Perperas A, Tsantoulas D, Portmann B, Eddleston AL, Williams R. Autoimmunity to a liver membrane lipoprotein and liver damage in alcoholic liver disease. *Gut.* 1981; 22:149-52.
- <sup>76</sup> McFarlane IG. Autoantibodies in alcoholic liver disease. *Addict Res* 2000; 5:141-151.
- <sup>77</sup> Chedid A, Chadalawada KR, Morgan TR, Moritz TE, Mendenhall CL, Hammond JB et al. Phospholipid antibodies in alcoholic liver disease. *Hepatology.* 1994; 20:1465-71.
- <sup>78</sup> Fernandes C, Pereira H, Correia M, Mendes A, Sousa L, Sousa M et al. Auto-anticorpos e doença hepática alcoólica. *Rev-Gastroenterol-Cir.* 1998; 15:177-184.
- <sup>79</sup> Macgeorge J, Frazer IH, Cunningham A. Autoantibodies, sheep cell agglutinins and anti-albumin antibodies in alcoholic liver disease. *J Clin Lab Immunol.* 1984; 13:21-4.
- <sup>80</sup> Laskin CA, Vidins E, Blendis LM, Soloninka CA. Autoantibodies in alcoholic liver disease. *Am J Med.* 1990; 89:129-33.
- <sup>81</sup> Rolla R, Vay D, Mottaran E, Parodi M, Parodi M, Vidali M, Sartori M et al. Antiphospholipid antibodies associated with alcoholic liver disease specifically recognise oxidised phospholipids. *Gut.* 2001; 49:852-9.
- <sup>82</sup> Albano E. Free radical mechanisms in immune reactions associated with alcoholic liver disease. *Free Radic Biol Med.* 2002; 32:110-4.
- <sup>83</sup> Costa Matos L, Martins B. Hepatites tóxicas: revisão da literatura. *Med-Interna.* 2005; 12:239-258
- <sup>84</sup> Clot P, Albano E, Eliasson E, Tabone M, Aricò S, Israel Y et al. Cytochrome P4502E1 hydroxyethyl radical adducts as the major antigen in autoantibody formation among alcoholics. *Gastroenterology.* 1996; 111:206-16.
- <sup>85</sup> Vidali M, Stewart SF, Rolla R, Daly AK, Chen Y, Mottaran E et al. Genetic and epigenetic factors in autoimmune reactions toward cytochrome P4502E1 in alcoholic liver disease. *Hepatology.* 2003; 37:410-9.
- <sup>86</sup> Ma Y, Meregalli M, Hodges S, Davies N, Bogdanos DP, Fargion S et al. Alcohol dehydrogenase: an autoantibody target in patients with alcoholic liver disease. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2005; 18:173-82.

- 
- <sup>87</sup> Purohit V, Bode JC, Bode C, Brenner DA, Choudhry MA, Hamilton F et al. Alcohol, intestinal bacterial growth, intestinal permeability to endotoxin, and medical consequences: summary of a symposium. *Alcohol*. 2008; 42:349-61.
- <sup>88</sup> Bode JC, Bode C, Heidelbach R, Dürr HK, Martini GA. Jejunal microflora in patients with chronic alcohol abuse. *Hepatogastroenterology*. 1984; 31:30-4.
- <sup>89</sup> Bode C, Kolepke R, Schäfer K, Bode JC. Breath hydrogen excretion in patients with alcoholic liver disease--evidence of small intestinal bacterial overgrowth. *Z Gastroenterol*. 1993; 31:3-7.
- <sup>90</sup> Wiest R, Garcia-Tsao G. Bacterial translocation (BT) in cirrhosis. *Hepatology*. 2005; 41:422-33.
- <sup>91</sup> Lata J, Jurankova J, Kopacova M, Vitek P. Probiotics in hepatology. *World J Gastroenterol*. 2011; 17:2890-6.
- <sup>92</sup> Bode C, Kugler V, Bode JC. Endotoxemia in patients with alcoholic and non-alcoholic cirrhosis and in subjects with no evidence of chronic liver disease following acute alcohol excess. *J Hepatol*. 1987; 4:8-14.
- <sup>93</sup> Fukui H, Brauner B, Bode JC, Bode C. Plasma endotoxin concentrations in patients with alcoholic and non-alcoholic liver disease: reevaluation with an improved chromogenic assay. *J Hepatol*. 1991; 12:162-9.
- <sup>94</sup> Mathurin P, Deng QG, Keshavarzian A, Choudhary S, Holmes EW, Tsukamoto H. Exacerbation of alcoholic liver injury by enteral endotoxin in rats. *Hepatology*. 2000; 32:1008-17.
- <sup>95</sup> Bhonchal S, Nain CK, Prasad KK, Nada R, Sharma AK, Sinha SK et al. Functional and morphological alterations in small intestine mucosa of chronic alcoholics. *J Gastroenterol Hepatol*. 2008; 23:e43-8.
- <sup>96</sup> Bhagwande BS, Apte M, Manwarring L. Endotoxin induced hepatic necrosis in rats on an alcohol diet *J Pathol*. 1987; 152:47-53.
- <sup>97</sup> Nanji AA, Khettry U, Sadrzadeh SM. Lactobacillus feeding reduces endotoxemia and severity of experimental alcoholic liver (disease). *Proc Soc Exp Biol Med*. 1994; 205:243-7.
- <sup>98</sup> Adachi Y, Moore LE, Bradford BU, Gao W, Thurman RG. Antibiotics prevent liver injury in rats following long-term exposure to ethanol. *Gastroenterology*. 1995; 108:218-24.
- <sup>99</sup> Forsyth CB, Farhadi A, Jakate SM, Tang Y, Shaikh M, Keshavarzian A. Lactobacillus GG treatment ameliorates alcohol-induced intestinal oxidative stress, gut leakiness, and liver injury in a rat model of alcoholic steatohepatitis. *Alcohol*. 2009; 43:163-72.
- <sup>100</sup> Pennington HL, Hall PM, Wilce PA, Worrall S. Ethanol feeding enhances inflammatory cytokine expression in lipopolysaccharide-induced hepatitis. *J Gastroenterol Hepatol*. 1997; 12:305-13.
- <sup>101</sup> Jarvelainen HA, Fang C, Ingelman-Sundberg M, Lindros KO. Effect of chronic coadministration of endotoxin and ethanol on rat liver pathology and proinflammatory and anti-inflammatory cytokines. *Hepatology*. 1999; 29:1503-10.
- <sup>102</sup> Thurman RG. Alcoholic liver injury involves activation of Kupffer cells by endotoxin. *Am J Physiol*. 1998; 275:G605-11.
- <sup>103</sup> Casini A. Alcohol-induced fatty liver and inflammation: where do Kupffer cells act? *J Hepatol*. 2000; 32:1026-30.
- <sup>104</sup> Soares JB, Pimentel-Nunes P, Roncon-Albuquerque R, Leite-Moreira A. The role of lipopolysaccharide/toll-like receptor 4 signaling in chronic liver diseases. *Hepatol Int*. 2010; 4:659-72.
- <sup>105</sup> Han DW. Intestinal endotoxemia as a pathogenic mechanism in liver failure. *World J Gastroenterol*. 2002; 8:961-5.
- <sup>106</sup> Neuman MG. Cytokines - central factors in alcoholic liver disease. *Alcohol Res Health*. 2003; 27:307-16.

- 
- <sup>107</sup> Osna NA, Clemens DL, Donohue TM Jr. Ethanol metabolism alters interferon gamma signaling in recombinant HepG2 cells. *Hepatology*. 2005; 42:1109-17.
- <sup>108</sup> Bharrhan S, Koul A, Chopra K, Rishi P. Catechin suppresses an array of signalling molecules and modulates alcohol-induced endotoxin mediated liver injury in a rat model. *PLoS One*. 2011; 6:e20635.
- <sup>109</sup> Gramenzi A, Caputo F, Biselli M, Kuria F, Loggi E, Andreone P. Review article: alcoholic liver disease - pathophysiological aspects and risk factors. *Aliment Pharmacol Ther*. 2006; 24:1151-61.
- <sup>110</sup> Morgan MY, Sherlock S. Sex-related differences among 100 patients with alcoholic liver disease. *Br Med J*. 1977; 1:939-41
- <sup>111</sup> Marshall AW, Kingstone D, Boss M, Morgan MY. Ethanol elimination in males and females: relationship to menstrual cycle and body composition. *Hepatology*. 1983; 3:701-6
- <sup>112</sup> Frezza M, di Padova C, Pozzato G, Terpin M, Baraona E, Lieber CS. High blood alcohol levels in women. The role of decreased gastric alcohol dehydrogenase activity and first-pass metabolism. *N Engl J Med*. 1990; 322:95-9.
- <sup>113</sup> Chrostek L, Jelski W, Szmitkowski M, Puchalski Z. Gender-related differences in hepatic activity of alcohol dehydrogenase isoenzymes and aldehyde dehydrogenase in humans. *J Clin Lab Anal*. 2003; 17:93-6.
- <sup>114</sup> Stinson FS, Grant BF, Dufour MC. The critical dimension of ethnicity in liver cirrhosis mortality statistics. *Alcohol Clin Exp Res*. 2001; 25:1181 – 7
- <sup>115</sup> Naveau S, Giraud V, Borotto E, Aubert A, Capron F, Chaput JC. Excess weight risk factor for alcoholic liver disease. *Hepatology*. 1997; 25:108-11.
- <sup>116</sup> Wiley TE, McCarthy M, Breidi L, Layden TJ. Impact of alcohol on the histological and clinical progression of hepatitis C infection. *Hepatology* 1998; 28:805-9
- <sup>117</sup> Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology*. 2008; 134:1655-69.
- <sup>118</sup> Friedman SL. Liver fibrosis - from bench to bedside. *J Hepatol*. 2003; 38:S38-53.
- <sup>119</sup> Xu GF, Wang XY, Ge GL, Li PT, Jia X, Tian DL et al. Dynamic changes of capillarization and peri-sinusoid fibrosis in alcoholic liver diseases. *World J Gastroenterol*. 2004; 10:238-43.
- <sup>120</sup> Ginès P, Cárdenas A, Arroyo V, Rodés J. Management of cirrhosis and ascites. *N Engl J Med*. 2004; 350:1646-54.
- <sup>121</sup> Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest*. 2005; 115:209-18.
- <sup>122</sup> Purohit V, Brenner DA. Mechanisms of alcohol-induced hepatic fibrosis: a summary of the Ron Thurman Symposium. *Hepatology*. 2006; 43:872-8.
- <sup>123</sup> Nahon P. Marqueurs non invasifs de fibrose dans la maladie alcoolique du foie. *Gastroenterol Clin Biol*. 2009; 33:1154-6.
- <sup>124</sup> Poynard T, Aubert A, Bedossa P, Abella A, Naveau S, Paraf F et al. A simple biological index for detection of alcoholic liver disease in drinkers. *Gastroenterology*. 1991; 100:1397-402.
- <sup>125</sup> Casanova P, Santos RM, Cipriano A, Ribeiro H, Porto A. PGA: Marcador biológico de doença hepática alcoólica. *Arq-Med*. 1996; 10:10-13.
- <sup>126</sup> Naveau S, Gaudé G, Asnacios A, Agostini H, Abella A, Barri-Ova N et al. Diagnostic and prognostic values of noninvasive biomarkers of fibrosis in patients with alcoholic liver disease. *Hepatology*. 2009; 49:97-105.
- <sup>127</sup> Baranova A, Lal P, Biredinc A, Younossi ZM. Non-Invasive markers for hepatic fibrosis. *BMC Gastroenterol*. 2011; 11:91.
- <sup>128</sup> Tran A, Benzaken S, Saint-Paul MC, Guzman-Granier E, Hastier P, Pradier C et al. Chondrex (YKL-40), a potential new serum fibrosis marker in patients with alcoholic liver disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2000; 12:989-93.



- 
- <sup>129</sup> Stickel F, Urbaschek R, Schuppan D, Poeschl G, Oesterling C, Conradt C et al. Serum collagen type VI and XIV and hyaluronic acid as early indicators for altered connective tissue turnover in alcoholic liver disease. *Dig Dis Sci*. 2001; 46:2025-32.
- <sup>130</sup> Gressner AM, Yagmur E, Lahme B, Gressner O, Stanzel S. Connective tissue growth factor in serum as a new candidate test for assessment of hepatic fibrosis. *Clin Chem*. 2006; 52:1815-7.
- <sup>131</sup> Marinho R, Serejo F, Velosa J, Carneiro de Moura M. Utilidade da elastografia hepática transitória (FibroScan®) na cirrose hepática. *J Port Gastroenterol*. 2007; 14:16-21.
- <sup>132</sup> Ziol M, Handra-Luca A, Kettaneh A, Christidis C, Mal F, Kazemi F et al. Noninvasive assessment of liver fibrosis by measurement of stiffness in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2005; 41:48-54.
- <sup>133</sup> Sporea I, Sirlu RL, Deleanu A, Popescu A, Focsa M, Danila M et al. Acoustic radiation force impulse elastography as compared to transient elastography and liver biopsy in patients with chronic hepatopathies. *Ultraschall Med*. 2011; 32:S46-52.
- <sup>134</sup> Okazaki H, Ito K, Fujita T, Koike S, Takano K, Matsunaga N. Discrimination of alcoholic from virus-induced cirrhosis on MR imaging. *AJR Am J Roentgenol*. 2000; 175:1677-81.
- <sup>135</sup> Bataller R, Rombouts K, Altamirano J, Marra F. Fibrosis in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2011; 25:231-44.
- <sup>136</sup> Reichen J. The Role of the Sinusoidal Endothelium in Liver Function. *News Physiol Sci*. 1999; 14:117-121.
- <sup>137</sup> Kolios G, Valatas V, Kouroumalis E. Role of Kupffer cells in the pathogenesis of liver disease. *World J Gastroenterol*. 2006; 12:7413-20.
- <sup>138</sup> Lee UE, Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2011; 25:195-206.
- <sup>139</sup> Siegmund SV, Dooley S, Brenner DA. Molecular mechanisms of alcohol-induced hepatic fibrosis. *Dig Dis*. 2005;23:264-74.
- <sup>140</sup> Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem*. 2000; 275:2247-50.
- <sup>141</sup> Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia Básica*. 11.ed. Guanabara Koogan, 2008. pg. 205 ISBN 978-85-277-1402-0
- <sup>142</sup> Friedman SL. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev*. 2008; 88:125-72.
- <sup>143</sup> Friedman SL, Roll FJ, Boyles J, Bissell DM. Hepatic lipocytes: the principal collagen-producing cells of normal rat liver. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1985; 82:8681-5.
- <sup>144</sup> Ramadori G, Saile B. Portal tract fibrogenesis in the liver. *Lab Invest*. 2004; 84:153-9.
- <sup>145</sup> Forbes SJ, Russo FP, Rey V, Burra P, Ruge M, Wright NA et al. A significant proportion of myofibroblasts are of bone marrow origin in human liver fibrosis. *Gastroenterology*. 2004; 126:955-63.
- <sup>146</sup> Kisseleva T, Uchinami H, Feirt N, Quintana-Bustamante O, Segovia JC, Schwabe RF et al. Bone marrow-derived fibrocytes participate in pathogenesis of liver fibrosis. *J Hepatol*. 2006; 45:429-38.
- <sup>147</sup> Jiao J, Friedman SL, Aloman C. Hepatic fibrosis. *Curr Opin Gastroenterol*. 2009; 25:223-9.
- <sup>148</sup> Wanless IR, Nakashima E, Sherman M. Regression of human cirrhosis. Morphologic features and the genesis of incomplete septal cirrhosis. *Arch Pathol Lab Med*. 2000; 124:1599-607.
- <sup>149</sup> Shiratori Y, Imazeki F, Moriyama M. Histologic improvement of fibrosis in patients with hepatitis C who have sustained response to interferon therapy. *Ann Intern Med*. 2000; 132:517-24.
- <sup>150</sup> Chang TT, Liaw YF, Wu SS, Schiff E, Han KH, Lai CL et al. Long-term entecavir therapy results in the reversal of fibrosis/cirrhosis and continued histological improvement in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology*. 2010; 52:886-93.

- 
- <sup>151</sup> Iredale JP, Benyon RC, Pickering J, McCullen M, Northrop M, Pawley S et al. Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis. Hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors. *J Clin Invest*. 1998; 102:538-49.
- <sup>152</sup> Okazaki I, Watanabe T, Hozawa S, Arai M, Maruyama K et al. Molecular mechanism of the reversibility of hepatic fibrosis: with special reference to the role of matrix metalloproteinases. *J Gastroenterol Hepatol*. 2000; 15:D26-32.
- <sup>153</sup> Fallowfield JA, Mizuno M, Kendall TJ, Constandinou CM, Benyon RC, Duffield JS et al. Scar-associated macrophages are a major source of hepatic matrix metalloproteinase-13 and facilitate the resolution of murine hepatic fibrosis. *J Immunol*. 2007; 178:5288-95.
- <sup>154</sup> Fischer R, Cariers A, Reinehr R, Häussinger D. Caspase 9-dependent killing of hepatic stellate cells by activated Kupffer cells. *Gastroenterology*. 2002; 123:845-61.
- <sup>155</sup> Malovic I, Sørensen KK, Elvevold KH, Nedredal GI, Paulsen S, Erofeev AV et al. The mannose receptor on murine liver sinusoidal endothelial cells is the main denatured collagen clearance receptor. *Hepatology*. 2007; 45:1454-61.
- <sup>156</sup> Iredale JP. Hepatic stellate cell behavior during resolution of liver injury. *Semin Liver Dis*. 2001; 21:427-36.
- <sup>157</sup> Radaeva S, Sun R, Jaruga B, Nguyen VT, Tian Z, Gao B. Natural killer cells ameliorate liver fibrosis by killing activated stellate cells in NKG2D-dependent and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-dependent manners. *Gastroenterology*. 2006; 130:435-52.
- <sup>158</sup> Jeong WI, Gao B. Innate immunity and alcoholic liver fibrosis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2008; 23:S112-8.
- <sup>159</sup> Byun JS, Jeong WI. Involvement of hepatic innate immunity in alcoholic liver disease. *Immune Netw*. 2010; 10:181-7.
- <sup>160</sup> Jeong WI, Park O, Gao B. Abrogation of the antifibrotic effects of natural killer cells/interferon-gamma contributes to alcohol acceleration of liver fibrosis. *Gastroenterology*. 2008; 134:248-58.
- <sup>161</sup> Arteel GE. Silencing a killer among us: ethanol impairs immune surveillance of activated stellate cells by natural killer cells. *Gastroenterology*. 2008; 134:351-3.
- <sup>162</sup> Oakley F, Trim N, Constandinou CM, Ye W, Gray AM, Frantz G et al. Hepatocytes express nerve growth factor during liver injury: evidence for paracrine regulation of hepatic stellate cell apoptosis. *Am J Pathol*. 2003; 163:1849-58.
- <sup>163</sup> Tam J, Liu J, Mukhopadhyay B, Cinar R, Godlewski G, Kunos G. Endocannabinoids in liver disease. *Hepatology*. 2011; 53:346-55.
- <sup>164</sup> Muñoz-Luque J, Ros J, Fernández-Varo G, Tugues S, Morales-Ruiz M, Alvarez CE et al. Regression of fibrosis after chronic stimulation of cannabinoid CB2 receptor in cirrhotic rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 2008; 324:475-83.
- <sup>165</sup> Inagaki Y, Higashi K, Kushida M, Hong YY, Nakao S, Higashiyama R et al. Hepatocyte growth factor suppresses profibrogenic signal transduction via nuclear export of Smad3 with galectin-7. *Gastroenterology*. 2008; 134:1180-90.
- <sup>166</sup> Iron deficiency and other hypoproliferative anemias. In *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 17<sup>th</sup> Edition. McGraw-Hill
- <sup>167</sup> Andrews NC. Disorders of iron metabolism. *N Engl J Med*. 1999; 341:1986-95
- <sup>168</sup> Frazer DM, Anderson GJ. Iron imports. I. Intestinal iron absorption and its regulation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2005; 289:G631-5.
- <sup>169</sup> Muñoz M, Villar I, García-Erce JA. An update on iron physiology. *World J Gastroenterol*. 2009; 15:4617-26.
- <sup>170</sup> Kohgo Y, Ikuta K, Ohtake T, Torimoto Y, Kato J. Body iron metabolism and pathophysiology of iron overload. *Int J Hematol*. 2008; 88:7-15.

