

TESIS DOCTORAL

La Hemocromatosis Hereditaria:
estudio del gen HFE y de sus mutaciones
en la población española

María Carmen Sánchez Fernández

Barcelona, 2002.

Esta memoria se ha realizado utilizando la tipografía Times New Roman (9-24), Perpetua (10) y Arial Narrow (8-10) con una distancia entre líneas de 1 y 1,3.

Portada diseñada por M. Sánchez con imagen de la direcciones de Internet: <http://hemochromatose.tripod.com/images/aatech.html> y modelo generado por ordenador de la estructura de la proteína hfe y β 2microglobulina (NCBI ID: 1A6Z) utilizando el software Cn3D 3.0.

La Hemocromatosis Hereditaria: estudio del gen HFE y de sus mutaciones en la población española

Memoria presentada por
María Carmen Sánchez Fernández
Para optar al grado de
Doctor en Biología

Trabajo realizado bajo la dirección del Dr. Rafael Oliva Virgili

Departamento C.C. Fisiológicas I
Facultad de Medicina
Universidad de Barcelona

Servicio de Genética
Hospital Clínico de Barcelona



Tesis adscrita al Departamento de Genética de la Facultad de Biología,
Universidad de Barcelona.

Tutora: Dra. Susana Balcells Comas.

Dr. Rafael Oliva

Dra. Susana Balcells

M. Sánchez

Barcelona, Febrero de 2002.

*A mis padres y
a mi hermano*

Nada es veneno, y todo es veneno;
la diferencia está en la dosis.

Paracelso
(Médico naturalista suizo)

Desde 1996 he estado trabajando en la realización de esta tesis doctoral, durante todo este tiempo he conocido y trabajado junto con personas que merecen mi admiración y gratitud por compartir conmigo el día a día y ayudarme en mi trabajo. A todos ellos les dedico estas líneas.

En primer lugar me gustaría agradecer el apoyo incondicional y ayuda que he recibido a lo largo de mi tesis de mi director, el Dr. Rafael Oliva. Le agradezco haberme permitido formar parte de su grupo y permitirme sumergirme en el mundo de la genética molecular. Gracias también por las horas de discusiones científicas y por compartir conmigo la experiencia de asistir a congresos internacionales que han sido una experiencia inolvidable y una ayuda de máxima importancia en la realización de mi tesis. Y gracias por haberme permitido introducirme en el mundo de la enseñanza universitaria, una experiencia de gran valor y relevancia para mí.

A la Dra. Susana Balcells por ser mi tutora de tesis y porque junto con el Dr. Daniel Grinberg me hicieron disfrutar de la genética siendo mis profesores en mi etapa de estudiante de bioquímica.

Mi agradecimiento a mis compañeros y compañeras presentes y pasados tanto del laboratorio Genoma Humano y como del laboratorio de Genética Molecular del Hospital Clínico: Verónica Ramos, Lourdes Mengual, Vanessa Martín, Cheles Ingelmo, Pau Pastor, Pilar Pastor, Víctor Obach, Albert Lleó, Esteban Muñoz, Salvador Bergoñón y Gemma Serra, gracias por compartir conmigo el trabajo de poyata. Especialmente me gustaría agradecer a José Manuel Vidal su tiempo dedicado a enseñarme y a contestar mis múltiples preguntas en el inicio de mis días como doctoranda y por sus inacabables ideas para solucionar cualquier problema del laboratorio. A nuestros alumnos de medicina Alicia Guillem, Cristina Rebordosa y Albert Lu por haber compartido conmigo sus horas de laboratorio y sus preguntas. A ellos me gustaría pedirles que sus ganas y entusiasmo por el campo de la genética molecular sigan tan vivo como el primer día y no desaparezcan nunca, ya que esto me ha reconfortado enormemente en mi experiencia como profesora.

A Marga Paula Villa por su inestimable ayuda en nuestro interminable proyecto 5000, al final lo acabamos y ahora creo que cualquier problema metodológico nos parece una tontería después de lo pasado. Gracias por haber sido el mejor técnico de laboratorio en el laboratorio de Genética Molecular del Hospital Clínico, donde pasamos tan buenos momentos; pero sobretodo, gracias por tu amistad y por compartir conmigo nuestras penas y alegrías de cada día.

Mi agradecimiento a todos aquellos que de una manera u otra se han visto implicados en mi “proyecto 5000”, especialmente agradezco la colaboración de los técnicos y médicos del Banco de Sangre y del Servicio de Hemoterapia y Hemostasia del Hospital Clínico, especialmente a la Dra. Cristina Sanz y al Dr. Pereira por su apoyo en este proyecto. A Montse Riego por su magnífica gestión en el envío y redacción de un montón de cartas y por estar siempre dispuesta a buscarme cualquier cosa que necesitara. A M^a Carmen Pérez por su inestimable ayuda en la recogida de muestras y su simpatía. Agradecer también al personal de campañas exteriores del Banco de Sangre y a todo aquel que ha participado con su donación en hacer posible el cribado de las mutaciones del gen HFE. Este proyecto no hubiese sido posible sin las horas de dedicación y los esfuerzos de Vanessa Martín, Cheles Ingelmo y Marga Villa, muchísimas gracias.

A Cheles, por su entusiasmo en el laboratorio, su amistad y su ayuda. Creo que sabes que siempre estaré para cualquier duda que tengas. Te deseo el mayor de los éxitos en la realización de tu tesis que ahora comienza y espero que disfrutes de la genética tanto como yo he disfrutado.

A mis vecinos de laboratorio Belén Mezquita, Montse Pau, Víctor Franconi, Xavier Vilagrassa, la Dra. Jovita Mezquita, el Dr. Cristóbal Mezquita, gracias por vuestros consejos. Gracias a Pau Mezquita por resolver nuestros problemas y dolores de cabeza informáticos. Y a mis otros vecinos: David Soto y Núria Comas, gracias.

A Núria Román por ser una secretaria tan eficaz y por ser tan alegre como es.

A María Piqué por su ayuda con los cultivos de líneas celulares y por sus horas dedicadas.

A mis compañeros del departamento de Bioquímica y de Biología de la Facultad de Medicina por estar siempre abiertos a prestar lo que se necesite.

Mi agradecimiento al servicio de Hepatología del Hospital Clínico de Barcelona por haber hecho posible que la Hemocromatosis sea una de las enfermedades que actualmente se realiza rutinariamente en el servicio de Genética, especialmente al Dr. Miquel Bruguera por atenderme con mis listados de pacientes analizados para el gen HFE y por su siempre abierta disponibilidad para mis dudas.

Al Dr. Enrique Quintero de la Unidad Mixta de Investigaciones del Hospital Universitario de Canarias, por su siempre dispuesta colaboración de la que espero que salgan grandes resultados.

Mi agradecimiento al Servicio de DNA del Hospital Clínico compuesto por el Dr. Joan Clària, Montse Bernat y Carmen Escofet y a los Servicios Científico Técnico de la Universidad de Barcelona, por su trabajo en secuenciar un montón de fragmentos de PCR y en la síntesis de una larga lista de *primers* de mi tesis.

A mis amigos de la Fundació Clínic y del Hospital Clínic: Olga Coll, Mireia Serradell, Jose M. Vila y Pili Cejudo porque siempre estaban allí por si necesitaba algún reactivo o aparato. Me gustaría recordar en mis agradecimientos a Mónica Gudayol, compañera de carrera y colaboradora con nuestro laboratorio cuya vida fue truncada tan dramáticamente hace un año, siempre te recordaremos Mónica.

Thanks to all my friends of Heidelberg, where I have spent two professional and personal unforgettable months.

Thanks to all the people in the Gene Expression lab of Matthias Hentze Group at the EMBL: Nadia Hubert, Karen Brenan, Fátima Gebauer, Bruno Galy, Thomas Preiss, Julie Baron, Thomas Schell, Giovanna Bergamini, Marica Grskovic, Sandra Clauder-Münster, Lizzy Bragado, Antje and Dirk Ostareck, because they have open their arms to me and they have made me feel as another member of the lab. Specially thanks to Matthias Hentze for giving me the opportunity to go to Germany, Heidelberg and the EMBL, that it really is another world in all technological aspects. And I can not forget my friends and teachers in the microarray technology, with them I have shared lots of experiments and Excel sheets (I can write it [sheet] better than pronounce), thanks Martina, thanks Sabine. I hope see all of you soon in the next step of my life as researcher, my postdoc.

Thanks to all the members of the Genome Core Facility at EMBL: Vladimir Benes, Belén Miñana, Silvia Sauer, Richard Carmouche, Monika Benesova, Jos de Graaf, for giving me a little corner where I could put my laptop and for their help.

Y no me olvido de aquellos que sin trabajar en mi grupo me hicieron pasar unos fantásticos fines de semana en Heidelberg, gracias a ellos también. A Vicente Tur por ser como es, no cambies, a Edward Faeth, mi mejor amigo sueco (my best Swedish friend, do not forget to learn more Spanish I think you should improve a little bit more), a Anushka Escamilla, tu salero nos contagia a todos eres la mejor de "too Granaa", a Anita, todos esperamos que llegues a ser una gran médico, ánimo y suerte, a nuestro cantautor Josemi, a Gregorio Fernández, a

Kostitas (sorry, Konstas), a Laura, a Christian, a Tania y a todos con los que compartí más de una cerveza en “La Romántica” y las fiestas del EMBL y más de una taza de té en la cafetería del EMBL. Gracias por estar allí y compartir los días conmigo.

A Jeremy Brock, a ti no hace falta que te lo traduzca, ¿verdad?. Gracias Jeremy por tu apoyo al pedir mi *short-fellowship* para el EMBL y por animarme a ir allí, mi estancia en el EMBL ha sido inolvidable.

A mis compañeras de piso. Vivir en un piso tan internacional como el mío me ha permitido conocer muchas personas de muy distintas nacionalidades, una experiencia muy gratificante en mi vida. Sobre todo me gustaría mencionar a mi amiga Karen Rivat y a mi ex-compañera de piso y profesora particular de alemán Margit Mayer (Vielen Danke, Margit. Ich hoffe merh Deutsch lernen).

Mi agradecimiento a La Fundació LA MARATÓ, a la Fundació Clínic, al Fondo de Investigaciones Sanitarias y a la Universidad de Barcelona por la concesión de unas becas y ayudas sin las que no hubiese sido posible la realización de esta tesis y que han permitido mi subsistencia aquí en Barcelona. Gracias también a la organización EMBO por la concesión de una *short-fellowship* para realizar una estancia en el EMBL, Heidelberg. También me gustaría mencionar a la organización *European Iron Club*, de la que soy socia, por haberme financiado la asistencia a diversos congresos y especialmente estoy agradecida a su secretaria la Dra. Roberta Ward por su magnífica gestión y su desbordante simpatía. La asistencia a los congresos BIOIRON (1999 y 2001) y los *European Iron Club Meetings* (1998 y 2000) me ha permitido conocer a aquellas personas de las que solo tenía referencia a través de *papers* y ha sido un gran privilegio y satisfacción comprobar que su calidad como personas supera su indiscutible alto prestigio como investigadores, a todos ellos, muchas gracias.

Agradezco a mis amigas de carrera la Dra. Laia Montell, Ester Padrós, Rita Teixidor y Susana Pastor su apoyo y amistad y espero que nunca perdamos el contacto por lejos que estemos.

A mis amigas de toda la vida Ana Martínez, Silvia Gil y Maribel Jiménez por ser mis amigas y aguantar mis “rollos” científicos aunque no sepáis de qué demonios hablo. Ya son muchos años los que nos unen, gracias.

A mis padres por su apoyo en mi carrera, por interesarse en mis estudios y por aguantar mis explicaciones sobre algo llamado Hemocromatosis. A mi hermano Toni, el genio informático de la familia, por ayudarme con Internet y mis líos entre ordenadores. Y a todo el resto de mi familia que siempre me ha apoyado desde Tarragona.

Esta tesis y los trabajos que aquí se presentan han sido realizados gracias a la concesión de los proyectos LA MARATÓ TV3 98-1010 y 99-1510 y al proyecto FIS 98/0145 al Dr. Rafael Oliva y a la concesión de una beca de “Recerca i Docència” de la Universidad de Barcelona a María Carmen Sánchez Fernández.

GUÍA GENERAL DE LA MEMORIA	1
INTRODUCCIÓN	3
I. LA HEMOCROMATOSIS	3
1.-HISTORIA	3
2.-DEFINICIÓN Y TIPOS DE HEMOCROMATOSIS	3
2.1.-Hemocromatosis Hereditaria (HH) tipo 1. Gen HFE	4
2.2.-Hemocromatosis tipo 2, Hemocromatosis Juvenil (JH) o HFE2.....	4
2.3.-Hemocromatosis tipo 3 o HFE3. Gen TFR2.	6
2.4.-Hemocromatosis tipo 4 o HFE4. Gen IREG1/FPN1.....	7
2.5.-Hemocromatosis Neonatal (NH, Neonatal Hemochromatosis).....	8
2.6.-Sobrecarga de hierro en África o Bantú siderosis	9
II. LA HEMOCROMATOSIS HEREDITARIA (HH) TIPO 1.	10
1.-SINTOMATOLOGÍA Y CLÍNICA DE LA HEMOCROMATOSIS HEREDITARIA	10
2.-DIAGNÓSTICO DE LA HEMOCROMATOSIS HEREDITARIA.....	12
2.1.-Determinación de la saturación de transferrina y ferritina sérica.....	12
2.2.-La biopsia hepática.....	14
2.3.-El análisis genético.....	15
3.-TRATAMIENTO.....	17
3.1.-Tratamiento de la sintomatología específica de la HH.....	19
4.-HERENCIA DE LA HH	20
5.-ASOCIACIÓN CON HLA	20
6.-EL DESCUBRIMIENTO DEL GEN RESPONSABLE DE LA HH. EL GEN HFE.....	21
6.1.-La mutación C282Y	21
6.2.-La mutación H63D	27
6.3.-Origen de las mutaciones C282Y y H63D	28
6.4.-Hipótesis de la ventaja selectiva de las mutaciones en el gen HFE.....	29
6.5.-Otras mutaciones y polimorfismos en el gen HFE	30
6.6.-Pacientes negativos para las mutaciones en HFE.....	36
6.7.-Técnicas de detección de las mutaciones del gen HFE	37
7.-ESTUDIOS POBLACIONALES DE LAS MUTACIONES C282Y Y H63D.....	41
7.1.-Estudios en pacientes con HH.....	42
7.2.-Estudios en la población general.....	45
8.-EL CRIBADO GENÉTICO DE LAS MUTACIONES C282Y Y H63D.....	52
III.-MECANISMO DE ABSORCIÓN DEL HIERRO	58
1.-EL HIERRO.....	58
2.-PROTEÍNAS IMPLICADAS EN EL METABOLISMO DEL HIERRO	59
2.1.-La proteína hfe.	59
2.2.-b-2-microglobulina (B2M).....	62
2.3.-Ferritina H y Ferritina L.....	62
2.3.-Transferrina (TF).....	64
2.4.-Receptor de transferrina clásico (TFR)	65
2.5.-Receptor de transferrina 2 (TFR2)	65

2.6.-DMT1/DCT1/Nramp2.....	66
2.7.-IREG1/ferroportina 1 (FPN1)/MTP1/SLC11A3.....	67
2.8.- Ceruloplasmina (Cp).....	68
2.9.- Hephaestin (HEPH).....	68
2.10.-Dcyt B (duodenal cytochrom B).....	69
2.11.-SFT(stimulador of Fe transport).....	70
2.12.-Hepcidina (HEPC1).....	70
2.13.-Las proteínas IRPs y la regulación por IRE.....	71
3.-MODELOS ANIMALES DE HEMOCROMATOSIS.....	73
4.-ALTERACIONES EN OTROS METALES EN LA HH.....	74
5.-VISIÓN GLOBAL METABOLISMO DEL HIERRO. PAPEL DEL GEN HFE.....	75
OBJETIVOS.....	81
ARTÍCULOS PUBLICADOS.....	83
1.-Prevalence of the Cys282Tyr and His63Asp HFE Gene Mutations in Spanish Patients with Hereditary Hemochromatosis.....	85
2.-Hereditary Hemochromatosis in Spain.....	91
3.-Cloning, Sequencing and Characterization of The Rat Hereditary Hemochromatosis Promoter: Comparison of the Human, Mouse and Rat HFE Promoter Region.....	99
4.-Complete Characterization of the 3' Region of the Human and Mouse Hereditary Hemochromatosis HFE Gene and Detection of Novel Splicing Forms.....	113
5.-Hemochromatosis Hereditaria: Utilidad del Diagnóstico Genético Molecular.....	125
6.-Utilidad Clínica de la Detección de las Mutaciones del Gen HFE en la Hemochromatosis.....	135
RESUMEN GLOBAL DE LOS RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	139
1.-BÚSQUEDA DE MUTACIONES RESPONSABLES DE LA HH.....	139
1.1.-Pacientes españoles de HH.....	139
1.2.-Población general española.....	141
1.3.-Pacientes con HH sin genotipo C282Y/C282Y o C282Y/H63D.....	149
2.-ESTUDIO DEL GEN HFE.....	153
2.1.-Estudio de la región promotora del gen HFE en humano, rata y ratón.....	153
2.2.-Formas de <i>splicing</i> del gen HFE.....	156
2.3.-La región 3' UTR del gen HFE en humano y ratón.....	157
3.-LÍNEAS DE FUTURO.....	160
CONCLUSIONES.....	163
APÉNDICE.....	165
A.1.-Tabla de <i>primers</i> diseñados.....	166
A.2.-Tabla de ESTs.....	171
A.3.-Modelo de carta de consentimiento del proyecto de cribado de la HH.....	173
A.4.-Modelos de cartas del proyecto Hemochromatosis.....	174
BIBLIOGRAFÍA.....	183

Abreviaciones

Aa	Aminoacid	Aminoácido
AD	Alzheimer disease	Enfermedad de Alzheimer
AGRS	Amplification generating restriction site	
ALT	Alanine transaminase	Alanina transaminasa
ARMS	Amplification refractory mutation system	
ASOH	Allele-specific oligonucleotide hybridization	
AST	Aspartatic transaminase	Aspartato transaminasa
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool	
CHD	Coronary heart disease	Enfermedad coronaria
Da	Daltons	
DFO	Deferoxamine	Deferoxamina
DHPLC	Denaturing high performance liquid chromatography	
DNA	Deoxyribonucleic acid	Ácido deoxiribonucleico
EST	Expressed Sequence Tag	
FISH	Fluorescent in situ hybridization	
FNC	First nucleotide change method	
FRET	Fluorescence resonance energy transfer	
GTP	γ -glutamyl transpeptidase	γ -glutamyl transpeptidasa
HCC	Hepatic carcinoma	Carcinoma hepatocelular
HH	Hereditary Hemochromatosis	Hemocromatosis Hereditaria
HIC	Hepatic iron concentration	Concentración hepática de hierro
HII	Hepatic iron index	Índice de hierro hepático
HLA	Human Leukocytic Antigen	Antígenos Leucocitarios Humanos
IRP	Iron response protein	
IRS	Interferon response sequence	
IRE	Iron response element	
IVS	Intronic variant sequence	Variante en la secuencia intrónica
JH	Juvenile Hemochromatosis	Hemocromatosis juvenil
KO	Knock-out	
MHC	Major Histocompatibility Complex	Complejo Histocompatibilidad Mayor
mRNA	Messenger RNA	RNA mensajero
MS-PCR	Multiple PCR	Múltiple PCR
NASH	Non-alcoholic steatohepatitis	Esteatohepatitis no alcohólica
NO	Nitric oxid	Óxido nítrico
OLA	Oligonucleotide ligation assay	
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man	
OMS		Organización Mundial de la Salud
Pb		Pares de bases
PCR	Polymerase Chain Reaction	Reacción en cadena de la polimerasa
PCR-SSOP	PCR-based sequence-specific oligonucleotide probe	
PCT	Porfiria cutanea tarda	Porfiria cutánea tarda o familiar

PV	Porfiria variegata	
RACE	Rapid Amplification of cDNA ends	Amplificación rápida extremos cDNA
RE	Reticuloendothelial System	Sistema del reticuloendotelial
RNA	Ribonucleic acid	Ácido ribonucleico
RT	Retrotranscription	Retrotranscripción
SSCP	Single Strand Conformational Polimorphysm	
TPA	12-O-tetradecanoyl-13-phorbol acetate	
TS	Transferrin saturation	Saturación de transferrina
UIBC	Unbound iron binding capacity	
UTR	Untranslated regions	Región no traducida

Abreviaciones de genes

β 2M	β 2microglobulin
Cp	Ceruloplasmin
DCT1 ¹	Divalent cation transporter 1
Dcyt B	Duodenal cytochrom B
DMT1 ¹	Divalent metal transporter
e-ALAS	Erithrocitic aminolaevulinat sintase
FPN1 ²	Ferroportin 1
HEPC1	Hepcidin
HEPH	Hephaestin
HFE	Hereditary Hemochromatosis gene
TFR	Transferrin receptor
H-FT	H ferritin
IREG1 ²	Iron regulator 1
IRP1=ACO1	Iron response protein 1/ aconitase 1
IRP2	Iron response protein 2
L-FT	L ferritin
MTP1 ²	Metal transporter 1
Nramp2 ¹	Natural resistance-associated macrophage protein 2
PPOX	Protoporfirinogen oxidase
SFT	Stimulator of Fe transport
SLC11A3 ²	Solute Carrier family 11 member A3
TF	Transferrin
TFR2	Transferrin receptor 2
UROD	Uroporfirinogen descarboxilase
USF2	Upstream stimulator factor 2

Nota 1: DCT1=DMT1=Nramp2

Nota 2: FPN1=IREG1=MTP1=SLC11A3

RELACIÓN DE TABLAS Y FIGURAS

- Tabla 1. Clasificación de los síndromes de sobrecarga de hierro.
- Tabla 2. Sintomatología y rasgos físicos de pacientes con HH.
- Tabla 3. Progresión de la Hemocromatosis Hereditaria a lo largo de la vida: Patogénesis, clínica y diagnóstico.
- Tabla 4. Resultados de los análisis de laboratorio en pacientes con HH.
- Tabla 5. Mutaciones y polimorfismos del gen HFE.
- Tabla 6. Las mutaciones C282Y y H63D en pacientes con HH.
- Tabla 7. Las mutaciones C282Y y H63D del gen HFE en la población Europea.
- Tabla 8. Las mutaciones C282Y y H63D del gen HFE en la población inmigrante de origen Europeo, africano y mezcla de orígenes.
- Tabla 9. Las mutaciones C282Y y H63D del gen HFE en la población indígena no-Europea.
- Tabla 10. Comparación de métodos de cribado poblacional de la HH.
- Tabla 11. Grandes estudios poblacionales sobre HH.
- Tabla 12. Genes implicados en el metabolismo del hierro.
- Tabla 13. Estudio de las mutaciones C282Y y H63D del gen HFE en pacientes de HH y en familiares.
- Tabla 14. Estudio de las mutaciones C282Y y H63D del gen HFE en 5370 donantes de sangre
- Tabla 15. Individuos homocigotos para la mutación C282Y del gen HFE detectados en el cribado de 5370 donantes de sangre.
- Tabla 16. Parámetros bioquímicos en el estudio de 5370 donantes de sangre.
- Tabla 17. Pacientes con HH sin el genotipo C282Y/C282Y o el genotipo C282Y/C282Y
- Tabla 18. Variantes detectadas en el gen HFE en pacientes sin el genotipado C282Y/C282Y o C282Y/H63D.
- Tabla 19. Variantes detectadas en el gen TFR2 en pacientes sin genotipado C282Y/C282Y o C282Y/H63D.

RELACIÓN DE TABLAS Y FIGURAS

- Figura 1. Algoritmo para la evaluación de un posible caso de HH en un individuo sin historia familiar.
- Figura 2. Correlación entre la frecuencia de la mutación C282Y y los grados de latitud norte de 40 poblaciones Europeas.
- Figura 3. Frecuencias europea de pacientes de HH homocigotos para la mutación C282Y.
- Figura 4. Frecuencia mundial de pacientes de HH homocigotos para la mutación C282Y.
- Figura 5. Frecuencia alélica de la mutación C282Y en Europa.
- Figura 6. Frecuencia alélica de la mutación H63D en Europa
- Figura 7. Frecuencia alélica de la mutación H63D en Asia, África y Australia.
- Figura 8. Modelo de la proteína HFE.
- Figura 9. Control post-transcripcional de los genes del metabolismo del hierro por las IRPs.
- Figura 10. Modelo de absorción y metabolismo del hierro en condiciones de niveles altos de hierro.
- Figura 11. Modelo de absorción y metabolismo del hierro en condiciones de niveles bajos de hierro.
- Figura 12. Modelo de absorción y metabolismo del hierro en situación de Hemocromatosis Hereditaria, según la hipótesis 2.
- Figura 13. Experimento de *band-shift* con el polimorfismo -410 A/C del promotor del gen HFE.
- Figura 14. Variante -48 C/G hallada en un paciente italiano con HH.
- Figura 15. Detección de la mutación sinónima V221V del exón 6 del gen FPN1.
- Figura 16. Comparación de las regiones promotoras de los genes del MHC de clase I clásicos HLA-A2, HLA-B39 y HLA-Cw1 y los genes del MHC de clase I no-clásicos: HLA-G y HFE
- Figura 17. Experimento de *Reporter gene* con luciferasa en el promotor del gen HFE
- Figura 18. Formas de *splicing* del gen HFE detectadas en la línea celular HepG2.
- Figura 19. Representación esquemática del gen HFE humano con las nuevas secuencias descritas.
- Figura 20. Representación esquemática del gen HFE murino con las nuevas secuencias descritas.
- Figura 21. RT-PCR y 3'-RACE en el gen HFE de ratón.

GUÍA GENERAL DE LA MEMORIA

El objetivo de esta tesis es profundizar sobre la Hemocromatosis Hereditaria y el papel del gen HFE en la Hemocromatosis Hereditaria en pacientes y población general española, además de realizar un estudio más básico del gen HFE en humano, ratón y rata.

La memoria se ha dividido en siete grandes bloques. Una introducción amplia donde se incluye toda la información de relevancia referente a la Hemocromatosis y a los mecanismos de absorción del hierro; una lista de objetivos, un capítulo que engloba a los seis artículos publicados sobre el tema de la tesis, un resumen global de resultados y discusión y una lista de conclusiones. Además se añade a modo de apéndice, para facilitar de este modo su consulta, una serie de datos y documentos importantes para la tesis. Por último se ha incluido una sección bibliográfica donde se recogen por orden alfabético las publicaciones incluidas como referencias para la elaboración de la presente tesis.

El apartado de artículos publicados está precedido de un breve resumen unificador y a su vez cada artículo publicado en inglés va acompañado de su propio resumen en castellano. Este apartado consta de cuatro artículos de investigación y dos artículos divulgativos de carácter más general sobre la Hemocromatosis Hereditaria.

Los cuatro artículos de investigación son:

- Prevalence of the Cys282Tyr and His63Asp HFE gene mutations in Spanish patients with hereditary hemochromatosis and in controls. *Journal of Hepatology* 1998; 29, 725-728.
- Hereditary Hemochromatosis in Spain. *Genetic Testing* 2000; 4 (2):171-6.
- Cloning, sequencing and characterization of the rat HFE promoter. Comparison of the human, mouse and rat hemochromatosis HFE promoter regions. *Gene* 1998; 225: 77-87
- Complete characterization of the 3' region of the human and Mouse Hereditary Hemochromatosis Gene and detection of novel splicing forms. *Blood Cells, Molecules and Diseases* 2001; 27: 35-43.

Los dos artículos de carácter general y divulgativo sobre la Hemocromatosis Hereditaria son:

- Hemocromatosis Hereditaria: utilización del diagnóstico genético molecular. *Medicina Integral* 1999; 33: 416-425.
- Utilidad clínica de la detección de las mutaciones del gen HFE en la Hemocromatosis. *Gastroenterología y Hepatología* 2000; 23: 433-435.

Para conseguir una exposición fluida, clara y coherente del trabajo de investigación que aquí se presenta se ha creído conveniente integrar la descripción de los resultados y su discusión en una única sección a modo de resumen global de resultados y discusión. Este apartado incluye resultados adicionales a los publicados y pretende dar una visión de conjunto del trabajo realizado.

Esta memoria ha sido escrita en castellano para una más amplia difusión y comprensión de la misma. Sin embargo al escribir ciertos vocablos he optado por utilizar la palabra originaria

inglesa debido a que o no existe una equivalencia propia en castellano o dicha equivalencia pueda ser confusa. Así pues he utilizado palabras como *primers*, *Northern blot*, *splicing*, etc. con su vocablo original y señalado en cursiva. En el caso de las abreviaciones utilizadas en la presente tesis he empleado la abreviación inglesa por defecto en toda la memoria para seguir una coherencia y he incluido una tabla de abreviaciones donde se especifica la equivalencia al castellano (ejemplos: HHI, *hepatic iron index* o índice de hierro hepático; TS, *transferrin saturation* o saturación de transferrina; JH, *juvenil Hemochromatosis* o Hemocromatosis juvenil). En todos estos casos siempre la palabra de origen inglesa se ha escrito en cursiva.

En la bibliografía de la presente tesis he incluido en cada artículo donde ha sido posible el número de identificación del PubMed (PMID) para facilitar la búsqueda de dichos artículos mediante, las cada vez más utilizadas, bases de consulta informáticas.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

I. La Hemocromatosis

1.-Historia

La primera descripción de Hemocromatosis fue atribuida a Trousseau en 1865, su primer paciente fue un hombre de 28 años con diabetes severa. Trousseau escribió: “ desde el primer momento en que el paciente entró en el hospital me sorprendió su apariencia casi de bronce y el color negro de su pene”. La autopsia reveló un hígado muy grande. “La totalidad de la superficie del órgano era granulada y era de un color gris-amarillento, muy denso y resistía la presión impidiendo la perforación con el dedo. Crujía bajo el escalpelo y la superficie del corte era granulada en vez de ser lisa” (Trousseau, 1865).

El término de Hemocromatosis fue utilizado por primera vez por von Recklinghausen en 1889 para describir los hallazgos tras la autopsia de un hombre con cirrosis asociada al acúmulo masivo de hierro en su hígado (von Recklinghausen, 1889).

La Hemocromatosis fue propuesta por primera vez como una enfermedad hereditaria por Sheldon en 1935 en su monográfico clásico “ Hemocromatosis”, donde revisa referencias de otros 14 autores con casos de Hemocromatosis con una base hereditaria (Sheldon, 1935). La heredabilidad de la enfermedad permaneció en controversia durante cuatro décadas hasta que Simon y colaboradores demostraron una fuerte asociación entre la Hemocromatosis y el HLA-A3, estableciendo que el gen responsable de la enfermedad estaría íntimamente ligado al locus HLA-A en el brazo corto del cromosoma 6 (Simon *et al.*, 1976). Más recientemente en 1996 se describió un gen candidato para la HH: el gen HFE y 2 mutaciones implicadas en la enfermedad: la mutación C282Y responsable de la mayoría de casos de HH y la mutación H63D involucrada en un estado heterocigoto compuesto con la mutación C282Y en un pequeño porcentaje de pacientes (Feder *et al.*, 1996).

Debido a que históricamente la Hemocromatosis se diagnosticaba basándose en las características clásicas de la cirrosis: pigmentación, diabetes y artralgia, la enfermedad se había descrito como una alteración muy rara con una frecuencia de 1 caso en 20000. Sin embargo estudios de autopsias revelaron una frecuencia más alta (1 a 2 casos por 1000) y más recientemente estudios de cribado poblacional han establecido una prevalencia de la enfermedad aún más alta (1 caso en 300 personas) (Powell *et al.*, 1998). Por lo tanto la Hemocromatosis es una de las alteraciones genéticas con herencia recesiva más frecuente.

2.-Definición y tipos de Hemocromatosis

El término de Hemocromatosis hereditaria generalmente se reserva para describir un desorden hereditario del metabolismo del hierro caracterizado por una sobrecarga progresiva de hierro en las células parenquimales del hígado, páncreas y corazón. Cuando la enfermedad está plenamente desarrollada la estructura de los órganos y su función se ven seriamente afectados (Bacon, 2001).

En general, los síndromes o desordenes de sobrecarga de hierro se pueden clasificar bajo dos criterios: Hemocromatosis primarias y Hemocromatosis secundarias. Las diferencias entre ambos tipos de Hemocromatosis son que en las Hemocromatosis secundarias existen otras causas, factores o enfermedades que propician la sobrecarga de hierro en el organismo, mientras que en una Hemocromatosis primaria la sobrecarga de hierro no puede ser atribuida a otras causas o enfermedades (Tabla 1). Esta tesis se centra en la Hemocromatosis primaria o Hemocromatosis Hereditaria de tipo I asociada al gen HFE y abreviada como HH, por lo que si no se especifica lo contrario cuando se cita las siglas HH nos referimos a la Hemocromatosis Hereditaria de tipo I.

2.1.-Hemocromatosis Hereditaria (HH) tipo 1. Gen HFE en 6p21.3

La Hemocromatosis hereditaria (HH) tipo 1 o Hemocromatosis genética se describe ampliamente en la sección II de esta tesis.

2.2.-Hemocromatosis tipo 2, Hemocromatosis Juvenil (JH) o HFE2. Gen en 1q21.

La Hemocromatosis Juvenil (JH) presenta unos rasgos similares a la HH pero su clínica es más severa, se caracteriza por una aparición temprana de los síntomas clínicos, antes de los 30 años. Los síntomas que se manifiestan frecuentemente son hipogonadismo hipogonadotrópico, fallo cardíaco y/o arritmias. En la primera década de la vida se presenta dolor abdominal, en la segunda hipogonadismo hipogonadotrópico y arritmias y en la tercera fallo cardíaco (Cazzola *et al.*, 1983).

A diferencia de la HH de tipo I, en la JH no existe una expresión mayoritaria en el sexo masculino, afectando a ambos sexos por igual y a nivel tisular, el daño en los órganos es más severo en la JH, aunque la distribución parenquimal del hierro es similar en ambas entidades (Scully *et al.*, 1983; Haddy *et al.*, 1988). Los pacientes con JH no suelen presentar mutaciones en el gen HFE responsable de la HH de tipo I, y también se ha descartado que exista ligamiento con 6p (Camaschella *et al.*, 1997). Por lo tanto la identificación de un paciente joven con Hemocromatosis y sin mutaciones en el gen HFE, debe apuntar hacia un posible caso de JH.

Existen muy pocos estudios funcionales sobre el metabolismo del hierro en pacientes con JH, de los datos que se disponen se concluye que la absorción y el acúmulo de hierro en estos pacientes es más severo que en los pacientes con Hemocromatosis tipo 1 (Camaschella *et al.*, 1997). Además el rango estimado de acúmulo de hierro calculado a través de las flebotomías requeridas es mayor en pacientes de JH que en adultos homocigotos para la mutación C282Y y afectados de HH (3.9-3.2 mg/día versus 1.6-0.8 mg/día) (Cazzola *et al.*, 1998). Esta considerable diferencia en los niveles de absorción de hierro sugiere un mecanismo patogénico diferente entre las dos enfermedades.

El curso clínico de la JH es progresivamente rápido, y frecuentemente implica complicaciones cardíacas a menudo fatales. En estos pacientes es importante realizar una inmediata pero cuidadosa disminución de los niveles de hierro bajo vigilancia, ya que las flebotomías (extracciones de sangre) pueden iniciar los episodios cardíacos. Los hermanos y

hijos de pacientes con JH deben ser testados bioquímicamente en cuanto a parámetros de hierro (Dooley and Walker, 2000).

Tabla 1. Clasificación de los síndromes de sobrecarga de hierro.

	Nombre	Gen	Posición cromosómica	Mutaciones	OMIM ¹
Hemocromatosis primarias	Relacionada con HFE				
	HH tipo 1	HFE	6p21.3	C282Y, H63D y otras ²	235200
	No relacionadas con HFE				
	HJ o HFE2	?	1q21		602390
	HFE3	TFR2	7q22	Y250X, E60X, M172K, delAVAQ	604205
	HFE4	IREG1/FPN1	2q32	A77D, N144H	604653
	Neonatal	?	?		231100
Hemocromatosis secundarias	Anemia causada por eritropoiesis inefectiva:				
	B-Talasemia	b-globina	11p15.5	Más de 400 mutaciones	141900
	Anemia sideroblástica	ALAS2	Xp11.21	I471N, T338S, F165L y otras	301300
	Anemia aplásica				
	Deficiencia de piruvato quinasa	PK	1q21	R132Y, T353M, Q421K y otras	266200
	Anemia <i>pyridoxine-responsive</i>				206000
	Enfermedades del hígado:				
	Alcoholismo				
	Hepatitis vírica crónica B y C				
	Porfiria cutánea tarda familiar (PCT)	UROD	1p34	G281V, E167K, R292G y otras	176100
	Porfiria variegata (PV)	PPOX	1q22	R59W, G232R, R168C y otras	176200
	Transfusiones y sobrecarga de hierro parenteral:				
	Transfusiones de eritrocitos				
Inyecciones de hierro-dextrano					
Asociado a hemodialisis de largo tiempo					
Sobrecarga de hierro de la dieta:					
Bantu siderosis (dieta+genética)					601195
Aceruloplasminemia	CP	3q23-24	5bp ins, W858X, 2389Gdel y otras	604290	
Atransferrinemia congénita	TF	3q21	N277G, H300R, G652E y otras	209300	

¹ OMIM: On-line Mendelian Inheritance in Man (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

² Ver tabla 5.

El caso de JH más joven publicado es el de un niño de 7 años y su hermano de 29 meses (Escobar *et al.*, 1987). Otros casos de JH se han descrito en familias italianas y del Reino Unido (Camaschella *et al.*, 1997; Kelly *et al.*, 1998)

La localización cromosómica del locus HFE2 no se estableció hasta 1999, cuando Roetto y colaboradores realizaron una búsqueda en todo el genoma para mapear el locus HFE2 en 9 familias afectas de JH, 6 de las cuales eran consanguíneas (Roetto *et al.*, 1999). El locus HFE2 se localizó en 1q, con un máximo de *lod score* de 5.75 en el marcador D1S498 con una fracción de recombinación de 0.0 y un lod score de 5.16 en D1S2344 con una fracción de recombinación de 0.0. La región candidata se delimitó mediante mapeo por homocigosidad (*homozygosity mapping*) de las familias consanguíneas en un intervalo aproximadamente a 4 cM entre los marcadores D1S442 y D1S2347. Los últimos estudios sobre la JH han excluido el gen ZIRTTL (*zinc-iron regulated transporter-like*) como causantes de la enfermedad y han acotado la región crítica de la JH entre los marcadores D1S2344 y D1S1156 (Roetto *et al.*, 2000). Por lo tanto se está a la espera del descubrimiento del gen responsable de la JH, gen que debido a la severidad de la enfermedad, debería jugar un papel importante en la regulación de la absorción de hierro.

2.3.-Hemocromatosis tipo 3 o HFE3. Gen TFR2 en 7q22.

Estudios italianos indican que sólo un 64% de los pacientes con Hemocromatosis en Italia son homocigotos para la mutación C282Y del gen HFE (Carella *et al.*, 1997; Piperno *et al.*, 1998a). Esto sugiere que otras mutaciones están presentes en regiones no analizadas del gen HFE o que la Hemocromatosis se caracteriza por una heterogeneidad genética en este país. La teoría de la heterogeneidad genética se ha confirmado en Italia ya que existen casos publicados de Hemocromatosis juvenil JH o HFE2, cuyo locus se localiza en el cromosoma 1 (1q) y no en el cromosoma 6 (6p) donde se encuentra el gen HFE y además se han encontrado mutaciones en el gen TFR2 (Receptor de transferrina 2) en algunos pacientes italianos con Hemocromatosis (HFE3).

Un estudio en 2 familias sicilianas, una consanguínea, que presentaban criterios de Hemocromatosis pero sin mutaciones en el gen HFE reveló una mutación (Y250X) en el gen TFR2 (Receptor de transferrina 2), gen homólogo al receptor de transferrina clásico TFR (ver sección III-2.5). La mutación consiste en un cambio de una C por una G en el exón 6, posición nucleotídica 750 del cDNA del gen TFR2. La mutación provoca que el aminoácido tirosina pase a ser un codón de stop en la posición aminoacídica 250 (TAC→TAG), creándose un sitio de restricción MaeI. Esta mutación afecta a los dos transcritos descritos del gen TFR2 (forma α y β) (Kawabata *et al.*, 1999). Todos los individuos afectados de las 2 familias estudiadas eran homocigotos para la mutación Y250X, mientras que la mutación no se encontró en 100 cromosomas normales ni en 12 pacientes de Hemocromatosis sin mutaciones en el gen HFE. Los análisis de ligamiento demostraron que el locus HFE3 se encuentra en 7q22, con un máximo de lod score de 4.09 con $\theta = 0.0$ para los marcadores D7S477 y D7S647 (Camaschella *et al.*, 2000).

En otro estudio posterior de Roetto y colaboradores se describen dos nuevas mutaciones en el gen TFR2 en otras dos familias italianas (Roetto *et al.*, 2001). Una de estas mutaciones corresponde a una inserción de una citosina en estado homocigoto en el exón 2 en una secuencia de 5 citosinas (84-88 C ins). Esta mutación resulta en la alteración del marco de lectura y la consecuente creación de un codón stop prematuro en el aminoácido 60 (E60X) de la proteína. La mutación estaba presente en homocigosis en 6 miembros de una misma familia consanguínea, 5 de los cuales eran afectados. A diferencia de la mutación Y250X que afecta a ambos transcritos descritos del gen TFR2 (formas α y β), la mutación E60X sólo afectaría a la forma α y no interferiría en el transcrito β . La segunda mutación detectada en el gen TFR2 es una transversión en homocigosis T→A identificada en el exón 4 posición nucleotídica 515 del cDNA. Esta mutación *missense* resulta en un cambio de aminoácido de metionina a lisina en la posición proteica 172 (M172K). Esta mutación se encontró en homocigosis en un individuo con una clínica severa que presentaba también β -talasemia en estado heterocigoto heredado por vía materna. La mutación M172K afecta de diferente forma a los dos transcritos del TFR2 (forma α y β). En la forma α la sustitución de un aminoácido básico conservado por un aminoácido neutro podría afectar las propiedades de esta forma. En la forma β la metionina 172 es el codón de inicio, por lo que su mutación previene la transcripción de esta forma. En ambas familias

estudiadas los individuos heterocigotos detectados no presentaban sobrecarga de hierro (Roetto *et al.*, 2001).

La última mutación descrita en el gen TFR2 es una delección de 12 nucleótidos duplicados, en el exón 16 y causante de la pérdida de 4 aminoácidos (Δ AVAQ 594-597) presentes en el dominio extracelular de la proteína. Esta delección se encontró en homocigosis en 3 pacientes de una familia italiana (Girelli *et al.*, 2001). La delección de estos aminoácidos afecta a las dos formas (α y β) del gen TFR2.

El estudio de estas mutaciones, descritas en el gen TFR2, en otros pacientes con Hemocromatosis o sobrecarga de hierro sin mutaciones en el gen HFE no ha resultado en la detección de nuevos casos, por lo que estas mutaciones podrían ser exclusivas de estas familias (Aguilar-Martínez *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2001).

2.4.-Hemocromatosis tipo 4 o HFE4. Gen IREG1/FPN1 en 2q32.

Muy recientemente se han publicado dos trabajos en los que se han detectado dos mutaciones en el gen IREG1 o ferroportina 1 (FPN1) también llamado MTP1 o SLC11A3, con lo que se crea un nuevo tipo de Hemocromatosis, la Hemocromatosis tipo 4 o HFE4.

El primer estudio se realizó en una extensa familia holandesa con Hemocromatosis de herencia dominante (Njajou *et al.*, 2001). Los síntomas clínicos de los individuos afectados eran similares a los de otros pacientes con HH clásico (dolor de las articulaciones, osteoartritis, fatiga, cardiomiopatías y desordenes endocrinos). En esta familia primero se realizó un análisis de ligamiento localizándose un máximo de *lod score* en el marcador D2S389; para esta zona, el mejor gen candidato era el gen IREG1. La mutación encontrada fue un cambio de A→C en posición nucleotídica 734 (exón 5), en estado heterocigoto. Este cambio supone el cambio aminoacídico de aspartato por histidina en una región predicha como dominio transmembrana (N144H). El cambio de un residuo neutro (Asp) por un residuo polar (His) reduciría la hidrofobicidad del dominio transmembrana y podría afectar a la estructura de la proteína. Los autores hipotetizan que la mutación resultaría en un transporte incrementado del hierro fuera del enterocito y hacia la circulación, por lo que se espera encontrar valores bajos de hierro en el enterocito que incrementaría la importación de hierro del lumen intestinal por el transportador apical DCT-1.

En un segundo trabajo, Montosi y colaboradores estudiaron una gran familia italiana (53 individuos) con 15 miembros afectados de sobrecarga hereditaria de hierro que presentaban una expresión fenotípica similar a la Hemocromatosis clásica. Sin embargo ninguno de los individuos afectados presentaba las mutaciones C282Y o H63D del gen HFE en homocigosis, ni existía ligamiento en el brazo corto del cromosoma 6 (Montosi *et al.*, 2001). El ligamiento con marcadores de 1q fue también descartado. Un rasgo distintivo de esta nueva entidad clínica incluía una temprana acumulación de hierro en las células reticuloendoteliales y un marcado incremento de la ferritina sérica antes de la detección de la elevación de la saturación de la transferrina; además la enfermedad presentaba un patrón de herencia dominante. Por análisis de ligamiento la enfermedad se mapeó en 2q32, donde se encuentra el gen IREG1 o FPN1. El análisis por secuenciación de este gen permitió detectar en los individuos afectados una mutación *missense* (C→A) en el exón 3 que daba lugar a un cambio de aminoácido (A77D). El

aminoácido A77 se encuentra cerca del primer dominio transmembrana predicho y está conservado en los vertebrados, no obstante según estudios preliminares de localización subcelular parece que la localización de la proteína mutada en la membrana no se vería afectada por esta mutación. La mutación modificaría un sitio predicho de meristilación y podría afectar a la estructura secundaria de la proteína. Los autores concluyen que la mutación afectaría al funcionamiento de la proteína conduciendo a una homeostasis del hierro anormal que resultaría en el desarrollo de una sobrecarga de hierro.

2.5.-Hemocromatosis Neonatal (NH, *Neonatal Hemochromatosis*)

La Hemocromatosis neonatal (NH) es un tipo de Hemocromatosis rara que presenta una edad de inicio extremadamente temprana (en fase fetal o neonatal) y un curso clínico muy agresivo que conduce normalmente a un desenlace fatal. La NH fue originalmente descrita en 1957 (Cottier, 1957) y actualmente se han publicado más de 100 casos.

Los recién nacidos con NH suelen ser prematuros o de talla pequeña para la edad de gestación. La enfermedad se detecta normalmente a las pocas horas de nacer, aunque algunos se han diagnosticado a las pocas semanas de edad. Estos pacientes presentan fallo hepático con hipoalbuminemia, hipoglucemia, coagulopatía, niveles bajos de fibrinógeno y frecuentemente trombocitopenia y anemia. Los niveles de transaminasas son característicamente bajos. Si la enfermedad no se presenta al nacer se desarrollan rápidamente ascitis y hiperbilirubinemia (Murray and Kowdley, 2001). Estos pacientes presentan una siderosis importante con elevados depósitos de hierro en múltiples tejidos, sobretodo en hígado, páncreas, corazón y glándulas endocrinas, con el sistema reticuloendotelial extrahepático relativamente no afectado. Además en dichos pacientes no existen evidencias de enfermedad hemolítica, síndromes asociados con hemosiderosis o sobrecarga de hierro exógena debida a transfusiones (Knisely *et al.*, 1987).

El fenotipo de NH se ha descrito también en niños con una deficiencia del enzima Δ^4 -3-oxoesteroide 5 β reductasa, aunque este enzima es lábil y quizás su actividad se vea reducida en condiciones de daño hepático (Clayton *et al.*, 1987). Este hecho ha apuntado que la deficiencia de este enzima podría no ser el defecto primario de la NH, y por otro lado no en todos los casos de NH existe una deficiencia de este enzima (Murray and Kowdley, 2001).

Debido a que los pacientes con NH mueren normalmente después del diagnóstico no existen muchos datos respecto al tratamiento. La terapia con deferoxamina (DFO), un quelante de hierro, o la terapia combinada de deferoxamina y un cóctel antioxidante no es eficaz. Sin embargo el trasplante hepático si ha tenido éxito en algunos de los pocos casos que sobreviven hasta el trasplante (Murray and Kowdley, 2001).

En la mayoría de los estudios realizados la herencia de la enfermedad ha sido descrita como autosómica recesiva, sin embargo también se han descrito casos de herencia dominante con penetrancia incompleta y casos de NH en hermanastros de misma madre y distinto padre lo que ha hecho pensar en un defecto mitocondrial, factores ambientales maternos o un mosaicismo gonadal de una enfermedad dominante como explicaciones más adecuadas al tipo de herencia (Murray and Kowdley, 2001). Las conclusiones contradictorias respecto a la herencia de la enfermedad seguramente reflejan que la NH es una categoría heterogénea donde los casos analizados son producto de distintas enfermedades.

En 1990 se buscaron evidencias de reordenaciones o deleciones en la región HLA de clase I sin éxito, tampoco se halló ninguna evidencia de ligamiento con los serotipos del HLA, por lo que se concluyó que la HH tipo 1 y la Hemocromatosis neonatal eran dos entidades genéticamente distintas (Hardy *et al.*, 1990). Mutaciones en el gen HFE parecen no ser responsables de la NH ya que niños con mutaciones en este gen no desarrollan necesariamente Hemocromatosis Neonatal (Murray and Kowdley, 2001).

2.6.-Sobrecarga de hierro en África o Bantú siderosis

He creído conveniente introducir la sobrecarga de hierro en África sub-Sahariana o Bantú siderosis dentro de este apartado de descripción de tipos de Hemocromatosis debido a que en la Bantú siderosis, a diferencia de las Hemocromatosis anteriormente citadas, existe un factor ambiental que contribuye notoriamente al desarrollo de la enfermedad. La enfermedad resulta de una ingestión incrementada de hierro procedente de la elaboración casera de cerveza fermentada en barriles de hierro no galvanizados (OMIM 601195).

Aunque la enfermedad fue en un principio atribuida únicamente al consumo de un exceso de hierro procedente de la dieta, una sobrecarga severa de hierro no se desarrolla en todo los bebedores y no todos los pacientes con sobrecarga de hierro consumen excesivas cantidades de cerveza (Andrews, 1999). Por lo tanto además de este factor ambiental se ha hipotetizado sobre la existencia de una predisposición genética de la enfermedad. Así pues se ha propuesto que la heterogeneidad para un gen aún no identificado y involucrado en la absorción de hierro conferiría susceptibilidad para el desarrollo de la enfermedad, siendo las personas homocigotas las más severamente afectadas por este tipo de Hemocromatosis (Moyo *et al.*, 1998).

La sobrecarga de hierro africana no se debe a mutaciones en el gen HFE ni esta ligada al locus HLA (Gordeuk *et al.*, 1992; McNamara *et al.*, 1998). Además la distribución hepática del depósito de hierro es diferente en ambas enfermedades, en pacientes con sobrecarga de hierro africana el hierro se deposita en las células de Kupffer además de en los hepatocitos, al igual que en pacientes con una siderosis por transfusión, lo que sugiere un defecto en la recirculación del eritrocito (Gangaidzo *et al.*, 1999).

La clínica se presenta con cirrosis ocasionalmente complicada con hepatocarcinoma; la cardiomiopatía y la diabetes son menos frecuentes. Aunque los niveles de ferritina son elevados, la saturación de transferrina no siempre refleja el grado real de sobrecarga de hierro en estos pacientes. Los pacientes con sobrecarga de hierro africana son probablemente más susceptibles que otros pacientes a infecciones y parece ser que tienen una incidencia incrementada a la tuberculosis (Gordeuk *et al.*, 1996; Moyo *et al.*, 1997). En americanos descendientes de africanos se ha descrito una sobrecarga de hierro clínicamente significativa que no es debida a mutaciones en el gen HFE (Barton *et al.*, 1995; Wurapa *et al.*, 1996; Baer D, 1996; Monaghan *et al.*, 1998).

II. La Hemocromatosis Hereditaria (HH) tipo 1.

1.-Sintomatología y clínica de la Hemocromatosis Hereditaria (HH)

La Hemocromatosis Hereditaria (HH) se caracteriza por una absorción intestinal masiva de hierro procedente de la dieta. El acúmulo de hierro a lo largo de la vida del paciente desemboca en alteraciones de diversos órganos en la quinta década de vida en el caso de los hombres y en la sexta en el caso de las mujeres. Así pues, la HH presenta una etapa inicial asintomática. La HH en fase avanzada cursa con cirrosis hepática, diabetes, pigmentación hipermelanótica de la piel (coloración bronceada), fallo cardíaco, artralgias, hipogonadismo y disminución de la libido (Bothwell *et al.*, 1995; Powell and Isselbacher, 1996). Todos estos síntomas son debidos al acúmulo de hierro en el hígado, páncreas, piel, corazón, articulaciones y glándulas endocrinas, respectivamente. La cirrosis hepática progresa a carcinoma hepatocelular primario en una tercera parte de los afectados de HH, por lo que la prevención de la HH es una forma de prevención de dicho cáncer.

Tabla 2. Síntomas y rasgos físicos de pacientes con HH (Bacon, 2001)

Síntomas	Rasgos físicos
Asintomático: Detectado por: Resultados anormales de hierro sérico en un cribado rutinario Resultados anormales de enzimas del hígado Identificación de familiar por cribado Identificación por cribado poblacional No específicos: Fatiga Debilidad Letargia Apatía Pérdida de peso Específicos (síntomas y órgano afectado): Dolor abdominal (hepatomegalia) Artralgias (artritis) Diabetes (páncreas) Amenorrea (cirrosis) Pérdida del libido, impotencia (pituitaria, cirrosis) Fallo cardíaco congestivo (corazón) Arritmias (corazón)	Asintomático: Sin rasgos físicos Hepatomegalia Sintomático: Hígado: Hepatomegalia Estigma cutáneo de enfermedad crónica del hígado Esplenomegalia Fallo hepático: ascitis, encefalopatía, etc. Articulaciones: Artritis Sudor de las articulaciones Corazón: Cardiomiopatías Fallo cardíaco Piel: Pigmentación incrementada Endocrino: Atrofia testicular Hipogonadismo Hipotiroidismo

Los síntomas y rasgos físicos característicos de los pacientes con HH se resumen en la tabla 2 (Bacon, 2001). Los rasgos típicos de HH en fase avanzada como piel bronceada, diabetes mellitus y cirrosis fueron descritos ya en 1865 por Trousseau, aunque la relación de estos síntomas con una sobrecarga de hierro fue reconocida posteriormente.

Aún hoy en día los pacientes de HH pueden llegar a presentar esta clínica aunque la tendencia actual es la de detectar a los pacientes en una fase más temprana antes de que ocurra un daño tisular irreversible. La dificultad de este objetivo radica en que los síntomas tempranos de la sobrecarga del hierro son inespecíficos. Estos rasgos tempranos son fatiga en un 70%, dolor abdominal en un 40% y dolor de las articulaciones en un 40% (Niederau *et al.*, 1996). La pérdida de la libido se presenta en un 25% de los pacientes. El síntoma de más larga duración es la artralgia. La media de retraso entre la aparición de los primeros síntomas y el diagnóstico de HH es de 5 y 8 años en hombres y mujeres respectivamente (Adams *et al.*, 1991).

Los síntomas físicos y los datos de un análisis de laboratorio en fase temprana (Tabla 2 y 4) son también inespecíficos y incluyen hepatomegalia y valores anormales en nivel medio de los tests de las funciones hepáticas, particularmente de las transaminasas (ALT alanina transaminasa y AST aspartato transaminasa) y la γ -glutamil transpeptidasa (GTP), valores que son frecuentemente asumidos como debidos a un consumo excesivo de alcohol. Teniendo en cuenta que la HH esta causada principalmente por la mutación C282Y del gen HFE, se han publicado cuatro estados de la enfermedad (Bacon, 2001):

1. Predisposición genética (genotipo C282Y/C282Y) sin ninguna alteración adicional.
2. Sobrecarga de hierro (aprox. 2-5 g) sin anomalías adicionales.
3. Sobrecarga de hierro con sintomatología temprana.
4. Sobrecarga de hierro con daño en los órganos.

En personas con HH la absorción incrementada de hierro se produce durante toda su vida pero el desarrollo de anomalías fenotípicas y síntomas clínicos varia dependiendo de factores como: la donación de sangre, la menstruación, el embarazo, la dieta, la suplementación de hierro y otros factores que pueden afectar a la expresión de la enfermedad. La progresión de la enfermedad a lo largo de la vida del paciente se resume en la tabla 3. Las personas afectas de HH normalmente empiezan a presentar síntomas entre los 30 y los 50 años aunque la presencia de otros cofactores como un consumo masivo de alcohol pueden adelantar la sintomatología. Una sintomatología plena de la enfermedad se da normalmente entre los 40 y los 60 años, aunque la enfermedad en estado latente puede ser detectada mucho antes a través de tests bioquímicos y genéticos (Powell *et al.*, 1998).

Tabla 3. Progresión de la Hemocromatosis Hereditaria a lo largo de la vida: Patogénesis, clínica y diagnóstico (Powell *et al.*, 1998).

Variable	Periodo de vida				
	Nacimiento e Infancia	Adolescencia a joven adulto	Joven adulto	Madurez	Madurez tardía a muerte
Patogénesis	Anormalidad genética de absorción y regulación del hierro	Incremento de absorción gastrointestinal de hierro y falta de regulación	Acumulación de reservas de hierro por incapacidad de ser captado por las proteínas	Depósito de hierro en tejidos, particularmente en células parenquimales	Daño oxidativo de los órganos y muerte
Síntomas clínicos	Asintomático	Normalmente asintomático excepto pacientes con rápida progresión	Asintomático o síntomas tempranos: fatiga, artralgia, dolor abdominal y impotencia	Síntomas tempranos con progresión a artritis, pigmentación piel, fibrosis hepática y diabetes	Síntomas graves (causantes muerte): cirrosis hepática, cardiomiopatía, hipogonadismo, hipopituitarismo artropatía, complicaciones diabetes
Test Diagnóstico	←		→		
		TS repetidamente elevada (>45%)	Test genético positivo (C282Y/C282Y, C282Y/H63D) Elevada TS y ferritina sérica Elevados enzimas hepáticos Índice de hierro hepático >1,9	Biopsia hepática: evidencia de depósito en células parenquimales. Índice de hierro hepático >1,9; Concentración de hierro hepático elevada	Biopsia positiva de HH Anormalidades hepáticas Anormalidades endocrinas (diabetes, gonadotropinas) Defectos cardíacos o fallo cardíaco

TS saturación de transferrina.

2.-Diagnóstico de la Hemocromatosis Hereditaria

El valor de la saturación de transferrina (TS, *transferrin saturation*), la ferritina sérica y la biopsia hepática son los parámetros considerados históricamente de referencia en el diagnóstico de la HH. Actualmente a estos datos hay que añadir la posibilidad del análisis genético del gen HFE.

La verificación del diagnóstico de la HH se ha definido históricamente en base a la evaluación de las pruebas (bioquímicas e histológicas) realizadas en una biopsia hepática o a través de la cuantificación de los gramos de hierro extraídos a través de la terapia por flebotomías. Así pues se considera un diagnóstico de HH en ausencia de otras causas conocidas de sobrecarga de hierro secundaria si en la evaluación de la biopsia hepática por lo menos se presenta 1 de los siguientes 3 criterios:

Grado 3 o 4 en la tinción de azul de Perls (tinción del hierro almacenado)

HIC (concentración de hierro hepático) > 80 μmol por gramo de tejido seco

HII (índice de hierro hepático) $\geq 1,9$

También se considera un diagnóstico de HH si los gramos de hierro extraídos a través de la terapia por flebotomías son ≥ 4 (Powell *et al.*, 1998).

Actualmente la detección de un genotipo C282Y/C282Y o C282Y/H63D en aquellas personas con sospecha clínica de HH también confirma el diagnóstico de HH.

2.1.-Determinación de la saturación de transferrina y ferritina sérica.

La medida de la saturación de transferrina (hierro del suero dividido por la capacidad total de unión a hierro, expresado en porcentaje) y la ferritina sérica son los parámetros clásicos que se usan para el diagnóstico de la HH. Varios estudios han demostrado que la saturación de transferrina (TS, %) es preferible a la ferritina sérica (Edwards and Kushner, 1993). Además, la primera expresión fenotípica de la enfermedad es una elevación de la saturación de transferrina (TS) que indica un exceso de transporte de hierro desde el intestino y ocurre antes de una sobrecarga de hierro significativa (Tabla 3). A medida que el hierro se va acumulando en los tejidos la concentración de ferritina sérica aumenta en una relación directamente proporcional a los niveles totales de hierro almacenado en el cuerpo (Powell *et al.*, 1998).

La determinación de la ferritina sérica no es determinante para el diagnóstico de la HH ya que existen múltiples causas por las que la ferritina sérica puede estar aumentada, a parte de por una sobrecarga de hierro. En pacientes con alcoholismo, esteatohepatitis no alcohólica (NASH) y hepatitis vírica crónica los niveles de ferritina sérica pueden estar aumentados en ausencia de HH (Bacon, 2001). Las enfermedades inflamatorias como artritis reumatoide o varias enfermedades neoplásicas, por ejemplo linfoma, pueden elevar los niveles de ferritina sérica (Bacon, 2001). Por lo tanto sólo la medida de la ferritina sérica puede dar lugar a resultados falsos positivos y siempre se realiza junto con la determinación de la saturación de transferrina.

Si el resultado inicial de una prueba de saturación de transferrina es alto la medida se debe repetir en ayunas ya que las comidas afectan a los resultados. Si la medida en ayunas es también por encima del rango normal, se debe realizar la medida de la ferritina sérica. No

existen unos valores universales de límite superior normal para la saturación de transferrina, pero valores >45-50% se consideran elevados dependiendo de las condiciones en las que se extrajo la muestra de sangre (Tabla 4).

Un individuo con dos valores de TS $\geq 45\%$ pero menores del 55% y con ferritina sérica normal y sin causa secundaria de elevación de los parámetros bioquímicos puede presentar HH y se deberían repetir las bioquímicas al cabo de 2 años. Si la TS es del 55% o mayor en la repetición del test y la ferritina sérica es normal se pueden clasificar como personas con hemocromatosis que no expresan la enfermedad y se les debería re-analizar al año. Los niveles de ferritina sérica definen el punto en el que la HH se expresa y que el tratamiento debe ser iniciado. Valores de TS en un test repetido $\geq 55\%$ y ferritina sérica elevada (valores $\geq 200 \mu\text{g/L}$ en mujeres premenopáusicas y $\geq 300 \mu\text{g/L}$ en hombres o mujeres postmenopáusicas) o existencia de evidencias de daño hepático (enzimas hepáticas elevadas o hepatomegalia) indican una sobrecarga de hierro hepático primaria debido a la Hemocromatosis (Powell *et al.*, 1998). Para acabar de definir si existe Hemocromatosis Hereditaria se pueden realizar el estudio genético del gen HFE y/o el estudio de la biopsia hepática del paciente.

Los valores de TS, ferritina sérica, hierro sérico en personas sanas y en pacientes de HH asintomáticos o sintomáticos se describen en la tabla 4.

Tabla 4. Resultados de los análisis de laboratorio en pacientes con HH (Bacon, 2001).

Medidas	Individuos normales	Pacientes con HH	
		Asintomáticos	Sintomáticos
Sangre (ayunas)			
Hierro sérico ($\mu\text{g/dL}$)	60-180	150-280	180-300
Transferrina sérica (mg/dL)	220-410	200-280	200-300
Saturación transferrina, ST (%)	20-45	45-100	80-100
Ferritina sérica (ng/mL)			
Hombre	20-200	150-1000	500-6000
Mujer	15-150	120-1000	500-6000
Análisis genético (HFE)			
C282Y/C282Y	wt/wt	C282Y/C282Y	C282Y/C282Y
C282Y/H63D	wt/wt	C282Y/H63D	C282Y/H63D
Hígado			
Concentración de hierro hepático			
$\mu\text{g/g}$	300-1500	2000-10000	800-30000
$\mu\text{mol/g}$	5-27	36-179	140-550
Índice de hierro hepático (HII)	<1,0	1,0 a >1,9	>1,9
Histología hepática:			
Tinción Perls' Prussian blue	0 a 1 +	2+ a 4+	3+ a 4+

wt/wt: genotipado *wildtype* o normal/normal.

Con estas determinaciones bioquímicas de la saturación de transferrina y la ferritina sérica se pueden identificar a la mayoría de los varones en riesgo de padecer HH, pero no permite detectar a una gran proporción de mujeres premenopáusicas (Moirand *et al.*, 1997a). También se ha descrito que estos estudios clásicos de los parámetros del metabolismo del hierro presentan una alta proporción de falsos positivos (Worwood *et al.*, 1993) y son poco sensibles

para detectar la enfermedad de forma precoz (Bell *et al.*, 1997). La determinación de la ferritina sérica y el índice de saturación de transferrina, utilizando un punto de corte para la saturación de transferrina del 55%, tiene un valor predictivo positivo de la enfermedad del 70%. Si aumentamos el punto de corte de la saturación de transferrina a un valor mayor del 62%, el valor predictivo alcanza el 92%, por lo que esta determinación ha sido descrita como el mejor indicador no genético para la HH (Dadone *et al.*, 1982).

El cribado y diagnóstico de la HH en la población general se puede realizar por una detección de una elevación persistente de la saturación de transferrina. Este método es relativamente sensible, barato, ampliamente disponible, aunque presenta una mayor sensibilidad en hombres que en mujeres, no es específico en condiciones de no ayuno y por lo tanto normalmente se debe determinar repetidamente (Edwards *et al.*, 1988; Cogswell *et al.*, 1998; Barton and Acton, 2000).

Otras pruebas que se podrían emplear para el diagnóstico de la HH son la capacidad de unión del hierro libre (UIBC *Unbound iron binding capacity*), la concentración de hierro en el suero y la determinación de los enzimas hepáticos. La capacidad de unión del hierro libre o UIBC es un método efectivo y barato (Adams *et al.*, 2000; Hickman *et al.*, 2000), pero se usa poco. La concentración de hierro en suero como único test no es un buen marcador para un diagnóstico de la Hemocromatosis porque existen marcadas variaciones diurnas de este parámetro. Los valores de enzimas hepáticos como la ALT y la AST no siempre están incrementadas en pacientes con HH y no son específicos de la HH ya que estos valores pueden estar elevados en otras causas de inflamación hepática, particularmente en la enfermedad alcohólica del hígado y en NASH. Así pues, estos parámetros son menos sensibles o menos específicos, o no se ha evaluado tanto como la prueba de la saturación de transferrina por lo que son utilizados en menor proporción y siempre en combinación con otras determinaciones (Witte *et al.*, 1996; Cogswell *et al.*, 1998).

2.2.-La biopsia hepática

Cuando los resultados de la saturación de transferrina y la ferritina sérica son persistentemente elevados, la biopsia hepática permite verificar el diagnóstico de HH y determinar la existencia de fibrosis o cirrosis.

La tinción histológica de la biopsia hepática con el colorante azul de Perls Prussian determina la distribución de los depósitos de hierro en las células hepáticas y permite obtener el grado de hierro almacenado, que es uno de los tres criterios de diagnóstico de la HH. En una tinción de una biopsia hepática de un paciente con HH los depósitos de hierro se presentan preferentemente en la zona periportal del lóbulo hepático (zona acinar 1) con una disminución gradual en las zonas acinar 2 y 3 (Brunt *et al.*; 2000). Las células hepáticas afectadas son los hepatocitos aunque cuando existe una sobrecarga de hierro importante también se detectan acúmulos de hierro en los agregados de células de Kupffer (nódulos sideróticos), el epitelio del conducto de la bilis y en tejidos fibrosos del tracto portal y séptico. La HH en estadio avanzado, cuando existe un importante acúmulo de hierro, presenta un patrón de acúmulo de hierro parecido a otros síndromes y enfermedades con hierro hepático detectable histológicamente, pero en los estadios iniciales de estas Hemocromatosis secundarias, a diferencia de en la

primaria, el hierro se acumula preferentemente en las células sinusoidales (células de Kupffer) y con una distribución más difusa en los acinos (Bacon, 2001). En pacientes con HH la tinción hepática presenta grado 3 a 4 de los niveles de hierro almacenado en los hepatocitos, con una mayor concentración en los hepatocitos periportales (Tabla 4).

Los análisis bioquímicos de la biopsia hepática permiten determinar la concentración de hierro en el hígado (HIC, *hepatic index concentration*), el índice de hierro hepático (HII, *hepatic iron index*), que son los otros dos criterios utilizados para el diagnóstico de la HH (Dooley and Walker, 2000). La concentración de hierro hepático (HIC) se expresa en μmol por gramos de tejido seco. El cociente entre la HIC y la edad del paciente define el índice de hierro hepático (HII). Un índice de hierro hepático (HII) superior a 1,9 es consistente con un diagnóstico de HH en estado homocigoto (Tabla 4) (Bonkowsky *et al.*, 1996). A pesar de haberse establecido el valor de índice de hierro hepático $>1,9$ como valor diagnóstico para la HH, estudios recientes han demostrado que un 15% de pacientes C282Y homocigotos con HH presentaban un HII $<1,9$ (Bacon, 2001).

Los valores de concentración de hierro hepático (HIC), el índice de hierro hepático (HII) y el grado de tinción hepático con azul de Prussian en personas sanas y en pacientes de HH asintomáticos o sintomáticos se describen en la tabla 4.

La realización de una biopsia hepática no es necesaria en todos los pacientes, sobretodo en pacientes jóvenes donde los acúmulos de hierro hepático no son lo suficientemente elevados para causar daño hepático. Por otro lado pueden existir contraindicaciones médicas para su realización o puede ser rechazada por el paciente. En estos casos el análisis de las mutaciones del gen HFE determina si el paciente presenta HH clásica. Estudios recientes concluyen que no se presenta cirrosis o fibrosis severa en pacientes de HH menores de 40 años, con una ferritina sérica $<1000 \mu\text{g/L}$, parámetros normales de AST (aspartato transaminasa) y hígado impalpable, por lo que en este tipo de pacientes no es necesario realizar una biopsia hepática (Guyader *et al.*; 1998; Bacon *et al.*; 1999b; Powell, 2000). Por el contrario, unos niveles de ferritina sérica $>1000 \mu\text{g/L}$ y/o niveles anormales de AST y/o hígado palpable están asociados con un riesgo significativo de cirrosis o fibrosis severa, la existencia de la cual se debe comprobar mediante biopsia hepática (Dooley and Walker, 2000; Bacon, 2001).

La detección de la presencia de fibrosis o cirrosis mediante una biopsia hepática es determinante para la prognosis y el tratamiento del paciente. Si existe cirrosis el paciente debe ser controlado respecto a la aparición o desarrollo de un carcinoma hepatocelular mediante la determinación de los niveles de α -fetoproteína, ya que éste puede ser tratado más efectivamente en estadios primarios.

2.3.-El análisis genético

El análisis de las mutaciones del gen HFE determinará si el paciente presenta HH clásica (homocigoto para C282Y o heterocigoto compuesto C282Y/H63D). Si se detecta que el paciente es heterocigoto para la mutación C282Y se recomienda la determinación de la mutación H63D ya que se ha descrito que un pequeño tanto por ciento de individuos heterocigotos compuestos C282Y/H63D desarrollan sobrecarga de hierro (Adams, 1999a).