- 
- <sup>171</sup> Hayakawa T, Jin CX, Ko SB, Kitagawa M, Ishiguro H. Lactoferrin in gastrointestinal disease. *Intern Med.* 2009; 48:1251-4.
- <sup>172</sup> Ganz T. Iron in innate immunity: starve the invaders. *Curr Opin Immunol.* 2009; 21:63-7.
- <sup>173</sup> Walczyk T, von Blanckenburg F. Natural iron isotope variations in human blood. *Science.* 2002; 295:2065-6.
- <sup>174</sup> Swanson CA. Iron intake and regulation: implications for iron deficiency and iron overload. *Alcohol.* 2003; 30:99-102.
- <sup>175</sup> Brittenham GM, Weiss G, Brissot P, Lainé F, Guillygomarc'h A, Guyader D et al. Clinical Consequences of New Insights in the Pathophysiology of Disorders of Iron and Heme Metabolism. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2000: 39-50.
- <sup>176</sup> Himmelfarb J. Iron regulation. *J Am Soc Nephrol.* 2007; 18:379-81.
- <sup>177</sup> McCord JM. Iron, free radicals, and oxidative injury. *J Nutr.* 2004; 134:3171S-3172S.
- <sup>178</sup> MacKenzie EL, Iwasaki K, Tsuji Y. Intracellular iron transport and storage: from molecular mechanisms to health implications. *Antioxid Redox Signal.* 2008; 10:997-1030.
- <sup>179</sup> Messner DJ, Sivam G, Kowdley KV. Curcumin reduces the toxic effects of iron loading in rat liver epithelial cells. *Liver Int.* 2009; 29:63-72.
- <sup>180</sup> Takami T, Sakaida I. Iron regulation by hepatocytes and free radicals. *J Clin Biochem Nutr.* 2011; 48:103-6.
- <sup>181</sup> Walter PB, Knutson MD, Paler-Martinez A, Lee S, Xu Y, Viteri FE et al. Iron deficiency and iron excess damage mitochondria and mitochondrial DNA in rats. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 99:2264-9.
- <sup>182</sup> Houglum K, Ramm GA, Crawford DH, Witztum JL, Powell LW, Chojkier M. Excess iron induces hepatic oxidative stress and transforming growth factor beta1 in genetic hemochromatosis. *Hepatology.* 1997; 26:605-10.
- <sup>183</sup> Arthur MJ. Iron overload and liver fibrosis. *J Gastroenterol Hepatol.* 1996; 11:1124-9.
- <sup>184</sup> Pietrangelo A. Iron, oxidative stress and liver fibrogenesis. *J Hepatol.* 1998; 28:S8-13.
- <sup>185</sup> Philippe MA, Ruddell RG, Ramm GA. Role of iron in hepatic fibrosis: one piece in the puzzle. *World J Gastroenterol.* 2007; 13:4746-54.
- <sup>186</sup> Lin M, Rippe RA, Niemelä O, Brittenham G, Tsukamoto H. Role of iron in NF-kappa B activation and cytokine gene expression by rat hepatic macrophages. *Am J Physiol.* 1997; 272:G1355-64.
- <sup>187</sup> She H, Xiong S, Lin M, Zandi E, Giulivi C, Tsukamoto H. Iron activates NF-kappaB in Kupffer cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2002; 283:G719-26.
- <sup>188</sup> Tsukamoto H. Iron regulation of hepatic macrophage TNFalpha expression. *Free Radic Biol Med.* 2002; 32:309-13.
- <sup>189</sup> Cederbaum AI. Iron and CYP2E1-dependent oxidative stress and toxicity. *Alcohol.* 2003; 30:115-20.
- <sup>190</sup> Deugnier Y, Turlin B, Loréal O. Iron and neoplasia. *J Hepatol.* 1998; 28:S21-5.
- <sup>191</sup> Abalea V, Cillard J, Dubos MP, Anger JP, Cillard P, Morel I. Iron-induced oxidative DNA damage and its repair in primary rat hepatocyte culture. *Carcinogenesis.* 1998 Jun;19(6):1053-9.
- <sup>192</sup> Deugnier Y. Iron and liver cancer. *Alcohol.* 2003; 30:145-50.
- <sup>193</sup> Troadec MB, Courselaud B, Détiavaud L, Haziza-Pigeon C, Leroyer P, Brissot P et al. Iron overload promotes Cyclin D1 expression and alters cell cycle in mouse hepatocytes. *J Hepatol.* 2006; 44:391-9.
- <sup>194</sup> Mainous AG 3rd, Gill JM, Carek PJ. Elevated serum transferrin saturation and mortality. *Ann Fam Med.* 2004; 2:133-8.

- 
- <sup>195</sup> Bonkovsky HL, Lambrecht RW. Iron-induced liver injury. *Clin Liver Dis.* 2000; 4:409-29.
- <sup>196</sup> Daram SR, Hayashi PH. Acute liver failure due to iron overdose in an adult. *South Med J.* 2005; 98:241-4.
- <sup>197</sup> Brandhagen DJ, Alvarez W, Therneau TM, Kruckeberg KE, Thibodeau SN, Ludwig J et al. Iron overload in cirrhosis-*HFE* genotypes and outcome after liver transplantation. *Hepatology.* 2000; 31:456-60.
- <sup>198</sup> Walker NM, Stuart KA, Ryan RJ, Desai S, Saab S, Nicol JA et al. Serum ferritin concentration predicts mortality in patients awaiting liver transplantation. *Hepatology.* 2010; 51:1683-91.
- <sup>199</sup> Muñoz M, García-Erce JA, Remacha AF. Disorders of iron metabolism. Part 1: molecular basis of iron homeostasis. *J Clin Pathol.* 2011; 64:281-6.
- <sup>200</sup> Trinder D, Oates PS, Thomas C, Sadleir J, Morgan EH. Localisation of divalent metal transporter 1 (DMT1) to the microvillus membrane of rat duodenal enterocytes in iron deficiency, but to hepatocytes in iron overload. *Gut.* 2000; 46:270-6.
- <sup>201</sup> Mims MP, Prchal JT. Divalent metal transporter 1. *Hematology.* 2005; 10:339-45.
- <sup>202</sup> Siah CW, Ombiga J, Adams LA, Trinder D, Olynyk JK. Normal iron metabolism and the pathophysiology of iron overload disorders. *Clin Biochem Rev.* 2006; 27:5-16.
- <sup>203</sup> Anderson GJ, Frazer DM, McLaren GD. Iron absorption and metabolism. *Curr Opin Gastroenterol.* 2009; 25:129-35.
- <sup>204</sup> Donovan A, Roy CN, Andrews NC. The ins and outs of iron homeostasis. *Physiology (Bethesda).* 2006; 21:115-23.
- <sup>205</sup> Darshan D, Anderson GJ. Liver-gut axis in the regulation of iron homeostasis. *World J Gastroenterol.* 2007; 13:4737-45.
- <sup>206</sup> Andrews NC. Understanding heme transport. *N Engl J Med.* 2005; 353:2508-9.
- <sup>207</sup> Flo TH, Smith KD, Sato S, Rodriguez DJ, Holmes MA, Strong RK et al. Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron. *Nature.* 2004; 432:917-21.
- <sup>208</sup> Huang H, Akira S, Santos MM. Is the iron donor lipocalin 2 implicated in the pathophysiology of hereditary hemochromatosis? *Hepatology.* 2009; 49:1012-6.
- <sup>209</sup> Zhang AS, Enns CA. Molecular mechanisms of normal iron homeostasis. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2009:207-14.
- <sup>210</sup> Zhang AS, Enns CA. Iron homeostasis: recently identified proteins provide insight into novel control mechanisms. *J Biol Chem.* 2009; 284:711-5.
- <sup>211</sup> Zhang DL, Hughes RM, Ollivierre-Wilson H, Ghosh MC, Rouault TA. A ferroportin transcript that lacks an iron-responsive element enables duodenal and erythroid precursor cells to evade translational repression. *Cell Metab.* 2009; 9:461-73.
- <sup>212</sup> Wallace DF, Harris JM, Subramaniam VN. Functional analysis and theoretical modeling of ferroportin reveals clustering of mutations according to phenotype. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2010 Jan;298(1):C75-84.
- <sup>213</sup> Rice AE, Mendez MJ, Hokanson CA, Rees DC, Björkman PJ. Investigation of the biophysical and cell biological properties of ferroportin, a multipass integral membrane protein iron exporter. *J Mol Biol.* 2009 Feb 27;386(3):717-32.
- <sup>214</sup> Andrews NC. Forging a field: the golden age of iron biology. *Blood.* 2008; 112:219-30.
- <sup>215</sup> Soe-Lin S, Apte SS, Andriopoulos B Jr, Andrews MC, Schranzhofer M, Kahawita T et al. Nramp1 promotes efficient macrophage recycling of iron following erythrophagocytosis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009; 106:5960-5.
- <sup>216</sup> Harrison PM, Fischbach FA, Hoy TG, Haggis GH. Ferric oxyhydroxide core of ferritin. *Nature.* 1967; 216:1188-1190.

- 
- <sup>217</sup> Koorts AM, Viljoen M. Ferritin and ferritin isoforms I: Structure-function relationships, synthesis, degradation and secretion. *Arch Physiol Biochem.* 2007; 113:30-54.
- <sup>218</sup> Harrison PM, Arosio P. The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochim Biophys Acta.* 1996; 1275:161-203.
- <sup>219</sup> Pan YH, Sader K, Powell JJ, Bleloch A, Gass M, Trinick J et al. 3D morphology of the human hepatic ferritin mineral core: new evidence for a subunit structure revealed by single particle analysis of HAADF-STEM images. *J Struct Biol.* 2009; 166:22-31.
- <sup>220</sup> Shi H, Bencze KZ, Stemmler TL, Philpott CC. A cytosolic iron chaperone that delivers iron to ferritin. *Science.* 2008; 320:1207-10.
- <sup>221</sup> Darshan D, Vanoaica L, Richman L, Beermann F, Kühn LC. Conditional deletion of ferritin H in mice induces loss of iron storage and liver damage. *Hepatology.* 2009; 50:852-60.
- <sup>222</sup> Ghosh S, Hevi S, Chuck SL. Regulated secretion of glycosylated human ferritin from hepatocytes. *Blood.* 2004; 103:2369-76.
- <sup>223</sup> Chen TT, Li L, Chung DH, Allen CD, Torti SV, Torti FM et al. TIM-2 is expressed on B cells and in liver and kidney and is a receptor for H-ferritin endocytosis. *J Exp Med.* 2005; 202:955-65.
- <sup>224</sup> Fisher J, Devraj K, Ingram J, Slagle-Webb B, Madhankumar AB, Liu X et al. Ferritin: a novel mechanism for delivery of iron to the brain and other organs. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007; 293:C641-9.
- <sup>225</sup> Adams PC, Barton JC. A diagnostic approach to hyperferritinemia with a non-elevated transferrin saturation. *J Hepatol.* 2011; 55:453-8.
- <sup>226</sup> Wixom RL, Prutkin L, Munro HN. Hemosiderin: nature, formation, and significance. *Int Rev Exp Pathol.* 1980; 22:193-225.
- <sup>227</sup> Graham RM, Chua AC, Herbison CE, Olynyk JK, Trinder D. Liver iron transport. *World J Gastroenterol.* 2007; 13:4725-36.
- <sup>228</sup> Zhang AS, Xiong S, Tsukamoto H, Enns CA. Localization of iron metabolism-related mRNAs in rat liver indicate that HFE is expressed predominantly in hepatocytes. *Blood.* 2004; 103:1509-14.
- <sup>229</sup> Ikuta K, Zak O, Aisen P. Recycling, degradation and sensitivity to the synergistic anion of transferrin in the receptor-independent route of iron uptake by human hepatoma (HuH-7) cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004; 36:340-52.
- <sup>230</sup> Robb A, Wessling-Resnick M. Regulation of transferrin receptor 2 protein levels by transferrin. *Blood.* 2004; 104:4294-9.
- <sup>231</sup> Graham RM, Reutens GM, Herbison CE, Delima RD, Chua AC, Olynyk JK et al. Transferrin receptor 2 mediates uptake of transferrin-bound and non-transferrin-bound iron. *J Hepatol.* 2008; 48:327-34.
- <sup>232</sup> Chua AC, Delima RD, Morgan EH, Herbison CE, Tirnitz-Parker JE, Graham RM et al. Iron uptake from plasma transferrin by a transferrin receptor 2 mutant mouse model of haemochromatosis. *J Hepatol.* 2010; 52:425-31.
- <sup>233</sup> Pietrangelo A. Heparin in human iron disorders: therapeutic implications. *J Hepatol.* 2011; 54:173-81.
- <sup>234</sup> Cable EE, Connor JR, Isom HC. Accumulation of iron by primary rat hepatocytes in long-term culture: changes in nuclear shape mediated by non-transferrin-bound forms of iron. *Am J Pathol.* 1998; 152:781-92.
- <sup>235</sup> Trinder D, Fox C, Vautier G, Olynyk JK. Molecular pathogenesis of iron overload. *Gut.* 2002; 51:290-5.
- <sup>236</sup> Liuzzi JP, Lichten LA, Rivera S, Blanchard RK, Aydemir TB, Knutson MD et al. Interleukin-6 regulates the zinc transporter Zip14 in liver and contributes to the hypozincemia of the acute-phase response. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102:6843-8.

- 
- <sup>237</sup> Liuzzi JP, Aydemir F, Nam H, Knutson MD, Cousins RJ. Zip14 (Slc39a14) mediates non-transferrin-bound iron uptake into cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103:13612-7.
- <sup>238</sup> Collins JF, Wessling-Resnick M, Knutson MD. Hepcidin regulation of iron transport. *J Nutr*. 2008; 138:2284-8.
- <sup>239</sup> Fleming RE, Britton RS. Iron Imports. VI. HFE and regulation of intestinal iron absorption. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006; 290:G590-4.
- <sup>240</sup> Griffiths WJ, Cox TM. Co-localization of the mammalian hemochromatosis gene product (HFE) and a newly identified transferrin receptor (TfR2) in intestinal tissue and cells. *J Histochem Cytochem*. 2003; 51:613-24.
- <sup>241</sup> Goswami T, Andrews NC. Hereditary hemochromatosis protein, HFE, interaction with transferrin receptor 2 suggests a molecular mechanism for mammalian iron sensing. *J Biol Chem*. 2006; 281:28494-8.
- <sup>242</sup> Vujic Spasic M, Kiss J, Herrmann T, Kessler R, Stolte J, Galy B et al. Physiologic systemic iron metabolism in mice deficient for duodenal Hfe. *Blood*. 2007; 109:4511-7.
- <sup>243</sup> Chen OS, Blemings KP, Schalinske KF, Eisenstein RS. Dietary iron intake rapidly influences iron regulatory proteins, ferritin subunits and mitochondrial aconitase in rat liver. *J Nutr*. 1998; 128:525-35.
- <sup>244</sup> Lymboussaki A, Pignatti E, Montosi G, Garuti C, Haile DJ, Pietrangelo A. The role of the iron responsive element in the control of ferroportin1/IREG1/MTP1 gene expression. *J Hepatol*. 2003; 39:710-5.
- <sup>245</sup> Eisenstein RS, Ross KL. Novel roles for iron regulatory proteins in the adaptive response to iron deficiency. *J Nutr*. 2003; 133:1510S-6S.
- <sup>246</sup> Li JY, Ram G, Gast K, Chen X, Barasch K, Mori K et al. Detection of intracellular iron by its regulatory effect. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2004; 287:C1547-59.
- <sup>247</sup> Mastrogiannaki M, Matak P, Keith B, Simon MC, Vaulont S, Peyssonnaud C. HIF-2alpha, but not HIF-1alpha, promotes iron absorption in mice. *J Clin Invest*. 2009; 119:1159-66.
- <sup>248</sup> Shah YM, Matsubara T, Ito S, Yim SH, Gonzalez FJ. Intestinal hypoxia-inducible transcription factors are essential for iron absorption following iron deficiency. *Cell Metab*. 2009; 9:152-64.
- <sup>249</sup> Simpson RJ, McKie AT. Regulation of intestinal iron absorption: the mucosa takes control? *Cell Metab*. 2009; 10:84-7.
- <sup>250</sup> Brandão M, Oliveira JC, Bravo F, Reis J, Garrido I, Porto G. The soluble transferrin receptor as a marker of iron homeostasis in normal subjects and in HFE-related hemochromatosis. *Haematologica*. 2005; 90:31-7.
- <sup>251</sup> Dassler K, Zydek M, Wandzik K, Kaup M, Fuchs H. Release of the soluble transferrin receptor is directly regulated by binding of its ligand ferritransferrin. *J Biol Chem*. 2006; 281:3297-304.
- <sup>252</sup> Núñez MT. Regulatory mechanisms of intestinal iron absorption-uncovering of a fast-response mechanism based on DMT1 and ferroportin endocytosis. *Biofactors*. 2010; 36:88-97.
- <sup>253</sup> Ganz T. Hepcidin and iron regulation, 10 years later. *Blood*. 2011; 117:4425-33.
- <sup>254</sup> Park CH, Valore EV, Waring AJ, Ganz T. Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J Biol Chem*. 2001; 276:7806-10.
- <sup>255</sup> Segat L, Pontillo A, Milanese M, Tossi A, Crovella S. Evolution of the hepcidin gene in primates. *BMC Genomics*. 2008; 9:120.
- <sup>256</sup> Franchini M, Montagnana M, Lippi G. Hepcidin and iron metabolism: from laboratory to clinical implications. *Clin Chim Acta*. 2010; 411:1565-9.
- <sup>257</sup> Valore EV, Ganz T. Posttranslational processing of hepcidin in human hepatocytes is mediated by the prohormone convertase furin. *Blood Cells Mol Dis*. 2008; 40:132-8.

- <sup>258</sup> Scamuffa N, Basak A, Lalou C, Wargnier A, Marcinkiewicz J, Siegfried G et al. Regulation of prohepcidin processing and activity by the subtilisin-like proprotein convertases Furin, PC5, PACE4 and PC7. *Gut*. 2008; 57:1573-82.
- <sup>259</sup> Gagliardo B, Kubat N, Faye A, Jaouen M, Durel B, Deschemin JC et al. Pro-hepcidin is unable to degrade the iron exporter ferroportin unless matured by a furin-dependent process. *J Hepatol*. 2009; 50:394-401.
- <sup>260</sup> Nemeth E, Ganz T. The role of hepcidin in iron metabolism. *Acta Haematol*. 2009; 122:78-86.
- <sup>261</sup> Krause A, Neitz S, Mägert HJ, Schulz A, Forssmann WG, Schulz-Knappe P et al. LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. *FEBS Lett*. 2000; 480:147-50.
- <sup>262</sup> Lou DQ, Nicolas G, Lesbordes JC, Viatte L, Grimber G, Szajnert MF et al. Functional differences between hepcidin 1 and 2 in transgenic mice. *Blood*. 2004; 103:2816-21.
- <sup>263</sup> Parajes S, González-Quintela A, Campos J, Quinteiro C, Domínguez F, Loidi L. Genetic study of the hepcidin gene (HAMP) promoter and functional analysis of the c.-582A > G variant. *BMC Genet*. 2010; 11:110.
- <sup>264</sup> Hunter HN, Fulton DB, Ganz T, Vogel HJ. The solution structure of human hepcidin, a peptide hormone with antimicrobial activity that is involved in iron uptake and hereditary hemochromatosis. *J Biol Chem*. 2002; 277:37597-603.
- <sup>265</sup> Jordan JB, Poppe L, Haniu M, Arvedson T, Syed R, Li V et al. Hepcidin revisited, disulfide connectivity, dynamics, and structure. *J Biol Chem*. 2009; 284:24155-67.
- <sup>266</sup> Kemna EH, Tjalsma H, Willems HL, Swinkels DW. Hepcidin: from discovery to differential diagnosis. *Haematologica*. 2008; 93:90-7.
- <sup>267</sup> Kaplan J, Ward DM, De Domenico I. The molecular basis of iron overload disorders and iron-linked anemias. *Int J Hematol*. 2011; 93:14-20.
- <sup>268</sup> Pigeon C, Ilyin G, Courselaud B, Leroyer P, Turlin B, Brissot P et al. A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. *J Biol Chem*. 2001; 276:7811-9.
- <sup>269</sup> Deugnier Y, Brissot P, Loréal O. Iron and the liver: update 2008. *J Hepatol*. 2008; 48:S113-23.
- <sup>270</sup> Nicolas G, Bennoun M, Devaux I, Beaumont C, Grandchamp B, Kahn A et al. Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (USF2) knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98:8780-5.
- <sup>271</sup> Bayele HK, McArdle H, Srai SK. Cis and trans regulation of hepcidin expression by upstream stimulatory factor. *Blood*. 2006; 108:4237-45.
- <sup>272</sup> Courselaud B, Pigeon C, Inoue Y, Inoue J, Gonzalez FJ, Leroyer P et al. C/EBPalpha regulates hepatic transcription of hepcidin, an antimicrobial peptide and regulator of iron metabolism. Cross-talk between C/EBP pathway and iron metabolism. *J Biol Chem*. 2002; 277:41163-70.
- <sup>273</sup> Lesbordes-Brion JC, Viatte L, Bennoun M, Lou DQ, Ramey G, Houbbron C et al. Targeted disruption of the hepcidin 1 gene results in severe hemochromatosis. *Blood*. 2006; 108:1402-5.
- <sup>274</sup> Nicolas G, Bennoun M, Porteu A, Mativet S, Beaumont C, Grandchamp B et al. Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver hepcidin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99:4596-601.
- <sup>275</sup> Viatte L, Nicolas G, Lou DQ, Bennoun M, Lesbordes-Brion JC, Canonne-Hergaux F, et al. Chronic hepcidin induction causes hyposideremia and alters the pattern of cellular iron accumulation in hemochromatotic mice. *Blood*. 2006; 107:2952-8.
- <sup>276</sup> Roetto A, Papanikolaou G, Politou M, Alberti F, Girelli D, Christakis J et al. Mutant antimicrobial peptide hepcidin is associated with severe juvenile hemochromatosis. *Nat Genet*. 2003; 33:21-2.

- 
- <sup>277</sup> Pietrangelo A, Trautwein C. Mechanisms of disease: The role of hepcidin in iron homeostasis--implications for hemochromatosis and other disorders. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol.* 2004; 1:39-45.
- <sup>278</sup> Theurl I, Ludwiczek S, Eller P, Seifert M, Artner E, Brunner P et al. Pathways for the regulation of body iron homeostasis in response to experimental iron overload. *Hepatology.* 2005; 43:711-9.
- <sup>279</sup> Détivaud L, Nemeth E, Boudjema K, Turlin B, Troadec MB, Leroyer P et al. Hepcidin levels in humans are correlated with hepatic iron stores, hemoglobin levels, and hepatic function. *Blood.* 2005; 106:746-8.
- <sup>280</sup> Frazer DM, Wilkins SJ, Becker EM, Vulpe CD, McKie AT, Trinder D et al. Hepcidin expression inversely correlates with the expression of duodenal iron transporters and iron absorption in rats. *Gastroenterology.* 2002; 123:835-44.
- <sup>281</sup> Robson KJ. Hepcidin and its role in iron absorption. *Gut.* 2004; 53:617-9.
- <sup>282</sup> Anderson GJ, Frazer DM. Recent advances in intestinal iron transport. *Curr Gastroenterol Rep.* 2005; 7:365-72.
- <sup>283</sup> Laftah AH, Ramesh B, Simpson RJ, Solanky N, Bahram S, Schümann K et al. Effect of hepcidin on intestinal iron absorption in mice. *Blood.* 2004; 103:3940-4.
- <sup>284</sup> Frazer DM, Wilkins SJ, Anderson GJ. Elevated iron absorption in the neonatal rat reflects high expression of iron transport genes in the distal alimentary tract. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2007; 293:G525-31.
- <sup>285</sup> Yeh KY, Yeh M, Glass J. Hepcidin regulation of ferroportin 1 expression in the liver and intestine of the rat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2004; 286:G385-94.
- <sup>286</sup> Leong WI, Lönnerdal B. Hepcidin, the recently identified peptide that appears to regulate iron absorption. *J Nutr.* 2004; 134:1-4.
- <sup>287</sup> Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, Vaughn MB, Donovan A, Ward DM et al. Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science.* 2004; 306:2090-3.
- <sup>288</sup> Nemeth E, Preza GC, Jung CL, Kaplan J, Waring AJ, Ganz T. The N-terminus of hepcidin is essential for its interaction with ferroportin: structure-function study. *Blood.* 2006; 107:328-33.
- <sup>289</sup> De Domenico I, Lo E, Ward DM, Kaplan J. Hepcidin-induced internalization of ferroportin requires binding and cooperative interaction with Jak2. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009; 106:3800-5.
- <sup>290</sup> De Domenico I, Nemeth E, Nelson JM. The hepcidin-binding site on ferroportin is evolutionarily conserved. *Cell Metab.* 2008; 8:146-56.
- <sup>291</sup> Vanoaica L, Darshan D, Richman L, Schümann K, Kühn LC. *Cell Metab.* Intestinal ferritin H is required for an accurate control of iron absorption. 2010; 12:273-82.
- <sup>292</sup> Farnaud S, Rapisarda C, Bui T, Drake A, Cammack R, Evans RW. Identification of an iron-hepcidin complex. *Biochem J.* 2008; 413:553-7.
- <sup>293</sup> Viatte L, Lesbordes-Brion JC, Lou DQ, Bennoun M, Nicolas G, Kahn A et al. Dereglulation of proteins involved in iron metabolism in hepcidin-deficient mice. *Blood.* 2005; 105:4861-4.
- <sup>294</sup> Yamaji S, Sharp P, Ramesh B, Srani SK. Inhibition of iron transport across human intestinal epithelial cells by hepcidin. *Blood.* 2004; 104:2178-80.
- <sup>295</sup> Mena NP, Esparza A, Tapia V, Valdés P, Núñez MT. Hepcidin inhibits apical iron uptake in intestinal cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2008; 294:G192-8.
- <sup>296</sup> Brasse-Lagnel C, Karim Z, Letteron P, Bekri S, Bado A, Beaumont C. Intestinal DMT1 cotransporter is down-regulated by hepcidin via proteasome internalization and degradation. *Gastroenterology.* 2011; 140:1261-1271.
- <sup>297</sup> Ramey G, Deschemin JC, Durel B, Canonne-Hergaux F, Nicolas G, Vaulont S. Hepcidin targets ferroportin for degradation in hepatocytes. *Haematologica.* 2010; 95:501-4.



- 
- <sup>298</sup> Andriopoulos B, Pantopoulos K. Heparin generated by hepatoma cells inhibits iron export from co-cultured THP1 monocytes. *J Hepatol.* 2006; 44:1125-31.
- <sup>299</sup> Ge XH, Wang Q, Qian ZM, Zhu L, Du F, Yung WH et al. The iron regulatory hormone hepcidin reduces ferroportin 1 content and iron release in H9C2 cardiomyocytes. *J Nutr Biochem.* 2009; 20:860-5.
- <sup>300</sup> Knutson MD, Oukka M, Koss LM, Aydemir F, Wessling-Resnick M. Iron release from macrophages after erythrophagocytosis is up-regulated by ferroportin 1 overexpression and down-regulated by hepcidin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102:1324-8.
- <sup>301</sup> Canonne-Hergaux F, Donovan A, Delaby C, Wang HJ, Gros P. Comparative studies of duodenal and macrophage ferroportin proteins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2006; 290:G156-63.
- <sup>302</sup> De Domenico I, Ward DM, Langelier C, Vaughn MB, Nemeth E, Sundquist WI et al. The molecular mechanism of hepcidin-mediated ferroportin down-regulation. *Mol Biol Cell.* 2007; 18:2569-78.
- <sup>303</sup> Zhang DL, Senecal T, Ghosh MC, Ollivierre-Wilson H, Tu T, Rouault TA. Heparin regulates ferroportin expression and intracellular iron homeostasis of erythroblasts. *Blood.* 2011; 118:2868-77.
- <sup>304</sup> Camberlein E, Abgueuen E, Fatih N, Canonne-Hergaux F, Leroyer P, Turlin B et al. Heparin induction limits mobilisation of splenic iron in a mouse model of secondary iron overload. *Biochim Biophys Acta.* 2010; 1802:339-46.
- <sup>305</sup> Chaston T, Chung B, Mascarenhas M, Marks J, Patel B, Srani SK et al. Evidence for differential effects of hepcidin in macrophages and intestinal epithelial cells. *Gut.* 2008; 57:374-82.
- <sup>306</sup> Chung B, Chaston T, Marks J, Srani SK, Sharp PA. Heparin decreases iron transporter expression in vivo in mouse duodenum and spleen and in vitro in THP-1 macrophages and intestinal Caco-2 cells. *J Nutr.* 2009; 139:1457-62.
- <sup>307</sup> Auriac A, Willemetz A, Canonne-Hergaux F. Lipid raft-dependent endocytosis: a new route for hepcidin-mediated regulation of ferroportin in macrophages. *Haematologica.* 2010; 95:1269-77.
- <sup>308</sup> Delaby C, Pilard N, Gonçalves AS, Beaumont C, Canonne-Hergaux F. Presence of the iron exporter ferroportin at the plasma membrane of macrophages is enhanced by iron loading and down-regulated by hepcidin. *Blood.* 2005; 106:3979-84.
- <sup>309</sup> Peslova G, Petrak J, Kuzelova K, Hrdy I, Halada P, Kuchel PW et al. Heparin, the hormone of iron metabolism, is bound specifically to alpha-2-macroglobulin in blood. *Blood.* 2009; 113:6225-36.
- <sup>310</sup> Ganz T, Olbina G, Girelli D, Nemeth E, Westerman M. Immunoassay for human serum hepcidin. *Blood.* 2008; 112:4292-7.
- <sup>311</sup> Ganz T. Heparin and its role in regulating systemic iron metabolism. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2006; 507:29-35.
- <sup>312</sup> Fleming RE, Ponka P. Iron overload in human disease. *N Engl J Med.* 2012; 366:348-59.
- <sup>313</sup> Tselepis C, Ford SJ, McKie AT, Vogel W, Zoller H, Simpson RJ et al. Characterization of the transition-metal-binding properties of hepcidin. *Biochem J.* 2010; 427:289-96.
- <sup>314</sup> Zhang X, Rovin BH. Heparin expression by human monocytes in response to adhesion and pro-inflammatory cytokines. *Biochim Biophys Acta.* 2010; 1800:1262-7.
- <sup>315</sup> Pinto JP, Dias V, Zoller H, Porto G, Carmo H, Carvalho F et al. Heparin messenger RNA expression in human lymphocytes. *Immunology.* 2010; 130:217-30.
- <sup>316</sup> Bekri S, Gual P, Anty R, Luciani N, Dahman M, Ramesh B et al. Increased adipose tissue expression of hepcidin in severe obesity is independent from diabetes and NASH. *Gastroenterology.* 2006; 131:788-96.
- <sup>317</sup> Vokurka M, Lacinová Z, Kremen J, Kopecký P, Bláha J, Pelinková K et al. Heparin expression in adipose tissue increases during cardiac surgery. *Physiol Res.* 2010; 59:393-400.

- 
- <sup>318</sup> Kulaksiz H, Theilig F, Bachmann S, Gehrke SG, Rost D, Janetzko A et al. The iron-regulatory peptide hormone hepcidin: expression and cellular localization in the mammalian kidney. *J Endocrinol.* 2005; 184:361-70.
- <sup>319</sup> Merle U, Fein E, Gehrke SG, Stremmel W, Kulaksiz H. The iron regulatory peptide hepcidin is expressed in the heart and regulated by hypoxia and inflammation. *Endocrinology.* 2007; 148:2663-8.
- <sup>320</sup> Frazier MD, Mamo LB, Ghio AJ, Turi JL. Hepcidin expression in human airway epithelial cells is regulated by interferon- $\gamma$ . *Respir Res.* 2011;12:100.
- <sup>321</sup> Strnad P, Schwarz P, Rasenack MC, Kucukoglu O, Habib RI, Heuberger D et al. Hepcidin is an antibacterial, stress-inducible peptide of the biliary system. *PLoS One.* 2011; 6:e16454.
- <sup>322</sup> Schwarz P, Kübler JA, Strnad P, Müller K, Barth TF, Gerloff A et al. Hepcidin is localised in gastric parietal cells, regulates acid secretion and is induced by *Helicobacter pylori* infection. *Gut.* 2012; 61:193-201.
- <sup>323</sup> Kulaksiz H, Fein E, Redecker P, Stremmel W, Adler G, Cetin Y. Pancreatic beta-cells express hepcidin, an iron-uptake regulatory peptide. *J Endocrinol.* 2008; 197:241-9.
- <sup>324</sup> Zechel S, Huber-Wittmer K, von Bohlen und Halbach O. Distribution of the iron-regulating protein hepcidin in the murine central nervous system. *J Neurosci Res.* 2006; 84:790-800.
- <sup>325</sup> Arnold J, Sangwaiya A, Manglam V, Geoghegan F, Thursz M, Busbridge M. Presence of hepcidin-25 in biological fluids: bile, ascitic and pleural fluids. *World J Gastroenterol.* 2010; 16:2129-33.
- <sup>326</sup> Viatte L, Vaulont S. Hepcidin, the iron watcher. *Biochimie.* 2009; 91:1223-8.
- <sup>327</sup> Theurl I, Theurl M, Seifert M, Mair S, Nairz M, Rumpold H et al. Autocrine formation of hepcidin induces iron retention in human monocytes. *Blood.* 2008; 111:2392-9.
- <sup>328</sup> Sow FB, Florence WC, Satoskar AR, Schlesinger LS, Zwilling BS, Lafuse WP. Expression and localization of hepcidin in macrophages: a role in host defense against tuberculosis. *J Leukoc Biol.* 2007; 82:934-45.
- <sup>329</sup> Kelley-Loughnane N, Sabla GE, Ley-Ebert C, Aronow BJ, Bezerra JA. Independent and overlapping transcriptional activation during liver development and regeneration in mice. *Hepatology.* 2002; 35:525-34.
- <sup>330</sup> Ganz T, Nemeth E. Iron imports. IV. Hepcidin and regulation of body iron metabolism. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2006; 290:G199-203.
- <sup>331</sup> Muckenthaler MU. Fine tuning of hepcidin expression by positive and negative regulators. *Cell Metab.* 2008; 8:1-3.
- <sup>332</sup> Atanasiu V, Manolescu B, Stoian I. Hepcidin - central regulator of iron metabolism. *Eur J Haematol.* 2007; 78:1-10.
- <sup>333</sup> Ganz T. Molecular control of iron transport. *J Am Soc Nephrol.* 2007; 18:394-400.
- <sup>334</sup> Flanagan JM, Truksa J, Peng H, Lee P, Beutler E. In vivo imaging of hepcidin promoter stimulation by iron and inflammation. *Blood Cells Mol Dis.* 2007; 38:253-7.
- <sup>335</sup> Ganz T. Hepcidin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation. *Blood.* 2003; 102:783-8.
- <sup>336</sup> Nemeth E, Valore EV, Territo M, Schiller G, Lichtenstein A, Ganz T. Hepcidin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute-phase protein. *Blood.* 2003; 101:2461-3.
- <sup>337</sup> Nicolas G, Chauvet C, Viatte L, Danan JL, Bigard X, Devaux I et al. The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. *J Clin Invest.* 2002; 110:1037-44.

- <sup>338</sup> Malik IA, Naz N, Sheikh N, Khan S, Moriconi F, Blaschke M et al. Comparison of changes in gene expression of transferrin receptor-1 and other iron-regulatory proteins in rat liver and brain during acute-phase response. *Cell Tissue Res.* 2011; 344:299-312.
- <sup>339</sup> Shike H, Lauth X, Westerman ME, Ostland VE, Carlberg JM, Van Olst JC et al. Bass hepcidin is a novel antimicrobial peptide induced by bacterial challenge. *Eur J Biochem.* 2002; 269:2232-2237.
- <sup>340</sup> Anderson GJ, Frazer DM, Wilkins SJ, Becker EM, Millard KN, Murphy TL et al. Relationship between intestinal iron-transporter expression, hepatic hepcidin levels and the control of iron absorption. *Biochem Soc Trans.* 2002; 30:724-6.
- <sup>341</sup> Nicolas G, Viatte L, Bennoun M, Beaumont C, Kahn A, Vaulont S. Hepcidin, a new iron regulatory peptide. *Blood Cells Mol Dis.* 2002; 29:327-35.
- <sup>342</sup> Rivera S, Liu L, Nemeth E, Gabayan V et al. Hepcidin excess induces the sequestration of iron and exacerbates tumor-associated anemia. *Blood.* 2005; 105:1797-802.
- <sup>343</sup> Roy CN, Mak HH, Akpan I, Losyev G, Zurakowski D, Andrews NC. Hepcidin antimicrobial peptide transgenic mice exhibit features of the anemia of inflammation. *Blood.* 2007; 109:4038-44.
- <sup>344</sup> Roy CN. Anemia of inflammation. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2010; 2010:276-80.
- <sup>345</sup> Wessling-Resnick M. Iron homeostasis and the inflammatory response. *Annu Rev Nutr.* 2010; 30:105-22.
- <sup>346</sup> Dallaglio G, Law E, Means RT Jr. Hepcidin inhibits in vitro erythroid colony formation at reduced erythropoietin concentrations. *Blood.* 2006; 107:2702-4.
- <sup>347</sup> Kemna E, Pickkers P, Nemeth E, van der Hoeven H, Swinkels D. Time-course analysis of hepcidin, serum iron, and plasma cytokine levels in humans injected with LPS. *Blood.* 2005; 106:1864-6.
- <sup>348</sup> Ohsugi Y. Recent advances in immunopathophysiology of interleukin-6: an innovative therapeutic drug, tocilizumab (recombinant humanized anti-human interleukin-6 receptor antibody), unveils the mysterious etiology of immune-mediated inflammatory diseases. *Biol Pharm Bull.* 2007; 30:2001-6.
- <sup>349</sup> Kawabata H, Tomosugi N, Kanda J, Tanaka Y, Yoshizaki K, Uchiyama T. Anti-interleukin 6 receptor antibody tocilizumab reduces the level of serum hepcidin in patients with multicentric Castleman's disease. *Haematologica.* 2007; 92:857-8.
- <sup>350</sup> Lee P, Peng H, Gelbart T, Beutler E. The IL-6- and lipopolysaccharide-induced transcription of hepcidin in HFE-, transferrin receptor 2-, and beta 2-microglobulin-deficient hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004; 101:9263-5.
- <sup>351</sup> Wrighting DM, Andrews NC. Interleukin-6 induces hepcidin expression through STAT3. *Blood.* 2006; 108:3204-9.
- <sup>352</sup> Verga Falzacappa MV, Vujic Spasic M, Kessler R, Stolte J, Hentze MW, Muckenthaler MU. STAT3 mediates hepatic hepcidin expression and its inflammatory stimulation. *Blood.* 2007; 109:353-8.
- <sup>353</sup> Pietrangelo A, Dierssen U, Valli L, Garuti C, Rump A, Corradini E. STAT3 is required for IL-6-gp130-dependent activation of hepcidin in vivo. *Gastroenterology.* 2007; 132:294-300.
- <sup>354</sup> Ganz T, Nemeth E. Iron sequestration and anemia of inflammation. *Semin Hematol.* 2009; 46:387-93.
- <sup>355</sup> Fatih N, Camberlein E, Island ML, Corlu A, Abgueguen E, Détivaud L et al. Natural and synthetic STAT3 inhibitors reduce hepcidin expression in differentiated mouse hepatocytes expressing the active phosphorylated STAT3 form. *J Mol Med (Berl).* 2010; 88:477-86.
- <sup>356</sup> Nemeth E, Rivera S, Gabayan V, Keller C, Taudorf S, Pedersen BK et al. IL-6 mediates hypoferrremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *J Clin Invest.* 2004; 113:1271-6.