En el caso de un probando homocigoto para la C282Y, se debe realizar un análisis genético del gen HFE a los hermanos y hermanas del probando, así como análisis de los niveles de hierro (TS y ferritina). Si encontramos algún otro hermano también homocigoto para la C282Y, el tratamiento de esta persona dependerá de los valores de saturación de transferrina y ferritina sérica que presente. Si los niveles de ferritina sérica están por encima del valor normal pero son $<1000 \mu\text{g/L}$, el tratamiento por flebotomía se debe empezar sin necesidad de realizar una biopsia hepática. Si los niveles de hierro son normales, no es necesaria la flebotomía pero estos valores se deben analizar cada año (Dolley and Walter, 2000). Se ha estimado que los valores de ferritina sérica solo aumentan $50 \mu\text{g/L}$ por año en individuos con HH (Powell, 1992), por lo que no sería necesaria una monitorización anual del individuo, no obstante este protocolo frecuente facilita el seguimiento del individuo y reduce la probabilidad de que la monitorización no se lleve a cabo por un olvido del individuo al citarlo en un periodo muy amplio (Dolley and Walter, 2000).

Si el hermano del probando es heterocigoto para la C282Y se debe realizar el análisis de la mutación H63D, por si es heterocigoto compuesto (C282Y/H63D), ya que existe un pequeño riesgo de sobrecarga de hierro en individuos con este genotipo (Bacon *et al.*, 1999a; Risch, 1997).

Los hijos de personas C282Y homocigotas tiene un riesgo de 1 en 20 de ser también homocigotos en una población con una frecuencia portadora del 10%. El análisis genético se puede llevar a cabo de dos formas: tanto el cónyuge como el hijo pueden ser analizados (Adams, 1998). Testar al cónyuge es lo más práctico, y así se evita el problema de obtener consentimiento informado de un niño. Si el cónyuge es normal para la C282Y y la H63D, entonces todos los hijos serán heterocigotos (C282Y/normal). Si el cónyuge es heterocigoto para la C282Y, el hijo tiene una probabilidad de 1 entre 2 de ser homocigoto, y es necesario realizarle el test genético para saber que genotipo presenta. Debido a que es raro que se de un incremento significativo de los valores del hierro antes del final de la adolescencia, el análisis genético pueden esperar hasta que el hijo cumpla la mayoría de edad y pueda dar consentimiento informado. Si el cónyuge es heterocigoto para la H63D, el hijo puede ser testado genéticamente pasada su mayoría de edad para establecer si es o no heterocigoto compuesto (C282Y/H63D) (Dolley and Walter, 2000).

Los padres de individuos con HH homocigotos para la C282Y también deben ser analizados, ya que ocasionalmente se puede encontrar que alguno de ellos sea también homocigoto para la C282Y, y esto tiene implicaciones para el resto de la familia. Para las familias con sobrecarga de hierro no relacionada con el gen HFE, el cribado de los hermanos, hijos y padres sólo puede llevarse a cabo determinando la saturación de transferrina y la ferritina sérica.

Ante una persona con sospecha de HH pero sin historial familiar se puede seguir el algoritmo presentado en la figura 1 para esclarecer su diagnóstico.

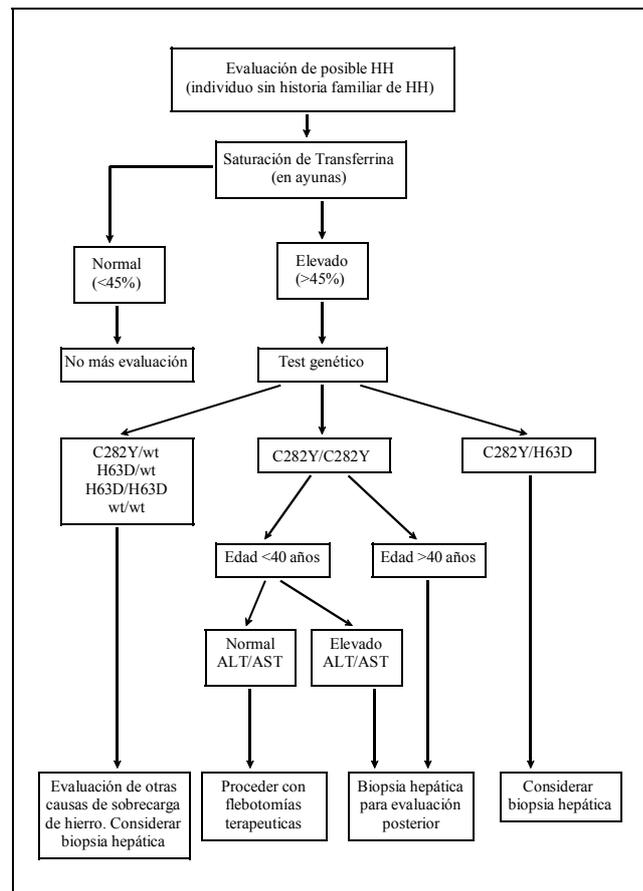


Figura 1. Algoritmo para la evaluación de un posible caso de HH en un individuo sin historia familiar de HH (Bacon, 2001). wt/wt genotipado *wildtype* o normal/normal. ALT alanina trasaminasa, AST aspartato transaminasa.

Unos pocos pacientes pueden presentar otro tipo de Hemocromatosis primaria sin presentar mutaciones en el gen HFE, como en los casos de la Hemocromatosis juvenil (HJ) o Hemocromatosis tipo 2 (OMIM 602390) que ha sido ligada al cromosoma 1q, la Hemocromatosis tipo 3 (OMIM 604250) causada por mutaciones en el gen TFR2 situado en el cromosoma 7 o la Hemocromatosis tipo 4 (OMIM 606069) causada por mutaciones en el gen IREG1 o FPN1 y que presenta una herencia autosómica dominante (Dooley *et al.*, 1999; Pietrangelo *et al.*, 1999, Walker *et al.*, 1999) (ver I-2).

3.-Tratamiento

El tratamiento precoz de la HH se realiza a través de flebotomías terapéuticas (extracciones de sangre) para eliminar el exceso de hierro del organismo y mantener unas reservas de hierro normales. Este tratamiento es muy efectivo, económico y carente de efectos secundarios previniendo las complicaciones asociadas al acúmulo de hierro si el tratamiento se realiza antes de la aparición de daño tisular (Powell and Isselbacher, 1996; Bothwell *et al.*, 1996; Barton and Bertoli, 1996). Se ha descrito que los pacientes con HH y sin cirrosis o diabetes mellitus, que han realizado un tratamiento terapéutico por flebotomías hasta normalizar sus niveles de hierro y el tratamiento de mantenimiento de flebotomías, presentan una esperanza de vida normal (Niederau *et al.*, 1996; Powell, 1996). Por lo tanto, la existencia de un

tratamiento eficaz contra la HH hace que el diagnóstico precoz presintomático sea de gran importancia.

La terapia por flebotomía fue introducida en los años 50 como método de deplección del acúmulo de hierro en el cuerpo y es todavía el método elegido para el tratamiento de la HH (Davis and Arrowsmith, 1952). El tratamiento debe ser iniciado en hombres con niveles de ferritina sérica de 300 ng/mL o más y en mujeres con niveles de ferritina sérica de 200 ng/mL o más, con o sin la presencia de síntomas (Barton *et al.*, 1998). En una fase inicial una o dos unidades de sangre (500 ml aproximadamente) deben ser extraídos cada semana (Dolley and Walter, 2000). El tiempo que dura la fase inicial de la terapia depende de cada individuo, y no existe un período exacto en el que se deba acabar la terapia. Las flebotomías terapéuticas deben continuarse hasta que la saturación de transferrina sea <50% y los niveles de ferritina sérica < 50 ng/mL, aunque algunos médicos prefieren bajar los niveles de ferritina sérica por debajo de 20 ng/mL (Bacon, 2001). Es importante que el paciente no llegue a mostrar síntomas de deficiencia de hierro o anemia. Los motivos de un inicial estado anémico en un paciente flebotomizado se deben a que es más probable depleccionar a valores normales los niveles de hierro sanguíneos que los de los tejidos, debido al retardo teórico entre los niveles de hierro en suero y la concentración de hierro celular en los tejidos (Dolley and Walter, 2000).

Una vez que el exceso de hierro se ha depleccionado mediante flebotomías semanalmente en la fase inicial del tratamiento, la mayoría de los pacientes de HH necesitan realizar un tratamiento de mantenimiento que consiste en una flebotomía de 2 a 4 veces por año, dependiendo de los valores de saturación de transferrina y ferritina sérica. Por razones aún desconocidas, ocasionalmente se encuentra que unos pocos pacientes de HH bien diagnosticados no vuelven a acumular hierro y no requieren de esta flebotomía de mantenimiento. Es importante llevar una meticulosa historia del paciente sobre posibles condiciones que causen pérdida de sangre (Dolley and Walter, 2000; Bacon, 2001).

Algunos pacientes no son candidatos para el tratamiento con flebotomías (pacientes con talasemias o anemias refractarias severas), en estos casos se requiere una terapia con quelantes de hierro (Barton *et al.*, 1998).

La cuantificación de las flebotomías da una medida práctica de la determinación de los niveles iniciales de exceso de hierro acumulado ya que cada unidad de sangre (500 ml aproximadamente) contiene 200-250 mg de hierro dependiendo del nivel de hemoglobina. Además la cuantificación de las flebotomías es un criterio aceptado para la medida del grado de sobrecarga de hierro y para la confirmación de un diagnóstico de Hemocromatosis, ya que en pacientes sin enfermedades hemolíticas o otras causas de sobrecarga de hierro secundaria, la movilización de 4 o más gramos de reservas de hierro (16 flebotomías de 500 ml de sangre) confirma la presencia de Hemocromatosis (Powell *et al.*, 1998).

Los pacientes con Hemocromatosis deben consumir en moderación alimentos que contengan grandes cantidades de hierro, como carnes rojas o órganos, y no deberían consumir suplementos de hierro incluidos suplementos multivitamínicos que contengan hierro. El alcohol aumenta la absorción de hierro y ciertas bebidas alcohólicas como el vino rojo contiene concentraciones relativamente altas de hierro, por lo que se recomienda un consumo moderado de alcohol en pacientes con HH y un consumo mínimo o nulo en aquellos pacientes con evidencias de daño hepático. En pacientes con HH existe una absorción incrementada de otros

metales como el cobalto, el manganesio, el zinc y el plomo, por lo que el uso de suplementos que contengan estos metales debe ser evitado o solamente empleado si existe una deficiencia nutricional específica comprobada. A pesar de estas recomendaciones no es necesario alterar la dieta del paciente a no ser que éste sea intolerante a las flebotomías, ya que la dieta no incrementa la excreción de hierro, no es sustitutoria de la terapia y el exceso de hierro de la dieta de estos pacientes (0,5 a 1 mg/día) es muy pequeño comparado con los gramos de hierro eliminados por las flebotomías (200-250 mg/flebotomía) (Barton *et al.*, 1998).

3.1.-Tratamiento de la sintomatología específica de la HH

La cirrosis: La mayor preocupación en los pacientes con HH es el alto riesgo de desarrollar un carcinoma hepatocelular (HCC) (Niederau *et al.*, 1996). Las recomendaciones son que se realice un examen por ultrasonidos del hígado y una analítica sérica de α -fetoproteína cada 6 meses. Este tipo de pruebas no se recomiendan en pacientes que no presentan cirrosis, porque raramente existen pacientes de HH no cirróticos con HCC. Las complicaciones más comunes de la cirrosis como ascitis, varices hemorrágicas del esófago y encefalopatía portal sistémica son infrecuentes excepto en fase tardía de la enfermedad y deben ser tratadas con los métodos habituales empleados cuando se dan por otras causas. Los pacientes en fase final de la enfermedad HH precisan de un trasplante hepático. El resultado del trasplante no es tan bueno como en otras enfermedades hepáticas, debido a complicaciones sépticas y cardíacas (Farrell *et al.*, 1994). Así pues, una detección y tratamiento temprano de la enfermedad es muy importante (Dolley and Walter, 2000).

La diabetes mellitus: Esta complicación se trata con los métodos habituales (dieta, agentes orales hipoglicémicos, insulina si es necesario). La desferritinización puede reducir los requerimientos de insulina o agentes orales hipoglicémicos, pero no altera la necesidad del tratamiento, por ejemplo si existe dependencia de insulina ésta continúa aunque se depleccione el hierro (Dolley and Walter, 2000).

Las artropatías: El dolor de las articulaciones puede mejorar, empeorar o no cambiar después de la deplección del hierro por las flebotomías. El dolor de las articulaciones sigue siendo uno de los problemas a largo término en el tratamiento de la HH. Normalmente es resistente al tratamiento con drogas no-esteroideas antiinflamatorias e incapacita una actividad normal. Ocasionalmente los opiáceos son necesarios. No existe una solución fácil, sin embargo algunas prótesis pueden ser útiles para articulaciones específicas (Dolley and Walter, 2000).

La pérdida de la libido: Está relacionado con los bajos niveles de gonadotrofinas debido al hipopituitarismo. Se debe medir el nivel de testosterona en el suero. Una terapia de reemplazamiento con testosterona puede ayudar (Dolley and Walter, 2000).

Enfermedad cardíaca: Los ecocardiogramas indicarán el grado de daño cardíaco que puede ser tratado convencionalmente. Puede producirse algunas mejoras funcionales después de la desferritinización (Dolley and Walter, 2000).

4.-Herencia de la HH

La naturaleza hereditaria de la Hemocromatosis fue reconocida por primera vez en 1935 por Sledon (Sheldon, 1935). A lo largo de la historia, el tipo de herencia de la HH ha generado una gran controversia, ya que mientras que unos estudios apuntaban hacia una herencia autosómica dominante (Bothwell *et al.*, 1959; Debre *et al.*, 1958), otros lo hacían hacia una herencia recesiva (Saddi and Feingold, 1974; Simon *et al.*, 1977). Un estudio de Bassett y colaboradores clarificó parte de la controversia previa, ya que en este estudio 4 de 5 familias estudiadas con descendencia homocigota resultaban de una unión de padres con genotipo heterocigoto-homocigoto (Basset *et al.*, 1982). Esto nos viene a explicar que el tipo de herencia de la HH es recesiva pero que debido a que la enfermedad presenta una alta frecuencia aparecen genealogías de pseudo-dominancia en que uno de los progenitores es homocigoto y el otro heterocigoto, presentándose personas afectas en dos generaciones continuas y dando un patrón de falsa dominancia.

Estudios de Borecki y colaboradores (1990) concluyeron que la HH es recesiva respecto a las manifestaciones clínicas y las anormalidades del hierro en el suero, con diferencias significativas respecto al sexo, las manifestaciones clínicas se daban en todos los hombres sugiriéndose que el genotipo recesivo de la HH presenta una penetrancia completa en hombres pero no en mujeres.

5.-Asociación con HLA

Un paso importante en la comprensión del defecto genético responsable de la Hemocromatosis se dió en 1975 al reconocerse que la mayoría de individuos afectos de Hemocromatosis presentaban una asociación con marcadores del sistema HLA (*human leukocytic antigen system*) del complejo de histocompatibilidad de clase I o MHC I, concretamente con el haplotipo HLA-A3, permitiendo avanzar la hipótesis de que el gen responsable de la HH debería de hallarse en el brazo corto del cromosoma 6 (Simon *et al.*, 1975). Subsiguientemente el análisis de genealogías mediante análisis de ligamiento demostró que esta hipótesis era correcta (Edwards *et al.*, 1981). Más recientemente numerosos estudios de análisis de ligamiento y de construcción de mapas físicos han ido acotando la región genómica que contiene el gen responsable de la Hemocromatosis (Gasparini *et al.*, 1993; Jazwinska *et al.*, 1993; Yaouanq *et al.*, 1994; Stone *et al.*, 1994; Calandro *et al.*, 1995; Raha-Choudhury *et al.*, 1995; Burt *et al.*, 1996; Malfroy *et al.*, 1996; Totaro *et al.*, 1996).

Varios estudios han publicado que el haplotipo predominantemente asociado con la Hemocromatosis es el HLA-A3, B7 (Milman *et al.*, 1988; Cragg *et al.*, 1988). Estos datos sugirieron que una única y ancestral mutación producida sobre este haplotipo y en un gen implicado en el metabolismo del hierro sería el responsable del alelo de la Hemocromatosis (Simon *et al.*, 1988).

La asociación de la enfermedad con el HLA desembocó en la propuesta de varios genes candidatos localizados en el brazo corto del cromosoma 6 y en la detección de varios marcadores asociados con la enfermedad. Sin embargo, ninguno de los genes propuestos, entre los que se encontraban 2 pseudogenes en 6p de la H-ferritina, correspondieron con el gen

responsable de la Hemocromatosis (David *et al.*, 1989; Dugast *et al.*, 1990). Estudios de Lord y colaboradores en 1990 excluyeron como causa de la HH grandes deleciones estructurales o grandes reordenamientos.

6.-El descubrimiento del gen responsable de la HH. El gen HFE.

La dificultad de la localización exacta del gen responsable de la HH radicó en que la zona en la que se encuentra (región telomérica a HLA-A) es una gran zona con una tasa de recombinación muy baja, donde 1 cM corresponde a varias Mb. Por esta razón marcadores que se encuentran a mucha distancia del gen responsable de la enfermedad presentan asociación con ella, como es el caso del marcador D6S105 que está a casi 2 Mb del gen y no definen una zona concreta para la búsqueda del gen responsable de la enfermedad. Pero sin duda este era un dato del que no disponían los investigadores y la existencia de esta baja tasa de recombinación supuso un caso excepcional de retraso en la clonación posicional del gen responsable de la HH. La idea de recombinación no uniforme hubiera supuesto el ahorro de una década en la infructífera búsqueda del gen responsable de la HH en una zona cercana al gen HLA-A, que se encuentra a 4,6 Mb del gen HFE.

La identificación definitiva del gen responsable de la Hemocromatosis se produjo en 1996 en un estudio de pacientes con HH en el que se secuenció una región de 250 kb, entre los marcadores D6S2238 y D6S2241, situada 3 Mb telomérica a la región del complejo mayor de histocompatibilidad o MHC y que era idéntica en un 85% de los cromosomas de los pacientes (Feder *et al.*, 1996). En este estudio se hallaron 15 genes, 12 de los cuales eran histonas. Los tres genes restantes presentaban homología a la ribonucleoproteína 52-kD Ro/SSA (gen RoRet), a un transportador de sodio-fosfato (gen NPT3) y al gen HLA-A2 (gen HLA-H o cDNA-24). Todos los genes identificados fueron secuenciados tanto en controles como en pacientes con HH para encontrar la o las mutaciones causantes de HH. En este trabajo se describieron las mutaciones C282Y y H63D en el gen denominado HLA-H o cDNA-24. La mutación C282Y estaba presente en un (83%) de enfermos HH (n=178, USA) en estado homocigoto, mientras que respecto a la mutación H63D se observó que el genotipo heterocigoto compuesto con la mutación C282Y (C282Y/H63D) era más frecuente en la población afectada que en la control (Feder *et al.*, 1996).

La nomenclatura del gen HLA-H fue cambiada a la de HFE debido a la existencia previa de un pseudogen con dicho nombre en la región MHC de clase I (Mercier *et al.*, 1997).

6.1.-La mutación C282Y

La mutación C282Y consiste en un cambio de guanina (G) por adenina (A) en el nucleótido 845 (exón 4) que resulta en un cambio de aminoácido de cisteína (Cys) por tirosina (Tyr). Esta mutación *missense* se da en un residuo implicado en un puente disulfuro del dominio α -3 conservado en las proteínas del complejo de histocompatibilidad o MHC de clase I. La mutación fue descrita por Feder y colaboradores en 1996 en la publicación donde se identificaba el gen HFE, llamado en este estudio HLA-H o cDNA 24. En este estudio mediante un ensayo de hibridación con nucleótidos alelo específicos (OLA) se detectó esta mutación en un 85% de

cromosomas de un grupo de 178 pacientes de HH, solo un 3,2% de cromosomas controles de un total de 310 presentaban la mutación. De los 178 pacientes de HH 148 (83%) eran homocigotos para la mutación, 9 eran heterocigotos y 21 no presentaban la mutación. Estos números distan de seguir el equilibrio de Hardy-Weinberg por lo que se propuso que en estos pacientes de HH existía una heterogeneidad, con un 83% de casos relacionados con homocigosis respecto a la mutación C282Y.

Tras la descripción de la mutación C282Y por Feder y colaboradores como la mutación responsable de la mayoría de casos de HH, muchos otros trabajos buscaron la presencia de esta mutación en otras poblaciones. La mutación C282Y está presente de un 100% a un 64% de los pacientes con Hemocromatosis de origen europeo (ver apartado 7).

Otro aspecto a resolver es la variabilidad de severidad en la sobrecarga de hierro en pacientes que presentan la misma mutación C282Y y un haplotipo también idéntico. Se ha propuesto que el locus HFE sería el locus principal causante de la enfermedad, pero que otros genes ligados o no a 6p podrían ser los causantes de esta variación en la expresión de la enfermedad (Jazwinska *et al.*, 1996).

6.1.1.-Penetrancia de la mutación C282Y

La penetrancia de un genotipo se define como el porcentaje de individuos con este genotipo que desarrollan evidencias o síntomas (penetrancia fenotípica) debido a la enfermedad (penetrancia de la enfermedad). Debido a las características de la HH, se pueden considerar dos tipos de penetrancias fenotípicas: la penetrancia fenotípica debida a evidencias de alteraciones en los parámetros bioquímicos de hierro, que se da anteriormente a la aparición de los síntomas clínicos, y la penetrancia fenotípica debida a la presencia de síntomas clínicos propios de la enfermedad (cirrosis, artritis, diabetes, etc.).

A pesar de los estudios realizados al respecto la penetrancia exacta de los homocigotos para la C282Y en la HH no se conoce aún, pero las divergencias entre el número de pacientes con HH, la frecuencia alélica de la mutación C282Y en la población general, y las predicciones de la frecuencia de la HH indican que o bien la penetrancia de la mutación es incompleta o que existen muchos pacientes no diagnosticados (Merryweather-Clarke *et al.*, 2000; Willis *et al.*, 2000). Otro dato que apunta hacia una penetrancia incompleta de la mutación es la existencia de individuos, detectados tanto en estudios de cribado poblacional como en estudios familiares, con el genotipo C282Y/C282Y y sin ninguna evidencia bioquímica o clínica de sobrecarga de hierro, es decir que no expresan la enfermedad (Moirand *et al.*, 1997b; Rhodes *et al.*, 1997; Adams *et al.*, 1997; Adams, 2000a).

Seis grandes estudios poblacionales describen un porcentaje de entre el 12 al 81% de individuos con la mutación C282Y en homocigosis con valores normales de ferritina sérica, es decir sin sobrecarga de hierro ni necesidad de tratamiento (tabla 11, página 52) (Burt *et al.*, 1998; Olynyk *et al.*, 1999; McDonnell *et al.*, 1999; Adams *et al.*, 2000; Jackson *et al.*, 2001; Asberg *et al.*, 2001). Esta amplia divergencia en el cálculo de la penetrancia de la mutación C282Y (18,8 a 88,4%) puede ser en parte debida a que los estudios de cribado normalmente describen una media de penetrancia en una población de individuos con un amplio rango de

edad, en vez de analizar solo el grupo de individuos más mayores, ya que la expresión de la HH es edad dependiente (Dooley and Walker, 2000).

El curso clínico de este tipo de individuos ha sido evaluado en dos estudios (Olynyk *et al.*, 1999; Adams *et al.*, 2000). En el trabajo de Adams y colaboradores sólo en uno de los 8 casos familiares reportados como C282Y homocigotos asintomáticos y estudiados durante una media de 3,5 años desarrolló un aumento de los niveles de ferritina requiriéndose terapia (Adams *et al.*, 2000). Igualmente el estudio de Olynyk y colaboradores describe evidencias de la existencia de individuos C282Y homocigotos no tratados que no desarrollan un aumento de los niveles de ferritina sérica durante un periodo de 4 años (Olynyk *et al.*, 1999).

Ni un exceso de hierro de la dieta ni pérdidas de sangre por menstruación o por donaciones explican todos los casos de C282Y homocigotos asintomáticos, por lo que se apunta hacia que mutaciones en otros genes pudieran modificar la expresión fenotípica de la HH. La proteína HFE es solamente una de las proteínas implicadas en el metabolismo del hierro, existen otras proteínas, conocidas o no, también implicadas en dicha homeostasis (ver sección III). Algún otro defecto genético que afectase a alguna de estas otras proteínas podría tener repercusión en la expresión fenotípica de la HH (Adams *et al.*, 2000).

Normalmente ante una evidencia de alteración bioquímica de los parámetros de hierro (saturación de transferrina y ferritina sérica elevados) los individuos C282Y homocigotos son puestos en tratamiento para evitar que se presenten complicaciones clínicas; esto hace que en muchas ocasiones la penetrancia de la mutación C282Y del gen HFE se haya referido a una penetrancia fenotípica correspondiente a alteraciones bioquímicas sin que se llegue a una alteración clínica manifiesta. La problemática estriba en que de este modo es imposible calcular la penetrancia de la mutación C282Y del gen HFE respecto las manifestaciones clínicas, ya que si los individuos son tratados es imposible saber cuantos de ellos desarrollarán finalmente una enfermedad manifiesta. Además es posible que otros factores o mutaciones a parte de la C282Y sean necesarios para la aparición de la enfermedad, por lo que no todos los individuos C282Y homocigotos con una bioquímica alterada desarrollarían síntomas clínicos en un futuro, tal y como se ha apuntado en el último trabajo realizado sobre la penetrancia de la mutación C282Y en la población de EE.UU. En este trabajo se concluye que menos del 1% de homocigotos para la mutación C282Y de la población general desarrollan manifestaciones clínicas de Hemocromatosis a pesar de que muchos presentan alteraciones bioquímicas (Beutler *et al.*, 2002).

El seguimiento a largo plazo de individuos jóvenes C282Y homocigotos detectados tanto por estudios poblacionales como por estudios familiares proporcionará una estimación más fiable de la penetrancia de la enfermedad. A su vez, el estudio de otras proteínas implicadas en el metabolismo del hierro proporcionará la respuesta a la pregunta de qué otros genes, a parte del gen HFE, están influyendo en la expresión fenotípica de la HH.

6.1.2.-La mutación C282Y en otras enfermedades

A parte de la implicación directa de la mutación C282Y en la Hemocromatosis Hereditaria, la mutación C282Y ha sido estudiada como factor de riesgo para otras enfermedades.

6.1.2.1.-Porfirias

6.1.2.1.1.- Porfiria cutánea tarda tipo II o familiar (PCT)

El caso más claro de asociación de la mutación C282Y con otra enfermedad se da en la porfiria cutánea tarda tipo II o porfiria cutánea tarda familiar.

La porfiria cutánea tarda tipo II o familiar (PCT) es una enfermedad autosómica dominante caracterizada por una dermatitis sensible a la luz y asociada con la excreción de grandes cantidades de uroporfirina en orina. La enfermedad está causada por mutaciones en el gen uroporfirinógeno descarboxilasa o UROD situado en 1q34 y que interviene en la biosíntesis del grupo hemo (OMIM 176100).

La mayoría de casos familiares de PCT presentan una sola mutación en el gen UROD, siendo la actividad del enzima del 50%. Estos individuos son asintomáticos y para que la enfermedad se manifieste es necesario que se presenten factores adicionales como hepatitis vírica o alcoholismo (Felsher *et al.*, 1982).

Desde hace tiempo se conoce que existe una alta frecuencia de sobrecarga de hierro en pacientes con PCT y una relación entre las anomalías del metabolismo del hierro, la progresión y los síntomas de la PCT (Cortes *et al.*, 1980; Elder GH, 1998). La reducción de la sobrecarga de hierro por flebotomías terapéuticas se ha llevado a cabo en el tratamiento de pacientes con PCT desde hace años (Elder GH, 1998). En estos pacientes es muy frecuente que se de hepatitis vírica crónica y/o alcoholismo (Elder GH, 1998).

Ya en 1985 se apuntó hacia una asociación entre la PCT y la Hemocromatosis (Kushner *et al.*, 1985), y más recientemente se ha confirmado esta asociación, ya que varios estudios han implicado a la mutación C282Y, causante de la Hemocromatosis hereditaria, como un factor que contribuye a la patogénesis de la PCT. Aproximadamente un 40% de los pacientes con PCT son homocigotos o heterocigotos para la mutación C282Y del gen HFE; sin embargo no existe una clara correlación entre la severidad de la PCT y los genotipos de la UROD y/o el gen HFE (Santos *et al.*, 1997; Robert *et al.*, 1997; Mendez *et al.*, 1998; Stuart *et al.*, 1998; Bonkovsky *et al.*, 1998; Bulaj *et al.*, 2000). La presencia de la mutación C282Y en un alto porcentaje de pacientes con PCT ha indicado que el gen HFE juega un papel importante en la sobrecarga de hierro de la PCT, y solo en aquellos países donde la frecuencia de la mutación C282Y es muy baja, el metabolismo anómalo de hierro asociado en éstos pacientes se daría por otros factores (Ivanova *et al.*, 1999; Furuyama *et al.*, 1999).

6.1.2.1.2.-Porfiria variegata (PV)

La porfiria variegata es un tipo de porfiria dominante con baja penetrancia causada por mutaciones en el gen protoporfirinógeno oxidasa (PPOX). Esta enfermedad es muy infrecuente excepto en Sud-África donde debido a un efecto fundador la mayoría de los pacientes con PV descienden de un único ancestro con la mutación R59W del gen PPOX (OMIM 172600).

Se ha descrito que pacientes con PV que presentan además de mutaciones en el gen PPOX mutaciones en el gen HFE presentan un fenotipo más severo de la enfermedad (de

Villiers *et al.*, 1999a). En este estudio se identificó un paciente con PV severa con la mutación R59W del gen PPOX y además era heterocigoto compuesto para las mutaciones del gen HFE H63D y Q127H.

6.1.2.2.-NASH (*non-alcoholic steatohepatitis*, esteatohepatitis no alcohólica)

Dos estudios recientes han mostrado una alta prevalencia de la mutación C282Y, en heterocigosis y en homocigosis, en pacientes con NASH (George *et al.*, 1998; Bonkovsky *et al.*, 1999). No obstante, no todos los pacientes con NASH y con sobrecarga de hierro presentan la mutación C282Y; por lo tanto otros factores deben estar implicados en la sobrecarga de hierro de estos pacientes. En ambos estudios se observó un aumento de fibrosis en pacientes con NASH que presentaban la mutación C282Y, sin embargo en otro estudio no se encontró un incremento en la severidad de la enfermedad causada por la sobrecarga de hierro en pacientes con NASH evaluados durante 20 años (Younossi *et al.*, 1999). Por lo tanto todavía no se sabe si el incremento en la frecuencia de las anomalías en el metabolismo del hierro encontrada en los dos primeros estudios representa una verdadera asociación entre la presencia de la mutación C282Y y NASH o no. Si existiese dicha asociación la terapia de flebotomías para reducir el exceso de hierro sería un tratamiento a tener en cuenta en los pacientes con NASH. Como las flebotomías son un tratamiento barato, seguro y sencillo se ha propuesto que esta terapia podría ser evaluada prospectivamente en un gran grupo de pacientes con NASH (Bacon, 2001).

6.1.2.3.-Hepatitis vírica

Desde hace tiempo se sabe que existe una relación entre la concentración de hierro hepático (HIC) y la respuesta al tratamiento con interferón en pacientes con hepatitis vírica. Múltiples estudios han demostrado que aquellos pacientes con hepatitis vírica que no responden a la terapia del interferón presentan unos valores medios de HIC mayores que los pacientes que sí responden a la terapia (Van Thiel *et al.*, 1994; Olynyk *et al.*, 1995; Piperno *et al.*, 1996; Fargion *et al.*, 1997). Así pues una primera terapia de flebotomías para depleccionar los niveles de hierro en estos pacientes mejora la respuesta a una posterior terapia con interferón (Fong *et al.*, 1998; Fontana *et al.*, 2000; Di Bisceglie *et al.*, 2000). Existen algunas evidencias que sugieren que un incremento en el HIC está asociado a un incremento en la fibrosis hepática en pacientes con hepatitis vírica C (Beinker *et al.*, 1996; Smith *et al.*, 1998; Martinelli *et al.*, 2000; Negro *et al.*, 2000). En estudios recientes se han analizado las mutaciones en el gen HFE en pacientes con hepatitis vírica C sin que se observara ninguna diferencia en la prevalencia de la mutación C282Y ni H63D entre pacientes y controles (Smith *et al.*, 1998; Piperno *et al.*, 1998b; Hezode *et al.*, 1999; Kazemi-Shirazi *et al.*, 1999; Fontana *et al.*, 2000; Martinelli *et al.*, 2000). En algunos de estos trabajos se describe que la presencia de la/s mutación/es del HFE, especialmente la C282Y, en pacientes con hepatitis C esta asociada con un incremento de la fibrosis y cirrosis (Smith *et al.*, 1998; Martinelli *et al.*, 2000), mientras que en otros estudios no se ha encontrado esta asociación (Hezode *et al.*, 1999; Kazemi-Shirazi *et al.*, 1999; Negro *et al.*, 2000). Así pues se necesitan más estudios para evaluar el papel de las mutaciones del gen HFE

y del hierro en pacientes con hepatitis vírica C y para evaluar si una terapia a largo plazo por flebotomías en estos pacientes disminuye la progresión de la fibrosis hepática.

6.1.2.4.-Enfermedad hepática alcohólica (*Alcoholic liver disease*)

Aproximadamente el 50% de pacientes con enfermedad hepática alcohólica presentan anomalías en el metabolismo del hierro, que normalmente se refleja en un incremento en los niveles de ferritina en el suero, aunque ocasionalmente algunos pacientes pueden presentar un incremento en la saturación de transferrina. La concentración de hierro hepático (HIC) es normal o ligeramente elevada, aunque no hasta los valores que se detectan en la HH (Chapman *et al.*, 1982). A pesar de estas anomalías en el metabolismo del hierro varios estudios han concluido que las mutaciones C282Y y H63D no están incrementadas en pacientes con enfermedad hepática alcohólica comparado con la población control. Además no existe ninguna relación entre las mutaciones del gen HFE y los niveles de hierro hepático en estos pacientes (Grove *et al.*, 1998). Por lo tanto aunque muchos pacientes con enfermedad hepática alcohólica presentan anomalías del metabolismo del hierro en suero y algunos tienen una concentración de hierro hepático elevada, parece ser que otros mecanismos no relacionados con el gen HFE son responsables de dichas irregularidades.

6.1.2.5.-Diabetes mellitus tipo 2

Una de las complicaciones asociadas a la HH es la diabetes, por lo que se ha estudiado si la Hemocromatosis o las mutaciones en el gen HFE están presentes en pacientes con diabetes mellitus tipo 2. Los resultados de dichos estudios son contradictorios ya que algunos apuntan a que sí que existe una prevalencia incrementada de Hemocromatosis hereditaria en pacientes con diabetes tipo 2 (Phelps *et al.*, 1989; Salonen *et al.*, 1998; Kwan *et al.*, 1998) mientras que otros concluyen que no (Turnbull *et al.*, 1997; Frayling *et al.*, 1998; Dubois-Laforgue *et al.*, 1998; Braun *et al.*, 1998; Hegele *et al.*, 1998).

6.1.2.6.-Enfermedad coronaria (CHD, *coronary heart disease*)

El exceso de hierro se ha descrito como un factor en el desarrollo de la enfermedad coronaria (CHD *coronary heart disease*) ya que el hierro desencadena la formación de radicales libres muy reactivos que pueden iniciar el fenómeno de lipoperoxidación. La lipoperoxidación causa la modificación de las LDL (lipoproteínas de baja densidad) que son fagocitadas por los macrófagos, que pueden depositarse en el endotelio de las arterias formando placas arterioscleróticas (Rasmussen *et al.*, 2001). También se ha descrito que los radicales libres por si solos pueden dañar las células del endotelio de las arterias (Beckman *et al.*, 1990). Además la pérdida de hierro por la menstruación se ha propuesto como la base de una baja incidencia de enfermedad cardiovascular en mujeres jóvenes, ya que la menstruación explicaría las diferencias de incidencia de la enfermedad coronaria por sexo y el incremento de esta incidencia en mujeres post-menopáusicas (Sullivan, 1981).

Estos datos han llevado al estudio de las mutaciones del gen HFE, sobretodo de la mutación C282Y, en pacientes con enfermedad coronaria. Los resultados de estos estudios son contradictorios ya que algunos apuntan hacia que la heterocigosidad para la mutación C282Y está asociada con un mayor riesgo de padecer una enfermedad coronaria (CHD) (Roest *et al.*, 1999; Tuomainen *et al.*, 1999; Rasmussen *et al.*, 2001) mientras otros no encuentran una asociación de dicha mutación con la CHD (Nassar *et al.*, 1998; Franco *et al.*, 1998; Calado *et al.*, 2000; Battiloro *et al.*, 2000; Nielsen *et al.*, 2001).

6.1.2.7.-Enfermedades neurodegenerativas

En la enfermedad de Alzheimer (AD, *Alzheimer disease*) se ha constatado que existe una acumulación de hierro en el cerebro. Debido al alto porcentaje de la población que es portadora de una de las mutaciones del gen HFE (C282Y y H63D) se ha investigado el papel de estas mutaciones en la AD, concluyéndose que la presencia de mutaciones en el gen HFE pueden alterar el metabolismo del hierro en el cerebro e influenciar en la edad de inicio de la enfermedad, la incidencia y la progresión de la enfermedad de Alzheimer (Connor *et al.*, 2001).

6.2.-La mutación H63D

La mutación H63D consiste en un cambio de C por G en el nucleótido 187 situado en el exón 2 del gen HFE. La mutación provoca el cambio del aminoácido histidina (His) por aspartato (Asp) en el aminoácido número 63 de la proteína hfe (Feder *et al.*, 1996).

Desde su descubrimiento la mutación H63D ha suscitado controversia sobre su verificación como tal o su consideración como un mero polimorfismo, debido a que la mutación se encuentra presente en la población Europea con una frecuencia relativamente alta (media de 14%).

Como ya se ha dicho, la mutación se encuentra en un porcentaje más elevado en estado heterocigoto compuesto con la mutación C282Y en pacientes que en controles (Feder *et al.*, 1996). Otros aspectos que apuntan hacia una participación de la mutación H63D en la enfermedad son:

- La mutación H63D esta asociada con un incremento en el porcentaje de individuos con saturación de transferrina mayor o igual a 45% (Beutler, 1997; Arya *et al.*, 1999).
- Se ha descrito que la mutación H63D impide el normal funcionamiento de la proteína hfe, y que esta mutación impediría el funcionamiento normal de disminución de la afinidad del receptor de la transferrina por la transferrina (Feder *et al.*, 1997).

6.2.1.-Penetrancia del genotipo heterocigoto compuesto C282Y/H63D

Se ha descrito que la penetrancia del genotipo heterocigoto compuesto es muy baja ya que el equilibrio Hardy-Weinberg predice en la población más heterocigotos compuestos que C282Y homocigotos y sólo un bajo tanto por ciento de heterocigotos compuestos presentan la enfermedad. Esta penetrancia ha sido estimada entre 0,44%-1,5% por varios grupos (Feder *et al.*, 1996; Jouanolle *et al.*, 1996).

6.3.-Origen de las mutaciones C282Y y H63D

Básicamente existen dos hipótesis sobre el origen de la mutación C282Y: la primera hipótesis postula que la mutación tiene un origen Celta, mientras que otra hipótesis postula que la mutación es de origen Vikinga.

Ya en 1980 se postuló un origen Celta de la mutación C282Y (Simon *et al.*, 1980). Los Celtas emergieron alrededor del año 1000 AC en la Europa del norte de los Alpes (Kruta, 1990) y colonizaron el centro, sudoeste y la región sud-central de Europa; la cultura, la lengua y la tecnología se propagó rápidamente a la gran mayoría del continente, llegando a Irlanda después del año 100 AC. Actualmente el término Celta se utiliza para describir el origen de esta condición de las poblaciones Irlandesa, Galesa y Bretona (Lucotte and Hazout, 1995).

El origen de la mutación C282Y ha sido estudiado recientemente por Lucotte y Mercier (2000) en un estudio donde recopilan 7293 controles de diferentes poblaciones Europeas de diversas publicaciones. Estos autores defienden la hipótesis del origen Celta de la mutación C282Y. En este estudio se muestra que la frecuencia alélica de la mutación C282Y está distribuida en una recta de regresión decreciente de norte a sur de Europa (Fig. 2). Además, al juntar las poblaciones según su descendencia se observa que las poblaciones con origen Celta (poblaciones de Irlanda, Sur de Gales, Jersey y de las regiones de Francia: Rennes, Brest, Sur de Finisterre y Bretaña) presentan una frecuencia global del alelo Y de la mutación C282Y del 8,5%, que es significativamente mayor que la reportada para poblaciones con origen Nórdico (6,8%), Findo-Húngara-Rusia (4,1%), Alemana (4,0%) o de población del Sur de Europa (2,4%) (Lucotte and Mercier, 2000).

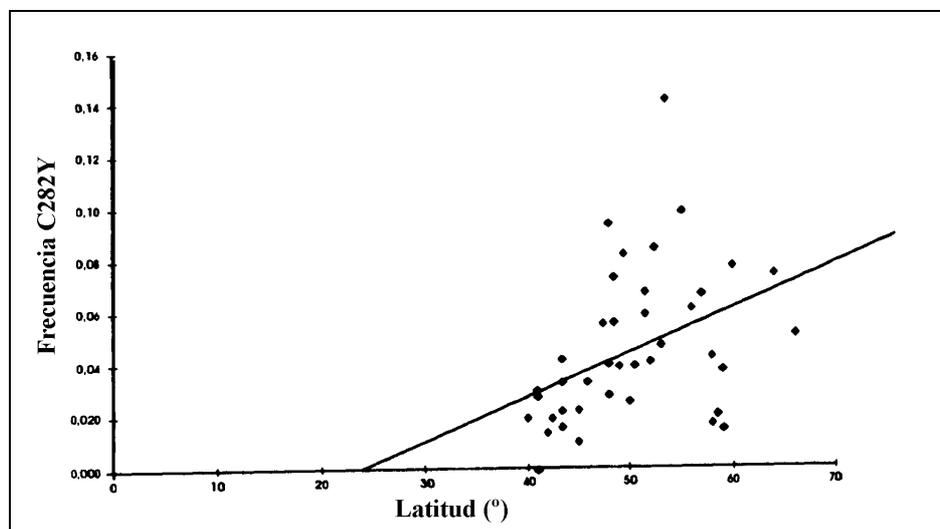


Figura 2. Correlación entre la frecuencia de la mutación C282Y y los grados de latitud norte de 40 poblaciones Europeas (Lucotte and Mercier, 2000).

También se aportan datos en los que se explica la baja frecuencia del alelo Y de la mutación C282Y en la población Vasca (1,6-1,9%; Mercier *et al.*, 1998a; Baiget *et al.*, 1998) debido al origen exclusivamente Mesolítico de esta población, en comparación con la mezcla entre Mesolíticos y Neolíticos que dió origen a la población Europea actual (Lucotte and Mercier, 2000). Por otro lado, el máximo valor de frecuencia alélica de la mutación C282Y se ha descrito en una población con clara ascendencia Celta (Irlanda, 14%, Ryan *et al.*, 1998).

Estos datos indican la posibilidad de la existencia de un origen ancestral común Celta de la mutación. La posterior diseminación de la mutación al resto de Europa posiblemente ocurrió con las migraciones de los Celtas por Europa (Kruta, 1990) durante la Edad de Hierro.

Mediante análisis de desequilibrio de ligamiento y la construcción de un haplotipo filogenético del cromosoma portador de la HH se ha estimado que la mutación C282Y se originó hace aproximadamente 59 generaciones (95% CI = 30-136) (Ajioka *et al.*, 1997), en otro estudio se describe que se originó hace aproximadamente 62 generaciones (95% CI = 39-85) (Thomas *et al.*, 1998). Asumiendo una media de tiempo de generación de 20 años, implica que la mutación apareció hacia el 600-800 DC, lo que sugiere que la mutación C282Y asociada con el haplotipo más común ocurrió en un periodo de la historia de la humanidad relativamente reciente. Este dato es interesante al tener que especular sobre el origen de la mutación C282Y y apunta más bien hacia un origen Vikingo de la mutación, ya que la expansión Celta ocurrió durante la segunda mitad del primer milenio AC (Cavalli-Sforza *et al.*, 1994), demasiado temprano para haber llevado la mutación C282Y, mientras que las intrusiones Vikingas en Europa empezaron alrededor del año 789 (Haywood J, 1995), por consiguiente coincidiendo con la fecha calculada de origen de la mutación C282Y. Así pues, estos datos apuntan hacia la teoría que la HH pueda ser debida a un origen Vikingo (Milman *et al.*, 1988, Merryweather-Clarke *et al.*, 2000).

Por estudios poblacionales se sabe que la mutación C282Y es muy frecuente en poblaciones del norte de Europa y en poblaciones con descendencia norte-europea, sin que se haya encontrado ninguna evidencia de que la mutación haya aparecido independientemente en poblaciones no europeas (Merryweather-Clarke *et al.*, 2000). También se sabe que la HH está asociada con un haplotipo predominante ancestral que incluyen los genes HLA A3 y B7 del MHC (complejo de histocompatibilidad) (Simon *et al.*, 1980; Porto and de Sousa, 2000). Así pues la mutación C282Y probablemente se originó en un cromosoma de un individuo europeo (celta o vikingo) que llevaba este haplotipo.

La amplia variedad de haplotipos con los que la mutación H63D está asociada, comparado con la mutación C282Y, sugiere que la mutación H63D sea la más antigua de las dos mutaciones (Ajioka *et al.*, 1997; Beutler and West, 1997; Thomas *et al.*, 1998), además la mutación H63D, a diferencia de la C282Y, se da en haplotipos que no se encuentran en la población europea, cosa que sugiere que la mutación H63D se ha originado más de una vez (Rochette *et al.*, 1999).

6.4.-Hipótesis de la ventaja selectiva de las mutaciones en el gen HFE

La gran prevalencia de la Hemocromatosis sugiere que ha existido una selección positiva, ya sea directamente para la mutación C282Y del gen HFE o para el haplotipo ancestral del MHC conservado con el que se asocia la mutación. La HH es una enfermedad que resulta en un exceso de hierro, aún así puede ser que confiera una ventaja selectiva en periodos de déficit nutricional de hierro o en estadios fisiológicos que requieren más hierro, como en el embarazo. Si el hierro fuese una fuente limitante en la dieta, aquellas personas heterocigotas tendrían una ventaja evolutiva. Esto sería así, particularmente, en el caso de favorecer la descendencia de mujeres con la mutación, ya que la mujer sufre una condición de déficit de hierro fisiológico por

la menstruación y en el periodo del embarazo; por lo que aquellas que presentasen la mutación no acusarían tanto la deficiencia de hierro y llevarían a cabo el embarazo con mayor éxito (Ritter *et al.*, 1984; Datz *et al.*, 1998). Así pues la mutación C282Y puede conferir alguna ventaja selectiva bajo condiciones de una dieta pobre, ante infecciones o en los embarazos múltiples, produciéndose una selección positiva de las mutaciones del gen HFE.

Respecto a una posible ventaja frente a infecciones se ha sugerido que debido a que la proteína HFE es una proteína de la superficie celular, ésta podría actuar como un receptor para agente patogénicos, por lo que las mutaciones que afectaran a su localización en la superficie o a la unión a un ligando podrían prevenir la infección (Rochette *et al.*, 1999), como ocurre en el caso de la mutación $\Delta F508$ de la fibrosis cística. La *Salmonella typhi*, el agente causante de la fiebre tifoidea, usa la proteína transmembrana de la fibrosis cística como receptor para entrar en las células epiteliales intestinales, pero la mutación $\Delta F508$ inhibe este proceso (Pier *et al.*, 1998).

Alternativamente, Thompson y Neel (1997) ha postulado que alelos asociados con fenotipos de enfermedad recesivas se espera que existan en una población con frecuencias muy variables. Por consiguiente, la tendencia genética y la expansión de la población pueden dar una explicación suficiente para la alta frecuencia del alelo C282Y en europeos del norte, en la ausencia de una selección positiva, y por lo tanto la alta frecuencia de la mutación podría ser debida a la casualidad y no existiría una fuerza selectiva hacia la mutación.

6.5.-Otras mutaciones y polimorfismos en el gen HFE

Desde el descubrimiento del gen HFE como responsable de la mayoría de los casos de HH, muchos trabajos han versado sobre la secuenciación y la búsqueda de nuevas mutaciones que pudiesen explicar aquellos casos en los que no se diesen los genotipos C282Y/C282Y ni C282Y/H63D. De estos trabajos se han derivado el hallazgo de varias nuevas mutaciones y polimorfismos (ver tabla 5). A parte de la mutación C282Y y la H63D, la mayoría de las nuevas mutaciones descritas hasta la fecha son muy poco frecuentes y están restringidas a familias o individuos concretos, hallándose en un genotipo heterocigoto compuesto con la mutación C282Y o H63D.

6.5.1.-Mutaciones no sinónimas (*missense*)

A parte de las mutaciones C282Y y H63D se han descrito otras mutaciones que comportan un cambio de aminoácido (mutaciones no sinónimas o *missense*). Algunas de estas mutaciones se han descrito en pacientes con sobrecarga de hierro, mientras que otras no tiene una asociación probada con la enfermedad y pueden ser simples variantes o polimorfismos. Excepto para las mutaciones C282Y y H63D no se han realizado estudios funcionales de las demás mutaciones descritas por lo que no se sabe la importancia de dichas mutaciones en el gen HFE.

S65C:

Mutación localizada en el exón 2 del gen HFE, consiste en el cambio 193A→T que comporta un cambio aminoacídico de serina por cisteína. Fue identificada en un hijo gemelo asintomático de un paciente homocigoto para la C282Y (Henz *et al.*, 1997) y se pensó que sería un polimorfismo no asociado con la enfermedad.

En un estudio de Mura y colaboradores en el que se analizaba 711 pacientes de HH y 410 controles se describe que la mutación S65C esta significativamente más presente en pacientes con al menos un cromosoma sin una mutación asignada (7.8% de los cromosomas HH que no presentaban ni C282Y ni H63D). Esta mayor presencia de la mutación en HH pacientes sugiere que la mutación esta asociada con una forma moderada de Hemocromatosis. Este estudio también describe que la mutación S65C no se encuentra en cromosomas portadores de la mutación C282Y o H63D (Mura *et al.*, 1999).

Varios estudios han detectado la presencia de la variante S65C en pacientes con HH no homocigotos para la C282Y (Bernard *et al.*, 1998; Barton *et al.*, 1999).

La mutación S65C fue encontrada en un 3% de los pacientes con porfiria variegata (PV) sin la mutación típica en el gen de la protoporfirinógeno oxidasa (PPOX, R59W) y en 1 de 73 pacientes positivos para la mutación R59W (de Villiers *et al.*, 1999a).

También se ha identificado a un paciente con sobrecarga de hierro dismetabólica, heterocigoto para la mutación S65C, en este estudio la mutación no se observó en ningún cromosoma de 96 portadores de la mutación C282Y (Douabin *et al.*, 1999). Worwood y colaboradores han descrito un caso de una mujer con déficit de hierro heterocigota para la mutación S65C y H63D (Worwood *et al.*, 1999).

Estudios realizados en diferentes población incluida la española apuntan a una baja frecuencia de esta mutación (1,5-5,5%) (Rochette *et al.*, 1999; Remacha *et al.*, 2000). La mutación S65C no se ha detectado en la población normal del Sud-este asiático ni en la población de Sri Lanka (Rochette *et al.*, 1999).

G93R:

La mutación *missense* G93R está causada por una transversión de guanina a citosina en el nucleótido 277 del cDNA del gen HFE (exón 2) y provoca una sustitución del aminoácido glicina por arginina. Fue identificada, tras la secuenciación de los exones 2, 3, 4 y 5 del gen HFE, en un paciente de HH de 20 estudiados no homocigotos para la C282Y ni la H63D, ni heterocigotos compuestos. En dicho paciente esta mutación está presente en heterocigosis compuesta con la mutación C282Y. Esta mutación también se encontró en una hermana haploidentica del paciente y con HH. La mutación no estaba presente en 176 controles (Barton *et al.*, 1999).

I105T:

La mutación I105T fue descubierta en el mismo estudio realizado por Barton y colaboradores (1999) que condujo a la identificación de la mutación G93R. La mutación I105T consiste en una transición de timina por citosina en posición 314 en el exón 2 del gen HFE y comporta una substitución aminoacídica de isoleucina por triptófano. La mutación fue hallada en uno de los pacientes (hombre) en heterocigosis compuesta con la mutación H63D. Un

estudio familiar demostró que estas dos mutaciones segregan independientemente. La hermana y una hija del probando eran heterocigota para la mutación I105T. La mutación I105T está en el haplotipo HLA-A3 y HLA-B7, el mismo haplotipo que está asociado con el haplotipo ancestral de la HH (Crawford *et al.*, 1995). La mutación no estaba presente en 176 controles (Barton *et al.*, 1999).

Q127H:

La mutación Q127H consiste en el cambio nucleotídico de adenina por citosina en posición 371 (371A→C) en el exón 3 del gen HFE y supone el cambio del aminoácido glutamina por histidina. Esta mutación se encontró en heterocigosis compuesta con la mutación H63D en un paciente con porfiria variegata (PV, ver 6.1.2.1.2) severa quién también es portador de la mutación R59W en el gen PPOX (de Villiers *et al.*, 1999a). La mutación R59W es la mutación más frecuente del gen PPOX y causa porfiria variegata, una enfermedad de herencia dominante (ver 6.1.2.1.2) (Meissner *et al.*, 1996; Warnich *et al.*, 1996).

V53M y V59M:

V53M (157G→A) y V59M (175G→A) son sustituciones de aminoácidos equivalentes, una valina por una metionina, causada por la transición de una guanina a una adenina en exón 2 del gen HFE. La mutación V53M se identificó en 8 de 458 controles de población negra de Sud-África y población bushmana. La mutación V59M se encontró en único caso de entre 102 controles caucásicos en el mismo estudio en la población de Sud-África (de Villiers *et al.*, 1999a). Estos dos cambios se dan en un residuo aminoacídico conservado en humano ratón y rata, pero aún no se ha determinado si alguno juega algún papel en el control del metabolismo del hierro (de Villiers *et al.*, 1999a).

V272L:

La sustitución V272L (814G→T) se encuentra en el exón 4 del gen HFE y consiste en una transversión de guanina a timina que resulta en un cambio de aminoácidos equivalentes valina por leucina. La mutación se identificó por análisis de heteroduplex (Worwood *et al.*, 1999). Esta mutación destruye el sitio control de corte del enzima RsaI que verifica la digestión completa de la PCR que se utiliza normalmente para la determinación de la mutación C282Y (Worwood *et al.*, 1997). No se ha encontrado evidencia de la presencia de esta variante en 253 pacientes de HH (Pointion *et al.*, 2000).

E277K:

El polimorfismo E277K (829G→A) se encuentra en el exón 4 del gen HFE y consiste en una transición de guanina a adenina que resulta en una sustitución de aminoácidos en este caso no equivalentes: ácido glutámico por lisina. Este cambio se encontró en un paciente diabético asiático de 58 años sin evidencia de sobrecarga de hierro y sin las mutaciones C282Y, H63D o S65C. Esta variante no se encontraron en 400 pacientes diabéticos, 130 pacientes de Hemocromatosis ni en 50 controles (Bradbury *et al.*, 2000).

Tabla 5. Mutaciones y polimorfismos del gen HFE.

Cambio	A(+1)GT	Localización	Enzima de restricción	Comentarios	Referencia
-1206 G-C	-1206	5'	-BbvI		Pointon et al. 2000
-970 T-G	-970	5'		En un paciente con HH atípica	Pointon et al. 2000
-825 G-A	-825	5'	-CviJI	En un paciente asiático	Pointon et al. 2000
-467 G-C	-467	5'	+AflIII/+Tail		Pointon et al. 2000
-370 A-T	-370	5'	MseI/AflII	En un paciente HH atípico	Pointon et al. 2000
-7 T-C	-7	5' UTR	+NciI	En un paciente con síndrome dismetabólico de hierro	Doubain et al. 1999
IVS1 +112 A-T	188	Intrón 1		En un paciente HH atípico, 1 paciente Asiático y 2 familiares H63D heterocigotos	Pointon et al. 2000
IVS1 +1146 G-T	1222	Intrón 1	+Bmri	En un paciente HH atípico	Pointon et al. 2000
IVS1 -680 A-T	2724	Intrón 1		En un paciente HH atípico	Pointon et al. 2000
H28H, 84 C-T	3411	Exón 2		En un paciente portador de C282Y	Liechti-Gallati et al. 1999
V53M, 157 G-A	3484	Exón 2	+NlaIII/-Maell	En población de Sud-Africa y bushmana	de Villiers et al. 1999a
V59M, 175 G-A	3502	Exón 2	+NlaIII	En 1 de 102 controles caucasicos de Sud-África	de Villiers et al. 1999a
H63D , 187 C-G	3514	Exón 2	-MboI	Mutación implicada en algunos casos de HH en heterocigosis compuesta con C282Y	Feder et al. 1996
H63H, 189 T-C	3516	Exón 2	-NlaIII	Mutación silenciosa detectada en población Sud-Africana	de Villiers et al. 1999a
S65C , 193 A-T	3520	Exón 2	-Hinf I	Identificada por 1ª vez en un familiar de un paciente C282Y homocigoto	Henz et al. 1997
V68, 203delT	3530	Exón 2	+MwoI	En un paciente C282Y heterocigoto	Liechti-Gallati et al. 1999
G93R , 277 G-C	3604	Exón 2		En dos hermanos con HH heterocigotos para esta mutación y para C282Y	Barton et al. 1999
I105T , 314 T-C	3641	Exón 2		En un paciente HH heterocigoto para esta mutación y para H63D	Barton et al. 1999
IVS2 +4 T-C	3671	Intrón 2	+Tail/ +RsaI	Alelo T asociado con mutación C282Y	Beutler and West 1997
Q127H, 317 A-C	3917	Exón 3		En heterocigosis en pacientes con porfiria variegata	de Villiers et al. 1999a
P160dC, 478-480C	4014-6	Exón 3		Paciente HH heterocigoto para esta mutación sin otra mutación en gen HFE	Pointon et al. 2000
IVS3+1 G-T	4153	Intrón 3		Mutación de <i>splicing</i> en 1 familia Caucásica, heterocigotos compuesto con la mutación C282Y	Wallace et al. 1999
V212V, 636 G-C	5265	Exón 4	-HphI	En una mujer diabética con parámetros de hierro normales	Bradbury et al. 2000
V272L, 814G-T	5443	Exón 4	-RsaI	En un individuo, destruye diana RsaI en el analisis de la mutación C282Y	Worwood et al. 1999
E277K, 829 G-A	5458	Exón 4	-MboII	En un hombre asiático diabético con parámetros de hierro normales	Bradbury et al. 2000
C282Y , 845 G-A	5474	Exón 4	+RsaI	Mutación causante de la mayoría de los casos de HH	Feder et al. 1996
IVS4 +48 G-A	5569	Intrón 4	+MseI	En <i>primer</i> diseñado por Feder et al. 1996 y usado para la detección dela mutación C282Y	Totaro et al. 1997
IVS4 -50 A-G	5630	Intrón 4	-Fok I	En la población Sud-Africana	de Villiers et al. 1999a
IVS4 -44 T-C	5636	Intrón 4	+HaeIII / -DdeI/ +Sau96I		Beutler and West 1997
R330M, 989 G-T	5776	Exón 5	NlaIII/DrdII	En un paciente de HH negativo para C282Y y H63D	de Villiers et al. 1999a
IVS5 +14 A-G	5807	Intrón 5		En un paciente HH atípico	Barton et al. 1999
IVS5 -398 G-T	6359	Intrón 5	EspI/+DdeI	En un paciente HH atípico	Doubain et al. 1999
IVS5 -47 A-G	6700	Intrón 5	+BanI / NlaI	Alelo G asociado con la mutación C282Y	Beutler and West 1997
IVS6 +426 A-G	8227	Intrón 6	BdeMJ	En un paciente HH atípico	Pointon et al. 2000
G-C base 124	9081	Exón 7, 3'UTR	-BsaMI	Frecuencia alélica G 90%, C10%	Doubain et al. 1999
C-T	9379	Poly A+5	-RsaI		Rochette et al. 1999

+ creación de diana de restricción por la mutación o polimorfismo. - destrucción de diana de restricción por la mutación o polimorfismo. IVS variante de secuencia intrónica (*intron variant sequence*). En negrita se presentan las mutaciones que se han implicado en la patogénia de la HH.

R330M:

La mutación R330M (989 G→T), en el exón 4, consiste en la sustitución de una arginina por una metionina en una posición conservada debido a la transversión de una guanina por una timina. La mutación se identificó en heterocigosis en un paciente de HH negativo para las mutaciones H63D y C282Y y en el que no se identificó ninguna otra mutación. Este cambio no está presente en 40 controles (de Villiers *et al.*, 1999a). El papel de esta mutación en el metabolismo del hierro todavía no se ha investigado.

6.5.2.-Mutaciones del sitio de *splicing*

Hasta la fecha sólo se ha descrito una única mutación de sitio de *splicing* (IVS3 + 1G→T) en un paciente de HH heterocigoto para la mutación C282Y, este paciente presenta cirrosis hepática, siderosis hepatocelular de grado +4 y un índice de hierro hepático de 5.0 (Wallace *et al.*, 1999). La mutación consiste en una transversión de guanina a timina. Tanto el probando como su hermana son heterocigotos compuestos para esta mutación y la C282Y y afectados de HH. El estudio familiar mostró que las mutaciones C282Y y IVS3+ 1G→T segregan independientemente. La hija del probando ha heredado la mutación IVS 3 + 1 G→T en ausencia de la C282Y y presenta valores de hierro normales a la edad de 22 años. La mutación causa la omisión del exón 3 con el resultado del exón 2 unido al exón 4. Trescientos sesenta y cinco europeos, incluyendo 50 heterocigotos para la C282Y son negativo para esta mutación. Esta mutación parece ser exclusiva de esta familia.

6.5.3.-Mutaciones sinónimas

Se han identificado tres mutaciones sinónimas. La H28H (84C→ T), una transición citosina a timina en el exón 2 se encontró en un heterocigoto para la C282Y (Liechti-Gallati *et al.*, 1999). La mutación sinónima H63H (189T →C) afecta el mismo codón que la mutación H63D (de Villiers *et al.*, 1999a; Bradbury *et al.*, 2000). Esta mutación es indistinguible de la H63D por el análisis de PCR seguido de corte con enzima de restricción, en ambos cambios (H63D y H63H) se destruye la diana. La mutación V212V (636G→C) es un cambio de una guanina a una citosina, está situada en el exón 4 y se encontró en uno de 400 diabéticos (Bradbury *et al.*, 2000). No hay ninguna evidencia de que estas mutaciones tengan algún papel en la HH.

6.5.4.-Mutaciones con cambio de la pauta de lectura

Hasta la fecha se han detectado dos mutaciones que alteran el marco de lectura de la proteína HFE, ambas son deleciones y están asociadas con HH.

Una deleción en heterocigosis de una citosina (P160ΔC) en el exón 3 del gen HFE en un paciente del Reino Unido parece causar HH (Pointon *et al.*, 2000). Este paciente tenía el diagnóstico de HH confirmado por biopsia hepática. La deleción P160ΔC causa un cambio en la pauta de lectura y introduce un codón de terminación o *stop* prematuro 50 aminoácidos después de la deleción. Este paciente no tiene ninguna otra mutación en la zona codificante del

gen HFE identificada hasta la fecha. En el cribado de 206 caucásico y 110 asiáticos no se identificó ningún caso de esta misma delección. Es probable que esta mutación sea exclusiva de este individuo.

Un segundo caso de delección de un nucleótido se encontró en el exón 2 del gen HFE, V68ΔT. Esta delección causa un cambio en la pauta de lectura que conlleva a una terminación prematura 19 aminoácidos después de la delección. Este cambio de pauta de lectura se encontró en un paciente de HH heterocigoto para la mutación C282Y (Liechti-Gallati *et al.*, 1999).

En ambos casos, el cambio del marco de lectura ocurre en el dominio $\alpha 2$ de la proteína, por lo que se supone que la proteína no se expresaría en la membrana celular ya que el dominio $\alpha 3$ no existiría y por lo tanto no interaccionaría con la proteína $\beta 2$ -microglobulina.

6.5.5.-Mutaciones y polimorfismos en el UTR

Se han descrito tres cambios en las regiones exónicas no codificantes o regiones no traducidas (UTR). La relevancia de estas variantes en el metabolismo del hierro es desconocida. Estos cambios son:

Una transición timina a citosina 7 nucleótidos antes del codón de iniciación (ATG) (-7T→C) en la región 5'UTR (Douabin *et al.*, 1999). En este estudio se encontró un paciente con síndrome dismetabólico de sobrecarga de hierro heterocigoto para esta mutación. Esta mutación no se encontró entre un grupo control de 88 cromosomas, ni en 18 pacientes HH homocigoto para la C282Y ni en 18 pacientes con síndrome dismetabólico de sobrecarga de hierro heterocigotos para C282Y.

Se han encontrado dos polimorfismos en la zona no codificante del exón 7 (3' UTR):

Una transición de citosina a timina cinco nucleótidos después de la señal de poliadenilización (poly A+5 C→T), nucleótido 2484 del mRNA (Rochette *et al.*, 1999). Este cambio presenta una frecuencia alélica del 32% en controles caucásicos y de un 16% en cromosomas con la mutación C282Y (Pointon *et al.*, 2000).

El segundo cambio es una transversión de guanina a citosina en el nucleótido 124 de exón 7 (nucleótido 2186 del mRNA) (Douabin *et al.*, 1999) que presenta una frecuencia alélica del 10% tanto en controles como en pacientes.

6.5.6.-Polimorfismos intrónicos

Se han encontrado varios polimorfismos intrónicos dialélicos en el gen HFE (Tabla 5). No se cree que estos polimorfismos estén implicados con la HH.

La existencia del polimorfismo IVS4 +48A→G (5569G→A) (Totaro *et al.*, 1997) en el *primer* reverso de uso muy frecuente para la detección de la mutación C282Y por PCR es sin duda el más estudiado de los polimorfismos debido a que en un principio se pensó que generaba falsos resultados (de Villiers *et al.*, 1999b; Jeffrey *et al.*, 1999a; Somerville *et al.*, 1999). El polimorfismo se encuentra 5 nucleótidos antes del 3' del *primer* originalmente propuesto por Feder y usado en la amplificación y genotipado de la mutación C282Y (Jeffrey *et al.*, 1999a). Dependiendo de las condiciones de la PCR la presencia del polimorfismo puede afectar a la amplificación del DNA. Así pues, a temperatura de *annealing* de 60°C o mayores, la presencia

del polimorfismo en combinación con el *primer antisense* original resulta en poca o ninguna amplificación del DNA, mientras que a temperaturas más bajas de *annealing* (58°C) el polimorfismo no afecta a la amplificación (European Haemochromatosis Consortium 1999, Gómez *et al.*, 1999; Merryweather-Clarke *et al.*, 1999a; Noll *et al.*, 1999). Por lo tanto si el polimorfismo se encuentra en el alelo contrario a la mutación C282Y, como se ha reportado en diversos artículos (Merryweather-Clarke *et al.*, 1999a), su presencia resultaría en un falso diagnóstico del genotipado de la mutación C282Y, obteniéndose un genotipo homocigoto para la C282Y en individuos heterocigotos al no amplificarse el cromosoma con el polimorfismo (si se hace la PCR a 65°C). De esta manera se generaría una sobreestimación de homocigotos para la mutación C282Y. En el estudio de Thorstensen y colaboradores (2000) se encontró un caso en el que el polimorfismo estaba asociado con la mutación C282Y obteniéndose un genotipo normal, bajo las condiciones que provocan el fallo de la PCR, en un individuo heterocigoto para la mutación C282Y. La existencia de este polimorfismo y su posible implicación en la determinación del genotipado de la mutación C282Y ha provocado que varios estudios hayan reanalizado sus resultados (Gómez *et al.*, 1999; Jeffrey *et al.*, 1999a; Somerville *et al.*, 1999; Thorstensen *et al.*, 2000). La prevalencia del polimorfismo en la población control es alta 10,5%, lo que sugiere que el polimorfismo es muy frecuente (Gómez *et al.*, 1999). Los distintos artículos que han estudiado este polimorfismo y su implicación en el genotipado de la mutación C282Y recomiendan la utilización de un *primer* alternativo en el que no esté presente el polimorfismo, como el descrito en el artículo de Jeffrey y colaboradores (1999a), para evitar posibles errores en el diagnóstico en todos aquellos laboratorios en los que la detección de la mutación C282Y se base en la técnica de la PCR seguida de digestión enzimática (Thorstensen *et al.*, 2000).

La existencia de polimorfismos intrónicos tiene por tanto importancia al diseñar *primers* para cribar mutaciones y es importante saber sus localizaciones para evitar posibles resultados erróneos. Esto es aún más crucial cuando un alelo de un polimorfismo está en desequilibrio de ligamiento con la mutación a estudiar, como es el caso de algunos polimorfismos del gen HFE (Tabla 5).

Algunos de estos polimorfismos se han usado para establecer haplotipos en el gen HFE; este tipo de estudio puede ayudar en la comprensión de los orígenes de las mutaciones (Beutler and West, 1997; Aguilar-Martínez, *et al.*, 1999; Rochette *et al.*, 1999).

6.6-Pacientes negativos para las mutaciones en HFE (*non-HFE patients*)

Aún reconociendo la importancia de las mutaciones C282Y y H63D del gen HFE, éstas no explican la totalidad de los casos de Hemocromatosis familiar. Según estudios realizados de la detección de las mutaciones C282Y y H63D presentes en pacientes afectados por HH en diferentes poblaciones existe una proporción de dichos enfermos que no presentan los genotipos del gen HFE asociados con la enfermedad (C282Y/C282Y, C282Y/H63D). La existencia de otras mutaciones descritas en el gen HFE a parte de la C282Y y H63D parece que son puntuales y exclusivas de un determinado paciente o familia (ver 6.5). En Italia es donde se ha publicado el número de casos de HH sin los genotipos asociados a la enfermedad más elevado (más del 31% sin el genotipo C282Y/C282Y) (Piperno *et al.*, 1998a), en este país es donde se han

reportado otros tipos de Hemocromatosis como la Hemocromatosis Juvenil o la Hemocromatosis tipo 3 y 4, entidades que no están asociadas con el gen HFE.

Se ha descrito que la detección de pacientes de HH sin los genotipos C282Y/C282Y o C282Y/H63D puede ser debido a un mal diagnóstico de Hemocromatosis primaria en aquellos pacientes que presentan al menos una causa secundaria potencial de sobrecarga de hierro como es la hepatitis vírica C o B, un exceso de alcohol y/o un uso exógeno de hierro (Shaheen *et al.*, 1998). No obstante aún realizando un exhaustivo estudio clínico y genético de la región codificante del gen HFE parece ser que existe un bajo porcentaje de pacientes bien diagnosticados de HH en los que no se ha detectado cual sería la causa genética responsable de su enfermedad. Esto indicaría que otras mutaciones en regiones no secuenciadas del gen HFE (promotor, UTRs) o presentes en otros genes de la región 6p o de otros cromosomas son responsables de estos casos. De estos estudios se desprende que es imprescindible un buen estudio clínico de los pacientes con HH para excluir posibles causas secundarias de sobrecarga de hierro, así como otros tipos de Hemocromatosis no relacionados con el gen HFE, ya que la inclusión de estos pacientes en los estudios de detección de mutaciones del gen HFE bajaría la frecuencia de las mutaciones C282Y y H63D encontradas en dicho gen.

6.7.-Técnicas de detección de las mutaciones del gen HFE

Debido a la gran cantidad y variedad de métodos utilizados para la detección de las mutaciones del gen HFE, principalmente C282Y y H63D, he considerado oportuno introducir esta sección en mi tesis.

6.7.1.-PCR seguida de digestión enzimática

Este método no requiere de equipamiento especializado y es probablemente el más utilizado en los laboratorios para la detección de las dos mutaciones.