- <sup>357</sup> Lou DQ, Lesbordes JC, Nicolas G, Viatte L, Bennoun M, Van Rooijen N et al. Iron- and inflammation-induced hepcidin gene expression in mice is not mediated by Kupffer cells in vivo. *Hepatology*. 2005; 41:1056-64.
- <sup>358</sup> Matak P, Chaston TB, Chung B, Srai SK, McKie AT, Sharp PA. Activated macrophages induce hepcidin expression in HuH7 hepatoma cells. *Haematologica*. 2009; 94:773-80.
- <sup>359</sup> Lee P, Peng H, Gelbart T, Wang L, Beutler E. Regulation of hepcidin transcription by interleukin-1 and interleukin-6. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005; 102:1906-10.
- <sup>360</sup> Armitage AE, Eddowes LA, Gileadi U, Cole S, Spottiswoode N, Selvakumar TA et al. Hepcidin regulation by innate immune and infectious stimuli. *Blood*. 2011; 118:4129-39.
- <sup>361</sup> Chung B, Verdier F, Matak P, Deschemin JC, Mayeux P, Vaulont S. Oncostatin M is a potent inducer of hepcidin, the iron regulatory hormone. *FASEB J*. 2010; 24:2093-103.
- <sup>362</sup> Montosi G, Corradini E, Garuti C, Barelli S, Recalcati S, Cairo G et al. Kupffer cells and macrophages are not required for hepatic hepcidin activation during iron overload. *Hepatology*. 2005; 41:545-52.
- <sup>363</sup> Moriconi F, Ahmad G, Ramadori P, Malik I, Sheikh N, Merli M et al. Phagocytosis of gadolinium chloride or zymosan induces simultaneous upregulation of hepcidin- and downregulation of hemojuvelin- and Fpn-1-gene expression in murine liver. *Lab Invest*. 2009; 89:1252-60.
- <sup>364</sup> Makui H, Soares RJ, Jiang W, Constante M, Santos MM. Contribution of Hfe expression in macrophages to the regulation of hepatic hepcidin levels and iron loading. *Blood*. 2005 Sep; 106:2189-95.
- <sup>365</sup> Theurl M, Theurl I, Hohegger K, Obrist P, Subramaniam N, van Rooijen N et al. Kupffer cells modulate iron homeostasis in mice via regulation of hepcidin expression. *J Mol Med (Berl)*. 2008; 86:825-35.
- <sup>366</sup> Liu XB, Nguyen NB, Marquess KD, Yang F, Haile DJ. Regulation of hepcidin and ferroportin expression by lipopolysaccharide in splenic macrophages. *Blood Cells Mol Dis*. 2005; 35:47-56.
- <sup>367</sup> Peyssonnaud C, Zinkernagel AS, Datta V, Lauth X, Johnson RS, Nizet V. TLR4-dependent hepcidin expression by myeloid cells in response to bacterial pathogens. *Blood*. 2006; 107:3727-32.
- <sup>368</sup> Sow FB, Alvarez GR, Gross RP, Satoskar AR, Schlesinger LS, Zwilling BS et al. Role of STAT1, NF-kappaB, and C/EBPbeta in the macrophage transcriptional regulation of hepcidin by mycobacterial infection and IFN-gamma. *J Leukoc Biol*. 2009; 86:1247-58.
- <sup>369</sup> Wu S, Zhang K, Lv C, Wang H, Wang H, Cheng B, Jin Y et al. Nuclear factor-kB mediated lipopolysaccharide-induced mRNA expression of hepcidin in human peripheral blood leukocytes. *Innate Immun*. 2012; 18:318-24.
- <sup>370</sup> Vecchi C, Montosi G, Zhang K, Lamberti I, Duncan SA, Kaufman RJ et al. ER stress controls iron metabolism through induction of hepcidin. *Science*. 2009; 325:877-80.
- <sup>371</sup> De Domenico I, Kaplan J. A new wrinkle in the fold: hepcidin links inflammation to the unfolded protein response. *Cell Metab*. 2009; 10:245-6.
- <sup>372</sup> Messner DJ, Kowdley KV. Biting the iron bullet: endoplasmic reticulum stress adds the pain of hepcidin to chronic liver disease. *Hepatology*. 2010; 51:705-7.
- <sup>373</sup> Oliveira SJ, Pinto JP, Picarote G, Costa VM, Carvalho F, Rangel M et al. ER stress-inducible factor CHOP affects the expression of hepcidin by modulating C/EBPalpha activity. *PLoS One*. 2009; 4:e6618.
- <sup>374</sup> Kawabata H, Germain RS, Ikezoe T, Tong X, Green EM, Gombart AF et al. Regulation of expression of murine transferrin receptor 2. *Blood*. 2001; 98:1949-54.
- <sup>375</sup> Wilkins SJ, Frazer DM, Millard KN, McLaren GD, Anderson GJ. Iron metabolism in the hemoglobin-deficient mouse: correlation of diferric transferrin with hepcidin expression. *Blood*. 2006; 107:1659-64.

- <sup>376</sup> Roetto A, Di Cunto F, Pellegrino RM, Hirsch E, Azzolino O, Bondi A et al. Comparison of 3 Tfr2-deficient murine models suggests distinct functions for Tfr2-alpha and Tfr2-beta isoforms in different tissues. *Blood*. 2010; 115:3382-9.
- <sup>377</sup> Chen J, Chloupková M, Gao J, Chapman-Arvedson TL, Enns CA. HFE modulates transferrin receptor 2 levels in hepatoma cells via interactions that differ from transferrin receptor 1-HFE interactions. *J Biol Chem*. 2007; 282:36862-70.
- <sup>378</sup> Waheed A, Britton RS, Grubb JH, Sly WS, Fleming RE. HFE association with transferrin receptor 2 increases cellular uptake of transferrin-bound iron. *Arch Biochem Biophys*. 2008; 474:193-7.
- <sup>379</sup> Fleming RE. Iron sensing as a partnership: HFE and transferrin receptor 2. *Cell Metab*. 2009; 9:211-2.
- <sup>380</sup> Gao J, Chen J, De Domenico I, Koeller DM, Koeller DM, Harding CO, Fleming RE et al. Hepatocyte-targeted HFE and TFR2 control hepcidin expression in mice. *Blood*. 2010; 115:3374-81.
- <sup>381</sup> Giannetti AM, Björkman PJ. HFE and transferrin directly compete for transferrin receptor in solution and at the cell surface. *J Biol Chem*. 2004; 279:25866-75.
- <sup>382</sup> Schmidt PJ, Toran PT, Giannetti AM, Bjorkman PJ, Andrews NC. The transferrin receptor modulates Hfe-dependent regulation of hepcidin expression. *Cell Metab*. 2008; 7:205-14.
- <sup>383</sup> Gao J, Chen J, Kramer M, Tsukamoto H, Zhang AS, Enns CA. Interaction of the hereditary hemochromatosis protein HFE with transferrin receptor 2 is required for transferrin-induced hepcidin expression. *Cell Metab*. 2009; 9:217-27.
- <sup>384</sup> Chloupková M, Zhang AS, Enns CA. Stoichiometries of transferrin receptors 1 and 2 in human liver. *Blood Cells Mol Dis*. 2010; 44:28-33.
- <sup>385</sup> Toledano M, Kozar E, Goldstein LH, Abu-Kishk I, Bar-Haim A, Siman-Tov Y et al. Hepcidin in acute iron toxicity. *Am J Emerg Med*. 2009; 27:761-4.
- <sup>386</sup> Lin L, Valore EV, Nemeth E. Iron transferrin regulates hepcidin synthesis in primary hepatocyte culture through hemojuvelin and BMP2/4. *Blood*. 2007; 110:2182-9.
- <sup>387</sup> Schmidt PJ, Andrews NC, Fleming MD. Hepcidin induction by transgenic overexpression of Hfe does not require the Hfe cytoplasmic tail, but does require hemojuvelin. *Blood*. 2010; 116:5679-87.
- <sup>388</sup> Truksa J, Peng H, Lee P, Beutler E. Bone morphogenetic proteins 2, 4, and 9 stimulate murine hepcidin 1 expression independently of Hfe, transferrin receptor 2 (Tfr2), and IL-6. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103:10289-93.
- <sup>389</sup> Fleming MD. The regulation of hepcidin and its effects on systemic and cellular iron metabolism. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2008:151-8.
- <sup>390</sup> Andriopoulos B Jr, Corradini E, Xia Y, Faasse SA, Chen S, Grgurevic L et al. BMP6 is a key endogenous regulator of hepcidin expression and iron metabolism. *Nat Genet*. 2009;41:482-7.
- <sup>391</sup> Knutson MD. Iron-sensing proteins that regulate hepcidin and enteric iron absorption. *Annu Rev Nutr*. 2010; 30:149-71.
- <sup>392</sup> Babitt JL, Huang FW, Xia Y, Sidis Y, Andrews NC, Lin HY. Modulation of bone morphogenetic protein signaling in vivo regulates systemic iron balance. *J Clin Invest*. 2007; 117:1933-9.
- <sup>393</sup> Yu PB, Hong CC, Sachidanandan C, Babitt JL, Babitt JL, Deng DY, Hoyng SA et al. Dorsomorphin inhibits BMP signals required for embryogenesis and iron metabolism. *Nat Chem Biol*. 2008; 4:33-41.
- <sup>394</sup> Steinbicker AU, Sachidanandan C, Vonner AJ, Yusuf RZ, Deng DY, Lai CS et al. Inhibition of bone morphogenetic protein signaling attenuates anemia associated with inflammation. *Blood*. 2011; 117:4915-23.
- <sup>395</sup> Meynard D, Kautz L, Darnaud V, Canonne-Hergaux F, Coppin H, Roth MP. Lack of the bone morphogenetic protein BMP6 induces massive iron overload. *Nat Genet*. 2009; 41:478-81.

- <sup>396</sup> Wang RH, Li C, Xu X, Zheng Y, Zheng Y, Xiao C, Zerfas P et al. A role of SMAD4 in iron metabolism through the positive regulation of hepcidin expression. *Cell Metab.* 2005; 2:399-409.
- <sup>397</sup> Roth MP, Coppin H. BMP6, un acteur clé dans la régulation du métabolisme du fer. *Med Sci (Paris)*. 2009; 25:678-80.
- <sup>398</sup> Corradini E, Rozier M, Meynard D, Odhiambo A, Lin HY, Feng Q et al. Iron Regulation of Hepcidin Despite Attenuated Smad1,5,8 Signaling in Mice Without Transferrin Receptor 2 or Hfe. *Gastroenterology*. 2011; 141:1907-14.
- <sup>399</sup> Steinbicker AU, Bartnikas TB, Lohmeyer LK, Leyton P, Mayeur C, Kao SM et al. Perturbation of hepcidin expression by BMP type I receptor deletion induces iron overload in mice. *Blood*. 2011; 118:4224-30.
- <sup>400</sup> Corradini E, Meynard D, Wu Q, Chen S, Ventura P, Pietrangelo A et al. Serum and liver iron differently regulate the bone morphogenetic protein 6 (BMP6)-SMAD signaling pathway in mice. *Hepatology*. 2011; 54:273-84.
- <sup>401</sup> Kautz L, Besson-Fournier C, Meynard D, Latour C, Roth MP, Coppin H. Iron overload induces BMP6 expression in the liver but not in the duodenum. *Haematologica*. 2011; 96:199-203.
- <sup>402</sup> Ramey G, Deschemin JC, Vaulont S. Cross-talk between the mitogen activated protein kinase and bone morphogenetic protein/hemojuvelin pathways is required for the induction of hepcidin by holotransferrin in primary mouse hepatocytes. *Haematologica*. 2009; 94:765-72.
- <sup>403</sup> Itoh S, ten Dijke P. Negative regulation of TGF-beta receptor/Smad signal transduction. *Curr Opin Cell Biol*. 2007; 19:176-84.
- <sup>404</sup> Kautz L, Meynard D, Monnier A, Darnaud V, Bouvet R, Wang RH et al. Iron regulates phosphorylation of Smad1/5/8 and gene expression of Bmp6, Smad7, Id1, and Atoh8 in the mouse liver. *Blood*. 2008; 112:1503-9.
- <sup>405</sup> Mleczko-Sanecka K, Casanovas G, Ragab A, Breitkopf K, Müller A, Boutros M et al. SMAD7 controls iron metabolism as a potent inhibitor of hepcidin expression. *Blood*. 2010; 115:2657-65.
- <sup>406</sup> Corradini E, Babitt JL, Lin HY. The RGM/DRAGON family of BMP co-receptors. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2009; 20:389-98.
- <sup>407</sup> Babitt JL, Huang FW, Wrighting DM, Xia Y, Sidis Y, Samad TA et al. Bone morphogenetic protein signaling by hemojuvelin regulates hepcidin expression. *Nat Genet*. 2006; 38:531-9.
- <sup>408</sup> Zhang AS, Gao J, Koeberl DD, Enns CA. The role of hepatocyte hemojuvelin in the regulation of bone morphogenetic protein-6 and hepcidin expression in vivo. *J Biol Chem*. 2010; 285:16416-23.
- <sup>409</sup> Papanikolaou G, Samuels ME, Ludwig EH, MacDonald ML, Franchini PL, Dubé MP et al. Mutations in HFE2 cause iron overload in chromosome 1q-linked juvenile hemochromatosis. *Nat Genet*. 2004; 36:77-82.
- <sup>410</sup> Oates PS, Ahmed U. Molecular regulation of hepatic expression of iron regulatory hormone hepcidin. *J Gastroenterol Hepatol*. 2007; 22:1378-87.
- <sup>411</sup> Krijt J, Vokurka M, Chang KT, Necas E. Expression of Rgmc, the murine ortholog of hemojuvelin gene, is modulated by development and inflammation, but not by iron status or erythropoietin. *Blood*. 2004; 104:4308-10.
- <sup>412</sup> Lin L, Goldberg YP, Ganz T. Competitive regulation of hepcidin mRNA by soluble and cell-associated hemojuvelin. *Blood*. 2005; 106:2884-9.
- <sup>413</sup> Lin L, Nemeth E, Goodnough JB, Thapa DR, Gabayan V, Ganz T. Soluble hemojuvelin is released by proprotein convertase-mediated cleavage at a conserved polybasic RNRR site. *Blood Cells Mol Dis*. 2008; 40:122-31.
- <sup>414</sup> Silvestri L, Pagani A, Camaschella C. Furin-mediated release of soluble hemojuvelin: a new link between hypoxia and iron homeostasis. *Blood*. 2008; 111:924-31.

- <sup>415</sup> Nili M, Shinde U, Rotwein P. Soluble repulsive guidance molecule c/hemojuvelin is a broad spectrum bone morphogenetic protein (BMP) antagonist and inhibits both BMP2- and BMP6-mediated signaling and gene expression. *J Biol Chem*. 2010; 285:24783-92.
- <sup>416</sup> Lee DH, Zhou LJ, Zhou Z, Xie JX, Jung JU, Liu Y et al. Neogenin inhibits HJV secretion and regulates BMP-induced hepcidin expression and iron homeostasis. *Blood*. 2010; 115:3136-45.
- <sup>417</sup> Yang F, West AP Jr, Allendorph GP, Choe S, Bjorkman PJ. Neogenin interacts with hemojuvelin through its two membrane-proximal fibronectin type III domains. *Biochemistry*. 2008; 47:4237-45.
- <sup>418</sup> Zhang AS, Yang F, Meyer K, Hernandez C, Chapman-Arvedson T, Bjorkman PJ et al. Neogenin-mediated hemojuvelin shedding occurs after hemojuvelin traffics to the plasma membrane. *J Biol Chem*. 2008; 283:17494-502.
- <sup>419</sup> Rodriguez A, Pan P, Parkkila S. Expression studies of neogenin and its ligand hemojuvelin in mouse tissues. *J Histochem Cytochem*. 2007; 55:85-96.
- <sup>420</sup> Kuns-Hashimoto R, Kuninger D, Nili M, Rotwein P. Selective binding of RGMc/hemojuvelin, a key protein in systemic iron metabolism, to BMP-2 and neogenin. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2008; 294:C994-C1003.
- <sup>421</sup> Zhang AS, Yang F, Wang J, Tsukamoto H, Enns CA. Hemojuvelin-neogenin interaction is required for bone morphogenetic protein-4-induced hepcidin expression. *J Biol Chem*. 2009; 284:22580-9.
- <sup>422</sup> Ramos E, Kautz L, Rodriguez R, Hansen M, Gabayan V, Ginzburg Y et al. Evidence for distinct pathways of hepcidin regulation by acute and chronic iron loading in mice. *Hepatology*. 2011; 53:1333-41.
- <sup>423</sup> Balesaria S, Ramesh B, McArdle H, Bayele HK, Srari SK. Divalent metal-dependent regulation of hepcidin expression by MTF-1. *FEBS Lett*. 2010; 584:719-25.
- <sup>424</sup> Bagu ET, Santos MM. Friend of GATA suppresses the GATA-induced transcription of hepcidin in hepatocytes through a GATA response element in the HAMP promoter. *J Mol Endocrinol*. 2011; 47:299-313.
- <sup>425</sup> Island ML, Fatih N, Leroyer P, Brissot P, Loreal O. GATA-4 transcription factor regulates hepatic hepcidin expression. *Biochem J*. 2011; 437:477-82.
- <sup>426</sup> Chung B, Matak P, McKie AT, Sharp P. Leptin increases the expression of the iron regulatory hormone hepcidin in HuH7 human hepatoma cells. *J Nutr*. 2007; 137:2366-70.
- <sup>427</sup> Sanad M, Osman M, Gharib A. Obesity modulate serum hepcidin and treatment outcome of iron deficiency anemia in children: a case control study. *Ital J Pediatr*. 2011 Jul; 37:34.
- <sup>428</sup> Frazer DM, Inglis HR, Wilkins SJ, Millard KN, Steele TM, McLaren GD et al. Delayed hepcidin response explains the lag period in iron absorption following a stimulus to increase erythropoiesis. *Gut*. 2004; 53:1509-15.
- <sup>429</sup> Pinto JP, Ribeiro S, Pontes H, Thowfequ S, Tosh D, Carvalho F et al. Erythropoietin mediates hepcidin expression in hepatocytes through EPOR signaling and regulation of C/EBPalpha. *Blood*. 2008; 111:5727-33.
- <sup>430</sup> Huang H, Constante M, Layoun A, Santos MM. Contribution of STAT3 and SMAD4 pathways to the regulation of hepcidin by opposing stimuli. *Blood*. 2009; 113:3593-9.
- <sup>431</sup> Lainé F, Laviolle B, Ropert M, Bouguen G, Morcet J, Hamon C et al. Early effects of erythropoietin on serum hepcidin and serum iron bioavailability in healthy volunteers. *Eur J Appl Physiol*. 2012; 112:1391-7.
- <sup>432</sup> Ashby DR, Gale DP, Busbridge M, Murphy KG, Duncan ND, Cairns TD et al. Erythropoietin administration in humans causes a marked and prolonged reduction in circulating hepcidin. *Haematologica*. 2010; 95:505-8.