La mutación C282Y crea una diana de restricción RsaI o SnaBI y la mutación H63D destruye una diana MboI o BclII, por lo que los alelos normales y mutados pueden ser fácilmente reconocidos en base al tamaño de los fragmentos una vez digeridos con el enzima adecuado y sometidos a electroforesis en un gel de agarosa. Muchos laboratorios utilizan los *primers* descritos por Feder y colaboradores en el artículo que describe el descubrimiento del gen HFE (Feder *et al.*, 1996). Si embargo es importante la selección de los *primers* y el enzima de restricción para que el producto de PCR contenga un sitio de restricción adicional al creado o destruido por la mutación, para usarlo de control interno. Así pues para mutación C282Y se utiliza el enzima RsaI en vez del SnaBI que es de corte menos frecuente con los *primers* descritos originalmente por Feder y colaboradores (1996) (Tabla A1.1). Para la mutación H63D es mejor rediseñar los *primers* para que en el producto de PCR se incluya otra diana MboI (Merryweather-Clarke *et al.*, 1997a; Worwood *et al.*, 1997). Debido a la polémica sobre la utilización del *primer* reverso descrito por Feder y colaboradores (1996) en esta técnica se ha recomendado no utilizar *primers* que comprendan polimorfismos conocidos y muchos laboratorios han rediseñado este *primer* (Jeffrey *et al.*, 1999a) (Tabla A1.1).

6.7.2.-PCR con *primers* de secuencia específica

Los métodos en los que el alelo normal y mutado son diferenciados por los *primers* de la PCR permiten una detección de la mutación sin la aplicación posterior a la PCR de ninguna técnica adicional.

Mullighan y colaboradores (1998) usan *primers* alelo específicos para la detección de las mutaciones H63D y C282Y empleando 4 reacciones de PCR para determinar ambos genotipos y si las mutaciones se encuentran en *cis* o *trans*.

Merryweather-Clarke y colaboradores (1997b) desarrolló un método de PCR con *primers* mutados (MS-PCR *mutagenically separated polymerase chain reaction*) para la detección de la mutación C282Y en el que los alelos se diferenciaban por tamaño.

Otro método de PCR alelo específico para la detección de la mutación C282Y fue descrito por Takeuchi y colaboradores (1997). Dos *primers* comunes amplifican un producto común y dos *primers* alelos específicos en orientación opuesta y no solapantes amplifican el producto alelo específico de tamaño diferente. Métodos parecidos han sido desarrollados para la mutación C282Y y la mutación H63D, requiriéndose 2 PCR para la detección de cada mutación (Smillie D, 1998; Guttridge *et al.*, 1998; Steffensen *et al.*, 1998).

El método ARMS (*multiple amplification refractory mutation system*) precisa de dos PCR para el genotipado de las dos mutaciones (Baty *et al.*, 1998). Este es probablemente el método de este tipo más eficaz para el análisis de pacientes con sospecha de HH y sus familiares, ya que precisa de menos reactivos y tiempo.

Otro método descrito para la detección de la mutación C282Y es el método AGRS (*amplification generating restriction site*). Esta técnica consiste en el diseño de *primers* mutados y la generación de una diana de restricción (KpnI en este caso) según se amplifique uno u otro alelo de la mutación (Andrikovics *et al.*, 1999).

También se ha descrito un ensayo que combina la PCR múltiple con *primers* mutados y la utilización de enzima de restricción. Mediante este ensayo permite el genotipado de ambas mutaciones (C282Y y H63D) tras una PCR múltiple y una digestión enzimática con el enzima BbrPI (Stott *et al.*, 1999).

6.7.3.-Hibridación con oligonucleótidos alelo específicos (ASOH) y hibridación reversa.

El método de hibridación con oligonucleótidos alelo específico (*allele-specific oligonucleotide hybridization*, ASOH) consiste en la generación de *dot blots* con el producto de PCR de la región mutada de cada individuo a analizar y la hibridación con oligonucleótidos alelo específicos marcados radiactivamente (Beutler *et al.*, 1996). También se han descrito variaciones de este método como la PCR-SSOP (*PCR-based sequence-specific oligonucleotide probe*) en la que se amplifica una gran región genómica por PCR que contine una o varias mutaciones y posteriormente se hibrida con sondas alelo específicas marcadas con digoxigenina (Murphy *et al.*, 1998).

En el mercado existen varios métodos comerciales basados en tiras reactivas para la detección de las mutaciones del gen HFE, estos métodos están basados en el ensayo de hibridación reversa. Oberkanins y colaboradores (2000) describen un método de hibridación

reversa para la detección simultánea de nueve mutaciones y polimorfismos del gen HFE. La variantes que se detectan con este test son: V53M, H63D, H63H, S65C, Q127H, E168X, E168Q y C282Y. El test está basado en tiras listas para su uso que contienen sondas de oligonucleótidos (14 y 26 pb) para cada alelo mutado y normal inmovilizadas en línea paralelas de un *array*. A partir de DNA del individuo a cribar se realizan PCR múltiples biotinilizadas que comprenden la secuencia a analizar del gen HFE. Las secuencias biotinilizadas son hibridadas sobre las tiras y el resultado se detecta por reacción colorimétrica del enzima conjugado a la estreptavidina. Este método puede ser adaptado a cubrir la detección de otras variantes del gen.

6.7.4.-SSCP (*single-strand conformational polymorphism*) y análisis de heteroduplex

La detección de las mutaciones C282Y y H63D por SSCP también es posible. Para ello se realiza una PCR múltiple de ambas mutaciones y los productos desnaturalizados son detectados por movilidad electroforética diferencial en geles no-desnaturalizantes tras una tinción con plata del gel de poliacrilamida (Hertzberg *et al.*, 1998, Simonsen *et al.*, 1999). La mutación S65C se puede detectar por este método (Simonsen *et al.*, 1999). Si se usan para cada mutación *primers* marcados con diferente fluorescencia los productos pueden ser detectados por capilaridad electroforética usando el sistema ABI Prism 310 CE (Bosserhoff *et al.*, 1999, Wenz *et al.*, 1999).

El análisis de heteroduplex aplicado a la detección de las mutaciones del gen HFE consiste en la amplificación por PCR del fragmento de DNA donde reside la mutación en la presencia de un generador de heteroduplex, que es la misma secuencia pero con la delección de codón situado justo en el extremo 5' de la mutación C282Y (Jackson *et al.*, 1997). Los heteroduplex generados durante la PCR tienen diferente movilidad en presencia o ausencia de la mutación y el análisis puede ser hecho en geles de poliacrilamida teñidos con plata o semi-automáticamente con capilares de electroforesis usando un analizador genético ABI Prism 310. Por este método se detectó la variante del exón 4 V272L (815G→T) (Worwood *et al.*, 1999). El análisis por heteroduplex de la mutación H63D detecta también la mutación S65C.

Una combinación del análisis por heteroduplex y de SSCP se usó en la búsqueda de las mutaciones C282Y y H63D en pacientes y controles. En este estudio además se detectó la presencia de 4 mutaciones *missense* en la región codificante y 3 polimorfismos intrónicos (de Villiers *et al.*, 1999a); lo que demuestra las ventajas del uso de este tipo de métodos para detectar nuevas mutaciones en la secuencia analizada.

6.7.5.-Métodos semi-automatizados o automatizados

Debido al interés que suscita un cribado poblacional a gran escala de la mutación C282Y del gen HFE, la utilización de tecnología automatizada ha adquirido una gran relevancia ya que esta tecnología resulta esencial para lograr una mayor rapidez y fiabilidad de los genotipados en un análisis a gran escala.

El primer método de detección de mutaciones en el gen HFE fue el ensayo de ligación de oligonucleótidos (*oligonucleotide ligation assay*, OLA) (Feder *et al.*, 1996). Este método de detección de mutaciones consiste en la detección del alelo mutado o normal por ligación de un

oligonucleótido biotinilizado a un oligonucleótido marcado con digoxigenina y unido al fragmento de PCR desnaturalizado en el sitio de la mutación (Delahunty *et al.*, 1996). El producto de la PCR es capturado en placas recubiertas de estreptavidina y la existencia de ligación se detecta por una reacción enzimática acoplada a un anticuerpo anti-digoxigenina. El método es complejo pero puede ser realizado automáticamente. Aunque esta técnica no se utiliza habitualmente, los *primers* diseñados originalmente son de uso muy frecuente en la detección de las mutaciones del gen HFE por otros métodos.

Se ha descrito la utilización de microplacas de capilares de electroforesis para separar productos de PCR digeridos con enzimas de restricción en la detección de la mutación C282Y (Woolley *et al.*, 1997; Simpson *et al.*, 1998). Los fragmentos se detectan con un escaner de fluorescencia cofocal. Este tipo de tecnología puede reducir el tiempo de análisis drásticamente con el análisis de 96 muestras en 8 minutos.

El método FNC (*first nucleotide change method*) consiste en la incorporación de nucleótidos marcados con fluoresceína a un *primer* biotinilado que esta junto al lado del sitio de la mutación. Los productos son capturados en una placa *microtiter* recubierta con estreptavidina y los resultados se detectan por colorimetría (Jazwinska *et al.*, 1996).

El análisis por SNUPE (*single nucleotide primer extension*) utiliza la extensión de un *primer* contiguo al sitio de la mutación por un nucleótido marcado radioactivamente y específico para el alelo normal o para el mutado. Los productos de SNUPE son purificados de los nucleótidos radiactivos libres y sometidos a electroforesis en un gel de poliacrilamida desnaturalizante y detectados por autoradiografía (Rhodes *et al.*, 1997).

También se ha descrito un análisis que combina los métodos FNC y SNUPE en el que los productos de PCR se capturan en una fase sólida, se utilizan *primers* biotinilados, la extensión se realiza con nucleótidos trititados y el resultado se detecta mediante contaje radioactivo con líquido de centelleo (Tuomainen *et al.*, 1999).

En 1997 se describió un nuevo método de *primer extension* y transferencia de energía de resonancia fluorescente desde un *primer* dador marcado a un dideoxinucleótido aceptor marcado que extiende la reacción (*fluorescence resonance energy transfer*, FRET) (Chen *et al.*, 1997). La monitorización de la reacción se puede realizar en una PCR de tiempo real o el método puede ser plaqueado y la fluorescencia leída en un lector de fluorescencia de placas. Las lecturas de fluorescencias son comparadas con aquellas de genotipos conocidos.

Otro método descrito para la detección de las mutaciones C282Y y H63D consiste en la realización de una PCR múltiple seguida de una detección por cromatografía desnaturalizante líquida o DHPLC (*denaturing high-performance liquid chromatography*) (Kaler *et al.*, 2000). En este método tras una amplificación de las dos mutaciones, los productos de la PCR son analizados bajo condiciones desnaturalizantes (60°C) con la adición y sin la adición de DNA con genotipo normal para determinar si las muestras homocigotas son normales o mutantes. El resultado de los posibles genotipos se detecta por los diferentes picos de los fragmentos eluidos. Devaney y colaboradores (2001) describen un método en el que se acopla la detección de las mutaciones por SNUPE a la detección por DHPLC.

Los métodos de *primer extension* de nucleótidos pueden ser adaptados para su detección con un alto rendimiento usando la tecnología del chip de DNA (Hacia and Collins, 1999). Oligonucleótidos *sense* y *antisense* modificados en N-terminal pueden ser acoplados de manera

ordenada en portaobjetos de vidrio (*arrays*) y hibridados a fragmentos de PCR desnaturalizados generados a partir de DNA genómico. Los portaobjetos son incubados con los 4 dideoxinucleótidos, cada uno marcado con un diferente fluoróforo, y con DNA polimerasa I. Después de los lavados, se escanean los portaobjetos. En el caso de una muestra homocigota, un dideoxinucleótido se incorpora y en el caso de una muestra heterocigota son incorporados 2 dideoxinucleótidos diferentes. El uso de robots y computadoras hacen de la tecnología del chip de DNA el método de elección para un futuro cribado poblacional, que posibilitaría la detección de individuos asintomáticos antes de cualquier complicación mediante su genotipado.

Todos estos métodos evitan la resolución de los productos de PCR en un gel de agarosa, pero requieren de una considerable manipulación post-PCR; sin embargo son muy específicos y rápidos, proporcionan un genotipado múltiple, con consumo mínimo de reactivo debido a la miniaturización y facilitan la manipulación de múltiples muestras.

6.7.5.1.-La PCR en tiempo real

La introducción de máquinas de PCR de tiempo real tales como el LightCycler de Roche, es uno de los avances recientes en la tecnología de la PCR. Este tipo de aparatos de PCR combinan la rapidez de los ciclos con una detección continua de los amplicones marcados fluorescentemente usando la tecnología láser. Los productos de PCR son detectados tanto por secuencia específica, hibridación de sondas fluorescentes usando la tecnología FRET (método TaqMan), o por un colorante fluorescente independiente de secuencia como el SYBR Green I. Al final de la PCR, los productos son calentados para que los perfiles de desnaturalización puedan ser calculados. Los productos que contienen secuencias normales o mutadas pueden ser identificados por su patrón único de perfil de desnaturalización. Esta técnica ha sido empleada en la detección de las mutaciones del gen HFE por varios autores (Bernard *et al.*, 1998; Kyger *et al.*, 1998; Bollhalder *et al.*, 1999; Mangasser-Stephan *et al.*, 1999; Restagno *et al.*, 2000).

La principal ventaja de esta nueva tecnología es que la PCR y la detección se realizan simultáneamente en el mismo capilar con ninguna manipulación post-PCR, por lo que existe menos probabilidad de error debido a manipulación de muestras. La PCR en este sistema es muy rápida, normalmente en 35 minutos esta completa. Sin embargo, el alto coste del aparato de PCR así como de los reactivos hacen que el método no sea adecuado para un cribado a gran escala.

7.-Estudios poblacionales de las mutaciones C282Y y H63D

En los múltiples estudios poblacionales realizados tanto en población control como en pacientes de HH se confirma que las mutaciones C282Y y H63D se encuentran en cromosomas diferentes por lo que se reduce a 6 los 9 posibles genotipos resultantes del cribado de ambas mutaciones H63D y C282Y (HHCC, HDCC, DDCC, HHCY, HDCY y HHYY). Solamente se han descrito ambas mutaciones en el mismo haplotipo, es decir en *cis*, en dos publicaciones (Thorstensen *et al.*, 2000; Best *et al.*, 2001), lo que sugiere que estas dos mutaciones son casi siempre excluyentes.

7.1.-Estudios en pacientes con HH

Los artículos subsiguientes al artículo donde se descubre el gen HFE confirman que este gen y en particular la mutación C282Y son los responsables de la mayoría de casos de Hemocromatosis Hereditaria (HH) de las diferentes poblaciones estudiadas (Tabla 6).

En las figuras 3 y 4 se muestran la frecuencia de homocigotos para la mutación C282Y en los pacientes de HH de Europa y del resto del mundo. Más del 80% de los HH pacientes del norte de Europa son homocigotos para la mutación C282Y (Merryweather-Clarke *et al.*, 2000). Variaciones en los criterios de diagnóstico resultan en algunas variaciones de los números, pero en general, existe un mayor porcentaje de pacientes HH homocigotos para la C282Y en el norte de Europa que en el sur de Europa (Tabla 6) (Merryweather-Clarke *et al.*, 2000).

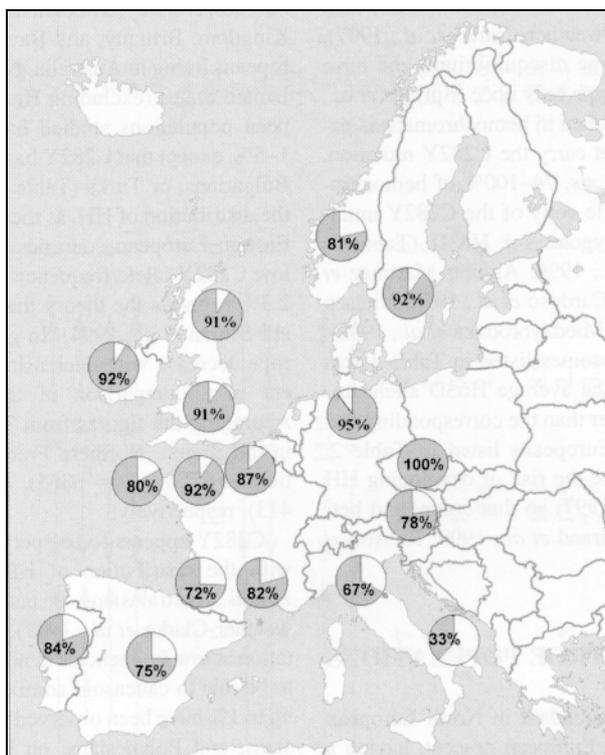


Figura 3. Frecuencia europea de pacientes de HH homocigotos para la mutación C282Y (Merryweather-Clarke *et al.*, 2000).

La mayor discrepancia se da en Italia, donde se ha publicado que en el norte de Italia sólo un 67% de pacientes HH son homocigotos para la C282Y y sólo un 33% lo es en el sur de Italia (Piperno *et al.*, 1998a). En Italia estudios de Carella y colaboradores han concluido que la Hemocromatosis en este país parece ser más heterogénea que la publicada en otros países europeos (Carella *et al.*, 1997). En su estudio presenta pacientes con HH y ligamiento en 6p sin la típica mutación C282Y, los autores apuntan como posibles explicaciones a la causa genética de estos pacientes la existencia de mutaciones en regiones no secuenciadas como regiones reguladoras (promotor o zona no traducida) o la existencia de otro gen responsable de la enfermedad en esta misma región 6p. Es también en Italia donde se ha descrito más casos de Hemocromatosis Juvenil (JH), catalogada como Hemocromatosis tipo 2, y de Hemocromatosis

tipo 3 ligada a mutaciones en el gen TFR2, ambas enfermedades no presentan mutaciones en el gen HFE (Camaschella C, 1998; Camaschella *et al.*, 2000) (ver I-2).

Tabla 6. La mutación C282Y y H63D en pacientes con HH.

País/región	N	Frecuencia genotipos (%)						%H63D ^a	Método ^b	Referencias
		HHCC	HDCC	DDCC	HHCY	HDCY	HHYY			
Norte Europa										
Alemania	92	0	0	0	1,1	4,3	94,6	80	PCR-dig.	Nielsen <i>et al.</i> 1998
Alemania	57	1,8	5,3	0	0	3,5	89,5	56	PCR-dig.	Gottschalk <i>et al.</i> 1998
Austria	40	10	2,5	2,5	0	7,5	77,5	40	PCR-dig.	Datz <i>et al.</i> 1997
Inglaterra (este)	18	0	0	0	0	0	100	-	ASOH/PCR-dig	Willis <i>et al.</i> 1997
Reino Unido	115	4,3	0	0,9	0,9	2,6	91,3	31	PCR-dig.	Worwood <i>et al.</i> 1997
Escocia	54	3,7	0	0	0	5,5	91	43	PCR-dig.	Miedzybrodzka <i>et al.</i> 1999
Irlanda	60	3,3	0	0	1,7	1,7	93,3	17	PCR-dig.	Ryan <i>et al.</i> 1998
Irlanda	30	3,3	0	3,3	3,3	0	90	40	PCR-SSOP	Murphy <i>et al.</i> 1998
Noruega	70		12,9 ^c			5,7 ^c	81,4	-		Bell <i>et al.</i> 1997
República Checa	12	0	0	0	0	0	100	-	AS-PCR	Zdarsky <i>et al.</i> 1999
Suecia	87	1,1	1,1	1,1	1,1	3,4	92	60	PCR-dig.	Cardoso <i>et al.</i> 1998
Suecia	38		5,3 ^c			5,3 ^c	89,5	-		Merryweather-Clarke <i>et al.</i> 2000
Bretaña	132	0	1,5	1,5	2,3	2,3	92,4	64	PCR-dig.	Jouanolle <i>et al.</i> 1997
Bretaña (oeste)	711	4,9	3,8	1,1	4,4	5,6	80,2	39	PCR-dig.	Mura <i>et al.</i> 1999
Bretaña (este)	217	0	0,5	0,5	0,9	1,8	96,3	70	PCR-dig.	Moirand <i>et al.</i> 1999
Francia	242	2,2	1,7	1,7	0,9	6	87,5	63		Merryweather-Clarke <i>et al.</i> 2000
Francia	99	3	3	4,1	1	7,1	81,8	64	PCR-dig.	Aguilar-Martinez <i>et al.</i> 1997
Francia	94	8,5	8,5	2,1	4,3	4,3	72,3	36	ASOH	Borot <i>et al.</i> 1997
Francia	61	9,8	4,9	8,2	3,3	6,6	67,2	50		Mercier <i>et al.</i> 1998b
Sur Europa										
España	22	4,5	0	4,5	4,5	4,5	81,8	50	PCR-dig.	Moreno <i>et al.</i> 1999
España	60		26,7 ^c			6,7 ^c	66,7	-	PCR-dig.	Fabrega <i>et al.</i> 1999
Portugal	25	0	4	0	8	4	84	40	OLA	Porto <i>et al.</i> 1998
Italia	75	21,3	4,0	1,3	2,7	6,7	64	21	PCR-dig.	Carella <i>et al.</i> 1997
Italia (norte)	158	11,3	7,6	1,3	6,3	4,4	69	28	PCR-dig.	Piperno <i>et al.</i> 1998a
Italia (sur)	30	36,7	13,3	3,3	3,3	10	33,3	25	PCR-dig.	Piperno <i>et al.</i> 1998a
Grecia	10	50	0	0	0	20	30	17	PCR-dig.	Papanikolaou <i>et al.</i> , 2000
Otros										
USA	178	11,2	0	0,6	0,6	4,5	83,1	20	OLA	Feder <i>et al.</i> 1996
USA	147	6,8	2,7	1,4	1,4	5,4	82,3	29	ASOH	Beutler <i>et al.</i> 1996
USA	56		8,9 ^c			10,7 ^c	80,4	-	PCR-dig.	Calandro <i>et al.</i> 1996
USA	61	8,2	4,9	4,9	6,6	8,2	67,2	45	TaqMan	Sham <i>et al.</i> 1997
USA	74	8,1	8,1	4	15	5,4	60	36	ASOH	Barton <i>et al.</i> 1997
Canadá, Quebec	32	25,0	6,3	12,5	3,1	9,4	43,8	41	PCR-dig.	Rivard <i>et al.</i> 2000
Australia	112	0	0	0	0	0	100	-	FNC/PCR-dig.	Jazwinska <i>et al.</i> 1996
Australia	41	7	0	0	12	0	81	0		Merryweather-Clarke <i>et al.</i> 2000
Nueva Zelanda	18	0	0	0	0	0	100	-	PCR-dig.	Burt <i>et al.</i> 1997
Total	3328									

Genotipos: H63D (H: histidina, D: ácido aspártico); C282Y (C: cisteína, Y: tirosina). No se han detectado las combinaciones DD/CY, DD/YY ni HD/YY.

^a H63D (%): frecuencia alélica en cromosomas sin la mutación C282Y.

^b Método: Método empleado en la detección de las mutaciones C282Y y H63D (PCR-dig.: PCR seguida de digestión enzimática, AS-PCR: PCR alelo específica, PCR-SSOP: PCR y hibridación con sonda oligonucleotida de secuencia específica, ASOH: Hibridación con oligonucleótido alelo específico, OLA: ensayo de oligonucleótido ligación, TaqMan: tecnología TaqMan, FNC: *first nucleotide change method*).

^c Solo se estudió la mutación C282Y y no la mutación H63D, por lo que no es posible obtener las frecuencias de cada uno de los genotipos.

En otros países del sur de Europa como España y Portugal la media de las frecuencia del genotipado C282/C282Y de los diferentes estudios publicados ronda el 80%, al igual que en Francia (Tabla 6). En Grecia solo existe un estudio con un número muy bajo de pacientes (n=10) y la frecuencia del genotipado C282Y/C282Y es de solo el 30% (Tabla 6).

Otros países con población de origen europeo como EE.UU. o Australia también presentan un alto porcentaje de pacientes de HH homocigotos para la mutación C282Y (Tabla 6).

En las figuras 4 se puede observar que la HH sólo se ha detectado en poblaciones de origen europeo. La distribución de la mutación C282Y es similar a la de la enfermedad, mientras que la mutación H63D está más extendida, y está presente en muchas poblaciones en las que no se ha detectado HH (figura 7)(Merryweather-Clarke *et al.*, 1997a).

La mutación H63D está presente en un porcentaje significativamente más alto en cromosomas de pacientes con Hemocromatosis que no presentan la mutación de C282Y (Feder *et al.*, 1996). En poblaciones del norte de Europa, el 74-100% de pacientes con Hemocromatosis que llevan una sola copia de la mutación de C282Y también presentan la mutación H63D, es decir que son heterocigotos compuestos (Beutler *et al.*, 1996; Feder *et al.*, 1996; Aguilar Martínez *et al.*, 1997; Worwood *et al.*, 1997; Cardoso *et al.*, 1998; Nielsen *et al.*, 1998; Miedzybrodzka *et al.*, 1999). Considerando los cromosomas de los pacientes con HH que son normales en la posición 282, la media de la frecuencia alélica de la H63D es de un 38%, valor que es significativamente mayor que la frecuencia en controles europeos, 16% (Merryweather *et al.*, 2000). Por consiguiente, la mutación H63D parece que aumenta el riesgo de desarrollar HH en los heterocigotos para la mutación C282Y (Risch, 1997) y por lo tanto el genotipo heterocigoto compuesto C282Y/H63D es otro de los genotipos de riesgo para desarrollar HH (Moirand *et al.*, 1999; Robson *et al.*, 2000).

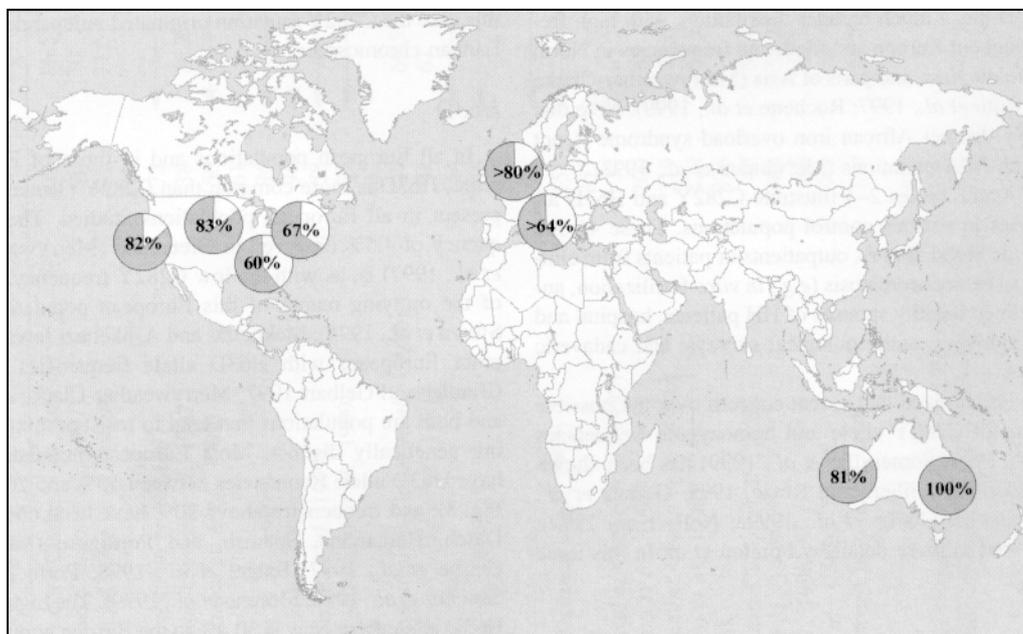


Figura 4. Frecuencia mundial de pacientes de HH homocigotos para la mutación C282Y (Merryweather-Clarke *et al.*, 2000).

7.2.-Estudios en la población general

Las mutaciones C282Y y H63D han sido estudiadas en la población general para estimar sus frecuencias. Para ello se han utilizado muestras controles que principalmente proceden de donantes de sangre, pero también se han utilizado muestras de pacientes no relacionados con Hemocromatosis, esposos / esposas sanos de pacientes con HH y empleados de hospitales, laboratorios y otras compañías como muestras representativas de la población general.

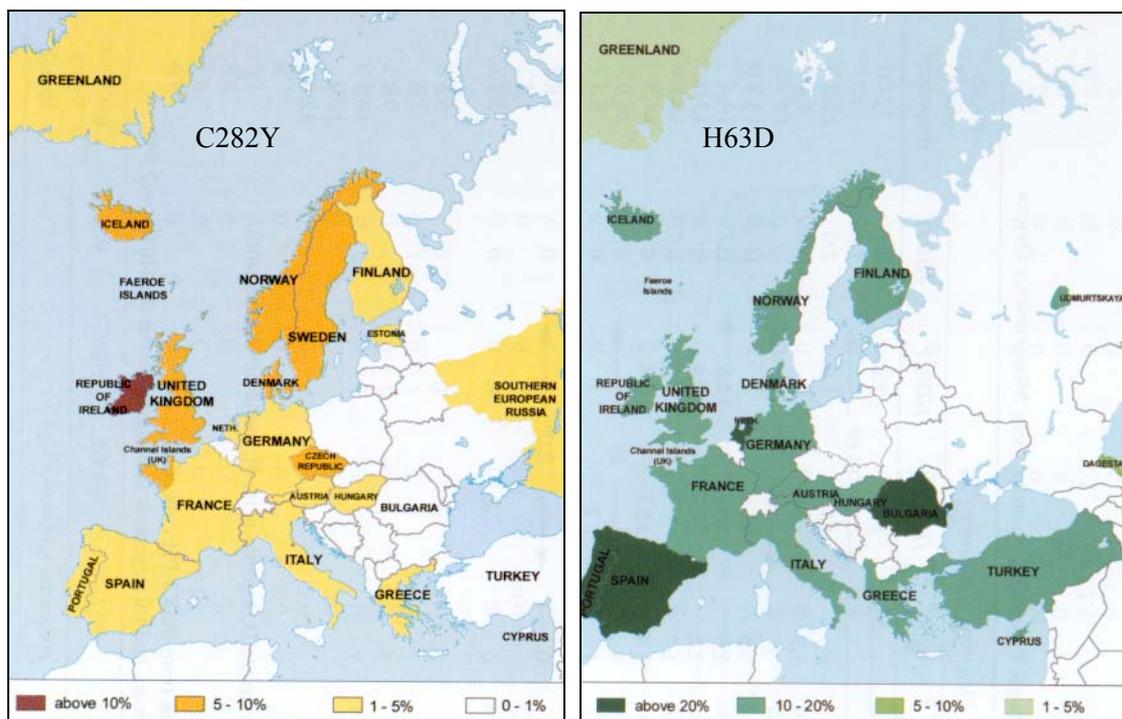
Hay que destacar que el síndrome de sobrecarga excesiva de hierro africano o Bantú siderosis no está asociado genéticamente con las mutaciones del gen HFE (McNamara *et al.*, 1998). Además es importante señalar que se ha demostrado que no existe una sobreestimación de la frecuencia de la mutación C282Y debida a la utilización del *primer* descrito por Feder y colaboradores en 1996 (ver 7.5.6).

En las tablas 7 a 9 y las figuras 5 a 7 se describen las frecuencias alélicas de las mutaciones C282Y y H63D en varias poblaciones controles.

7.2.1.-La mutación C282Y en la población general

La mutación C282Y es muy frecuente en poblaciones del norte de Europa y en aquellas de descendencia norte-europea, teniendo una distribución similar a la observada en pacientes con HH (Merryweather-Clarke *et al.*, 1997a). Esta alta frecuencia alélica de la mutación C282Y detectada en las poblaciones del norte de europea explica por qué la HH es el desorden autosómico recesivo más común que afecta a estas personas (Tabla 7 y Fig. 5). La frecuencia alélica poblacional más elevada publicada de la mutación C282Y ha sido de un 14% (Ryan *et al.*, 1998) y se ha observado en Irlanda, con un promedio de los cinco estudios irlandeses citados en tabla 7 del 10,1%. El hecho de que sea la población irlandesa donde se ha encontrado la frecuencia alélica de C282Y más elevada ha dado origen a especular sobre un origen Celta de esta mutación (ver 6.3). Frecuencias alélicas de la mutación C282Y del 5 al 10,3% se han observado en Islandia, las Islas Faeroes, Noruega, Suecia, norte de Finlandia, Dinamarca, el Reino Unido, Bretaña, y Baviera, y en europeos que viven en Australia, Nueva Zelanda, Sudáfrica, y los Estados Unidos (excluyendo los Hispanos) (Tabla 7) (Merryweather-Clarke *et al.*, 2000).

Todas las otras poblaciones europeas estudiadas tienen una frecuencia alélica de la mutación C282Y de entre un 1 a un 5%, excepto en udmurts, búlgaros y turcos donde la mutación C282Y no se ha detectado (Tabla 7). Esto es consistente con la distribución de la HH ya que no hay ningún informe de HH en países del este de Europa (Porto and de Sousa, 2000). La baja frecuencia alélica de la C282Y descrita en la población de Groenlandia (2,3%) apoya la teoría de que los Inuitas son de origen asiático (Cavalli-Sforza *et al.*, 1994).



Figuras 5 y 6. Frecuencia alélica de la mutación C282Y y la mutación H63D en Europa. (Merryweather-Clarke *et al.*, 2000).

En general, la frecuencia de la mutación C282Y disminuye en Europa con la latitud (Fig. 2, página 26). Esto se observa muy claramente en una comparación de las diferentes poblaciones francesas, donde según la media de varios estudios la frecuencia alélica de C282Y en la Bretaña, el norte de Francia, y el Sur de Francia son de 7,6% (n = 8865), 4,9% (n = 1117), y 2,6% (n 413), respectivamente (Tabla 7) (Merryweather-Clarke *et al.*, 2000). En el sur de Europa (Grecia, Italia, España y Portugal) le frecuencia alélica de la mutación C282Y varía entre un 1,3 a un 3,2, hallándose el valor más elevado en España y el más bajo en Italia y Grecia (Tabla 7).

La mutación C282Y parece ser específica de los europeos ya que muy raramente se ha detectado en africanos, asiáticos, asiáticos australianos o americanos nativos (Tabla 9) (Merryweather-Clarke *et al.*, 1997a). En las publicaciones sobre la mutación C282Y realizadas en poblaciones no europeas no se ha encontrado ninguna evidencia de que la mutación haya aparecido independientemente en estas poblaciones y la causa más probable de la existencia de la mutación se debería a la mezcla con población caucásica. Una frecuencia alélica de C282Y de un 1% se ha observado en los aborígenes australianos, melanesios, y polinesios, en todos estos casos la mutación estaba presente en el haplotipo de HLA europeo (Cullen *et al.*, 1998). Sin embargo se ha informado de un caso de la mutación C282Y en un individuo de Sri Lanka en asociación con un haplotipo no observado en las poblaciones europeas, por lo que es posible que en este caso la mutación el C282Y se originara independientemente en un cromosoma de Sri Lanka (Rochette *et al.*, 1999).

Tabla 7. Las mutaciones C282Y y H63D del gen HFE en la población Europea.

País, región o población	N	Frecuencia genotipos (%)						H63D frec. alélica	C282Y frec. alélica	Referencia
		HHCC	HDCC	DDCC	HHCY	HDCY	HHYY			
Groenlandia	200	86,5	9,0	0	4,5	0	0	4,5	2,3	Merryweather-Clarke et al., 1999b
Islandia	90	70,0	15,6	1,1	10,0	3,3	0,0	10,6	6,7	Merryweather-Clarke et al., 1997a
Islandia	231	71,5	19,5	0,4	6,5	1,7	0,4	11,0	4,5	Merryweather-Clarke et al., 1999b
Total, Islandia	321							10,9	5,1	
Finlandia (norte)	173		90,8 ^a			8,1 ^a		1,1	-	Beckman et al., 1997
Finlandia	38	76,3	23,7	0	0	0	0	11,8	0	Merryweather-Clarke et al., 1997a
Finlandia (este)	1150		93,3 ^a			6,6 ^a		0,1	-	Tuomainen et al., 1999
Total, Finlandia	1361							11,8 ^p	3,5	
Saaremaa	96		95,8 ^a			4,2 ^a		0	-	Mikelsaar et al., 1999
Hiumaa	96		96,9 ^a			3,1 ^a		0	-	Mikelsaar et al., 1999
Oeste Estonia	158		89,9 ^a			10,1 ^a		0	-	Mikelsaar et al., 1999
Sur-este Estonia	92		92,4 ^a			6,5 ^a		1,1	-	Mikelsaar et al., 1999
Total, Estonia	442								3,5	
Islas Faeroe	187	69,5	18,2	3,2	6,4	1,6	1,1	13,1	5,1	Merryweather-Clarke et al., 1999b
Noruega	94	67,0	18,1	2,1	12,8	0	0	11,2	6,4	Merryweather-Clarke et al., 1997a
Noruega	144		88 ^a			12 ^a		0	-	Bell et al., 1997
Noruega	505		84,7 ^a			14,9 ^a		0,4	-	Distante et al., 1999
Total, Noruega	743							11,2 ^p	7,3	
Suecia	206		86,4 ^a			12,1 ^a		1,5	-	Beckman et al., 1997
Suecia, Saamis	151		96,0 ^a			4,0 ^a			-	Beckman et al., 1997
Total, Sweden	357								-	
Dinamarca	37	62,2	16,2	2,7	16,2	2,7	0	12,2	9,5	Merryweather-Clarke et al., 1997a
Dinamarca	200	65,0	20,0	1,5	11,0	2,5	0	12,8	6,8	Steffensen et al., 1998
Dinamarca	219	72,6	12,3	0,0	13,7	0,0	1,4	6,2	8,2	Merryweather-Clarke et al., 1999b
Dinamarca	420	63,1	23,3	1,2	9,8	2,6	0,0	14,8	6,2	Simonsen et al., 1999
Total, Dinamarca	876							12,1	7,0	
Irlanda	45	51,1	28,9	0,0	11,1	8,9	0,0	18,9	10,0	Merryweather-Clarke et al., 1997a
Irlanda	404	57,2	22,8	1,5	14,9	2,5	1,2	14,1	9,9	Murphy et al., 1998
Irlanda	109	46,8	21,1	3,7	24,7	3,7	0	17,9	14,0	Ryan et al., 1998
Irlanda	411	34,5	30,7	0,3	15,1	4,8	1,5	15,6 ^p	10,9	Byrnes et al., 1999
Irlanda	150	68,6	18,7	0,7	10,7	1,3	0	10,7	6,0	Merryweather-Clarke et al., 2000
Total, Ireland	1119							14,7 ^p	10,1	
Paises Bajos	39	43,6	46,2	5,1	2,6	2,6	0	29,5	2,6	Merryweather-Clarke et al., 1997a
Paises Bajos, Utrecht	555		92,3 ^a			7,2 ^a		0,5	-	Roest et al., 1999
Total, Paises Bajos	594							29,5 ^p	3,8	
Escocia (nord-este)	188	-	-	-	-	-	-	15,7	8,4	Miedzybrodzka et al., 1999
Islas Orkney	103	59,2	29,1	2,9	5,8	2,0	1,0	18,4	4,9	Merryweather-Clarke et al., 2000
Reino Unido, UK	368	67,7	20,9	0	7,6	3,3	0,5	12,1	6,0	Merryweather-Clarke et al., 1997a
Inglaterra (este)	200	-	-	-	-	-	-	-	8,5	Willis et al., 1997
Inglaterra (nord-este)	117	56,4	28,2	0,9	12,8	0,9	0,9	15,4	7,7	Grove et al., 1998
Reino Unido	330	56,7	22,4	1,2	16,1	3,3	0,3	14,1	10,0	Mullighan et al., 1998
Sur Gales	101	64,4	21,8	3,0	5,9	3,9	1,0	16,0	5,9	Worwood et al., 1997
Sur Gales	10556	58,2	23,6	2,4	12,7	2,4	0,7	15,3	8,2	Jackson et al., 1999
Gales	323	62,2	18,6	2,8	13,0	2,8	0,6	13,5	8,5	Merryweather-Clarke et al., 2000
Jersey	411	60,6	20,9	2,9	11,4	3,2	1,0	15,0	8,3	Merryweather-Clarke et al., 1998
Total, UK	12697							15,2 ^p	8,1	
Bretaña	139	66,9	23,7	3,6	3,6	2,2	0,0	16,5	2,9	Jouanolle et al., 1997
Bretaña (oeste)	254	53,9	25,6	2,4	13,8	3,5	0,8	16,9	9,4	Jézéquel et al., 1998
Bretaña	1000	87,5 ^a			12,0 ^a		0,5	-	6,3	Jouanolle et al., 1998
Bretaña	62	88,7 ^a			11,3 ^a		0	-	5,6	Mercier et al., 1998a
Bretaña	7000	85,0 ^a			14,3 ^a		0,7	16,8 ^p	7,8	Merryweather-Clarke et al., 2000
Bretaña	410	60,0	24,4	0,7	12,2	2,2	0,5	14,0	7,7	Mura et al., 1999
Francia, Paris	126	57,1	31,0	4,0	7,9	0,0	0	19,4	4,0	Mercier et al., 1998b
Francia (norte), Amiens	991	61,0	26,4	2,7	6,8	2,9	0,2	17,4	5,0	Merryweather-Clarke et al., 2000
Sur Francia	60	63,3	25,0	5,0	5,0	1,7	0	18,3	3,3	Aguilar-Martinez et al., 1997
Sur Francia	95	64,2	23,2	4,2	8,4	0	0	15,7	4,2	Borot et al., 1997
Francia, Catalanes	166	95,8 ^a			4,2 ^a		0	-	2,1	Mercier et al., 1998a
Francia, Vascos	92	96,7 ^a			3,3 ^a		0	-	1,6	Mercier et al., 1998a
Total, Francia	10395							16,7 ^p	7,1	
Judios Ashkenazi	35	82,9	17,1	0,0	0,0	0,0	0	8,6	0	Merryweather-Clarke et al., 1997a
Judios Ashkenazi	381	79,5	16,3	1,6	2,6	0,0	0	9,7	1,3	Beutler and Gelbart, 1997
Total, Judios Ashkenazi	416							9,6 ^p	1,2	

Tabla 7. Las mutaciones C282Y y H63D del gen HFE en la población Europea (continuación).

País, región o población	N	Frecuencia genotipos (%)						H63D frec. alélica	C282Y frec. alélica	Referencia
		HHCC	HDCC	DDCC	HHCY	HDCY	HHYY			
Alemania	53	67,9	20,8	7,5	1,9	1,9	0	18,9	1,9	Merryweather-Clarke et al., 1997a
Bavaria	62	66,1	22,6	0	11,3	0	0	11,3	5,6	Merryweather-Clarke et al., 1997a
Alemania	153	73,9	19,0	2,0	3,3	2,0	0	12,1	2,6	Gottschalk et al., 1998
Alemania (norte)	157	65,5	23,6	1,3		9,6 ^a	0	13,1	4,8	Nielsen et al., 1998
Total, Alemania	425							13,2	3,8	
Republica Checa	139	-	-	-	-	-	0	-	5,0	Zdarsky et al., 1999
Austria	271	69,3	19,9	3,0	7,4	0,0	0,4	12,9	3,7	Datz et al., 1997
Hungría	277	67,9	19,1	1,8	9,4	1,8	0	12,3	5,6	Tordai et al., 1998
Hungría	994	-	-	-	-	-	-	-	3,4	Andrikovics et al., 1999
Hungría (este)	308		29,4 ^a			12,0 ^a	2,0	-	2,6	Szakony et al., 1999
Hungría, Rumanos	140		13,8 ^a			1 ^a	1,0	-	1,1	Szakony et al., 1999
Total, Hungría	1719							12,3 ^a	3,4	
Bulgaria	100	54,0	46,0	0	0	0	0	23,0	0	Ivanova et al., 1999
Mekhelta	108	81,5	14,8	0,9	2,8	0	0	8,3	1,4	Merryweather-Clarke et al., 1997a
Udmurtia	46	71,7	26,1	2,2	0	0	0	15,2	0,0	Merryweather-Clarke et al., 1997a
Mordvinia	85		96,5 ^a			3,5 ^a	0	-	1,8	Beckman et al., 1997
Total, Rusos de Sud-europea	239							10,4 ^a	1,3	
Turquía	70	75,7	21,4	2,9	0	0	0	13,6	0	Merryweather-Clarke et al., 1997a
Grecia	196	73,5	20,9	3,1	2,5	0	0	13,5	1,3	Merryweather-Clarke et al., 1997a
Italia	139	75,5	20,9	1,4	2,2	0	0	11,9	1,1	Pipemo et al., 1998a
Italia	189	76,2	20,6	1,1	2,1	0	0	11,4	1,1	Longo et al., 1999
Italia	50	78,0	20,0	0,0	2,0	0	0	10,0	1,0	Carella et al., 1997
Italia (nord-este)	131	68,7	22,9	3,8	4,6	0	0	15,3	2,3	Borgna-Pignatti et al., 1998
Italia	91	75,8	20,9	2,2	1,1	0	0	12,6	0,5	Merryweather-Clarke et al., 1997a
Italia	2100	72,8	21,5	2,5	3,1	0,1	0	13,3	1,6	Cassanelli et al., 2001
Total, Italia	2700							12,4	1,3	
España, Vascos	28	50,0	25,0	17,9	7,1	0	0	30,4	3,6	Merryweather-Clarke et al., 1997a
España, Vascos	51	24,5	19,6	3,9	1,8	0	0	27,5	2,0	Baiget et al., 1998
España, Cataluña	50	52,0	36,0	4,0	2,0	4,0	0	24,0	3,0	Merryweather-Clarke et al., 1997a
España, Cataluña	108	64,8	25,9	1,8	5,5	1,8	0	15,7	3,7	Baiget et al., 1998
España, gitanos	58	38,8	8,6	0,0	2,6	0,0	0	8,6	2,6	Baiget et al., 1998
España, Madrid	174	59,7	32,7	2,9	3,4	1,1	0	19,7	2,3	Moreno et al., 1999
España, Cantabria	213		91,1 ^a			8,9 ^a	0	-	4,4	Fabrega et al., 1999
Total, España	682							20,6 ^b	3,2	
Portugal	71	56,4	31,0	7,0	5,6	0	0	23,0	2,8	Porto et al., 1998
Total, Europa	36320							14,9 ^a	6,6	

Genotipos: H63D (H: histidina, D: ácido aspártico); C282Y (C: cisteína, Y: tirosina). No se han detectado las combinaciones DD/CY, DD/YY ni HD/YY.

^a No se estudió la mutación H63D, solo la mutación C282Y, por lo que no es posible obtener las frecuencias de cada uno de los genotipos.

^b Frecuencias de H63D no disponibles para todos los individuos de esta muestra.

Tabla 8. Las mutaciones C282Y y H63D del gen HFE en la población inmigrante con mezcla de orígenes (europeo, africano e indígena).

País, región o población	N	Frecuencia genotipos (%)						H63D	C282Y	Referencia	
		HHCC	HDCC	DDCC	HHCY	HDCY	HHYY	frec. alélica	frec. alélica		
Australia	3011		85,4 ^a		11,9	2,2	0,5	-	7,3	Olynyk et al., 1999	
Nueva Zelanda	1032		80,4 ^a			18,6 ^a		1,0	-	10,3	Takeuchi et al., 1997
Sud África, Caucasicos	102	59,8	23,5	0	13,7	1,0	2,0	12,3	9,3	de Villiers et al., 1999a	
Sud África, miscegenos	156	83,3	12,2	1,3	2,6	0	0,6	7,4	1,9	de Villiers et al., 1999a	
USA	156	-	32,7	-		6,4 ^a	-	17,0	3,2 ^c	Feder et al., 1996	
USA	193	58,0	23,3	3,6	14,0	1,0	0	15,8	7,5	Beutler et al., 1996	
USA	142	62,7	19,7	2,8	10,6	3,5	0,7	14,4	6,0	Barton et al., 1997	
USA, Nuevo Méjico	287	65,5	19,9	2,4	29,8	2,4	0	13,6	6,1	Garry et al., 1997	
USA, Maine	1001	61,1	24,6	1,7	9,7	2,2	0,7	15,1	6,6	Bradley et al., 1998	
USA, Alabama	176	60,3	15,4	3,4	13,1	6,8	0	14,5	9,9	Barton et al., 1999a	
USA	100	63,0	24,0	4,0		8 ^a	1,0	16,0	5,0	Marshall et al., 1999	
USA, Hispanos	100	82,0	14,0	1,0	2,0	1,0	0	8,5	1,5	Marshall et al., 1999	
Total, USA Caucasicos	2155							14,7	6,3		
USA, Americanos africanos	172	94,0	3,0	0		3 ^a	0	1,5	1,5	Monaghan et al., 1998	
USA, Americanos africanos	56	94,5	3,5	0		2,0 ^a	0	1,8	1,0	Marshall et al., 1999	
Total, Americanos africanos	228							1,6	1,4		
Jamaica, origen africanos	90	93,4	4,4	0	2,2	0	0	2,2	1,1	Merryweather-Clarke et al., 1997a	
Méjico	54	87,0	13,0	0	0	0	0	6,5	0	Merryweather-Clarke et al., 1997a	
Méjico	153	85,0	11,8	0,6	2,0	0,6	0	6,2	1,3	Ruiz-Argüelles et al., 2001	
Brazil, africanos	85	-	-	-	-	-	-	7,5	1,1	Agostinho et al., 1999	
Brazil, caucasioa-amerindios	91	-	-	-	-	-	-	9,8	1,1	Agostinho et al., 1999	
Brazil, caucasicos	71	-	-	-	-	-	-	16,3	1,4	Agostinho et al., 1999	
Total, inmigrantes de Brasil	247	-	-	-	-	-	-	10,9	1,2		
Total	6985							12,9 ^a	6,8		

Genotipos: H63D (H: histidina, D: ácido aspártico); C282Y (C: cisteína, Y: tirosina). No se han detectado las combinaciones DD/CY, DD/YY ni HD/YY.

^a No se estudió la mutación H63D, solo la mutación C282Y, por lo que no es posible obtener las frecuencias de cada uno de los genotipados.

^b Frecuencias de H63D no disponibles para todos los individuos de esta muestra.

^c Las muestras de DNA utilizadas por Feder y colaboradores incluyen muestras de procedencia francesa del CEPH

Tabla 9. Las mutaciones C282Y y H63D del gen HFE en la población indígena no-Europea.

País, región o población	N	Frecuencia genotipos (%)						H63D frec. alélica	C282Y frec. alélica	Referencia
		HHCC	HDCC	DDCC	HHCY	HDCY	HHYY			
África										
Algeria, Mozabitos	95	82,1	17,9	0	0	0	0	8,9	0	Roth et al., 1997
Etiopia central	181	82,3	16,6	1,1	0	0	0	9,4	0	Roth et al., 1997
Kenia	78	97,4	2,6	0	0	0	0	1,3	0	Merryweather-Clarke et al., 1997a
Nigeria	80	96,2	3,8	0	0	0	0	1,9	0	Merryweather-Clarke et al., 1997a
Gambia	39	97,4	2,6	0	0	0	0	1,3	0	Merryweather-Clarke et al., 1997a
Senegal	130	100,0	0	0	0	0	0	0	0	Merryweather-Clarke et al., 1997a
Senegal	94	100,0	0	0	0	0	0	0	0	Roth et al., 1997
Ghana	97	97,9	2,1	0	0	0	0	1,0	0	Jeffery et al., 1999
Zambia	76	98,7	1,3	0	0	0	0	0,7	0	Merryweather-Clarke et al., 1997a
Sud Africa	200	99,5	0	0	1,0	0	0	0	0,25	de Villiers et al., 1999a
Total, Africa	1070							2,8	0,05	
Asia										
Arabia Saudi	118	83,1	16,9	0	0	0	0	8,5	0	Merryweather-Clarke et al., 1997a
Sri Lanka	109	82,6	16,5	0,9	0	0	0	9,2	0	Merryweather-Clarke et al., 1997a
Sri Lanka	65	-	-	-	-	-	-	10,8	0,8	Rochette et al., 1999
Total, Sri Lanka	174							9,8	0,3	
India	99		100 ^a		0	0	0	-	0	Beckman et al., 1997
India/Pakistan	106	84,0	15,1	0,0	0,9	0	0	7,5	0,5	Merryweather-Clarke et al., 1997a
Total, India	205							7,5 ^b	0,3	
Nepal	116		100 ^a		0	0	0	-	0	Cullen et al., 1998
Myanmar	137	94,2	5,8	0	0	0	0	2,9	0	Rochette et al., 1999
China	104		100 ^a		0	0	0	-	0	Beckman et al., 1997
China	596		99,6 ^a		0,34 ^a	0	0	-	0,2	Chang et al., 1997
Norte China	67	94,0	6,0	0	0	0	0	3,0	0	Cullen et al., 1998
Sur China	97	93,8	6,2	0	0	0	0	3,1	0	Cullen et al., 1998
China, Hong Kong	72	94,4	5,6	0	0	0	0	2,8	0	Merryweather-Clarke et al., 1997a
Total, China	936							3,0 ^p	0,1	
Taiwan, Aborígenes	80	100,0	0	0	0	0	0	0	0	Merryweather-Clarke et al., 1997a
Japón	252	98,0	2,0	0	0	0	0	1,0	0	Sohda et al., 1999
Java	68		100 ^a		0	0	0	0	0	Cullen et al., 1998
Indonesia	90	94,4	5,6	0	0	0	0	2,8	0	Merryweather-Clarke et al., 1997a
Total, Asia	2176							3,9 ^v	0,1	
Australasia										
Micronesia	106		100 ^a		0	0	0	-	0	Cullen et al., 1998
Papua Nueva Guinea	139	100,0	0	0	0	0	0	0	0	Merryweather-Clarke et al., 1997a
Australia, Aborígenes	93	100,0	0	0	0	0	0	0	0	Merryweather-Clarke et al., 1997a
Australia, Aborígenes-Cape York	93	89,0	7,7	1,1	2,2	0	0	5,0	1,1	Cullen et al., 1998
Australia, Aborígenes-Groote Eylandt	92	100,0	0	0	0	0	0	0	0	Cullen et al., 1998
Vanuatu	90	98,9	1,1	0	0	0	0	0,6	0	Merryweather-Clarke et al., 1997a
Melanesia	139		90,3 ^a		0,7 ^a	0	0	-	0,4	Cullen et al., 1998
Polinesia	169		98,2 ^a		1,8 ^a	0	0	-	0,9	Cullen et al., 1998
Total, Australasia	921							1,0 ^b	0,3	
América										
Canada, indios Isla de Vancouver	37	94,6	2,7	0	2,7	0	0	1,4	1,4	Merryweather-Clarke et al., 1997a
Columbia	47	100,0	0	0	0	0	0	0	0	Merryweather-Clarke et al., 1997a
Brasil, Indios Parakana	75	100,0	0	0	0	0	0	0	0	Agostinho et al., 1999
Total, Indígenas Americanos	159							0,3	0,3	
Total, no-Europeos	4326							2,9 ^b	0,1	

Genotipos: H63D (H: histidina, D:ácido aspártico); C282Y (C:cisteína, Y: tirosina). No se han detectado las combinaciones DD/CY, DD/YY ni HD/YY.

^a No se estudió la mutación H63D, solo la mutación C282Y, por lo que no es posible obtener las frecuencias de cada uno de los genotipos.

^b Frecuencias de H63D no disponibles para todos los individuos de esta muestra.

7.2.2.-La mutación H63D en la población general

La mutación H63D tiene una distribución mucho más amplia que la mutación C282Y, con un alta frecuencia por toda Europa y una frecuencia moderadas en el norte de África, en el Medio Este, y en partes de Asia (Merryweather-Clarke *et al.*, 1997a; Roth *et al.*, 1997; Rochette *et al.*, 1999).

En todas las poblaciones europeas y en aquellas de descendencia europea, la mutación H63D es más frecuente que la C282Y (Tabla 7 y 8). La mutación H63D está presente en todas las poblaciones europeas estudiadas (Tabla 7). La frecuencia europea más baja descrita es de un 4,5% observada en Groenlandia (Merryweather-Clarke *et al.*, 1997a), al igual que la más baja de la mutación C282Y, los que demuestra un la naturaleza periférica de esta población europea (Cavalli-Sforza *et al.*, 1994). Los Mekheltas y los judíos Ashkenazis son los otros únicos europeos con la frecuencia alélica de H63D por debajo del 10% (Beutler and Gelbart 1997; Merryweather-Clarke *et al.*, 1997a), estas dos poblaciones son poblaciones reticentes al mestizaje, y han permaneciendo genéticamente distintas. La mayoría de las poblaciones europeas estudiadas tiene una frecuencia alélica de H63D de entre el 10% y el 20% (Tabla 7 y Fig. 6), y se han observado frecuencias mayores del 20% en Holanda, Bulgaria, España y Portugal (Merryweather-Clarke *et al.*, 1997a; Baiget *et al.*, 1998; Porto *et al.*, 1998; Moreno *et al.*, 1999). La H63D frecuencia alélica más alta reportada es del 30.4% en la población vasca (Merryweather-Clarke *et al.*, 1997a) que es otra población periférica que se cree que se originó de una tribu europea paleolítica (Cavalli-Sforza *et al.*, 1994).

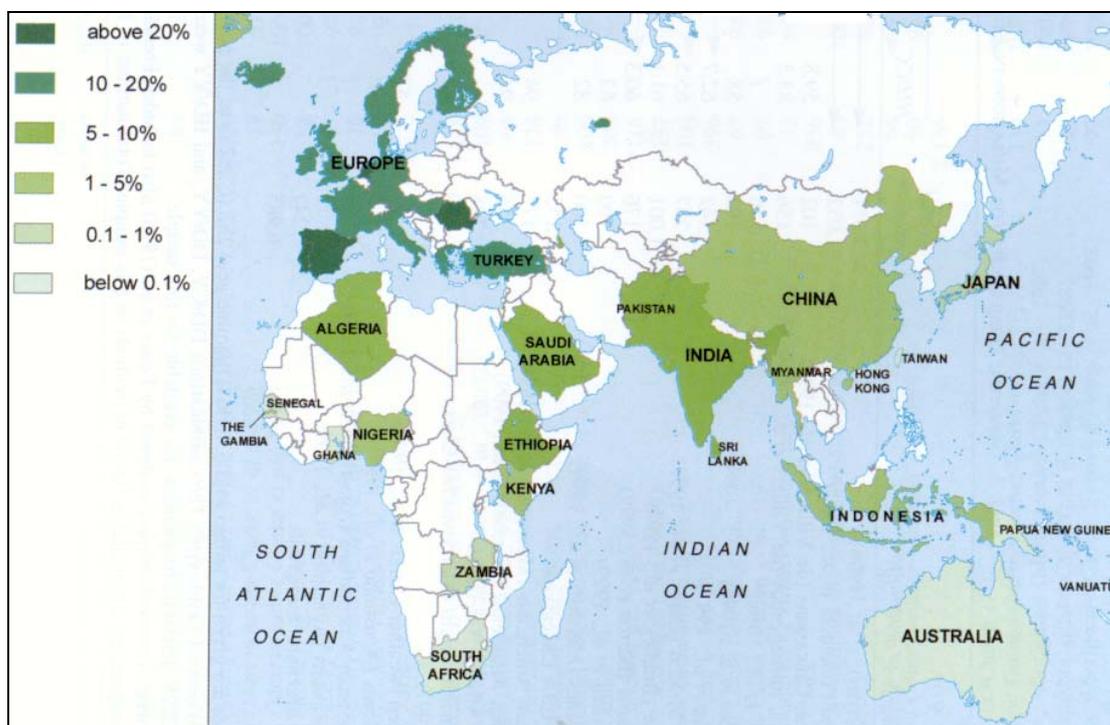


Figura 7. Frecuencia alélica de la mutación H63D en Asia, África y Australia (Merryweather-Clarke *et al.*, 2000).

Se ha observado una frecuencia alélica para la mutación H63D de entre el 8% y el 10% a lo largo del mediterráneo en el norte de África, Etiopía, y el Medio Este, (Tabla 9 y Fig. 7)

(Merryweather-Clarke *et al.*, 1997a; Roth *et al.*, 1997). Ésta disminuye considerablemente cuanto más se va hacia el este, oeste o sur de África siendo de un 0 a 1,9% en esas poblaciones estudiadas (Tabla 9).

No existen muchos datos disponibles sobre la frecuencia alélica de H63D para la mayoría de las poblaciones asiáticas (Tabla 9). De aquéllas estudiadas, se ha observado que la frecuencia alélica más elevada de H63D en Asia se da en Asia del Sur, y es comparable con la descrita en África del Norte y el Medio Este (Merryweather-Clarke *et al.*, 1997a; Rochette *et al.*, 1999). Frecuencias alélicas de H63D bajas de entre 2,8% y el 3,1% se han descrito en birmanos, chinos e indonesios (Tabla 9) (Merryweather-Clarke *et al.*, 1997a; Cullen *et al.*, 1998; Rochette *et al.*, 1999). En japoneses, la frecuencia alélica de H63D es del 1% (Sohda *et al.*, 1999), y la mutación no se detectó en 80 indígenas taiwaneses (Merryweather-Clarke *et al.*, 1997a).

La presencia de la mutación H63D en población de Sri Lanka y china en haplotipos diferentes a los que la mutación está asociada en Europa sugieren que la mutación se ha originado más de una vez (Rochette *et al.*, 1999; Cullen *et al.*, 1998).

La mutación H63D no se encuentra en la mayoría de las poblaciones austral-asiáticas testadas (Tabla 9), y se observó en cromosomas de aborígenes australianos siempre en asociación con el haplotipo europeo (Cullen *et al.*, 1998), lo que indica que la presencia de la mutación es debida a la mezcla de la población aborigen con población de descendencia europea. La mutación H63D estaba también ausente, o presente en una frecuencia baja, en todas las poblaciones indígenas americanas estudiadas (Tabla 9).

8.-El cribado genético de las mutaciones C282Y y H63D en la población general

Actualmente se está realizando un intenso **debate** sobre la necesidad de realizar o no un cribado poblacional de la HH debido a su alta frecuencia en la población de origen europeo. La HH cumple las características establecidas por la OMS (Organización Mundial de la Salud) para un cribado poblacional. Los criterios establecidos por la OMS para un cribado poblacional de una determinada enfermedad son:

- 1.-La enfermedad debe tener tratamiento
- 2.-La enfermedad debe presentar un estado latente temprano asintomático donde poder determinar su existencia
- 3.-Se debe conocer la historia de la enfermedad incluyéndose su desarrollo de estado asintomático a enfermedad declarada
- 4.-Debe disponerse de un *test* de cribado fiable, es decir, el *test* usado en el diagnóstico de la enfermedad debe ser preciso. Así mismo debe ser posible la verificación de los resultados positivos y los resultados falsos negativos deben ser escasos
- 5.-El *test* debe ser aceptado por la población
- 6.-Debe saberse quién debe ser tratado
- 7.-La detección de la enfermedad, y por tanto el cribado, debe ser coste-eficaz

El tratamiento que se emplea en la HH, las flebotomías o sangrías, es un tratamiento barato que evita las complicaciones derivadas de un acúmulo excesivo de hierro en los órganos.

Además, esta sangre puede ser empleada en transfusiones a otras personas por lo que se genera un aporte adicional y siempre bien venido a las donaciones voluntarias de sangre. La sangre de los pacientes con HH se emplea en transfusiones en Noruega, Suecia, Sud-África y Canadá sin que se haya descrito ningún efecto adverso en los receptores de esta sangre. Actualmente en EE.UU. y debido a las recomendaciones de varios autores (Jeffrey and Adams, 1999), se comienza a utilizar la sangre de pacientes con HH en transfusiones.

La HH es una enfermedad que cursa con un estado presintomático amplio, ya que las complicaciones no se dan hasta la 5ª o 6ª década de la vida del paciente. La sintomatología, el curso clínico y las complicaciones que conlleva la enfermedad son conocidos (ver II-1, página 8).

Respecto a la metodología a emplear, el cribado de la HH puede ser realizado mediante: un cribado fenotípico, un cribado fenotípico/genotípico o un cribado genotípico/fenotípico. El cribado fenotípico consiste en pruebas bioquímicas de sobrecarga de hierro (saturación de transferrina o UIBC y ferritina sérica), mientras que un cribado genotípico consiste en el análisis de la mutación C282Y del gen HFE. Cada uno de estos cribados presenta diferentes ventajas y desventajas resumidas en la tabla 10.

Respecto a la aceptación del *test* por parte de la población tanto el cribado fenotípico/genotípico como el genotípico/fenotípico presentan una buena aceptación, sin embargo un cribado únicamente fenotípico donde se requiere una biopsia hepática presenta una menor aceptación en la población (Adams, 1999b).

Tabla 10. Comparación de métodos de cribado poblacional de la HH (Adams, 1999b).

	Tipo de cribado		
	Fenotípico/	Genotípico/	Fenotípico/
	TS o UIBC	TS o UIBC	C282Y
Test inicial	TS o UIBC	TS o UIBC	C282Y
2º Test	2ª TS	C282Y	Ferritina
	Ferritina		
Biopsia hepática	sí	no	no
Detección de todos los casos de sobrecarga de hierro	no	no	la mayoría
Edad dependiente	sí	sí	no
Detección de deficiencia de hierro	sí	sí	no
Detección de HH sin sobrecarga de hierro	no	no	sí
Coste del cribado	+	+	+++
Aceptación del test	+	++	++

TS saturación de transferrina. UIBC *unbound iron binding capacity*

Los estudios bioquímicos preceden la fecha del descubrimiento del gen HFE. La saturación de la transferrina (TS, %) da una indicación temprana de los incrementos de hierro acumulados (Edwards and Kushner, 1993), y se usa como prueba bioquímica inicial con preferencia a la determinación de la ferritina sérica. Actualmente existen una controversia acerca de que límite de saturación de transferrina debe ser usado para determinar a partir de cuando existe la posibilidad de desarrollar HH (45%, 50%, 55%, o mayor), ya que el valor empleado afectará la sensibilidad y especificidad del cribado. Así pues si tomamos un valor de

saturación de transferrina >45% se perderán menos individuos con posibilidad de desarrollar HH que si tomamos valores >50%, pero también habrá un gran número de estos individuos que no desarrollarán la enfermedad (falsos positivos), por otro lado si tomamos un valor de saturación de transferrina alto (>62%) el número de positivos falsos será pequeño, pero se perderían algunos individuos que desarrollarán HH. Esto se refleja en un estudio de 16.000 individuos, en el que sólo el 10% de los 932 que tenían una saturación de transferrina >45% en el test inicial tuvieron un diagnóstico final de HH (Phatak *et al.*, 1998).

El análisis genético de las mutaciones del gen HFE como diagnóstico para la HH presenta una serie de ventajas respecto al cribado bioquímico. El diagnóstico genético permite distinguir con certeza a los heterocigotos de los homocigotos y en consecuencia permite esclarecer el curso evolutivo de las manifestaciones clínicas y estudiar (partiendo de grupos más homogéneos) los factores que influyen en la penetrancia de la enfermedad (Adams *et al.*, 1994, Bulaj *et al.*, 1996). El cribado de la población general o de los familiares de primer grado de pacientes mediante el diagnóstico genético permite el diagnóstico presintomático de la enfermedad incluso muchos años antes de la aparición de alteraciones bioquímicas detectables. El diagnóstico genético acorta la ruta del diagnóstico y evita la necesidad de realizar una biopsia hepática en aquellos individuos C282Y/C282Y con valores normales de aspartato transaminasa, sin hepatomegalia y con unos niveles de ferritina sérica inferiores a 1000 ng/mL (Guyader *et al.*, 1998).

Sin embargo el análisis genético presenta todavía una cuestión sin resolver: la penetrancia de la mutación C282Y. Varios datos apuntan hacia una penetrancia incompleta del genotipo homocigoto de la mutación C282Y (ver sección II-6.1.1), por lo que no todo aquel que presente este genotipo desarrollará la enfermedad. Esto ha hecho que algunos expertos en el campo de la salud pública sean reticentes a un cribado poblacional hasta que exista más datos sobre la penetrancia de la enfermedad (Haddow and Bradley, 1999). Por otro lado, los médicos que ven casos irreversibles de la enfermedad debidos a un retraso en el diagnóstico defienden el cribado de la población y una mayor información a los médicos sobre la HH (Adams, 2000b). Uno de los problemas en la determinación de la penetrancia de la mutación C282Y es que no se sabe cuántos individuos con el genotipo C282Y/C282Y desarrollaran manifestaciones clínicas de la enfermedad, ya que ante una evidencia de elevación de los parámetros bioquímicos estos individuos son puestos en tratamiento. Existen estudios en los que se ha publicado que un 17,3% de sujetos homocigotos para la mutación C282Y no expresan una sobrecarga de hierro suficientemente alta para entrar dentro del criterio de definición de la HH (Crawford *et al.*, 1998). Por lo general la penetrancia de la mutación C282Y ha sido calculada respecto a una expresión fenotípica a nivel bioquímico (elevación de saturación de transferrina más ferritina sérica). De esta forma y según los últimos grandes estudios publicados (Tabla 11) la penetrancia del genotipo C282Y/C282Y abarcaría de un 18,8% a un 88,4%. La gran variabilidad de este valor podría deberse a que la muestra poblacional no está restringida a la población de mayor edad que es donde la enfermedad se manifiesta.

Los últimos datos que se ha publicado respecto a la penetrancia del genotipo C282Y/C282Y concluyen que menos del 1% de homocigotos para la mutación C282Y de la población general desarrollan manifestaciones clínicas de Hemocromatosis a pesar de que muchos presentan alteraciones bioquímicas (Beutler *et al.*, 2002).

Los resultados de los últimos grandes estudios poblacionales de HH (Tabla 11) evidencian que las mutaciones en el gen HFE afectan los valores bioquímicos de hierro y los individuos con una o dos mutaciones C282Y presentan una concentración de hierro y una saturación de transferrina mayor que individuos sin las mutaciones. En estos estudios también se demuestra que la ferritina sérica está más elevada en individuos con el genotipado C282Y/C282Y respecto a los normales.

Las estimaciones de la prevalencia de la HH previas al descubrimiento del gen se hacían basándose en la expresión fenotípica de la enfermedad. Con la caracterización del gen HFE se ha podido establecer la frecuencia de las mutaciones del gen y analizar su relación con los parámetros bioquímicos y la presencia o no de clínica en dichos individuos. Los resultados de los grandes estudios sobre HH donde se analiza las mutaciones del gen HFE y los parámetros bioquímicos se describen en la tabla 11. En estos estudios se puede apreciar que la prevalencia de la HH es menor que la del genotipado C282Y/C282Y. Las dos razones más probables de la discrepancia entre los estudios de prevalencia clínica y genética son: 1) una baja estimación (underdiagnosis) de la enfermedad y 2) una penetrancia incompleta del gen de la Hemocromatosis, es decir, una ausencia de sobrecarga de hierro en individuos con el genotipado C282Y/C282Y (Adams, 1999b).

Tabla 11. Grandes estudios poblacionales sobre HH

Tipo de muestra	País (región)	Test	Pruebas	N (H, M)	Prevalencia			C282Y/C282Y con BQ alta	Referencia
					C282Y/C282Y	BQ alta	HH		
Población general (censo electoral)	Nueva Zelanda (Christchurch)	G+BQ	TS>55%, F, UIBC, C282Y, H63D, B	1064 (423, 641)	1 en 213	1 en 133	1 en 355	37,5%	Burt et al., 1998
Población general	Australia (Busselton)	G+BQ	TS>45%, F, C282Y, H63D ¹ , B	3011 (1520, 1491)	1 en 189	1 en 158	1 en 251	66,6%	Olynyk et al., 1999
Empleados compañía	USA (Missouri)	G+BQ	TS>50/60%, F ¹ C282Y ² , H63D ²	1653 (288, 1365)	1 en 242 ²	1 en 551	1 en 330	33,3%	McDonnell et al., 1999
Donantes de sangre	Canada (Londres)	BQ, G	UIBC, TS>45%, F ¹ , C282Y, H63D ¹	5211 (2958, 2253)	1 en 327	1 en 868	-	18,8%	Adams et al., 2000
Donantes de plaquetas	Italia (Modena)	G+BQ	TS>45%, F C282Y, H63D	2100 (1122, 975)	1 en 3900 ³	-	-	-	Cassanelli et al., 2001
Donantes de sangre	Sur Gales	G+BQ	TS, F, UIBC C282Y, H63D	10556 (5066, 5470)	1 en 147	1 de 346		50%	Jackson et al., 2001
Población general	Noruega (Nord-Trondelag)	BQ, G	2TS>50/55%, F ¹ C282Y ¹ , H63D ¹ , B	65238 (30509, 34729)	1 en 147 ⁴	1 en 178	1 de 135 H/ 1 en 278 M	88,4%	Asberg et al., 2001

Test: BQ: Bioquímico, G: Genético. TS: saturación de transferrina, F: ferritina sérica, UIBC: *unbound iron binding capacity*, B: biopsia hepática. N: número de casos, H: Hombre, M: Mujer. BQ alta: Bioquímica alta = saturación de transferrina + Ferritina sérica elevada. HH: Hemocromatosis Hereditaria. ¹ Prueba no realizada en todas las muestras. ² solo 1450 individuos fueron genotipados. ³ Frecuencia predicha. ⁴ Prevalencia estimada, solo se genotiparon 559 muestras.