- 
- <sup>433</sup> Peyssonnaud C, Zinkernagel AS, Schuepbach RA, Rankin E, Vaulont S, Haase VH et al. Regulation of iron homeostasis by the hypoxia-inducible transcription factors (HIFs). *J Clin Invest*. 2007; 117:1926-32.
- <sup>434</sup> Braliou GG, Verga Falzacappa MV, Chachami G, Casanovas G, Muckenthaler MU, Simos G. 2-Oxoglutarate-dependent oxygenases control hepcidin gene expression. *J Hepatol*. 2008; 48:801-10.
- <sup>435</sup> Volke M, Gale DP, Maegdefrau U, Schley G, Klanke B, Bosserhoff AK et al. Evidence for a lack of a direct transcriptional suppression of the iron regulatory peptide hepcidin by hypoxia-inducible factors. *PLoS One*. 2009; 4:e7875.
- <sup>436</sup> Choi SO, Cho YS, Kim HL, Park JW. ROS mediate the hypoxic repression of the hepcidin gene by inhibiting C/EBPalpha and STAT-3. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007; 356:312-7.
- <sup>437</sup> Goss JA, Seu P, Gao FQ, Wyllie S. Ischemia-reperfusion of rat liver modulates hepcidin in vivo expression. *Liver Transpl*. 2005; 11:800-6.
- <sup>438</sup> Piperno A, Galimberti S, Mariani R, Pelucchi S, Ravasi G, Lombardi C et al. Modulation of hepcidin production during hypoxia-induced erythropoiesis in humans in vivo: data from the HIGHCARE project. *Blood*. 2011; 117:2953-9.
- <sup>439</sup> Silvestri L, Pagani A, Nai A, De Domenico I, Kaplan J, Camaschella C. The serine protease matriptase-2 (TMPRSS6) inhibits hepcidin activation by cleaving membrane hemojuvelin. *Cell Metab*. 2008; 8:502-11.
- <sup>440</sup> Du X, She E, Gelbart T, Truksa J, Lee P, Xia Y et al. The serine protease TMPRSS6 is required to sense iron deficiency. *Science*. 2008; 320:1088-92.
- <sup>441</sup> Folgueras AR, de Lara FM, Pendás AM, Garabaya C, Rodríguez F, Astudillo A et al. Membrane-bound serine protease matriptase-2 (Tmprss6) is an essential regulator of iron homeostasis. *Blood*. 2008; 112:2539-45.
- <sup>442</sup> Lee P. Role of matriptase-2 (TMPRSS6) in iron metabolism. *Acta Haematol*. 2009; 122:87-96.
- <sup>443</sup> Finberg KE, Whittlesey RL, Fleming MD, Andrews NC. Down-regulation of Bmp/Smad signaling by Tmprss6 is required for maintenance of systemic iron homeostasis. *Blood*. 2010; 115:3817-26.
- <sup>444</sup> Zhang AS, Anderson SA, Wang J, Yang F, DeMaster K, Ahmed R et al. Suppression of hepatic hepcidin expression in response to acute iron deprivation is associated with an increase of matriptase-2 protein. *Blood*. 2011; 118:4459-62.
- <sup>445</sup> Nai A, Pagani A, Silvestri L, Campostrini N, Corbella M, Girelli D et al. TMPRSS6 rs855791 modulates hepcidin transcription in vitro and serum hepcidin levels in normal individuals. *Blood*. 2011; 118:4459-62.
- <sup>446</sup> Tanaka T, Roy CN, Yao W, Matteini A, Semba RD, Arking D et al. A genome-wide association analysis of serum iron concentrations. *Blood*. 2010; 115:94-6.
- <sup>447</sup> Beutler E, Van Geet C, te Loo DM, Gelbart T, Crain K, Truksa J et al. Polymorphisms and mutations of human TMPRSS6 in iron deficiency anemia. *Blood Cells Mol Dis*. 2010; 44:16-21.
- <sup>448</sup> Melis MA, Cau M, Congiu R, Sole G, Barella S, Cao A et al. A mutation in the TMPRSS6 gene, encoding a transmembrane serine protease that suppresses hepcidin production, in familial iron deficiency anemia refractory to oral iron. *Haematologica*. 2008; 93:1473-9.
- <sup>449</sup> Finberg KE, Heeney MM, Campagna DR, Aydinok Y, Pearson HA, Hartman KR et al. Mutations in TMPRSS6 cause iron-refractory iron deficiency anemia (IRIDA). *Nat Genet*. 2008; 40:569-71.
- <sup>450</sup> Cui Y, Wu Q, Zhou Y. Iron-refractory iron deficiency anemia: new molecular mechanisms. *Kidney Int*. 2009; 76:1137-41.
- <sup>451</sup> Ramsay AJ, Hooper JD, Folgueras AR, Velasco G, López-Otín C. Matriptase-2 (TMPRSS6): a proteolytic regulator of iron homeostasis. *Haematologica*. 2009; 94:840-9.



- 
- <sup>452</sup> Ramsay AJ, Quesada V, Sanchez M, Garabaya C, Sardà MP, Baiget M et al. Matriptase-2 mutations in iron-refractory iron deficiency anemia patients provide new insights into protease activation mechanisms. *Hum Mol Genet.* 2009; 18:3673-83.
- <sup>453</sup> Silvestri L, Guillem F, Pagani A, Nai A, Oudin C, Silva M et al. Molecular mechanisms of the defective hepcidin inhibition in TMPRSS6 mutations associated with iron-refractory iron deficiency anemia. *Blood.* 2009; 113:5605-8.
- <sup>454</sup> De Falco L, Totaro F, Nai A, Pagani A, Girelli D, Silvestri L et al. Novel TMPRSS6 mutations associated with iron-refractory iron deficiency anemia (IRIDA). *Hum Mutat.* 2010; 31:E1390-405.
- <sup>455</sup> Meynard D, Vaja V, Sun CC, Corradini E, Chen S, López-Otín C et al. Regulation of TMPRSS6 by BMP6 and iron in human cells and mice. *Blood.* 2011; 118:747-56.
- <sup>456</sup> Pak M, Lopez MA, Gabayan V, Ganz T, Rivera S. Suppression of hepcidin during anemia requires erythropoietic activity. *Blood.* 2006; 108:3730-5.
- <sup>457</sup> Tanno T, Bhanu NV, Oneal PA, Goh SH, Staker P, Lee YT et al. High levels of GDF15 in thalassemia suppress expression of the iron regulatory protein hepcidin. *Nat Med.* 2007; 13:1096-101.
- <sup>458</sup> Lakhali S, Talbot NP, Crosby A, Stoepker C, Townsend AR, Robbins PA et al. Regulation of growth differentiation factor 15 expression by intracellular iron. *Blood.* 2009; 113:1555-63.
- <sup>459</sup> Tanno T, Porayette P, Sripichai O, Noh SJ, Byrnes C, Bhupatiraju A et al. Identification of TWSG1 as a second novel erythroid regulator of hepcidin expression in murine and human cells. *Blood.* 2009; 114:181-6.
- <sup>460</sup> Tanno T, Miller JL. Iron Loading and Overloading due to Ineffective Erythropoiesis. *Adv Hematol.* 2010; 2010:358283.
- <sup>461</sup> Musallam KM, Taher AT, Duca L, Cesaretti C, Halawi R, Cappellini MD. Levels of growth differentiation factor-15 are high and correlate with clinical severity in transfusion-independent patients with  $\beta$  thalassemia intermedia. *Blood Cells Mol Dis.* 2011; 47:232-4.
- <sup>462</sup> Tanno T, Noel P, Miller JL. Growth differentiation factor 15 in erythroid health and disease. *Curr Opin Hematol.* 2010; 17:184-90.
- <sup>463</sup> Santini V, Girelli D, Sanna A, Martinelli N, Duca L, Campostrini N et al. Hepcidin levels and their determinants in different types of myelodysplastic syndromes. *PLoS One.* 2011; 6:e23109.
- <sup>464</sup> Poli M, Girelli D, Campostrini N, Maccarinelli F, Finazzi D, Luscieti S et al. Heparin: a potent inhibitor of hepcidin expression in vitro and in vivo. *Blood.* 2011; 117:997-1004.
- <sup>465</sup> Bachman E, Feng R, Travison T, Li M, Olbina G, Ostland V et al. Testosterone suppresses hepcidin in men: a potential mechanism for testosterone-induced erythrocytosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010; 95:4743-7.
- <sup>466</sup> Castoldi M, Vujic Spasic M, Altamura S, Elmén J, Lindow M, Kiss J et al. The liver-specific microRNA miR-122 controls systemic iron homeostasis in mice. *J Clin Invest.* 2011; 121: 1386-96.
- <sup>467</sup> Young B, Zaritsky J. Hepcidin for clinicians. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2009; 4:1384-7.
- <sup>468</sup> Yilmaz MI, Solak Y, Covic A, Goldsmith D, Kanbay M. Renal anemia of inflammation: the name is self-explanatory. *Blood Purif.* 2011; 32:220-5.
- <sup>469</sup> Babitt JL, Lin HY. Molecular mechanisms of hepcidin regulation: implications for the anemia of CKD. *Am J Kidney Dis.* 2010; 55:726-41.
- <sup>470</sup> Stenvinkel P. Inflammatory and atherosclerotic interactions in the depleted uremic patient. *Blood Purif.* 2001; 19:53-61.
- <sup>471</sup> Zaritsky J, Young B, Wang HJ, Westerman M, Olbina G, Nemeth E et al. Hepcidin - a potential novel biomarker for iron status in chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2009; 4:1051-6.

- 
- <sup>472</sup> Ashby DR, Gale DP, Busbridge M, Murphy KG, Duncan ND, Cairns TD et al. Plasma hepcidin levels are elevated but responsive to erythropoietin therapy in renal disease. *Kidney Int.* 2009; 75:976-81.
- <sup>473</sup> Weiss G, Theurl I, Eder S, Koppelstaetter C, Kurz K, Sonnweber T et al. Serum hepcidin concentration in chronic haemodialysis patients: associations and effects of dialysis, iron and erythropoietin therapy. *Eur J Clin Invest.* 2009; 39:883-90.
- <sup>474</sup> Zaritsky J, Young B, Gales B, Wang HJ, Rastogi A, Westerman M et al. Reduction of serum hepcidin by hemodialysis in pediatric and adult patients. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2010; 5:1010-4.
- <sup>475</sup> Nakanishi T, Hasuike Y, Otaki Y, Kida A, Nonoguchi H, Kuragano T. Hepcidin: another culprit for complications in patients with chronic kidney disease? *Nephrol Dial Transplant.* 2011; 26:3092-100.
- <sup>476</sup> Smith C, Mitchinson MJ, Aruoma OI, Halliwell B. Stimulation of lipid peroxidation and hydroxyl-radical generation by the contents of human atherosclerotic lesions. *Biochem J.* 1992; 286:901-5.
- <sup>477</sup> Yuan XM, Anders WL, Olsson AG, Brunk UT. Iron in human atheroma and LDL oxidation by macrophages following erythrophagocytosis. *Atherosclerosis.* 1996; 124:61-73.
- <sup>478</sup> Pang JH, Jiang MJ, Chen YL, Wang FW, Wang DL, Chu SH et al. Increased ferritin gene expression in atherosclerotic lesions. *J Clin Invest.* 1996; 97:2204-12.
- <sup>479</sup> Kolodgie FD, Gold HK, Burke AP, Fowler DR, Kruth HS, Weber DK et al. Intraplaque hemorrhage and progression of coronary atheroma. *N Engl J Med.* 2003; 349:2316-25.
- <sup>480</sup> Sullivan JL. Macrophage iron, hepcidin, and atherosclerotic plaque stability. *Exp Biol Med (Maywood).* 2007; 232:1014-20.
- <sup>481</sup> Sullivan JL. Do hemochromatosis mutations protect against iron-mediated atherogenesis? *Circ Cardiovasc Genet.* 2009; 2:652-7.
- <sup>482</sup> Sullivan JL, Zacharski LR. Hereditary haemochromatosis and the hypothesis that iron depletion protects against ischemic heart disease. *Eur J Clin Invest.* 2001; 31:375-7.
- <sup>483</sup> Isoda M, Hanawa H, Watanabe R, Yoshida T, Toba K, Yoshida K et al. Expression of the peptide hormone hepcidin increases in cardiomyocytes under myocarditis and myocardial infarction. *J Nutr Biochem.* 2010; 21:749-56.
- <sup>484</sup> Simonis G, Mueller K, Schwarz P, Wiedemann S, Adler G, Strasser RH et al. The iron-regulatory peptide hepcidin is upregulated in the ischemic and in the remote myocardium after myocardial infarction. *Peptides.* 2010; 31:1786-90.
- <sup>485</sup> Suzuki H, Toba K, Kato K, Ozawa T, Tomosugi N, Higuchi M et al. Serum hepcidin-20 is elevated during the acute phase of myocardial infarction. *Tohoku J Exp Med.* 2009; 218:93-8.
- <sup>486</sup> Li H, Ginzburg YZ. Crosstalk between Iron Metabolism and Erythropoiesis. *Adv Hematol.* 2010; 2010:605435.
- <sup>487</sup> Origa R, Galanello R, Ganz T, Giagu N, Maccioni L, Faa G et al. Liver iron concentrations and urinary hepcidin in beta-thalassemia. *Haematologica.* 2007; 92:583-8.
- <sup>488</sup> Ciccarelli BT, Patterson CJ, Hunter ZR, Hanzis C, Ioakimidis L, Manning R et al. Hepcidin is produced by lymphoplasmacytic cells and is associated with anemia in Waldenström's macroglobulinemia. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* 2011; 11:160-3.
- <sup>489</sup> Weinstein DA, Roy CN, Fleming MD, Loda MF, Wolfsdorf JI, Andrews NC. Inappropriate expression of hepcidin is associated with iron refractory anemia: implications for the anemia of chronic disease. *Blood.* 2002 Nov 15;100(10):3776-81.
- <sup>490</sup> Semrin G, Fishman DS, Bousvaros A, Zholudev A, Saunders AC et al. Impaired intestinal iron absorption in Crohn's disease correlates with disease activity and markers of inflammation. *Inflamm Bowel Dis.* 2006 Dec;12(12):1101-6.

- 
- <sup>491</sup> Price EA, Schrier SL. Unexplained aspects of anemia of inflammation. *Adv Hematol.* 2010; 2010:508739.
- <sup>492</sup> Oustamanolakis P, Koutroubakis IE, Messaritakis I, Malliaraki N, Sfiridaki A, Kouroumalis EA. Serum hepcidin and prohepcidin concentrations in inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2011; 23:262-8.
- <sup>493</sup> Arnold J, Sangwaiya A, Bhatkal B, Geoghegan F, Busbridge M. Hepcidin and inflammatory bowel disease: dual role in host defence and iron homeostasis. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2009; 21:425-9.
- <sup>494</sup> Nguyen NB, Callaghan KD, Ghio AJ, Haile DJ, Yang F. Hepcidin expression and iron transport in alveolar macrophages. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2006; 291:L417-25.
- <sup>495</sup> Xu M, Kashanchi F, Foster A, Rotimi J, Turner W, Gordeuk VR et al. Hepcidin induces HIV-1 transcription inhibited by ferroportin. *Retrovirology.* 2010 Dec 2; 7:104.
- <sup>496</sup> Hershko C, Ianculovich M, Souroujon M. A hematologist's view of unexplained iron deficiency anemia in males: impact of *Helicobacter pylori* eradication. *Blood Cells Mol Dis.* 2007; 38:45-53.
- <sup>497</sup> Beutler E. Hepcidin mimetics from microorganisms? A possible explanation for the effect of *Helicobacter pylori* on iron homeostasis. *Blood Cells Mol Dis.* 2007; 38:54-5.
- <sup>498</sup> Schwarz P, Kübler JA, Strnad P, Müller K, Barth TF, Gerloff A et al. Hepcidin is localised in gastric parietal cells, regulates acid secretion and is induced by *Helicobacter pylori* infection. *Gut.* 2012; 61:193-201
- <sup>499</sup> De Domenico I, Zhang TY, Koenig CL, Branch RW, London N, Lo E et al. Hepcidin mediates transcriptional changes that modulate acute cytokine-induced inflammatory responses in mice. *J Clin Invest.* 2010; 120:2395-405.
- <sup>500</sup> Lasocki S, Longrois D, Montravers P, Beaumont C. Hepcidin and anemia of the critically ill patient: bench to bedside. *Anesthesiology.* 2011; 114:688-94.
- <sup>501</sup> van Eijk LT, Kroot JJ, Tromp M, van der Hoeven JG, Swinkels DW, Pickkers P. Inflammation-induced hepcidin-25 is associated with the development of anemia in septic patients: an observational study. *Crit Care.* 2011; 15:R9.
- <sup>502</sup> Heming N, Montravers P, Lasocki S. Iron deficiency in critically ill patients: highlighting the role of hepcidin. *Crit Care.* 2011; 15:210.
- <sup>503</sup> Lasocki S, Baron G, Driss F, Westerman M, Puy H, Boutron I et al. Diagnostic accuracy of serum hepcidin for iron deficiency in critically ill patients with anemia. *Intensive Care Med.* 2010; 36:1044-8.
- <sup>504</sup> Prowle JR, Ostland V, Calzavacca P, Licari E, Ligabo EV, Echeverri JE et al. Greater increase in urinary hepcidin predicts protection from acute kidney injury after cardiopulmonary bypass. *Nephrol Dial Transplant.* 2012; 27:595-602.
- <sup>505</sup> Haase-Fielitz A, Mertens PR, Plass M, Kuppe H, Hetzer R, Westerman M et al. Urine hepcidin has additive value in ruling out cardiopulmonary bypass-associated acute kidney injury - an observational cohort study. *Crit Care.* 2011; 15:R186.
- <sup>506</sup> Pinnix ZK, Miller LD, Wang W, D'Agostino R Jr, Kute T, Willingham MC et al. Ferroportin and iron regulation in breast cancer progression and prognosis. *Sci Transl Med.* 2010; 2:43-56.
- <sup>507</sup> Pogribny IP. Ferroportin and hepcidin: a new hope in diagnosis, prognosis, and therapy for breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2010; 12:314.
- <sup>508</sup> Kijima H, Sawada T, Tomosugi N, Kubota K. Expression of hepcidin mRNA is uniformly suppressed in hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer.* 2008; 8:167.
- <sup>509</sup> Shpyleva SI, Muskhelishvili L, Tryndyak VP, Koturbash I, Tokar EJ, Waalkes MP et al. Chronic administration of 2-acetylaminofluorene alters the cellular iron metabolism in rat liver. *Toxicol Sci.* 2011; 123:433-40.