A pesar de la existencia de personas con la mutación C282Y en homocigosis sin alteraciones bioquímicas, se ha descrito que el genotipado C282Y/C282Y confiere un alto riesgo de desarrollar una sobrecarga de hierro, y que un *test* solo bioquímico deja al margen algunos individuos con la mutación C282Y en homocigosis y sin alteraciones bioquímicas. Además la alta frecuencia y efectos de las mutaciones C282Y y H63D sugieren que ambas mutaciones son factores importantes del estatus del hierro en poblaciones de origen europeo.

También existe una controversia respecto al orden en el que se debe realizar la metodología de cribado: análisis bioquímico-genético (fenotipo/genotipo) o análisis genético-bioquímico (genotipo/fenotipo). La realización de un análisis bioquímico seguido de uno genético presenta la desventaja de no identificar aquellos individuos homocigotos para la C282Y con valores normales bioquímicos y que posteriormente puedan desarrollar la enfermedad. Con el método alternativo, realizar un análisis genético-bioquímico, se detectan a todos los individuos con HH asociada al gen HFE. Las desventajas son el coste del *test* genético que excederían el coste de la determinación bioquímica más un genotipado selectivo y la imposibilidad de identificar causas raras no relacionadas con el gen HFE de sobrecarga de hierro. Cualquiera que sea el método usado (bioquímico-genético o genético-bioquímico), existe un motivo para realizar ambas pruebas en la muestra de sangre inicial, la proporción de pacientes (20%) que no vuelve para repetirse el test cuando son llamados (McDonnell *et al.*, 1998).

Ante de un cribado genético de la población de una determinada enfermedad existe la posibilidad de una discriminación social, sanitaria y/o laboral que deben ser evitada mediante la creación de leyes que prevengan este hecho. Sobretodo en Estados Unidos se ha levantado cuestiones de problemas éticos y de la obtención de un seguro médico debido a la realización del *test* genético y la identificación de homocigotos para la C282Y, particularmente si no tienen valores incrementados de acúmulo de hierro en el momento del diagnóstico. El resultado del *test* puede tener repercusiones negativas si se desea contratar un seguro de vida o médico (a pesar de ser beneficio para las compañías de seguros y los individuos tener esta información), y, quizás, también pudiera resultar en una discriminación en el trabajo (a pesar de la protección legal que existe al respecto). Actualmente, cualquier análisis genético realizado en individuos normales debe realizarse después de un consentimiento informado por escrito.

Una importante cuestión a resolver delante de un cribado poblacional es qué población a qué edad se debe realizar el cribado. La HH es una enfermedad de origen europeo y es muy rara encontrarla en poblaciones no caucásicas. Por lo tanto basándose en estos datos es razonable restringir el cribado para la HH a la población de origen europeo (Europa, EE.UU., Canadá, Australia, Sud-África). Se ha propuesto que el cribado para la HH se podría realizar junto al los análisis neonatales que se llevan a cabo para la detección de la fenilcetonuria, aunque para la HH clásica no es crítico un análisis al nacer, ya que es muy raro que la HH de tipo 1 cause ninguna morbilidad antes de los 20 años, por lo que éste se podría realizar en edad adulta (Bacon, 2001). Es importante también evitar un colapso del sistema sanitario por la realización de campañas masivas de cribado de la enfermedad en las que las personas tengan que hacer cola frente a los hospitales, por lo que se ha sugerido que el análisis se podría realizar en los centros de salud propios de cada individuo (ambulatorios) aprovechando su visita por cualquier otro motivo y bajo la supervisión del médico de cabecera.

Los principales factores que afectan al coste de un estudio de cribado poblacional son la prevalencia de la enfermedad, la penetrancia del gen y el coste del test inicial usado en el cribado. Una buena relación coste-eficacia respecto a un cribado poblacional se da cuando es más económico la detección de la enfermedad versus a su no detección. Por lo tanto en la decisión de realizar o no un cribado de la HH es importante saber la diferencia entre el coste de un paciente no tratado versus al coste del test utilizado para su diagnóstico. El coste que supone

los cuidados médicos necesarios en un individuo no diagnosticado comprende principalmente el coste del tratamiento de una cirrosis, pero también el de un carcinoma hepatocelular, la diabetes y un fallo cardíaco, que son otras posibles afectaciones. El análisis de los costes de un cribado poblacional para la HH ha predicho que existe un ahorro económico de un diagnóstico y tratamiento temprano de la enfermedad versus a los costes del cribado (estrategia dominante) (Adams, 1999b).

Recientes datos han confirmado una buena relación coste-eficacia si se usa la determinación automatizada del UIBC como prueba inicial de cribado bioquímico (Adams *et al.*, 2000; Hickman *et al.*, 2000) o usando la metodología de hibridación por oligonucleótido alelo específico (Beutler and Gelbart, 2000). Aún en el supuesto del más bajo valor de penetrancia de la mutación C282Y (19%) se ha descrito que la detección de la enfermedad precozmente es coste-efectivo respecto al coste que conllevaría el tratamiento de las complicaciones de la enfermedad (Williamson *et al.*, 2001). Solamente en Italia, donde se ha descrito una frecuencia de la mutación C282Y muy baja ($2,1\% \pm 0,6$), se ha concluido que el cribado de esta mutación en esta población mediante un método semiautomático (Tecnología TaqMan), no sería coste-efectivo (Restagno *et al.*, 2000). Hay que tener en cuenta también que la tendencia actual de la ciencia a la automatización y el mayor uso de esta tecnología rebajará los precios de la detección genética de las mutaciones, lo que hará viable económicamente el cribado genético de enfermedades frecuentes como la HH.

Otra cuestión que se apuntó en el debate sobre el cribado poblacional de la HH en el congreso Internacional BIOIRON 2001 realizado en Cairns, Australia, es que para muchas otras enfermedades como el cáncer de mama, cáncer de cervicales o cáncer de colon actualmente se están realizando un cribado poblacional mediante pruebas de diagnóstico (mamografías, biopsias cervicales y colonoscopías) que superan con creces el coste que supondría un cribado para la HH (Williamson *et al.*, 2001).

Actualmente y debido a la recomendación realizada por varias instituciones sanitarias, como el centro para el control de la enfermedad (CDC) de los Estados Unidos, ya se están llevando a cabo varios ensayos pilotos de cribado poblacional de las mutaciones C282Y y H63D del gen HFE para evaluar y esclarecer los problemas que se han planteado.

III.-Mecanismo de absorción del hierro

Como se ha expuesto en esta tesis la HH es una enfermedad involucrada en el metabolismo del hierro teniendo como principal gen responsable el gen HFE. El metabolismo del hierro y en general de los metales es un campo de investigación con profundas lagunas en el conocimiento detallado del mismo. Desde hace tiempo se conoce la existencia de algunas proteínas implicadas en el transporte y almacenaje del hierro como la transferrina y la ferritina, sin embargo el modo de absorción de los metales y la regulación de los mismos es un campo aún incipiente donde cada día se descubren nuevas proteínas involucradas en él. Con esta sección se pretende describir las proteínas involucradas en el metabolismo del hierro, haciéndose un especial hincapié en la proteína hfe.

1.-El hierro

El hierro es un componente esencial para los organismos debido a que es necesario para la actividad de muchas proteínas celulares. En los vertebrados, múltiples procesos fisiológicos incluyéndose el transporte de oxígeno, la respiración, la síntesis de DNA, la formación de neurotransmisores y hormonas, el metabolismo de xenobióticos y ciertos aspectos de la defensa contra microorganismos, requieren de proteínas que contienen hierro. Sin embargo el uso de hierro en los sistemas biológicos presenta dos inconvenientes: su baja solubilidad y su toxicidad en potencia ya que el hierro puede promover la formación de intermediarios del oxígeno altamente reactivos, como el radical hidroxilo y promover así la oxidación de los lípidos (lipoperoxidación), de las proteínas o de otros componentes celulares. Los organismos biológicos han desarrollado una serie de mecanismos que permiten adquirir y hacer uso del hierro reduciendo los efectos adversos de este micronutriente sobre la viabilidad celular. Uno de estos mecanismos consiste en la unión específica del hierro a proteínas que incrementan su solubilidad y reducen su toxicidad, además de ejercer un control sobre el metabolismo de este metal.

Los mamíferos usan una combinación de mecanismos transcripcionales y post-transcripcionales para controlar la abundancia de proteínas que modulan el transporte, la captación celular, y el destino metabólico del hierro.

En general, el hierro puede ser empleado de tres maneras distintas en la célula. Puede ser incorporado en proteínas que contienen hierro (en forma hemo o no hemo), puede ser almacenado o puede ser exportado fuera de la célula. En el hígado y especialmente en el eritrocito, la mayor parte del hierro citoplasmático se utiliza para la síntesis del grupo hemo que posteriormente será incorporado en proteínas como la hemoglobina. En la mayoría de las células el enzima limitante para la formación del grupo hemo es el 5-aminolevulinato sintetasa o ALAS, la síntesis del cual está ligada a los niveles de hierro vía las IRPs (*iron response proteins*) (ver sección 2.14). En el almacenamiento del hierro la ferritina juega un papel primordial, y su regulación también está estrechamente ligada a los niveles celulares de hierro. En la exportación del hierro se han involucrado proteínas recientemente descubiertas como el exportador IREG1 y las oxidasas que contienen cobre ceruloplasmina (Cp) y hephaestin (HEPH) (ver secciones 2.8, 2.9 y 2.10).

El cuerpo humano masculino contiene de 3 a 5 gramos de hierro (normalmente menos en el femenino) y de esta cantidad dos terceras partes se encuentran en circulación en las células de la serie rojas formando parte de la hemoglobina y un 15-25% se encuentra almacenado como ferritina o hemosiderina. El resto del hierro, aproximadamente un 8% está en la mioglobina del músculo, en los citocromos y en los enzimas que contienen hierro (Harrison and Arosio, 1996).

Los principales órganos que acumulan hierro son el hígado (aproximadamente una tercera parte), el bazo y la médula ósea. El músculo es cuantitativamente importante debido a que constituye una gran masa, aunque la concentración total de hierro almacenado es baja (40 mg/Kg). Solo 1 mg de hierro es absorbido por día en individuos sanos, este número representa solo un 10% del contenido de hierro de la comida; esta cantidad se regula dependiendo de la necesidad corporal de hierro, así pues en situación de déficit de hierro y en situaciones de incremento de la eritropoiesis se absorbe más hierro. En humanos los medios de excreción de hierro, a excepción de la menstruación, son limitados ya que no existe un mecanismo de excreción de este metal. La pérdida de hierro se debe principalmente a la descamación de las células intestinales y en menor proporción a excreciones en la orina y el sudor. Por lo tanto se precisa de un minucioso control que mantenga el equilibrio entre la entrada y la salida de hierro.

Existen situaciones en las que se da una absorción de hierro anormal como es el caso de los diferentes tipos de Hemocromatosis (ver sección I-2). En la mayoría de formas de sobrecarga de hierro, el hierro almacenado se deposita en las células de Kupffer y en otras células fagocíticas, pero en la Hemocromatosis existe una sobrecarga de hierro preferencialmente en las células parenquimales (los hepatocitos, en el caso del hígado). Ambos tipos de sobrecarga de hierro pueden ser movilizados ya sea por flebotomías en el caso de la HH o por tratamiento con agentes quelantes de hierro como es el caso de las anemias con sobrecarga de hierro. En situaciones de deficiencia de hierro las reservas de hierro están disminuidas o pueden estar totalmente ausentes.

2.-Proteínas implicadas en el metabolismo del hierro

2.1.-La proteína hfe.

2.1.1.-Estructura de la proteína hfe

El gen HFE tiene un marco de lectura abierto de 1029 nucleótidos y codifica para una proteína de 343 aminoácidos muy homóloga a las moléculas no-clásicas del complejo de Histocompatibilidad de clase I o MHC I. La proteína está organizada en tres dominios extracelulares ($\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$), un dominio transmembrana y una cola citoplasmática corta. Presenta 4 cisteínas muy conservadas que forman 2 puentes disulfuros intracelulares, uno en el dominio $\alpha 2$ y otro en el dominio $\alpha 3$ (Fig. 8). Estos puentes disulfuros son esenciales para el correcto plegamiento de la proteína, para la interacción no covalente con la proteína $\beta 2$ -microglobulina y para la localización en la superficie celular de la proteína (Feder *et al.*, 1997; Waheed *et al.*, 1997).

A diferencia de las proteínas del MHC I la proteína hfe presenta un surco más estrecho entre los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ por lo que se ha hipotetizado que este hecho hace que la proteína sea

incapaz de presentar antígenos tal y como lo hacen las moléculas del HLA. Así pues, la proteína hfe no tendría esta función inmunológica. Debido a estas diferencias la molécula del HFE se ha clasificado como molécula del MHC de clase I no clásica grupo en el que también se encuentran las moléculas Rcn, HLA-G y HLA-F.

La estructura de la proteína HFE ha sido realizada de acuerdo con su similitud a la estructura de las proteínas del MHC de clase I (Fig. 8). La mutación C282Y se encuentra en el dominio α_3 , dominio implicado en la unión con la proteína β_2M mientras que la mutación H63D se encuentra en el dominio α_1 (Fig. 8).

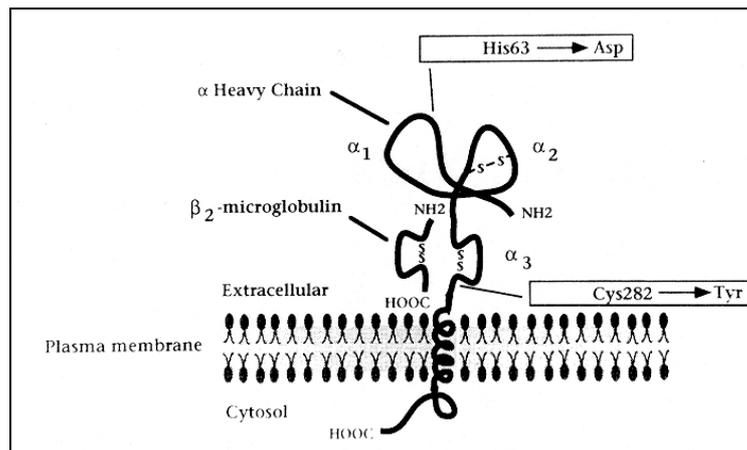


Figura 8. Modelo de la proteína HFE (Feder *et al.*, 1996)

La proteína hfe fue cristalizada en 1998 con una resolución de 2.6 Å (Lebrón *et al.* 1998). En este estudio también se caracterizó su interacción con el TFR describiéndose una estequiometría TRF:HFE de 2:1, diferente de la del complejo TFR:TF que es 2:2 y compatible con la posibilidad de la formación de un complejo ternario entre la proteínas hfe, la transferrina y el TFR. También se han obtenido cristales de la proteína HFE asociada al TFR lo que ha permitido precisar el sitio de unión de la proteína hfe al TFR, que es la porción C-terminal del dominio en hélice α_1 y el asa o *loop* adyacente (Lebrón *et al.*, 1999).

2.1.2.-Función y localización de la proteína hfe

Un año después del descubrimiento del gen HFE y la mutación C282Y, dos publicaciones confirmaron la predicción de que la mutación C282Y pudiera romper un puente disulfuro crítico en el dominio α_3 de la proteína hfe, evitándose de esta forma la unión de la proteína hfe con la proteína β_2 microglobulina (β_2M) y el transporte a la superficie celular de este complejo hfe- β_2 microglobulina (Feder *et al.*, 1997; Waheed *et al.*, 1997). La proteína no mutada o la proteína con la mutación H63D sí se asociaban con la proteína β_2 microglobulina y es transportada a la membrana. Datos inmunológicos y bioquímicos demostraron que la proteína HFE con la mutación C282Y se retenía en el retículo endoplasmático y en los compartimentos del aparato de Golgi, la proteína no era procesada en el aparato de Golgi tardío y era degradada con mayor rapidez (Waheed *et al.*, 1997).

Estudios funcionales y cristalográficos demuestran que la proteína HFE interacciona con el receptor de transferrina clásico (TFR) en la superficie celular y compite con la transferrina (TF) en la unión al receptor de transferrina (Parkkila *et al.*, 1997a; Feder *et al.*, 1998; Lebrón *et al.*, 1998; Lebrón and Bjorkman 1999; Lebrón *et al.* 1999). Estudios de sobreexpresión del gen HFE demuestran que la proteína hfe interfiere con el proceso de transporte de hierro del endosoma al citoplasma, ya sea a nivel de la acidificación de los endosomas, la reducción del Fe³⁺ o en el transporte a través de la membrana del endosoma del Fe²⁺ (Arredondo *et al.*, 2001). Por lo tanto la función normal del gen HFE es la de disminuir la entrada de hierro al citoplasma celular, actuando a dos niveles: a nivel de la membrana plasmática inhibiendo la captación de este metal a través de la vía TFR-TF y a nivel endosomal bloqueando el transporte de hierro al citoplasma.

La mutación C282Y bloquearía la llegada de la proteína hfe a la membrana y por lo tanto su interacción con el TFR, mientras que la mutación H63D afectaría a la competencia entre el HFE y la TF por el TFR, lo que resultaría en una entrada incrementada del hierro en los tejidos que contribuiría a la formación de los depósitos de hierro. De esta manera se da una explicación molecular a las mutaciones presentes en los pacientes con HH (Feder *et al.*, 1998).

A pesar de que la relación entre el TFR y HFE es la primera evidencia de implicación del gen HFE en el metabolismo del hierro, la disminución de la afinidad del TFR por la TF que produce el gen HFE no explica el incremento de la absorción intestinal de hierro que se encuentra en los pacientes de HH, ya que el TFR solo se expresa en la región basal y no apical de los enterocitos (Arredondo *et al.*, 2001). Varias hipótesis se barajan sobre el papel de la proteína hfe en la absorción intestinal del hierro (ver sección 5).

La sobreexpresión del gen HFE en células de epitelio intestinal Caco-2 y células HeLa disminuye el contenido intracelular de hierro y la absorción apical de hierro (Roy *et al.*, 1999; Corsi *et al.*, 1999; Riedel *et al.*, 1999), pero esta disminución en la absorción apical del hierro no es debida a un descenso de la expresión del transportador DMT1 (ver 2.6), ya que la proteína DMT1 se encuentra incrementada (Arredondo *et al.*, 2001). Al contrario que en las células Caco-2 o HeLa, se ha reportado que en monocitos y macrófagos la sobreexpresión del gen HFE induce un incremento en la captación de hierro ligado a TF (Montosi *et al.*, 2000), por lo tanto el metabolismo del hierro es diferente en el enterocito y los macrófagos y el gen DMT1 podría actuar de diferente manera en ambos sistemas.

La disminución en la captación del hierro unido a la TF hallada en las células HeLa con sobreexpresión de HFE produce un aumento en la captación del hierro no unido a TF (Corsi *et al.*, 1999), pero aún no se sabe que mecanismos moleculares son responsables de este efecto.

Estudios inmunohistoquímicos han revelado que la proteína hfe se expresa solo en ciertas células del tracto alimentario humano (las células de la cripta del duodeno) con una localización única intracelular y perinuclear, totalmente diferente a la localización de membrana que tendría en los demás tejidos (Parkkila *et al.*, 1997b). Mediante *Northern blot* y RT-PCR se ha detectado que el mRNA de HFE se expresa constitutivamente y a unos niveles muy bajos en todos los tejidos testados, siendo mayoritaria su expresión en hígado (Feder *et al.*, 1996; Rhodes *et al.*, 1999).

2.1.3.-El gen HFE en ratón

Un año antes de que Feder y colaboradores descubrieran el gen HFE, en 1995, Hashimoto y colaboradores identificaron sin saberlo y mientras buscaba genes homólogos al MHC de clase I humano en ratón, el gen homólogo del HFE en ratón que denominaron MR2 (Hashimoto *et al.* 1995). El gen homólogo en ratón presenta una similitud de aproximadamente un 66% en secuencia y se expresa en todos los tejidos analizados (corazón, cerebro, bazo, pulmón, hígado, músculo, riñón, testículo) (Hashimoto *et al.* 1997). El gen MR2 presenta 8 aminoácidos extra entre el dominio α -1 y α -2 procedentes de la creación adicional de secuencia codificante a partir del intrón. Los autores demostraron que mientras que el gen en humanos se localiza telomérico a la región del MHC en el cromosoma 6, el gen homólogo en ratón estaba translocado desde la posición sinténica telomérica del MHC del cromosoma 17 de ratón al cromosoma 13 junto con otros genes.

2.2.- β -2-microglobulina (B2M)

La proteína β 2M consta de una cadena polipeptídica de peso molecular 11.600 Da. Presenta homología con la secuencia de las inmunoglobulinas y es el componente de bajo peso molecular de los antígenos HLA. La β 2M es esencial para la expresión de los HLA. Líneas celulares como la de melanoma humana FO-1, la línea celular Burkitt linfoma y líneas celulares colorectales no expresan los antígenos del HLA de clase I debido a deleciones del gen β 2M. La ausencia de la expresión de los antígenos HLA de clase I de las líneas celulares se ha propuesto como uno de los mecanismo de escape del reconocimiento del sistema inmune por las células citotóxicas T (OMIM 109700).

La proteína HFE responsable de la HH se asocia también a la proteína β 2M y su expresión en membrana también dependiente de su asociación con la proteína β 2M (Waheed *et al.*, 1997).

De Sousa y colaboradores (1994) describieron una distribución tisular de hierro en ratones heterocigotos y homocigotos para el KO del gen β 2M comparable a nivel histológico y cuantitativo con la presente en la HH. Además los ratones KO homocigotos presentaban una sobrecarga progresiva de hierro hepática indistinguible de la observada en la HH humana.

2.3.-Ferritina H y Ferritina L

La ferritina es una cavidad proteica compuesta por 24 cadenas polipeptídica de dos tipos de subunidades (H y L) capaz de almacenar hasta 4.500 átomos de Fe(III). La ferritina tiene un diámetro exterior de 12-13 nm y interior de 7-8 nm y un peso de aproximadamente 500.000 Da. La ferritina está presente en todas las especies y su estructura tridimensional está muy conservada. Su habilidad para secuestrar hierro le confiere una función dual de proteína destoxicadora de hierro y de reserva de hierro (Harrison and Arosio, 1996).

Existe tanto la forma de heteropolímeros de subunidades de ferritina (H y L) como los homopolímeros de subunidades (H o L). La secuencia de la subunidad H y L presentan aproximadamente un 45% de identidad. Las dos subunidades que componen la ferritina

presentan diferentes papeles en el metabolismo del hierro. La H-ferritina es una ferroxidasa y su actividad promueve una rápida incorporación del hierro en ferritinas ricas en esta subunidad. La forma rica en subunidades L captan hierro más lentamente, pero parece ser que la acumulación de hierro es a más largo término. Por lo tanto, en general, los tejidos que almacenan hierro como el hígado y el bazo presentan ferritinas ricas en la forma L y estas ferritinas normalmente presentan un relativamente alto contenido de hierro (1500 átomos de Fe/ molécula o más) (Harrison and Arosio, 1996).

La producción de ferritina está directamente ligada al estatus celular de hierro, a través de cambios en la traducción de los mRNAs de las formas H y L vía la interacción de las IRPs (*iron response proteins*) con el elemento IRE (*iron response element*) presente en el 5' del mRNA de ambas formas (ver 2.13). Esta interacción permiten una rápida respuesta en las situaciones de exceso o deficiencia de hierro celular. Cuando la síntesis de ferritina es activada la proporción de cada una de las dos subunidades dependerá de la abundancia relativa de cada mRNA, que varía dependiendo del tejido o tipo celular; así pues la subunidad H toma este nombre debido a que en el corazón (*Heart*) es más abundante, mientras que la subunidad L es más abundante en hígado (*Liver*). También existe un control a nivel transcripcional de ambos genes que codifican para la subunidad H y L. Se ha descrito que varias hormonas, como el TNF- α (*tumor necrosis factor alfa*), la tirotropina, la hormona tiroidea y la insulina y que los oncogenes E1A y c-myc afectan a la transcripción de la ferritina H (Eisenstein RS, 2000).

Aunque en los vertebrados la ferritina se localiza principalmente en el citoplasma, bajas concentraciones (123 ng/ml en hombres, 56 ng/ml en mujeres) están presentes en el plasma. La forma de ferritina detectable en plasma no presenta subunidades de tipo H y es pobre en hierro. Se han descrito receptores de ferritina sérica en células del hígado, linfocitos, eritroblastos, adipocitos y en diferentes líneas celulares (Harrison and Arosio, 1996).

Tanto en humanos como en otros mamíferos se han identificado múltiples copias de los genes de la forma H y L de las ferritinas, la mayoría corresponden a pseudogenes sin intrones. En el hombre existen alrededor de 16 copias del gen H-ferritina y 5 de la L-ferritina (Craggs *et al.*, 1985; McGill *et al.*, 1987). Las copias funcionales de los genes de la H y la L-ferritina se localizan en 11q23 y en el cromosoma 19, respectivamente. Ambos genes presentan 3 intrones.

Recientemente se ha descrito la existencia de una ferritina mitocondrial codificada por un gen de copia única sin intrones y localizada en 5q23.1. Esta nueva forma de ferritina tiene actividad ferroxidasa y su mRNA no presenta el IRE (*iron response element*) existente en el 5' del mRNA de las formas H y L. Este gen se expresaría en testículo y células eritroideas y sus niveles están muy aumentados en los sideroblastos de pacientes con anemia sideroblástica (Levi *et al.*, 2001).

Los ratones KO para el gen de la ferritina H mueren en útero pero los ratones heterocigotos se ha propuesto como modelos animales del desorden del metabolismo del hierro que se produce en el Alzheimer y el Parkinson (Thompson *et al.*, 2001).

2.3.1.-Hemosiderina

En condiciones normales la ferritina es la principal proteína que almacena hierro, pero en enfermedades de sobrecarga de hierro la hemosiderina es la proteína predominante, este es el

caso de la HH que presenta depósitos de hemosiderina en los hepatocitos del hígado y otras células parenquimales de otros tejidos debido a una anormalmente incrementada absorción de hierro por el intestino.

La hemosiderina es un producto de degradación de la ferritina y a diferencia de la ferritina que es soluble, la hemosiderina es insoluble. Bajo el microscopio electrónico la hemosiderina se ve como agrupaciones masivas e irregulares de partículas densas encerradas en membranas que se cree que son lisosomas secundarios y que reciben en nombre de siderosomas. Las formas de hemosiderina presenten en la Hemocromatosis primaria y la Hemocromatosis secundaria son diferentes. La hemosiderina presente en la Hemocromatosis primaria o HH contiene un péptido mayoritario de 20kDa y un núcleo amorfo de óxido férrico, mientras que la hemosiderina presente en Hemocromatosis secundarias contiene mayoritariamente un péptido de 15 KDa y un núcleo de hierro estructurado tipo goetita, a diferencia de la ferritina que presenta un núcleo de hierro estructural tipo ferrihidrita. Se ha postulado que en la Hemocromatosis secundaria el hierro de la ferritina sería parcialmente solubilizado en los lisosomas lo que permitiría su reprecipitación para formar la estructura menos tóxica tipo goetita. En Hemocromatosis primaria o HH la rápida incorporación de hierro induciría una rápida precipitación de hierro intracelular con una formación de núcleos de hierro caótica (Harrison and Arosio, 1996).

2.3.-Transferrina (TF)

La transferrina (TF) es una glicoproteína con una masa molecular aproximada de 76.500 Da y su cadena polipeptídica la componen 679 aminoácidos. La transferrina se originó como consecuencia de una duplicación intragénica de un gen ancestral, esta duplicación condujo a la presencia de dominios N y C terminales homólogos, cada uno de los cuales une un ión de hierro férrico (Fe^{+3}). Por lo tanto, la TF puede unir dos átomos de hierro como máximo. Normalmente un tercio de los sitios de unión de hierro están saturados de hierro en el suero, con la apo forma presente para evitar la acumulación de hierro libre (OMIM 190000).

La TF del plasma contiene 3 mg de hierro, pero el intercambio diario de hierro a través de la TF es 10 veces esta cantidad, por lo tanto la TF es el principal medio de transporte de hierro (en forma no hemo) entre órganos.

La transferrina transporta hierro desde el intestino, el sistema reticuloendotelial y las células parenquimales del hígado a todas las células proliferantes del organismo. La TF acepta hierro procedente de las células reticuloendoteliales (22 mg diarios procedentes de la destrucción de las células rojas), de tejidos parenquimales (7 mg/día), de las células de la mucosa intestinal (1mg/día) y lo entrega a los eritoides de la médula (22 mg/día) y otros tejidos para la síntesis de proteínas que contienen hierro y para su almacenamiento (Harrison and Arosio, 1996). La captación celular de hierro unido a TF se realiza a través de endocitosis mediada por receptor tal y como se explica en el siguiente apartado.

La expresión de la TF está influenciada por múltiples factores, y la abundancia de la TF sérica está inversamente relacionada al estatus corporal de hierro. En situación de deficiencia de hierro, la transcripción del gen de la TF se incrementa de 2 a 3 veces en el hígado, que es el

principal órgano de síntesis de la TF. Cuando los niveles de hierro son altos se reduce la traducción del mRNA de la TF.

2.4.-Receptor de transferrina clásico (TFR)

El TFR es una proteína de aproximadamente 95.000 Da que forma homodímeros y es capaz de unir dos moléculas de transferrina (TF). A pH extracelular la TF diférrica se une al TFR, el complejo TF-TFR es internalizado por endocitosis mediada por receptor y en el compartimento endosomal donde el pH es ácido el hierro se libera de la TF y es bombeado al citoplasma, posiblemente por la proteína DMT1 (ver 2.6) (Fleming *et al.*, 1998). El complejo apo-TF-TFR se recicla a membrana donde a pH extracelular la apo-TF se disocia del TFR y puede captar de nuevo hierro del plasma.

El TFR se encuentra en la mayoría pero no en todos los tipos celulares del organismo. El número de TFR presentes en la superficie celular es proporcional a la captación de hierro, además la deficiencia de hierro induce la expresión del TFR. La función del TFR puede ser afectada por otras proteínas como el SFT y el HFE. El SFT estimula la captación de hierro vía TF y vía no-TF, mientras que el HFE reduciría la captación de hierro unido a TF. La vía por la que el hierro modula la síntesis del TFR es mediante alteraciones en la estabilidad del mRNA a través de la interacción de los IREs presentes en el 3' del mRNA del TFR y las IRPs, esta vía de regulación es la principal en condiciones de deficiencia de hierro (ver 2.13). También existe cierto grado de modulación transcripcional del gen TFR, aunque este tipo de regulación es más importante en células eritropoiéticas. La transcripción del gen TFR está también influenciada por el crecimiento celular (OMIM 190010).

La inactivación del gen TFR implica serias consecuencias en el desarrollo del eritrocito y del sistema nervioso (Levy *et al.*, 1999a)

2.5.-Receptor de transferrina 2 (TFR2)

Al intentar aislar genes codificantes para un nuevo factor de transcripción de una genoteca de cDNA de leucemia eritroidea (TF-1) Kawabata y colaboradores clonaron un fragmento de 831 pb de cDNA humano con homología a nivel de aminoácido con el receptor de transferrina clásico (Kawabata *et al.*, 1999). Mediante 5' y 3' RACE clonaron el cDNA completo (2,9 kb) que fue denominado TFR2. Dos transcritos fueron identificados uno de 2,9 kb llamado α y otro de 2,5 kb llamado β y clonado a partir de una genoteca de cDNA de leucemia mielocítica. La forma α consiste en una proteína transmembrana de tipo II de 801 aminoácidos con un 45 % de identidad y un 66% de similaridad en su dominio extracelular con el TFR clásico. La forma β resultaría de un *splicing* diferencial o de la utilización de un promotor alternativo; esta forma no presenta el extremo amino-terminal de la forma α incluyéndose el posible dominio transmembrana. Mediante Northern blot se detectó expresión de la forma α en hígado y en la línea celular eritromegacariocítica K562, mientras que por RT-PCR se detectó expresión de la forma α en hígado, bazo, pulmón, músculo, próstata, células mononucleares de sangre periférica. Respecto a la forma β no se detectó expresión mediante Northern blot pero sí mediante RT-PCR en todos los tejidos analizados (Kawabata *et al.*, 1999)..

La expresión de la forma humana del TFR2 se une a holotransferrina y confiere transporte de hierro mediado por transferrina en una línea celular de ovario de hámster Chino que no presenta TFR endógeno. Los autores concluyeron que TFR2- α podría ser un receptor de transferrina secundario que podría intervenir en el transporte celular de hierro. El TFR2- α contiene 18 exones, la forma β no presenta los exones del 1 al 3 y presenta 142 bases adicionales en el extremo 5' del exón 4. El TFR2 se localiza en 7q22.

La mayoría de la entrada de hierro al hígado es mediada por transferrina en condiciones normales. La expresión del TFR clásico en hepatocitos y en otras células no-reticuloendoteliales está regulada de forma negativa en respuesta a un incremento intracelular de hierro, por lo que no se detecta expresión del TFR clásico en el hígado de enfermos de Hemocromatosis Hereditaria con sobrecarga de hierro hepática. No obstante, la carga hepática de hierro en estos pacientes es progresiva y no se detiene. A diferencia del TFR clásico, el transcrito del TFR2 se expresaba altamente en hepatocitos y no está regulado por el estado tisular de hierro ni su expresión disminuye en ratones modelos para la Hemocromatosis Hereditaria (Kawabata *et al.*, 1999). Así pues se ha propuesto que el TFR2 continúa mediando la entrada de hierro unido a transferrina en el hígado después de que se produzca la regulación negativa del TFR clásico. De esta manera se puede explicar el progresivo incremento de hierro que se produce en el hígado de los enfermos de Hemocromatosis Hereditaria.

El TFR2 presenta una alta expresión en hígado y une TF, aunque con una afinidad de unión mucho menor que la del TFR clásico (Kawabata *et al.*, 2000; West *et al.*, 2000). A diferencia del TFR clásico, que se ha descrito que interacciona con la proteína HFE, existe estudios contradictorios sobre si el TFR2 se asocia o no con el HFE (West *et al.*, 2000, Griffiths and Cox, 2001).

Hasta la fecha se ha descrito cuatro mutaciones (Y250X, insC, M174K, Δ AVAQ) en homocigosis en familias italianas con Hemocromatosis de tipo 3 en el gen TFR2 (ver I-2.3).

2.6.-DMT1/DCT1/Nramp2

La proteína Nramp2/DMT1/DCT1 se descubrió mediante un sistema de clonaje y expresión en oocitos de *Xenopus* usado para la identificación de proteínas capaces de transportar metales iónicos (Gunshin *et al.*, 1997). Esta proteína es homóloga a la proteína Nramp1, que es una proteína asociada a la resistencia a la infección por parásitos intracelulares.

Mutaciones en el gen Nramp2 han sido implicadas como causa de la anemia microcítica en ratones mk/mk, estos ratones presentan defectos en la absorción intestinal del hierro y en la entrada del hierro en las células rojas. La mutación causante de este fenotipo es la G185R en estado homocigoto del gen Nramp2 (Fleming *et al.*, 1997). Esta misma mutación es la causa de la deficiencia de hierro que presentan las ratas anémicas Belgrado, que son deficientes en el paso del hierro del endosoma al citoplasma del eritroblasto (Fleming *et al.*, 1998). Por mutagénesis dirigida del gen murino DMT1 se ha confirmado que la mutación G185R hace que se pierda la función de transportador de hierro de la proteína DMT1 (Su *et al.*, 1998).