- 
- <sup>510</sup> Piperno A, Mariani R, Trombini P, Girelli D. Heparin modulation in human diseases: from research to clinic. *World J Gastroenterol.* 2009; 15:538-51.
- <sup>511</sup> Kulaksiz H, Gehrke SG, Janetzko A, Rost D, Bruckner T, Kallinowski B et al. Pro-hepcidin: expression and cell specific localisation in the liver and its regulation in hereditary haemochromatosis, chronic renal insufficiency, and renal anaemia. *Gut.* 2004; 53:735-43.
- <sup>512</sup> Hadley KB, Johnson LK, Hunt JR. Iron absorption by healthy women is not associated with either serum or urinary prohepcidin. *Am J Clin Nutr.* 2006; 84:150-5.
- <sup>513</sup> Roe MA, Spinks C, Heath AL, Harvey LJ, Foxall R, Wimperis J et al. Serum prohepcidin concentration: no association with iron absorption in healthy men; and no relationship with iron status in men carrying HFE mutations, hereditary haemochromatosis patients undergoing phlebotomy treatment, or pregnant women. *Br J Nutr.* 2007; 97:544-9.
- <sup>514</sup> Huang X, Fung ET, Yip C, Zeleniuch-Jacquotte A. Serum prohepcidin is associated with soluble transferrin receptor-1 but not ferritin in healthy post-menopausal women. *Blood Cells Mol Dis.* 2008; 41:265-9.
- <sup>515</sup> Young MF, Glahn RP, Ariza-Nieto M, Inglis J, Olbina G, Westerman M et al. Serum hepcidin is significantly associated with iron absorption from food and supplemental sources in healthy young women. *Am J Clin Nutr.* 2009; 89:533-8.
- <sup>516</sup> Kemna E, Tjalsma H, Laarakkers C, Nemeth E, Willems H, Swinkels D. Novel urine hepcidin assay by mass spectrometry. *Blood.* 2005; 106:3268-70.
- <sup>517</sup> Kemna EH, Tjalsma H, Podust VN, Swinkels DW. Mass spectrometry-based hepcidin measurements in serum and urine: analytical aspects and clinical implications. *Clin Chem.* 2007; 53:620-8.
- <sup>518</sup> Bozzini C, Campostrini N, Trombini P, Nemeth E, Castagna A, Tenuti I et al. Measurement of urinary hepcidin levels by SELDI-TOF-MS in HFE-hemochromatosis. *Blood Cells Mol Dis.* 2008; 40:347-52.
- <sup>519</sup> Swinkels DW, Girelli D, Laarakkers C, Kroot J, Campostrini N, Kemna EH et al. Advances in quantitative hepcidin measurements by time-of-flight mass spectrometry. *PLoS One.* 2008; 3:e2706.
- <sup>520</sup> Ward DG, Roberts K, Stonelake P, Goon P, Zampronio CG, Martin A et al. SELDI-TOF-MS determination of hepcidin in clinical samples using stable isotope labelled hepcidin as an internal standard. *Proteome Sci.* 2008; 6:28.
- <sup>521</sup> Anderson DS, Heeney MM, Roth U, Menzel C, Fleming MD, Steen H et al. High-throughput matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry method for quantification of hepcidin in human urine. *Anal Chem.* 2010; 82:1551-5.
- <sup>522</sup> Kroot JJ, Laarakkers CM, Geurts-Moespot AJ, Grebenchtchikov N, Pickkers P, van Ede AE et al. Immunochemical and mass-spectrometry-based serum hepcidin assays for iron metabolism disorders. *Clin Chem.* 2010; 56:1570-9.
- <sup>523</sup> Macdougall IC, Malyszko J, Hider RC, Bansal SS. Current status of the measurement of blood hepcidin levels in chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2010; 5:1681-9.
- <sup>524</sup> Butterfield AM, Luan P, Witcher DR, Manetta J, Murphy AT, Wroblewski VJ et al. A dual-monoclonal sandwich ELISA specific for hepcidin-25. *Clin Chem.* 2010; 56:1725-32.
- <sup>525</sup> Koliaraki V, Marinou M, Vassilakopoulos TP, Vavourakis E, Tsochatzis E, Pangalis GA et al. A novel immunological assay for hepcidin quantification in human serum. *PLoS One.* 2009; 4:e4581.
- <sup>526</sup> Schwarz P, Strnad P, von Figura G, Janetzko A, Krayenbühl P, Adler G et al. A novel monoclonal antibody immunoassay for the detection of human serum hepcidin. *J Gastroenterol.* 2011; 46:648-56.
- <sup>527</sup> Kaneko Y, Miyajima H, Piperno A, Tomosugi N, Hayashi H, Morotomi N et al. Measurement of serum hepcidin-25 levels as a potential test for diagnosing hemochromatosis and related disorders. *J Gastroenterol.* 2010; 45:1163-71.

- 
- <sup>528</sup> Sanad M, Gharib AF. Urinary hepcidin level as an early predictor of iron deficiency in children: A case control study. *Ital J Pediatr.* 2011; 37:37.
- <sup>529</sup> Pasricha SR, McQuilten Z, Westerman M, Keller A, Nemeth E, Ganz T et al. Serum hepcidin as a diagnostic test of iron deficiency in premenopausal female blood donors. *Haematologica.* 2011; 96:1099-105.
- <sup>530</sup> Galesloot TE, Vermeulen SH, Geurts-Moespot AJ, Klaver SM, Kroot JJ, van Tienoven D et al. Serum hepcidin: reference ranges and biochemical correlates in the general population. *Blood.* 2011; 117:e218-25.
- <sup>531</sup> Brasse-Lagnel C, Poli M, Lesueur C, Grandchamp B, Lavoigne A, Beaumont C et al. Immunoassay for human serum hemojuvelin. *Haematologica.* 2010; 95:2031-7.
- <sup>532</sup> Nemeth E. Targeting the hepcidin-ferroportin axis in the diagnosis and treatment of anemias. *Adv Hematol.* 2010; 2010:750643.
- <sup>533</sup> Ganz T, Nemeth E. Hepcidin and disorders of iron metabolism. *Annu Rev Med.* 2011; 62:347-60.
- <sup>534</sup> Gagliardo B, Faye A, Jaouen M, Deschemin JC, Canonne-Hergaux F, Vaulont S et al. Production of biologically active forms of recombinant hepcidin, the iron-regulatory hormone. *FEBS J.* 2008; 275:3793-803.
- <sup>535</sup> Rivera S, Nemeth E, Gabayan V, Lopez MA, Farshidi D, Ganz T. Synthetic hepcidin causes rapid dose-dependent hypoferremia and is concentrated in ferroportin-containing organs. *Blood.* 2005; 106:2196-9.
- <sup>536</sup> Viatte L, Vaulont S. Prévenir et guérir les surcharges en fer, les espoirs de l'hepcidine. *Med Sci (Paris).* 2006; 22:696-8.
- <sup>537</sup> Parrow NL, Gardenghi S, Rivella S. Prospects for a hepcidin mimic to treat  $\beta$ -thalassemia and hemochromatosis. *Expert Rev Hematol.* 2011; 4:233-5.
- <sup>538</sup> Gardenghi S, Ramos P, Marongiu MF, Melchiori L, Breda L, Guy E et al. Hepcidin as a therapeutic tool to limit iron overload and improve anemia in  $\beta$ -thalassemic mice. *J Clin Invest.* 2010; 120:4466-77.
- <sup>539</sup> Bartnikas TB, Fleming MD. A tincture of hepcidin cures all: the potential for hepcidin therapeutics. *J Clin Invest.* 2010; 120:4187-90.
- <sup>540</sup> Nemeth E. Hepcidin biology and therapeutic applications. *Expert Rev Hematol.* 2010; 3:153-5.
- <sup>541</sup> Corradini E, Schmidt PJ, Meynard D, Garuti C, Montosi G, Chen S et al. BMP6 treatment compensates for the molecular defect and ameliorates hemochromatosis in Hfe knockout mice. *Gastroenterology.* 2010; 139:1721-9.
- <sup>542</sup> Preza GC, Ruchala P, Pinon R, Ramos E, Qiao B, Peralta MA et al. Minihepcidins are rationally designed small peptides that mimic hepcidin activity in mice and may be useful for the treatment of iron overload. *J Clin Invest.* 2011; 121:4880-8.
- <sup>543</sup> Coyne DW. Hepcidin: clinical utility as a diagnostic tool and therapeutic target. *Kidney Int.* 2011; 80:240-4.
- <sup>544</sup> Theurl I, Schroll A, Sonnweber T, Nairz M, Theurl M, Willenbacher W et al. Pharmacologic inhibition of hepcidin expression reverses anemia of chronic disease in rats. *Blood.* 2011; 118:4977-84.
- <sup>545</sup> Wang L, Trebicka E, Fu Y, Ellenbogen S, Hong CC, Babitt JL et al. The bone morphogenetic protein-hepcidin axis as a therapeutic target in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2012; 18:112-9.
- <sup>546</sup> Sasu BJ, Cooke KS, Arvedson TL, Plewa C, Ellison AR, Sheng J et al. Antihepcidin antibody treatment modulates iron metabolism and is effective in a mouse model of inflammation-induced anemia. *Blood.* 2010; 115:3616-24.
- <sup>547</sup> Reuben AR. Praise ye the god of iron. *Hepatology.* 2004; 40:1231-4.

- 
- <sup>548</sup> Feder JN, Gnirke A, Thomas W, Tsuchihashi Z, Ruddy DA, Basava A et al. A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nat Genet.* 1996 Aug; 13:399-408.
- <sup>549</sup> Fleming RE, Britton RS, Waheed A, Sly WS, Bacon BR. Pathophysiology of hereditary hemochromatosis. *Semin Liver Dis.* 2005; 25:411-9.
- <sup>550</sup> Pantopoulos K. Function of the hemochromatosis protein HFE: Lessons from animal models. *World J Gastroenterol.* 2008; 14:6893-901.
- <sup>551</sup> van Dijk BA, Laarakkers CM, Klaver SM, Jacobs EM, van Tits LJ, Janssen MC et al. Serum hepcidin levels are innately low in HFE-related haemochromatosis but differ between C282Y-homozygotes with elevated and normal ferritin levels. *Br J Haematol.* 2008; 142:979-85.
- <sup>552</sup> Kautz L, Meynard D, Besson-Fournier C, Darnaud V, Al Saati T, Coppin H et al. BMP/Smad signaling is not enhanced in Hfe-deficient mice despite increased Bmp6 expression. *Blood.* 2009; 114:2515-20.
- <sup>553</sup> Corradini E, Garuti C, Montosi G, Ventura P, Andriopoulos B Jr, Lin HY et al. Bone morphogenetic protein signaling is impaired in an HFE knockout mouse model of hemochromatosis. *Gastroenterology.* 2009; 137:1489-97.
- <sup>554</sup> Pietrangelo A. Hereditary hemochromatosis: pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Gastroenterology.* 2010; 139:393-408
- <sup>555</sup> Ryan JD, Ryan E, Fabre A, Lawless MW, Crowe J. Defective bone morphogenic protein signaling underlies hepcidin deficiency in HFE hereditary hemochromatosis. *Hepatology.* 2010; 52:1266-73.
- <sup>556</sup> Girelli D, Trombini P, Busti F, Camprostrini N, Sandri M, Pelucchi S et al. A time course of hepcidin response to iron challenge in patients with HFE and TFR2 hemochromatosis. *Haematologica.* 2011; 96:500-6.
- <sup>557</sup> Bridle KR, Frazer DM, Wilkins SJ, Dixon JL, Purdie DM, Crawford DH et al. Disrupted hepcidin regulation in HFE-associated haemochromatosis and the liver as a regulator of body iron homeostasis. *Lancet.* 2003; 361:669-73.
- <sup>558</sup> Gehrke SG, Kulaksiz H, Herrmann T, Riedel HD, Bents K, Veltkamp C et al. Expression of hepcidin in hereditary hemochromatosis: evidence for a regulation in response to the serum transferrin saturation and to non-transferrin-bound iron. *Blood.* 2003; 102:371-6.
- <sup>559</sup> Piperno A, Girelli D, Nemeth E, Trombini P, Bozzini C, Poggiali E et al. Blunted hepcidin response to oral iron challenge in HFE-related hemochromatosis. *Blood.* 2007; 110:4096-100.
- <sup>560</sup> Sangwaiya A, Manglam V, Busbridge M, Thursz M, Arnold J. Blunted increase in serum hepcidin as response to oral iron in HFE-hemochromatosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2011; 23:721-4.
- <sup>561</sup> Hanson EH, Imperatore G, Burke W. HFE gene and hereditary hemochromatosis: a HuGE review. *Human Genome Epidemiology. Am J Epidemiol.* 2001; 154:193-206.
- <sup>562</sup> Olynyk JK, Cullen DJ, Aquilia S, Rossi E, Summerville L, Powell LW. A population-based study of the clinical expression of the hemochromatosis gene. *N Engl J Med.* 1999; 341:718-24.
- <sup>563</sup> McLaren GD, Gordeuk VR. Hereditary hemochromatosis: insights from the Hemochromatosis and Iron Overload Screening (HEIRS) Study. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2009 195-206.
- <sup>564</sup> European Association For The Study Of The Liver. EASL clinical practice guidelines for HFE hemochromatosis. *J Hepatol.* 2010; 53:3-22.
- <sup>565</sup> Sohda T, Yanai J, Soejima H, Tamura K. Frequencies in the Japanese population of HFE gene mutations. *Biochem Genet.* 1999; 37:63-8.

- <sup>566</sup> Shiono Y, Ikeda R, Hayashi H, Wakusawa S, Sanae F, Takikawa T et al. C282Y and H63D mutations in the HFE gene have no effect on iron overload disorders in Japan. *Intern Med.* 2001; 40:852-6.
- <sup>567</sup> Adams PC, Reboussin DM, Barton JC, McLaren CE, Eckfeldt JH, McLaren GD et al. Hemochromatosis and iron-overload screening in a racially diverse population. *N Engl J Med.* 2005; 352:1769-78.
- <sup>568</sup> Lok CY, Merryweather-Clarke AT, Viprakasit V, Chinthammitr Y, Srichairatanakool S, Limwongse C et al. Iron overload in the Asian community. *Blood.* 2009; 114:20-5.
- <sup>569</sup> Jain S, Agarwal S, Tamhankar P, Verma P, Choudhuri G. Lack of association of primary iron overload and common HFE gene mutations with liver cirrhosis in adult Indian population. *Indian J Gastroenterol.* 2011; 30:161-5.
- <sup>570</sup> Hunt JR, Zeng H. Iron absorption by heterozygous carriers of the HFE C282Y mutation associated with hemochromatosis. *Am J Clin Nutr.* 2004; 80:924-31.
- <sup>571</sup> Roe MA, Heath AL, Oyston SL, Macrow C, Hoogewerff JA, Foxall R et al. Iron absorption in male C282Y heterozygotes. *Am J Clin Nutr.* 2005; 81:814-21.
- <sup>572</sup> Cardoso CS, Oliveira P, Porto G, Oberkanins C, Mascarenhas M, Rodrigues P et al. Comparative study of the two more frequent HFE mutations (C282Y and H63D): significant different allelic frequencies between the North and South of Portugal. *Eur J Hum Genet.* 2001; 9:843-8.
- <sup>573</sup> Spínola C, Brehm A, Spínola H. Prevalence of H63D, S65C, and C282Y hereditary hemochromatosis gene variants in Madeira Island (Portugal). *Ann Hematol.* 2011; 90:29-32.
- <sup>574</sup> Aranda N, Viteri FE, Montserrat C, Arijá V. Effects of C282Y, H63D, and S65C HFE gene mutations, diet, and life-style factors on iron status in a general Mediterranean population from Tarragona, Spain. *Ann Hematol.* 2010; 89:767-73.
- <sup>575</sup> Bulaj ZJ, Griffen LM, Jorde LB, Edwards CQ, Kushner JP. Clinical and biochemical abnormalities in people heterozygous for hemochromatosis. *N Engl J Med.* 1996; 335:1799-805.
- <sup>576</sup> Lim EM, Rossi E, De Boer WB, Reed WD, Jeffrey GP. Hepatic iron loading in patients with compound heterozygous HFE mutations. *Liver Int.* 2004; 24:631-6.
- <sup>577</sup> Walsh A, Dixon JL, Ramm GA, Hewett DG, Lincoln DJ, Anderson GJ et al. The clinical relevance of compound heterozygosity for the C282Y and H63D substitutions in hemochromatosis. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2006; 4:1403-10.
- <sup>578</sup> Sebastiani G, Wallace DF, Davies SE, Kulhalli V, Walker AP, Dooley JS. Fatty liver in H63D homozygotes with hyperferritinemia. *World J Gastroenterol.* 2006; 12:1788-92.
- <sup>579</sup> Lim EM, Rossi E, De Boer WB, Reed WD, Jeffrey GP. Hepatic iron loading in patients with compound heterozygous HFE mutations. *Liver Int.* 2004; 24:631-6.
- <sup>580</sup> Gurrin LC, Bertalli NA, Dalton GW, Osborne NJ, Constantine CC, McLaren CE et al. HFE C282Y/H63D compound heterozygotes are at low risk of hemochromatosis-related morbidity. *Hepatology.* 2009; 50:94-101.
- <sup>581</sup> Baiget M, Barceló MJ, Gimferrer E. Frequency of the HFE C282Y and H63D mutations in distinct ethnic groups living in Spain. *J Med Genet.* 1998; 35:701.
- <sup>582</sup> Ropero P, Briceño O, Mateo M, Polo M, Mora A, González FA et al. Frequency of the C282Y and H63D mutations of the hemochromatosis gene (HFE) in a cohort of 1,000 neonates in Madrid (Spain). *Ann Hematol.* 2006; 85:323-6.
- <sup>583</sup> Rhodes DA, Raha-Chowdhury R, Cox TM, Trowsdale J. Homozygosity for the predominant Cys282Tyr mutation and absence of disease expression in hereditary haemochromatosis. *J Med Genet.* 1997; 34:761-4.
- <sup>584</sup> Waalen J, Nordestgaard BG, Beutler E. The penetrance of hereditary hemochromatosis. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2005; 18:203-20.

- 
- <sup>585</sup> Bulaj ZJ, Ajioka RS, Phillips JD, LaSalle BA, Jorde LB, Griffen LM et al. Disease-related conditions in relatives of patients with hemochromatosis. *N Engl J Med*. 2000; 343:1529-35.
- <sup>586</sup> Rossi E, Jeffrey GP. Clinical penetrance of C282Y homozygous HFE haemochromatosis. *Clin Biochem Rev*. 2004; 25:183-90.
- <sup>587</sup> McCune CA, Ravine D, Carter K, Jackson HA, Hutton D, Hedderich J et al. Iron loading and morbidity among relatives of HFE C282Y homozygotes identified either by population genetic testing or presenting as patients. *Gut*. 2006; 55:554-62.
- <sup>588</sup> Allen KJ, Gurrin LC, Constantine CC, Osborne NJ, Delatycki MB, Nicoll AJ et al. Iron-overload-related disease in HFE hereditary hemochromatosis. *N Engl J Med*. 2008; 358:221-30.
- <sup>589</sup> Fletcher LM, Dixon JL, Purdie DM, Powell LW, Crawford DH. Excess alcohol greatly increases the prevalence of cirrhosis in hereditary hemochromatosis. *Gastroenterology*. 2002; 122:281-9.
- <sup>590</sup> Beutler E. Iron storage disease: facts, fiction and progress. *Blood Cells Mol Dis*. 2007; 39:140-7.
- <sup>591</sup> Pietrangelo A. Hereditary hemochromatosis - a new look at an old disease. *N Engl J Med*. 2004; 350:2383-97.
- <sup>592</sup> Adams PC, Barton JC. Haemochromatosis. *Lancet*. 2007; 370:1855-60.
- <sup>593</sup> McLaren GD, McLaren CE, Adams PC, Barton JC, Reboussin DM, Gordeuk VR et al. Clinical manifestations of hemochromatosis in HFE C282Y homozygotes identified by screening. *Can J Gastroenterol*. 2008; 22:923-30.
- <sup>594</sup> Brissot P, Bardou-Jacquet E, Jouanolle AM, Loréal O. Iron disorders of genetic origin: a changing world. *Trends Mol Med*. 2011; 17:707-13.
- <sup>595</sup> Fargion S, Mandelli C, Piperno A, Cesana B, Fracanzani AL, Fraquelli M et al. Survival and prognostic factors in 212 Italian patients with genetic hemochromatosis. *Hepatology*. 1992; 15:655-9.
- <sup>596</sup> Kowdley KV. Iron, hemochromatosis, and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2004; 127:S79-86.
- <sup>597</sup> Nash S, Marconi S, Sikorska K, Naeem R, Nash G. Role of liver biopsy in the diagnosis of hepatic iron overload in the era of genetic testing. *Am J Clin Pathol*. 2002; 118:73-81.
- <sup>598</sup> Bassett ML, Hickman PE, Dahlstrom JE. The changing role of liver biopsy in diagnosis and management of haemochromatosis. *Pathology*. 2011; 43:433-9.
- <sup>599</sup> Guyader D, Jacquelinet C, Moirand R, Turlin B, Mendler MH, Chaperon J et al. Noninvasive prediction of fibrosis in C282Y homozygous hemochromatosis. *Gastroenterology*. 1998; 115:929-36.
- <sup>600</sup> Morrison ED, Brandhagen DJ, Phatak PD, Barton JC, Krawitt EL, El-Serag HB et al. Serum ferritin level predicts advanced hepatic fibrosis among U.S. patients with phenotypic hemochromatosis. *Ann Intern Med*. 2003; 138:627-33.
- <sup>601</sup> Allen KJ, Bertalli NA, Osborne NJ, Constantine CC, Delatycki MB, Nisselle AE et al. HFE Cys282Tyr homozygotes with serum ferritin concentrations below 1000 microg/L are at low risk of hemochromatosis. *Hepatology*. 2010; 52:925-33.
- <sup>602</sup> Deugnier Y, Turlin B, le Quilleuc D, Moirand R, Loréal O, Messner M et al. A reappraisal of hepatic siderosis in patients with end-stage cirrhosis: practical implications for the diagnosis of hemochromatosis. *Am J Surg Pathol*. 1997; 21:669-75.
- <sup>603</sup> Ludwig J, Hashimoto E, Porayko MK, Moyer TP, Baldus WP. Hemosiderosis in cirrhosis: a study of 447 native livers. *Gastroenterology*. 1997; 112:882-8.
- <sup>604</sup> Hézode C, Cazeneuve C, Coué O, Roudot-Thoraval F, Lonjon I, Bastie A et al. Liver iron accumulation in patients with chronic active hepatitis C: prevalence and role of hemochromatosis gene mutations and relationship with hepatic histological lesions. *J Hepatol*. 1999; 31:979-84.



- 
- <sup>605</sup> Silva IS, Perez RM, Oliveira PV, Cantagalo MI, Dantas E, Sisti C et al. Iron overload in patients with chronic hepatitis C virus infection: clinical and histological study. *J Gastroenterol Hepatol*. 2005; 20:243-8.
- <sup>606</sup> Corengia C, Galimberti S, Bovo G, Vergani A, Arosio C, Mariani R et al. Iron accumulation in chronic hepatitis C: relation of hepatic iron distribution, HFE genotype, and disease course. *Am J Clin Pathol*. 2005; 124:846-53.
- <sup>607</sup> Valenti L, Pulixi EA, Arosio P, Cremonesi L, Biasiotto G, Dongiovanni P et al. Relative contribution of iron genes, dysmetabolism and hepatitis C virus (HCV) in the pathogenesis of altered iron regulation in HCV chronic hepatitis. *Haematologica*. 2007; 92:1037-42.
- <sup>608</sup> Rigamonti C, Andorno S, Maduli E, Capelli F, Boldorini R, Sartori M. Gender and liver fibrosis in chronic hepatitis: the role of iron status. *Aliment Pharmacol Ther*. 2005; 21:1445-51.
- <sup>609</sup> Fujita N, Sugimoto R, Urawa N, Araki J, Mifuji R, Yamamoto M et al. Hepatic iron accumulation is associated with disease progression and resistance to interferon/ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C. *J Gastroenterol Hepatol*. 2007; 22:1886-93.
- <sup>610</sup> Price L, Kowdley KV. The role of iron in the pathophysiology and treatment of chronic hepatitis C. *Can J Gastroenterol*. 2009; 23:822-8.
- <sup>611</sup> Hayashi H, Piperno A, Tomosugi N, Hayashi K, Kimura F, Wakusawa S et al. Patients with chronic hepatitis C may be more sensitive to iron hepatotoxicity than patients with HFE-hemochromatosis. *Intern Med*. 2010; 49:2371-7.
- <sup>612</sup> Guido M, Mangia A, Faa G. Chronic viral hepatitis: the histology report. *Dig Liver Dis*. 2011; 43:S331-43.
- <sup>613</sup> Fujita N, Sugimoto R, Takeo M, Urawa N, Mifuji R, Tanaka H et al. Hcpidin expression in the liver: relatively low level in patients with chronic hepatitis C. *Mol Med*. 2007; 13:97-104.
- <sup>614</sup> Girelli D, Pasino M, Goodnough JB, Nemeth E, Guido M, Castagna A et al. Reduced serum hepcidin levels in patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol*. 2009; 51:845-52.
- <sup>615</sup> Miyachi H, Kobayashi Y, Relja B, Fujita N, Iwasa M, Gabazza EC et al. Effect of suppressor of cytokine signaling on hepcidin production in hepatitis C virus replicon cells. *Hepatol Res*. 2011; 41:364-74.
- <sup>616</sup> Fujita N, Sugimoto R, Motonishi S, Tomosugi N, Tanaka H, Takeo M et al. Patients with chronic hepatitis C achieving a sustained virological response to peginterferon and ribavirin therapy recover from impaired hepcidin secretion. *J Hepatol*. 2008; 49:702-10.
- <sup>617</sup> Jaroszewicz J, Rogalska M, Flisiak I, Flisiak R. Successful antiviral therapy is associated with a decrease of serum prohepcidin in chronic hepatitis C. *World J Gastroenterol*. 2010; 16:1747-52.
- <sup>618</sup> Deugnier Y, Loréal O, Carré F, Duvallet A, Zoulim F, Vinel JP et al. Increased body iron stores in elite road cyclists. *Med Sci Sports Exerc*. 2002; 34:876-80.
- <sup>619</sup> Pietrangelo A. Hemochromatosis: an endocrine liver disease. *Hepatology*. 2007; 46:1291-301
- <sup>620</sup> Moirand R, Mortaji AM, Loréal O, Paillard F, Brissot P, Deugnier Y et al. A new syndrome of liver iron overload with normal transferrin saturation. *Lancet*. 1997; 349:95-7.
- <sup>621</sup> Mendler MH, Turlin B, Moirand R, Jouanolle AM, Sapey T, Guyader D et al. Insulin resistance-associated hepatic iron overload. *Gastroenterology*. 1999; 117:1155-63.
- <sup>622</sup> Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med*. 2002; 346:1221-31.
- <sup>623</sup> Clark JM, Brancati FL, Diehl AM. The prevalence and etiology of elevated aminotransferase levels in the United States. *Am J Gastroenterol*. 2003; 98:960-7.
- <sup>624</sup> Mendler MH, Turlin B, Moirand R, Sapey T, Guyader D, Brissot P et al. The "dysmetabolic iron overload syndrome": a concept which unites hepatic iron overload associated with polymetabolic disorders, steatosis, and NASH. 49th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases; Chicago November 1998, 4-12. *Hepatology* 1998; 28:501A.

- 
- <sup>625</sup> Fargion S. Dysmetabolic iron overload syndrome. *Haematologica*. 1999; 84:97-8.
- <sup>626</sup> Trombini P, Piperno A. Ferritin, metabolic syndrome and NAFLD: elective attractions and dangerous liaisons. *J Hepatol*. 2007; 46:549-52.
- <sup>627</sup> Sumida Y, Yoshikawa T, Okanoue T. Role of hepatic iron in non-alcoholic steatohepatitis. *Hepatol Res*. 2009; 39:213-22.
- <sup>628</sup> Barisani D, Pelucchi S, Mariani R, Galimberti S, Trombini P, Fumagalli D et al. Hepsidin and iron-related gene expression in subjects with Dysmetabolic Hepatic Iron Overload. *J Hepatol*. 2008; 49:123-33.
- <sup>629</sup> Jiang F, Sun ZZ, Tang YT, Xu C, Jiao XY. Hepsidin expression and iron parameters change in Type 2 diabetic patients. *Diabetes Res Clin Pract*. 2011; 93:43-8.
- <sup>630</sup> Senates E, Yilmaz Y, Colak Y, Ozturk O, Altunoz ME, Kurt R et al. Serum levels of hepcidin in patients with biopsy-proven nonalcoholic Fatty liver disease. *Metab Syndr Relat Disord*. 2011; 9:287-90.
- <sup>631</sup> Bekri S, Gual P, Anty R, Luciani N, Luciani N, Dahman M, Ramesh B et al. Increased adipose tissue expression of hepcidin in severe obesity is independent from diabetes and NASH. *Gastroenterology*. 2006; 131:788-96.
- <sup>632</sup> Hintze KJ, McClung JP. Hepsidin: A Critical Regulator of Iron Metabolism during Hypoxia. *Adv Hematol*. 2011; 2011:510304.
- <sup>633</sup> Hintze KJ, Snow D, Nabor D, Timbimboo H. Adipocyte Hypoxia Increases Hepatocyte Hepsidin Expression. *Biol Trace Elem Res*. 2011; 143:764-71
- <sup>634</sup> Whittington PF. Neonatal hemochromatosis: a congenital alloimmune hepatitis. *Semin Liver Dis*. 2007; 27:243-50.
- <sup>635</sup> Gebara E, Fernández MA, Rojas E, Afazani A, Ciocca M, Bosaleh A et al. Hemocromatosis neonatal. Una causa de fallo hepático in útero. Presentación de dos casos y revisión de la bibliografía. *Arch Argent Pediatr*. 2008; 106:155-61.
- <sup>636</sup> Fletcher LM, Powell LW. Hemochromatosis and alcoholic liver disease. *Alcohol*. 2003; 30:131-6.
- <sup>637</sup> Fletcher LM, Bridle KR, Crawford DH. Effect of alcohol on iron storage diseases of the liver. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2003; 17:663-77.
- <sup>638</sup> Fletcher LM, Halliday JW, Powell LW. Interrelationships of alcohol and iron in liver disease with particular reference to the iron-binding proteins, ferritin and transferrin. *J Gastroenterol Hepatol*. 1999; 14:202-14.
- <sup>639</sup> Pascoe A, Kerlin P, Steadman C, Clouston A, Jones D, Powell L et al. Spur cell anaemia and hepatic iron stores in patients with alcoholic liver disease undergoing orthotopic liver transplantation. *Gut*. 1999; 45:301-5.
- <sup>640</sup> Kohgo Y, Ohtake T, Ikuta K, Suzuki Y, Hosoki Y, Saito H et al. Iron accumulation in alcoholic liver diseases. *Alcohol Clin Exp Res*. 2005; 29:189S-93S.
- <sup>641</sup> Sebastiani G, Walker AP. HFE gene in primary and secondary hepatic iron overload. *World J Gastroenterol*. 2007; 13:4673-89.
- <sup>642</sup> Eng SC, Taylor SL, Reyes V, Raaka S, Berger J, Kowdley KV. Hepatic iron overload in alcoholic end-stage liver disease is associated with iron deposition in other organs in the absence of HFE-1 hemochromatosis. *Liver Int*. 2005; 25:513-7.
- <sup>643</sup> Whitfield JB, Zhu G, Heath AC, Powell LW, Martin NG. Effects of alcohol consumption on indices of iron stores and of iron stores on alcohol intake markers. *Alcohol Clin Exp Res*. 2001; 25:1037-45.
- <sup>644</sup> Bell H, Skinningsrud A, Raknerud N, Try K. Serum ferritin and transferrin saturation in patients with chronic alcoholic and non-alcoholic liver diseases. *J Intern Med*. 1994; 236:315-22.

- 
- <sup>645</sup> Machado MV, Gonçalves MS, Cortez-Pinto H. Metabolismo do Ferro em Alcoólicos Crônicos em Consumo Activo e Durante a Abstinência. *J Port Gastroenterol* 2004; 11:186-190.
- <sup>646</sup> Hearnshaw S, Thompson NP, McGill A. The epidemiology of hyperferritinaemia. *World J Gastroenterol*. 2006; 12:5866-9.
- <sup>647</sup> Milman N, Ovesen L, Byg K, Graudal N. Iron status in Danes updated 1994. I: prevalence of iron deficiency and iron overload in 1332 men aged 40-70 years. Influence Of blood donation, alcohol intake, and iron supplementation *Ann Hematol*. 1999; 78:393-400.
- <sup>648</sup> Ioannou GN, Dominitz JA, Weiss NS, Heagerty PJ, Kowdley KV. The effect of alcohol consumption on the prevalence of iron overload, iron deficiency, and iron deficiency anemia. *Gastroenterology*. 2004; 126:1293-301.
- <sup>649</sup> De Feo TM, Fargion S, Duca L, Cesana BM, Boncinelli L, Lozza P et al. Non-transferrin-bound iron in alcohol abusers. *Alcohol Clin Exp Res*. 2001; 25:1494-9.
- <sup>650</sup> Sumida Y, Nakashima T, Yoh T, Kakisaka Y, Nakajima Y, Ishikawa H et al. Serum thioredoxin elucidates the significance of serum ferritin as a marker of oxidative stress in chronic liver diseases. *Liver*. 2001; 21:295-9.
- <sup>651</sup> Duane P, Raja KB, Simpson RJ, Peters TJ. Intestinal iron absorption in chronic alcoholics. *Alcohol Alcohol*. 1992; 27:539-44.
- <sup>652</sup> Celada A, Rudolf H, Donath A. Effect of experimental chronic alcohol ingestion and folic acid deficiency on iron absorption. *Blood*. 1979; 54:906-15.
- <sup>653</sup> Suzuki Y, Saito H, Suzuki M, Hosoki Y, Sakurai S, Fujimoto Y et al. Up-regulation of transferrin receptor expression in hepatocytes by habitual alcohol drinking is implicated in hepatic iron overload in alcoholic liver disease. *Alcohol Clin Exp Res*. 2002; 26:26S-31S
- <sup>654</sup> Kohgo Y, Ohtake T, Ikuta K, Suzuki Y, Torimoto Y, Kato J. Dysregulation of systemic iron metabolism in alcoholic liver diseases. *J Gastroenterol Hepatol*. 2008; 23S78-81.
- <sup>655</sup> Harrison-Findik DD, Schafer D, Klein E, Timchenko NA, Kulaksiz H, Clemens D et al. Alcohol metabolism-mediated oxidative stress down-regulates hepcidin transcription and leads to increased duodenal iron transporter expression. *J Biol Chem*. 2006; 281:22974-82.
- <sup>656</sup> Harrison-Findik DD, Klein E, Evans J, Gollan J. Regulation of liver hepcidin expression by alcohol in vivo does not involve Kupffer cell activation or TNF-alpha signaling. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2009; 296:G112-8.
- <sup>657</sup> Harrison-Findik DD. Role of alcohol in the regulation of iron metabolism. *World J Gastroenterol*. 2007; 13:4925-30.
- <sup>658</sup> Ohtake T, Saito H, Hosoki Y, Inoue M, Miyoshi S, Suzuki Y et al. Hepcidin is down-regulated in alcohol loading. *Alcohol Clin Exp Res*. 2007; 31:S2-8.
- <sup>659</sup> Liu H, Colavitti R, Rovira II, Finkel T. Redox-dependent transcriptional regulation. *Circ Res*. 2005; 97:967-74.
- <sup>660</sup> Swinkels DW, Drenth JP. Hepcidin in the management of patients with mild non-hemochromatotic iron overload: Fact or fiction? *J Hepatol*. 2008; 49:680-5.
- <sup>661</sup> Bridle K, Cheung TK, Murphy T, Walters M, Anderson G, Crawford DG et al. Hepcidin is down-regulated in alcoholic liver injury: implications for the pathogenesis of alcoholic liver disease. *Alcohol Clin Exp Res*. 2006; 30:106-12.
- <sup>662</sup> Harrison-Findik DD, Klein E, Crist C, Evans J, Timchenko N, Gollan J. Iron-mediated regulation of liver hepcidin expression in rats and mice is abolished by alcohol. *Hepatology*. 2007; 46:1979-85.
- <sup>663</sup> Gerjevic LN, Liu N, Lu S, Harrison-Findik DD. Alcohol Activates TGF-Beta but Inhibits BMP Receptor-Mediated Smad Signaling and Smad4 Binding to Hepcidin Promoter in the Liver. *Int J Hepatol*. 2012; 2012:459278.
- <sup>664</sup> Harrison-Findik DD. Is the iron regulatory hormone hepcidin a risk factor for alcoholic liver disease? *World J Gastroenterol*. 2009; 15:1186-93.

- 
- <sup>665</sup> Iqbal T, Diab A, Ward DG, Brookes MJ, Tselepis C, Murray J et al. Is iron overload in alcohol-related cirrhosis mediated by hepcidin? *World J Gastroenterol*. 2009; 15:5864-6.
- <sup>666</sup> Bonkovsky HL, Lambrecht RW, Shan Y. Iron as a co-morbid factor in nonhemochromatotic liver disease. *Alcohol*. 2003; 30:137-44.
- <sup>667</sup> Wallace DF, Subramaniam VN. Co-factors in liver disease: the role of HFE-related hereditary hemochromatosis and iron. *Biochim Biophys Acta*. 2009; 1790:663-70.
- <sup>668</sup> Heritage ML, Murphy TL, Bridle KR, Anderson GJ, Crawford DH, Fletcher LM. Hepcidin regulation in wild-type and Hfe knockout mice in response to alcohol consumption: evidence for an alcohol-induced hypoxic response. *Alcohol Clin Exp Res*. 2009; 33:1391-400.
- <sup>669</sup> Flanagan JM, Peng H, Beutler E. Effects of alcohol consumption on iron metabolism in mice with hemochromatosis mutations. *Alcohol Clin Exp Res*. 2007; 31:138-43.
- <sup>670</sup> Ropero Gradilla P, Villegas Martínez A, Fernández Arquero M, García-Agúndez JA, González Fernández FA, Benítez Rodríguez J et al. C282Y and H63D mutations of HFE gene in patients with advanced alcoholic liver disease. *Rev Esp Enferm Dig*. 2001; 93:156-63.
- <sup>671</sup> Machado MV, Ravasco P, Martins A, Almeida MR, Camilo ME, Cortez-Pinto H. Iron homeostasis and H63D mutations in alcoholics with and without liver disease. *World J Gastroenterol*. 2009; 15:106-11.
- <sup>672</sup> Grove J, Daly AK, Burt AD, Guzail M, James OF, Bassendine MF et al. Heterozygotes for HFE mutations have no increased risk of advanced alcoholic liver disease. *Gut*. 1998; 43:262-6.
- <sup>673</sup> Gleeson D, Evans S, Bradley M, Jones J, Peck RJ, Dube A et al. HFE genotypes in decompensated alcoholic liver disease: phenotypic expression and comparison with heavy drinking and with normal controls. *Am J Gastroenterol*. 2006; 101:304-10.
- <sup>674</sup> Lauret E, Rodríguez M, González S, Linares A, López-Vázquez A, Martínez-Borra J et al. HFE gene mutations in alcoholic and virus-related cirrhotic patients with hepatocellular carcinoma. *Am J Gastroenterol*. 2002; 97:1016-21.
- <sup>675</sup> Frenzer A, Rudzki Z, Norton ID, Butler WJ, Roberts-Thomson IC. Heterozygosity of the haemochromatosis mutation, C282Y, does not influence susceptibility to alcoholic cirrhosis. *Scand J Gastroenterol*. 1998; 33:1324.
- <sup>676</sup> Robinson G, Narasimhan S, Weatherall M, Beasley R. Hemochromatosis gene mutations, liver function tests and iron status in alcohol-dependent patients admitted for detoxification. *J Gastroenterol Hepatol*. 2007; 22:852-4.
- <sup>677</sup> Olynyk JK, Knuiman MW, Divitini ML, Bartholomew HC, Cullen DJ, Powell LW. Effects of HFE gene mutations and alcohol on iron status, liver biochemistry and morbidity. *J Gastroenterol Hepatol*. 2005; 20:1435-41.
- <sup>678</sup> Raszeja-Wyszomirska J, Kurzawski G, Zawada I, Suchy J, Lubinski J, Milkiewicz P. HFE gene mutations in patients with alcoholic liver disease. A prospective study from northwestern Poland. *Pol Arch Med Wewn*. 2010; 120:127-31.
- <sup>679</sup> Raynard B, Balian A, Fallik D, Capron F, Bedossa P, Chaput JC et al. Risk factors of fibrosis in alcohol-induced liver disease. *Hepatology*. 2002; 35:635-8.
- <sup>680</sup> Ganne-Carrié N, Christidis C, Chastang C, Ziol M, Chapel F, Imbert-Bismut F et al. Liver iron is predictive of death in alcoholic cirrhosis: a multivariate study of 229 consecutive patients with alcoholic and/or hepatitis C virus cirrhosis: a prospective follow up study. *Gut* 2000; 46:277-82.
- <sup>681</sup> Kohgo Y, Ikuta K, Ohtake T, Torimoto Y, Kato J. Iron overload and cofactors with special reference to alcohol, hepatitis C virus infection and steatosis/insulin resistance. *World J Gastroenterol*. 2007; 13:4699-706.
- <sup>682</sup> Purohit V, Russo D, Salin M. Role of iron in alcoholic liver disease: introduction and summary of the symposium. *Alcohol*. 2003; 30:93-7.

- <sup>683</sup> Scotet V, Mérour MC, Mercier AY, Chanu B, Le Faou T, Raguénes O et al. Hereditary hemochromatosis: effect of excessive alcohol consumption on disease expression in patients homozygous for the C282Y mutation. *Am J Epidemiol.* 2003; 158:129-34.
- <sup>684</sup> Fargion S, Fracanzani AL, Piperno A, Braga M, D'Alba R, Ronchi G et al. Prognostic factors for hepatocellular carcinoma in genetic hemochromatosis. *Hepatology.* 1994; 20:1426-31.
- <sup>685</sup> Adams PC, Agnew S. Alcoholism in hereditary hemochromatosis revisited: prevalence and clinical consequences among homozygous siblings. *Hepatology.* 1996; 23:724-7.
- <sup>686</sup> Pietrangelo A. Iron-induced oxidant stress in alcoholic liver fibrogenesis. *Alcohol.* 2003; 30:121-9.
- <sup>687</sup> Tavill AS, Qadri AM. Alcohol and iron. *Semin Liver Dis.* 2004; 24:317-25.
- <sup>688</sup> Xiong S, She H, Sung CK, Tsukamoto H. Iron-dependent activation of NF-kappaB in Kupffer cells: a priming mechanism for alcoholic liver disease. *Alcohol.* 2003; 30:107-13
- <sup>689</sup> Tsukamoto H, Lin M, Ohata M, Giulivi C, French SW, Brittenham G. Iron primes hepatic macrophages for NF-kappaB activation in alcoholic liver injury. *Am J Physiol.* 1999; 277:G1240-50.
- <sup>690</sup> Xiong S, She H, Tsukamoto H. Signaling role of iron in NF-kappa B activation in hepatic macrophages. *Comp Hepatol.* 2004; 3:S36.
- <sup>691</sup> Xiong S, She H, Zhang AS, Wang J, Mkrtchyan H, Dynnyk A et al. Hepatic macrophage iron aggravates experimental alcoholic steatohepatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2008; 295:G512-21.
- <sup>692</sup> Tsukamoto H, Horne W, Kamimura S, Niemelä O, Parkkila S, Ylä-Herttuala S et al. Experimental liver cirrhosis induced by alcohol and iron. *J Clin Invest.* 1995; 96:620-30.
- <sup>693</sup> Bridle KR, Crawford DH, Ramm GA. Identification and characterization of the hepatic stellate cell transferrin receptor. *Am J Pathol.* 2003; 162:1661-7.
- <sup>694</sup> Ramm GA, Britton RS, O'Neill R. Identification and characterization of a receptor for tissue ferritin on activated rat lipocytes *J Clin Invest.* 1994; 94:9-15.
- <sup>695</sup> Ramm GA, Crawford DH, Powell LW, Walker NI, Fletcher LM, Halliday JW. Hepatic stellate cell activation in genetic haemochromatosis. Lobular distribution, effect of increasing hepatic iron and response to phlebotomy. *J Hepatol.* 1997; 26:584-92.
- <sup>696</sup> Darnis F, Mossé A, Breauté C, Delorme ML. Aspects actuels du traitement des hémochromatoses (à propos de 100 observations). *Ann Med Interne (Paris).* 1971; 122:1193-210.
- <sup>697</sup> Grace ND, Greenberg MS. Phlebotomy in the treatment of iron overload: a controlled trial (a preliminary report). *Gastroenterology.* 1971; 60:744.
- <sup>698</sup> Powell LW. Changing concepts in haemochromatosis. *Postgrad Med J.* 1970 Apr;46(534):200-9.
- <sup>699</sup> Shaw S, Jayatilleke E. The role of cellular oxidases and catalytic iron in the pathogenesis of ethanol-induced liver injury. *Life Sci.* 1992; 50:2045-52.
- <sup>700</sup> Otagawa K, Ogawa T, Shiga R, Nakatani K, Ikeda K, Nakajima Y et al. Attenuation of acute and chronic liver injury in rats by iron-deficient diet. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2008; 294:R311-20.
- <sup>701</sup> Kaji K, Yoshiji H, Kitade M, Ikenaka Y, Noguchi R, Shirai Y et al. Combination treatment of angiotensin II type I receptor blocker and new oral iron chelator attenuates progression of nonalcoholic steatohepatitis in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2011; 300:G1094-104.
- <sup>702</sup> Deugnier Y, Turlin B. Pathology of hepatic iron overload. *World J Gastroenterol.* 2007; 13:4755-60.
- <sup>703</sup> Batts KP. Iron overload syndromes and the liver. *Mod Pathol.* 2007; 20:S31-9.
- <sup>704</sup> Deugnier Y, Turlin B. Pathology of hepatic iron overload. *World J Gastroenterol.* 2007; 13:4755-60.

- 
- <sup>705</sup> Adams PC. Is there a threshold of hepatic iron concentration that leads to cirrhosis in C282Y hemochromatosis? *Am J Gastroenterol.* 2001; 96(2):567-9.
- <sup>706</sup> Emond MJ, Bronner MP, Carlson TH, Lin M, Labbe RF, Kowdley KV. Quantitative study of the variability of hepatic iron concentrations. *Clin Chem.* 1999; 45:340-6.
- <sup>707</sup> Ernst O, Sergent G, Bonvarlet P, Canva-Delcambre V, Paris JC, L'Herminé C. Hepatic iron overload: diagnosis and quantification with MR imaging. *AJR Am J Roentgenol.* 1997; 168:1205-8.
- <sup>708</sup> Bonkovsky HL, Rubin RB, Cable EE, Davidoff A, Rijcken TH, Stark DD. Hepatic iron concentration: noninvasive estimation by means of MR imaging techniques. *Radiology.* 1999; 212:227-34.
- <sup>709</sup> Ernst O, Rose C, Sergent G, L'Herminé C. Hepatic iron overload: quantification with MR imaging at 1.5 T. *AJR Am J Roentgenol.* 1999; 172:1141-2.
- <sup>710</sup> Gandon Y, Olivie D, Guyader D, Aubé C, Oberti F, Sebille V et al. Non-invasive assessment of hepatic iron stores by MRI. *Lancet.* 2004; 363:357-62.
- <sup>711</sup> Wood JC. Magnetic resonance imaging measurement of iron overload. *Curr Opin Hematol.* 2007; 14:183-90.
- <sup>712</sup> Tziomalos K, Perifanis V. Liver iron content determination by magnetic resonance imaging. *World J Gastroenterol.* 2010; 16:1587-97.
- <sup>713</sup> Castiella A, Alústiza JM, Emparanza JI, Zapata EM, Costero B, Díez MI. Liver iron concentration quantification by MRI: are recommended protocols accurate enough for clinical practice? *Eur Radiol.* 2011; 21:137-41.
- <sup>714</sup> Nielsen P, Engelhardt R, Duerken M, Janka GE, Fischer R. Using SQUID biomagnetic liver susceptometry in the treatment of thalassemia and other iron loading diseases. *Transfus Sci.* 2000; 23:257-8.
- <sup>715</sup> Fischer R, Piga A, Harmatz P, Nielsen P. Monitoring long-term efficacy of iron chelation treatment with biomagnetic liver susceptometry. *Ann N Y Acad Sci.* 2005; 1054:350-7.
- <sup>716</sup> Castiella A, Alústiza JM, Emparanza JI, Zapata EM, Costero B, Díez MI. Liver iron concentration quantification by MRI: are recommended protocols accurate enough for clinical practice? *Eur Radiol.* 2011; 21:137-141.
- <sup>717</sup> Couzigou P, Vincendeau P, Fleury B, Richard-Molard B, Pierron A, Bergeron JL et al. Changes in circulating lymphocyte subsets in alcoholic hepatopathies. Respective role of alcohol, hepatocellular insufficiency and malnutrition. *Gastroenterol Clin Biol.* 1984; 8:915-9.
- <sup>718</sup> Spinozzi F, Rambotti P, Gerli R, Cernetti C, Rondoni F, Frascarelli A et al. Immunoregulatory T cells in alcoholic liver disease: phenotypical dissection of circulating Leu3+/T4+ inducer T-lymphocytes. *J Clin Lab Immunol.* 1987; 23:161-7.
- <sup>719</sup> Cook RT, Garvey MJ, Booth BM, Goeken JA, Stewart B, Noel M. Activated CD-8 cells and HLA DR expression in alcoholics without overt liver disease. *J Clin Immunol.* 1991; 11:246-53.
- <sup>720</sup> Arosa FA, Porto G, Cabeda JM, Lacerda R, Resende D, Cruz E et al. Expansions of CD8+CD28- and CD8+TcRVbeta5.2+ T cells in peripheral blood of heavy alcohol drinkers. *Alcohol Clin Exp Res.* 2000; 24:519-27.
- <sup>721</sup> Naude CE, Bouic P, Senekal M, Kidd M, Ferrett HL, Fein G et al. Lymphocyte measures in treatment-naïve 13-15-year old adolescents with alcohol use disorders. *Alcohol.* 2011; 45:507-14.
- <sup>722</sup> Müller C, Wolf H, Göttlicher J, Eibl MM. Helper-inducer and suppressor-inducer lymphocyte subsets in alcoholic cirrhosis. *Scand J Gastroenterol.* 1991; 26:295-301.
- <sup>723</sup> Laso FJ, Madruga JI, López A, Ciudad J, Alvarez-Mon M, San Miguel J et al. Distribution of peripheral blood lymphoid subsets in alcoholic liver cirrhosis: influence of ethanol intake. *Alcohol Clin Exp Res.* 1996; 20:1564-8.
- <sup>724</sup> Lombardo L, Capaldi A, Poccardi G, Vineis P. Peripheral blood CD3 and CD4 T-lymphocyte reduction correlates with severity of liver cirrhosis. *Int J Clin Lab Res.* 1995; 25:153-6.

- <sup>725</sup> Cook RT, Ballas ZK, Waldschmidt TJ, Vandersteen D, LaBrecque DR, Cook BL. Modulation of T-cell adhesion markers, and the CD45R and CD57 antigens in human alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res.* 1995; 19:555-63.
- <sup>726</sup> Schirren CA, Jung MC, Zachoval R, Diepolder H, Hoffmann R, Riethmüller G et al. Analysis of T cell activation pathways in patients with liver cirrhosis, impaired delayed hypersensitivity and other T cell-dependent functions. *Clin Exp Immunol.* 1997; 108:144-50.,
- <sup>727</sup> Szabo G, Mandrekar P, Oak S, Mayerle J. Effect of ethanol on inflammatory responses. Implications for pancreatitis. *Pancreatology.* 2007; 7:115-23
- <sup>728</sup> Lau AH, Szabo G, Thomson AW. Antigen-presenting cells under the influence of alcohol. *Trends Immunol.* 2009; 30:13-22.
- <sup>729</sup> Valenti L, De Feo T, Fracanzani AL, Fatta E, Salvagnini M, Aricò S et al: Alcohol Alcohol. Cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 A49G polymorphism is associated with susceptibility to and severity of alcoholic liver disease in Italian patients. *Alcohol Alcohol* 2004; 39:276-80
- <sup>730</sup> Ye C, Li WY, Zheng MH, Chen YP. T-helper 17 cell: A distinctive cell in liver diseases. *Hepatol Res.* 2011; 41:22-9.
- <sup>731</sup> Patsenker E, Stickel F. Role of integrins in fibrosing liver diseases. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2011; 301:G425-34.
- <sup>732</sup> Cook RT, Waldschmidt TJ, Cook BL, Labrecque DR, McLatchie K. Loss of the CD5+ and CD45RAhi B cell subsets in alcoholics. *Clin Exp Immunol.* 1996; 103:304-10.
- <sup>733</sup> Bonacchi A, Romagnani P, Romanelli RG, Efsen E, Annunziato F, Lasagni L et al. Signal transduction by the chemokine receptor CXCR3: activation of Ras/ERK, Src, and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt controls cell migration and proliferation in human vascular pericytes. *J Biol Chem.* 2001; 276:9945-54.
- <sup>734</sup> Laso FJ, Madruga JI, Girón JA, López A, Ciudad J, San Miguel JF et al. Decreased natural killer cytotoxic activity in chronic alcoholism is associated with alcohol liver disease but not active ethanol consumption. *Hepatology.* 1997; 25:1096-100.
- <sup>735</sup> Muhanna N, Doron S, Wald O, Horani A, Eid A, Pappo O et al. Activation of hepatic stellate cells after phagocytosis of lymphocytes: A novel pathway of fibrogenesis. *Hepatology.* 2008; 48:963-77.
- <sup>736</sup> Safadi R, Ohta M, Alvarez CE, Fiel MI, Bansal M, Mehal WZ et al. Immune stimulation of hepatic fibrogenesis by CD8 cells and attenuation by transgenic interleukin-10 from hepatocytes. *Gastroenterology.* 2004; 127:870-82.
- <sup>737</sup> Higazi AA, El-Haj M, Melhem A, Horani A, Pappo O, Alvarez CE et al. Immunomodulatory effects of plasminogen activators on hepatic fibrogenesis. *Clin Exp Immunol.* 2008; 152:163-73.
- <sup>738</sup> Arosa FA, da Silva AJ, Godinho IM, ter Steege JC, Porto G, Rudd CE et al. Decreased CD8-p56lck activity in peripheral blood T-lymphocytes from patients with hereditary haemochromatosis. *Scand J Immunol.* 1994; 39:426-32.
- <sup>739</sup> Porto G, Vicente C, Teixeira MA, Martins O, Cabeda JM, Lacerda R et al. Relative impact of HLA phenotype and CD4-CD8 ratios on the clinical expression of hemochromatosis. *Hepatology.* 1997; 25:397-402.
- <sup>740</sup> Arosa FA, Oliveira L, Porto G, da Silva BM, Kruijjer W, Veltman J et al. Anomalies of the CD8+ T cell pool in haemochromatosis: HLA-A3-linked expansions of CD8+CD28- T cells. *Clin Exp Immunol.* 1997; 107:548-54.
- <sup>741</sup> Cardoso C, Porto G, Lacerda R, Resende D, Rodrigues P, Bravo F et al. T-cell receptor repertoire in hereditary hemochromatosis: a study of 32 hemochromatosis patients and 274 healthy subjects. *Hum Immunol.* 2001; 62:488-99.
- <sup>742</sup> Cruz E, Vieira J, Almeida S, Lacerda R, Gartner A, Cardoso CS et al. A study of 82 extended HLA haplotypes in HFE-C282Y homozygous hemochromatosis subjects: relationship to the genetic control of CD8+ T-lymphocyte numbers and severity of iron overload. *BMC Med Genet.* 2006; 7:16.

---

<sup>743</sup> Cruz E, Vieira J, Gonçalves R, Alves H, Almeida S, Rodrigues P et al. Involvement of the major histocompatibility complex region in the genetic regulation of circulating CD8 T-cell numbers in humans. *Tissue Antigens*. 2004; 64:25-34.

<sup>744</sup> Macedo MF, Porto G, Costa M, Vieira CP, Rocha B, Cruz E et al. Low numbers of CD8+ T lymphocytes in hereditary haemochromatosis are explained by a decrease of the most mature CD8+ effector memory T cells. *Clin Exp Immunol*. 2010; 159:363-71.

<sup>745</sup> Cardoso EM, Hagen K, de Sousa M, Hultcrantz R. Hepatic damage in C282Y homozygotes relates to low numbers of CD8+ cells in the liver lobuli. *Eur J Clin Invest*. 2001; 31:45-53.

<sup>746</sup> Cruz E, Melo G, Lacerda R, Almeida S, Porto G. The CD8+ T-lymphocyte profile as a modifier of iron overload in HFE hemochromatosis: an update of clinical and immunological data from 70 C282Y homozygous subjects. *Blood Cells Mol Dis*. 2006; 37:33-9.