La existencia de esta mutación en el gen Nramp2 de ratones mk/mk y ratas Belgrado así como el hecho de que mientras que el ratón KO para el gen HFE presenta un fenotipo de sobrecarga severa de hierro, el doble KO HFE/DMT1 no sobrecumula hierro (Levy *et al.*,

2000), son evidencias que indican que el gen DMT1 es el principal transportador apical de hierro del enterocito duodenal. A parte de ser el importador de hierro del lumen al citoplasma del enterocito, la proteína DMT1 podría también actuar como exportador de hierro desde el endosoma al citoplasma (Andrews *et al.*, 1999).

En un principio se identificaron dos formas de mRNA del gen DMT1 producidas por *splicing* diferencial del 3' UTR, una de estas formas presenta un IRE (*iron response element*) que permite la regulación de la traducción del mRNA dependiendo de los niveles del hierro celular, vía IRPs (ver 2.13) (Gunshin *et al.*, 1997). Recientemente se ha descrito que también existe *splicing* en el 5' del gen, por lo que son 4 los transcritos posibles del gen DMT1 (Ex1A-IRE, Ex1A-nonIRE, Ex1B-IRE y Ex1B-nonIRE) (Hubert and Hentze, 2001). Los diferentes transcritos tienen una expresión diferente según el tejido, siendo la forma Ex1A-IRE la que se expresa mayormente en duodeno y por lo tanto la que debe ser regulada mayoritariamente por los niveles de hierro tanto a nivel transcripcional como traduccional (Hubert and Hentze, 2001).

La proteína DMT1 se ha localizado mediante técnicas de inmunolocalización en la barrera apical o *brush border* del enterocito en rata deficientes de hierro (Trinder *et al.*, 2000) y en el duodeno humano (Griffiths *et al.*, 2000).

2.7.-IREG1/ferroportina 1 (FPN1)/MTP1/SLC11A3

La captación férrica del lumen intestinal a través de la superficie apical del enterocito duodenal polarizado se realiza a través del transportador de metal de divalente, DMT1. Varios grupos identificaron un segundo transportador involucrado en exportar hierro a través de la superficie basolateral del enterocito a la circulación (Donovan *et al.*, 2000; McKie *et al.*, 2000; Abboud and Haile, 2000). Donovan y colaboradores identificaron mediante clonación posicional el gen responsable de la anemia hipocrómica del pez cebra mutante '*weissherbst*'. El gen, que llamaron ferroportina-1 (FPN1), codifica para una proteína con múltiples dominios transmembranas y se expresaba en el saco yolk del pez cebra, por lo que era un buen candidato para ser exportador de hierro. Este grupo también aisló los cDNAs humanos y de ratón por RT-PCR de hígado y placenta. Mediante una estrategia de clonaje y análisis por PCR otro grupo aisló el mismo cDNA en ratón y humano, llamándolo gen IREG1 (*iron-regulated transporter 1*) (McKie *et al.*, 2000).

Por Northern blot se observó que el nivel más alto de expresión se daba en placenta, hígado, bazo, y riñón. En el ratón, los eritroblastos primarios no expresan FPN1, pero las células del trofoblasto de la placenta interna expresan niveles muy elevados de ferroportina-1. Ambos grupos verificaron que el gen FPN-1 funcionaba como un exportador de hierro ferroso (Fe^{+2}) al ser expresado en el oocitos de *Xenopus* (Donovan *et al.*, 2000; McKie *et al.*, 2000).

La proteína FPN1 humana es una proteína de 571 aminoácidos con 10 dominios transmembranas y presenta un IRE (*iron response element*) en el 5' UTR que se encuentra conservado en las tres especies (pez cebra, ratón y humano). En la placenta humana, la proteína se localiza principalmente en la región de los sincitiotrofoblastos, lo que sugiere que transporta hierro de la madre al embrión. La ferroportina-1 de mamífero se localiza en la superficie basolateral del enterocito duodenal (Donovan *et al.*, 2000; McKie *et al.*, 2000). Por FISH, se

posicionó el gen en el cromosoma 2q32 humano y en el cromosoma 1 banda 1B de ratón (Haile DJ, 2000).

Mutaciones en esta proteína se han identificado en 2 familias con Hemocromatosis tipo 4 con *pedigree* dominante (ver I-2.4).

2.8.-Ceruloplasmina (Cp)

La ceruloplasmina es una proteína que transporta cobre (Cu) a través de la sangre. La Cp está también asociada con el metabolismo del hierro ya que presenta actividad ferroxidasa y está implicada en la oxidación del Fe (II) a Fe(III) que es captado por la TF (Osaki *et al.*, 1966). Mutaciones en el gen de la Cp dan lugar a la aceruloplasminemia. La aceruloplasminemia es una enfermedad autosómica recesiva que se caracteriza por una deficiencia de ceruloplasmina, bajos niveles de hierro sérico, altos niveles de ferritina sérica y un acúmulo excesivo de hierro en el cerebro, el hígado y el páncreas. Esta enfermedad cursa con demencia, pérdida de memoria, diabetes, degradación de la retina y presenta una edad de inicio tardía (OMIM 117700).

2.9.-Hephaestin (HEPH)

A través del estudio del ratón con deficiencia anémica ligada al cromosoma X (*sla*, *sex-linked anemia*) se identificó un componente nuevo en el metabolismo del hierro, la proteína Heph (Vulpe *et al.*, 1999). El ratón *sla* presenta un bloqueo del transporte de hierro intestinal (Grewal, 1962). Los ratones que llevan la mutación *sla* desarrollan anemia hipocrómica microcítica de moderada a severa. En estos ratones la absorción de hierro a través del lumen intestinal a las células epiteliales es normal, pero la salida del hierro a la circulación está disminuida (Bannerman, 1976). Como resultado de esto el hierro se acumula en el enterocito y se pierde durante el recambio del epitelio intestinal (Edwards *et al.*, 1977).

Falconer y Isaacson (1962) mapearon el locus *sla* en el cromosoma X de ratón. Anderson y colaboradores (1998) acotaron la región crítica entre los marcadores DXMit45 y DXMit16. Una serie de coincidencias condujo al descubrimiento del gen candidato de *sla*, llamado hephaestin (Heph) en honor al dios griego que trabaja el metal. Vulpe y colaboradores (1999) se dieron cuenta de que varios EST de ratón y humanos presentaban homología con la ceruloplasmina, una ferroxidasa sérica que transporta cobre, y aislaron un cDNA completo de ratón que codificaba para una proteína 50% idéntica a la ceruloplasmina de ratón. Los sitios I, II y III de unión de cobre de la Cp están conservados en la HEPH al igual que todos los residuos de cisteínas involucrados en la formación de puentes disulfuro. A diferencia de la ceruloplasmina, la hephaestin contiene un dominio predicho transmembrana en el C-terminal que hizo pensar que se trataba de una proteína de membrana. Mediante híbridos de radiación se mapeó la HEPH humana a 14.55 cR de DXS1194 en Xq11-q12 (*lod score* = 7.81), una región sinténica homóloga a la región *sla* de ratón.

La Cp se encuentra altamente expresada en hígado, en menor grado en otros tejidos incluyéndose cerebro y pulmones, y no se expresa en intestino. Contrariamente a este patrón de expresión la Heph se expresa mucho en intestino (Vulpe *et al.*, 1999). Estudios de hibridación *in*

situ indican que la expresión intestinal de la Heph está limitada a las células de la villi donde se da la absorción intestinal de hierro, sin casi ninguna expresión en las células de la cripta intestinal. Vulpe y colaboradores descubrieron que el ratón *sla* presenta una delección de 582 nucleótidos del gen HEPH, que predice una delección en pauta de lectura de 194 aminoácidos de la proteína. En base a la homología con la Cp y a que la proteína sólo presenta un dominio transmembrana, con lo que es poco probable de que se trate de un transportador, se propuso que la Heph sería una ferroxidasa necesaria para la salida del hierro de las células epiteliales intestinales que podría interactuar con una proteína transportadora de hierro para facilitar la salida de hierro por la membrana (Vulpe *et al.*, 1999).

El cobre y el hierro se encuentran vinculados en el metabolismo sistémico del hierro. La Hephaestin representa en los mamíferos un eslabón entre ambos metabolismos. La deficiencia de cobre produce una absorción disminuida de hierro de la dieta que normalmente entra en el epitelio intestinal pero no puede terminar en la circulación. Ejemplos de la relación del metabolismo del hierro y del cobre se dan en la aceruloplasminemia, que conduce a la acumulación de hierro en diversos tejidos, la anemia deficiente de hierro del ratón *sla* y la deficiencia de cobre del cerdo, que presenta una acumulación intestinal de hierro similar a la del ratón *sla* (Lee *et al.*, 1968). La administración de cobre, pero no de hierro, a cerdos deficientes de cobre alivia la anemia y facilita la salida de hierro de los tejidos, incluido del intestino.

2.10.-Dcyt B (*duodenal cytochrom B*)

La absorción a través de la mucosa intestinal de hierro férrico dietético se atribuye a la presencia de una actividad reductasa en la membrana apical (*brush-border*) del enterocito con una respuesta adaptativa al estado de hierro en la célula. McKie y colaboradores (2001) aislaron un cDNA, que llamaron Dcytb por 'duodenal citocromo b,' que codifica para una hipotética proteína di-hemo de la mucosa duodenal de ratón. Buscando en las bases de datos de EST, los autores encontraron también el clon de cDNA completo del gen DcytB humano.

El DcytB codifica para una proteína con 6 dominios transmembrana y presenta 4 residuos de histidina conservados que se han propuesto como ligandos del grupo hemo. El DcytB presenta una similitud de entre el 45 al 50% con la familia de reductasas de membrana citocromo b561, su expresión es muy alta en la membrana apical (*brush-border*) de los enterocitos duodenales, y presenta una actividad reductasa férrica cuando se expresa en oocitos de *Xenopus* y cultivos celulares. Los niveles de expresión duodenales del mRNA del DcytB y los niveles de la proteína se regulan por cambios fisiológicos de absorción de hierro, como ocurre en la anemia crónica, la deficiencia férrica y la hipoxia. Tres transcripciones mayoritarias de 1, 4 y 5 kb se ha detectado por análisis de *Northern blot*, indicando la existencia de *splicings* alternativos o la presencia de mRNAs no procesados. El DcytB carece de motivos convencionales para NADH, NADPH, o motivos de unión a flavin que permitirían a estos cofactores actuar como dadores intracelulares de electrones. Al igual que el citocromo b561 que recibe un electrón del ascorbato y no parece requerir de otros componentes, se ha especulado que DcytB podría usar también ascorbato o formar un complejo activo con otras proteínas para realizar su función reductora (McKie *et al.*, 2001).

2.11.-SFT (*stimulador of Fe transport*)

La proteína SFT es una proteína transportadora específica de Fe (III)/Fe (II) capaz de estimular tanto el transporte de hierro unido a TF como el hierro no unido a TF (Gutiérrez *et al* 1997). El peso molecular predicho a partir de la secuencia de la proteína SFT es de 41 kDa, sin embargo la banda que se observaba en los *Westerns* es de 80-87 kDa (Gutiérrez *et al.*, 1997; Barisani *et al*, 2001), por lo que se cree que la proteína forma homodímeros que son estables incluso bajo las condiciones del *Western*. El análisis por FISH posicionó el SFT en 10q21 (Gutiérrez *et al* 1998).

Resultados de inmunohistoquímica obtenidos en controles indican que la proteína SFT se localiza en la parte media y superior de la villi, es decir, en los enterocitos especializados en la absorción de hierro. Análisis por tinción de estas células muestran una localización principalmente apical, a diferencia de la localización del TFR que es basal, en cambio otros estudios hechos en células HeLa y BHK sitúan ambas proteínas en los compartimentos endosomales (Gutiérrez *et al.*, 1997; Yu *et al* 1998a).

Estudios *in vitro* con la línea celular HeLa y HepG2 incubadas con DFO (deferoxamina, un quelante de hierro) han detectado un incremento de la expresión del mRNA del SFT (Yu *et al*, 1998a; Yu *et al*, 1998b); por lo que los niveles de mRNA de SFT se ven regulados inversamente a la concentración intracelular de hierro (Yu *et al* 1998a).

2.12.-Hepcidina (HEPC1)

Recientemente se ha descrito una nueva proteína implicada en el metabolismo del hierro, se trata de la hepcidina. Esta proteína fue involucrada en el metabolismo del hierro a partir de la sorprendentemente observación de que los ratones *knock out* para el gen *USF2*, gen que codifica para el factor de transcripción *Upstream stimulator factor 2*, presentaban una sobrecarga de hierro similar a la de los pacientes con HH (distribución hepática de hierro periportal y sistema RE depleccionado de hierro) (Nicolas *et al.*, 2001). Al intentar explicar este fenotipo los autores descubrieron que los ratones no expresaban la molécula hepcidina cuyo gen se encuentra inmediatamente después del gen *USF2*, por lo que se atribuyó la sobrecarga de hierro con la ausencia de hepcidina, una proteína hepática previamente identificada como un péptido circulante antimicrobial (Krause *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2001).

El transcrito de la hepcidina codifica para una proteína precursora de 84 aminoácidos, incluyendo un péptido señal de 24 aminoácidos. La forma circulante sólo consta del extremo C-terminal de 25 aa que presenta actividad antibacteriana y antifúngica por lo que la proteína fue clasificada como miembro de los péptidos antimicrobiales catiónicos y ricos en cisteína como es el caso de las tioninas y las defensinas. El transcrito de la hepcidina no presenta ningún IRE.

Varios datos apuntan a que la hepcidina podría ser el regulador de niveles de hierro del hígado o *store regulator* (ver sección 5).

Tabla 10. Genes del metabolismo del hierro

Gen	Cromosoma	Función	Enfermedad/es asociada/s	OMIM
HFE	6p21.3	Asociación TFR, regulador metab. hierro	Hemocromatosis Hereditaria	235200
TF	3q21	Transporte de hierro circulante	Atransferrinemia	190000
TFR	3q29	Captación de Tf		190010
TFR2	7q22	Captación de Tf en hígado	Hemocromatosis (HFE3)	604720
FTL	19q13.3-q13.4	Acúmulo de hierro intracelular	Síndrome Hiperferritinemia-cataratas <i>Basal ganglia disease</i>	134790
FTH	11q12-q13	Acúmulo de hierro intracelular	Sobrecarga de hierro autosómica dominante	134770
B2M	15q21-q22	Asociación a HFE y HLAs	Linfoma de Burkitt	109700
DMT1	12q13	Transportador apical duodenal		600523
FPN1	2q32	Transportador basal duodenal	Hemocromatosis (HFE4)	604653
Cp	3q23-q24	Ferroxidasa sérica	Aceruloplasminemia	117700
HEPH	Xq11-q12	Ferroxidasa basal del enterocito duodenal		300167
DcytB	2p14-2q14.3	Reductasa apical del enterocito duodenal		605745
IRP1	9p22-p13	Regulador posttranscripcional metab. hierro		100880
IRP2	15	Regulador posttranscripcional metab. hierro		147582
SFT	10q21	Estimulador del transporte de hierro		603274
HEPC	19q13	Regulador del hierro almacenado (?)		

(?) Función hipotética.

DMT1=DCT1=Nramp2. FPN1=IREG1=MTP1=SLC11A3. IRP1=ACO.

2.13.-Las proteínas IRPs y la regulación por IRE (*iron response element*).

Las IRPs (*iron response proteins*) son proteínas implicadas en el control post-transcripcional del metabolismo del hierro. Existen dos IRPs: la IRP1 y la IRP2.

La IRP-1 es una proteína citosólica de 98 kDa localizada en el cromosoma 9 en humanos, y altamente homóloga a la proteína mitocondrial m-aconitasa, proteína que convierte cis-aconitato a isocitrato en el ciclo del ácido tricarboxílico. La proteína IRP-1 presenta dos funciones mutuamente excluyentes y intercambiables dependiendo del nivel de hierro presente en la célula. Por una parte en condiciones de niveles altos de hierro la proteína presenta el cluster 4Fe-4S y funciona como aconitasa, en cambio en situación de bajo niveles de hierro intracelular el *cluster* se desensambla y la aloproteína es capaz de unirse al IRE (*iron response element*) presente en el mRNA de algunos genes implicados en el metabolismo del hierro (Cairo and Pietrangelo, 2000). Además del estatus de hierro intracelular se ha descrito que la estabilidad del *cluster* 4Fe-4S también depende del estado de fosforilación de un residuo de serina necesario en la unión al RNA (Brown *et al.*, 1998).

La IRP-2 es una proteína citoplasmática de 108 kDa, con un porcentaje del 57% de identidad con la proteína IRP-1, aunque presenta dos principales diferencias respecto a la IRP-1: presenta una inserción de 73 aminoácidos en la parte N-terminal y no tiene actividad aconitasa, probablemente debido a que no puede ensamblar el *cluster* 4Fe-4S. Los 73 aminoácidos específicos de la IRP-2 le confieren la característica por la que esta proteína es regulada, ya que en presencia de niveles elevados de hierro la IRP-2 se ve sometida a un proceso de rápida degradación mediada por el proteosoma. La IRP-2 está presente en menos abundancia en los tejidos que la IRP-1, expresándose más en intestino y cerebro. En cambio está presente en la mayoría de líneas celulares, quizás debido a una mayor sensibilidad a los cambios de los niveles de hierro. También se sabe que cuando la IRP-2 es la proteína más abundante o la única expresada, ella sola puede actuar como moduladora del metabolismo intracelular de hierro (Cairo and Pietrangelo, 2000).

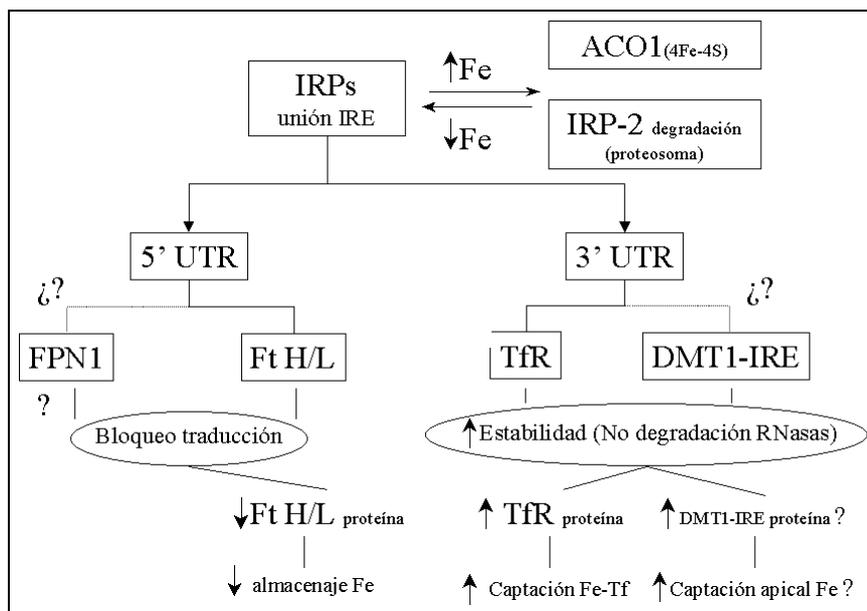


Fig 9. Control post-transcripcional de los genes del metabolismo del hierro por las IRPs.

Las IRPs reconocen una secuencia conservada de nucleótidos llamada IRE (*iron response element*) presentes en las regiones UTR (*untranslated regions*) de mRNAs de diversos genes implicados en el metabolismo del hierro. Los IREs forman una estructura de *stem-loop* con una secuencia altamente conservada en el *hairpin loop* (CAGUGU/C) y estructuras secundarias predichas diferentes en los tallos o *stems* (Cairo and Pietrangelo, 2000).

En respuesta a los niveles de hierro celular las IRPs se unen al IRE y actúan de diferente manera según si el IRE está presente en el 3' o en el 5' UTR del mRNA.

Ambas subunidades de la Ft (ferritina) la H y la L presentan un IRE en el 5' UTR cercano al AUG o inicio de traducción. La unión del IRE por la IRP evita la traducción del mRNA ya que previene la interacción entre el factor de iniciación eIF4F y la unidad ribosomal, es decir se evita la formación del complejo traduccional y el mRNA no se traduce a proteína (Fig. 9). Los pacientes con el síndrome de hiperferritinemia-cataratas presentan mutaciones en el IRE de la Ft L que desemboca en cataratas y la presencia de unos niveles muy elevados de ferritina en ausencia de una sobrecarga de hierro. Otras proteínas que presentan también un IRE en 5' UTR son la m-aconitasa, la e-ALAS (eritrocito aminolaevulinato sintasa) enzima implicado en la síntesis del grupo hemo y el recientemente descubierto exportador basal de hierro en enterocitos y macrófagos FPN1 o IREG1. Aunque todavía esta por ver si el IRE presente en FPN1/IREG está regulado por las IRPs.

El mRNA de TFR presenta 5 IREs en el 3'UTR, la interacción de las IRPs con los IREs aumenta el tiempo de vida media del mRNA ya que lo protege de la acción de las RNAsas (Fig. 9). La estabilización incrementada del transcrito conlleva una mayor expresión del TFR en la membrana celular y una mayor entrada de hierro. No se ha encontrado la secuencia típica de IRE en el TRF2, por lo que podría ser que este receptor de transferrina no estuviese modulado por la falta de hierro (Kawabata *et al.*, 2000). Un potencial IRE está también presente en el 3'UTR de una de las formas de *splicing* del DMT1, el principal transportador apical de hierro de los enterocitos (Gunshin *et al.*, 1997), aunque todavía no existen evidencias de que este IRE confiera un control post-transcripcional del DMT1.

A parte de por los niveles celulares de hierro, las IRPs también son estimuladas por otros factores, como el estrés oxidativo, el NO (óxido nítrico), los xenobióticos, el crecimiento y la hipoxia (Cairo and Pietrangelo 2000).

3.-Modelos animales de Hemocromatosis

En la actualidad existen tres modelos de animales que mimetizan la situación humana de Hemocromatosis. Estos modelos son los ratones *knock-outs* (KO) para los genes β 2microglobulina, HFE y USF2.

β 2M KO:

De Sousa y colaboradores (1994) publicaron que los ratones heterocigotos y homocigotos KO para el gen β 2M (β 2microglobulina) presentaban una distribución tisular de hierro comparable a nivel histológico y cuantitativo con la presente en la HH humana. Además el estudio halló una sobrecarga hepática progresiva indistinguible de la que se produce en la Hemocromatosis humana en ratones KO β 2M homocigotos. Otros autores también han constatado la existencia de una sobrecarga de hierro similar a la producida en la HH humana en ratones KO para el gen β 2M (Rothenberg and Voland, 1996).

HFE KO:

Para testar la hipótesis de que el gen HFE estaba involucrado en la regulación homeostática del hierro Zhou y colaboradores (1998) estudiaron los efectos de la disrupción del gen homólogo murino. Los ratones resultantes presentaban parámetros anormales en la homeostasis del hierro, incluso con una dieta estándar. La tinción de hierro hepático en los ratones con el gen HFE mutado era predominante en hepatocitos con una distribución periportal. Este estudio mostró que la proteína HFE está involucrada en la regulación de la homeostasis del hierro y que mutaciones en el gen son responsables de la Hemocromatosis Hereditaria.

Dentro de la familia del MCH de clase I, la proteína HFE parece que realiza una inusual pero básica función en el metabolismo del hierro. Para averiguar si la proteína HFE presentaba algún papel dentro del sistema inmune, como claramente presentan las proteínas del MHC de clase I, Bahram y colaboradores (1999) diseñaron ratones KO para el gen HFE con una delección de los dominios α -1 y α -2, que son los dominios responsables de la unión de péptidos antigénicos que activan la respuesta inmune. Estos ratones KO, al igual que los diseñados por Zhou y colaboradores (1998), mimetizan la Hemocromatosis en humanos, ya que desarrollaban sobrecarga de hierro. A pesar del exhaustivo estudio realizado de los órganos linfoides primarios y secundarios incluyéndose el intestino, no se hallaron evidencias de una función obvia de la proteína HFE en el sistema inmune.

Levy y colaboradores (1999b) produjeron ratones en los que se introdujo la mutación C282Y en el gen murino HFE (ratones *knock in*) y los compararon con ratones HFE KO en los que se había deleccionado una región de la codificante del gen. Los ratones heterocigotos para ambas estrategias mutacionales acumulaban más hierro que los controles normales. Los niveles de hierro en hígado en estos ratones estaban aumentados y el hierro del bazo estaba disminuido

igual que en la HH humana. La homocigosis para ambas mutaciones resultaron en una sobrecarga de hierro postnatal, sin embargo los efectos de los ratones KO eran más severos que los de los ratones que solo presentaban la mutación C282Y, por lo que se concluyó que la mutación C282Y no resultaba en un alelo nulo tal y como lo hacía una delección grande de la codificante del gen HFE.

KO USF2:

La generación de ratones *knock out* para el gen USF2, gen que codifica para un factor de transcripción (*Upstream stimulator factor 2*), proporcionó información sobre la respuesta a la glucosa de ciertos genes, motivo por el que se diseñaron estos ratones (Vallet *et al.*, 1998), pero además sorprendentemente los autores se percataron de que estos ratones presentaban anomalías bioquímicas y histológicas similares a la HH humana y al ratón HFE KO que no eran debidas a los genes HFE y TFR2 (Nicolas *et al.*, 2001). El acúmulo de hierro en estos ratones en principio no se debe tampoco a la ausencia de por sí del gen USF2 (aunque no queda totalmente descartada esta hipótesis) sino a la ausencia de la molécula hepcidina (HEPC) cuyo gen se encuentra inmediatamente después del gen USF2. Los autores atribuyen la ausencia de expresión de la hepcidina al efecto descrito en otras construcciones *knock-outs* y llamado *neighbouring disturbance*, que consiste en la alteración de la expresión de genes vecinos al gen del cual se ha hecho el KO mediante la insertar del marcador de selección Neo. Sin embargo no se puede descartar totalmente un posible papel del gen USF2 como factor de transcripción que regulase la expresión del gen HEPC.

3.1.-El background genético determina la severidad del grado de acúmulo de hierro

Los estudios clínicos han demostrado que el grado de acúmulo de hierro es muy variable entre individuos con idéntico genotipo del gen HFE, por lo que otros factores genético podrían modificar la gravedad de la enfermedad. Esta hipótesis se ve reforzada por el hecho de que existen diferencias en los parámetros de acúmulo de hierro (niveles de hierro hepático y saturación de transferrina), tanto en ratones *wildtypes* sometidos a dietas con exceso de hierro como en ratones KO para el gen HFE o el gen β -2-microglobulina dependiendo del tipo de cepa de ratón utilizada para generar el KO (Sproule *et al.*, 2001; Sly *et al.*, 2001). Actualmente se está realizando estudios de ligamiento de todo el genoma en la descendencia de cruces de cepas de ratones con diferente *background* genético para descubrir que loci son responsables de la diversidad de fenotipos en el almacenamiento de hierro (Custodio *et al.*, 2001).

4.-Alteraciones en otros metales en la Hemocromatosis Hereditaria.

La HH como se ha expuesto es debida a una absorción masiva de hierro procedente de la dieta, es por tanto una enfermedad que afecta al metabolismo de un metal: el hierro. Debido a que los sistemas de transportes y almacenamiento de los metales en los organismos vivos comparten vías y proteínas, no es de extrañar que los pacientes afectados de HH presenten alteraciones de otros metales. Sargent y colaboradores (1979) describieron que el cromo se retiene en menos cantidad en pacientes HH que en sujetos normales. El cromo es necesario para

la función normal de la insulina por lo que la diabetes que presentan los pacientes de HH podría ser debida por lo menos en parte a un déficit de cromo. Los niveles de plomo y cobalto en pacientes HH homocigotos están incrementados (Barton *et al.*, 1994) por lo que la vía de absorción de estos metales podría ser la misma. Estos hallazgos sugieren que los pacientes con HH podrían ser más susceptibles a envenenamiento por plomo.

5.-Visión global metabolismo del hierro. Papel del gen HFE.

En este apartado se pretende plantear un modelo de integración de las proteínas implicadas en el metabolismo del hierro y resumidas en la tabla 10 para dar una visión global del mecanismo de absorción del hierro en mamíferos e integrar en este contexto a la proteína hfe.

En mamíferos existen dos formas de obtener hierro a través de la dieta: como hierro libre o como hierro asociado al grupo hemo. El hierro libre de la dieta tras ser reducido de férrico (Fe+3) a ferroso (Fe+2) en el lumen del duodeno del intestino delgado por la reductasa **DyctB** es transportado a dentro del enterocito por el transportador apical **DMT1** (DCT1 o Nramp2). El hierro en forma hemo de la dieta se absorbe mediante un transportador todavía no identificado y se separa del grupo hemo dentro del enterocito. Una vez en el enterocito, el hierro puede ser almacenado dentro de éste en forma de **ferritina** y perderse tras la escamación del enterocito senescente o puede ser transportado a través de la membrana basolateral al plasma mediante el transportador **Ireg1** (FPN1 o MTP1). Este proceso requiere de la oxidación de Fe+2 a Fe+3 por la **hephaestin** (HEPH). Una vez que el hierro ha entrado en la circulación, no existen mecanismos fisiológicos de importancia que conlleven una pérdida de hierro, a excepción de la menstruación (Fleming and Sly, 2001).

El hierro absorbido se une a la **transferrina** (TF) circulante como Fe+3 y pasa inicialmente por el sistema portal del hígado, que es el lugar principal de almacenamiento de hierro. Los hepatocitos capturan la transferrina unida al hierro por un proceso mediado por el **receptor de transferrina** clásico o TFR aunque probablemente en mayor cantidad a través del **receptor de transferrina 2** o TFR2, una proteína homóloga al TFR clásico. El principal sitio de utilización de hierro es la médula ósea, donde el hierro se absorbe vía TFR en los precursores de los eritrocitos para usarlo en la síntesis del grupo hemo. El hierro del grupo hemo es reciclado en la ingestión de los eritrocitos senescentes por los macrófagos reticuloendoteliales. Los macrófagos también expresan el TFR y toman directamente hierro de la circulación. El hierro de los macrófagos es retenido (almacenado en la ferritina) o expulsado al plasma donde es oxidado por la **ceruloplasmina** y transportado vía transferrina para su reutilización. Por lo tanto el hígado y el sistema reticuloendotelial representan los sitios principales de movilización del hierro (Fleming and Sly, 2001).

La zona proximal del intestino delgado (duodeno) ejerce un papel regulador importante entre el hierro absorbido por la dieta y los niveles de hierro almacenados en el cuerpo. En esta zona intestinal las células de la cripta duodenal, que son las células precursoras de los enterocitos, detectan las necesidades de hierro del cuerpo y son programadas para la expresión de niveles apropiados de las proteínas citadas anteriormente a la vez que maduran para

convertirse en enterocitos con capacidad de absorción. Se ha postulado que las células de la cripta obtienen la información de los niveles de hierro a través de dos reguladores, el regulador del hierro almacenado (*store regulator*), que respondería a los niveles de hierro almacenados en el organismo, principalmente en el hígado, y el regulador eritropoietico (*erythropoietic regulator*) que respondería a las necesidades corporales de eritropoiesis. Se cree que estos dos reguladores serían componentes solubles del plasma que pudiesen transportar la información del estado corporal de hierro entre los diferentes órganos (hígado, intestino, precursores eritropoieticos y macrófagos del bazo) (Fleming and Sly, 2001).

Varias evidencias apuntan a que el regulador de hierro almacenado podría ser la **hepcidina**, ya que la hepcidina es un péptido sintetizado principalmente por el hígado y su expresión aumenta en condiciones de sobrecarga de hierro, como en la sobrecarga de hierro inducida por la dieta en ratones y en los ratones KO para el gen $\beta 2M$ (Pigeon *et al.*, 2001). Se ha especulado que el TFR2 mediaría la absorción de hierro por los hepatocitos y que a través de la hepcidina y de la interacción del TFR2 con el HFE- $\beta 2M$ en las células de la cripta duodenal se regularía la absorción del hierro de la dieta (Nicolas *et al.*, 2001).

A todas estas proteínas implicadas en el metabolismo del hierro hay que añadir la proteína **hfe**. Debido a que mutaciones en el gen HFE son responsables de la HH, esta proteína debe jugar un papel importante en la absorción de hierro. El gen **HFE** codifica para una proteína integral de membrana homóloga a las proteínas del HLA del complejo de histocompatibilidad I, y interacciona con la proteína **β -2-microglobulina** ($\beta 2M$) (Feder *et al.*, 1996). Esta asociación HFE- $\beta 2M$ es necesaria para el transporte de la proteína hfe a la superficie celular (Feder *et al.*, 1997). En el duodeno el complejo HFE- $\beta 2M$ se encuentra en las células de la cripta en una localización perinuclear, donde se asocia al **TFR** (Waheed *et al.*, 1999). La proteína HFE interacciona con el TFR y inhibe estéricamente por competición con la TF la unión del TFR con la TF, por lo que la proteína HFE impide que se absorba hierro unido a TF por vía del TFR (Feder *et al.*, 1998, Lebrón *et al.*, 1998). Además la proteína hfe bloquea la internalización del TFR y el transporte de hierro del endosoma al citoplasma (Arredondo *et al.*, 2001). La absorción del hierro del lumen en las células intestinales no se realizaría a través del complejo HFE- $\beta 2M$ -TFR ya que el TFR no se expresa en la región apical de estas células sino en la basolateral, por lo que este complejo desempeñaría más bien un papel de captación de hierro de la circulación sanguínea a las células de la cripta para sus necesidades biológicas y posiblemente para obtener la información de los niveles de reserva de hierro corporales.

Así pues en una situación de niveles altos de hierro almacenados en el hígado (Fig. 10) los hepatocitos producirían y secretarían hepcidina al torrente sanguíneo. Esta hepcidina interactuaría con su receptor en las células intestinales haciendo que las células de la cripta al diferenciar a enterocitos se programasen para disminuir la expresión de las proteínas importadoras/exportadoras de hierro (DMT1 y IREG1), con lo que se disminuiría la absorción intestinal de hierro y se equilibrarían los niveles de hierro.

En una situación de niveles bajos de hierro almacenados en el cuerpo no se secretaría hepcidina, lo que conduciría a una expresión de las proteínas importadoras/exportadoras de hierro (DMT1 y IREG1) en el enterocito y se absorbería más hierro (Fig. 11).

En la Hemocromatosis Hereditaria los niveles de hierro circulante y almacenados en el hígado son altos, los niveles de hierro en el sistema reticuloendolial (RE) son bajos y la

absorción intestinal está incrementada a pesar de la existencia de unos niveles elevados de reservas de hierro en el hígado. Esto sugiere que la comunicación entre el lugar de almacenamiento de hierro (hígado) y el lugar de entrada de hierro (duodeno) se encuentra afectada.

En la mucosa duodenal de los enfermos de HH existe un incremento de la actividad de la IRP-1 y de la expresión del TFR (Pietrangelo *et al.*, 1992) y una reducción de la síntesis de ferritina (Fracanzani *et al.*, 1989; Pietrangelo *et al.*, 1995). También existe una actividad incrementada de la actividad de las IRPs en los monocitos de los pacientes con HH (Cairo *et al.*, 1997). La expresión del transportador apical DMT1 en pacientes con HH con C282Y/C282Y y en ratones KO para el gen HFE está incrementada, así como la expresión del gen FPN1 (Zoller *et al.*, 1999; Fleming *et al.*, 1999; McKie *et al.*, 2000; Zoller *et al.*, 2001). Estos datos simulan características de deficiencia de hierro dentro del enterocito de los pacientes con HH, a pesar de la sobrecarga de hierro que existe en otros órganos y han llevado a proponer la siguiente hipótesis (**hipótesis 1**).

Hipótesis 1: En el duodeno de los pacientes con HH existe un *pool* disminuido de hierro citoplasmático que conduciría a una programación de las células de la cripta para la absorción de más hierro una vez transformadas en enterocitos. Según esta hipótesis, la pérdida de la función del gen HFE, que es la causa de la enfermedad, debería producir una entrada (o retención) disminuida de hierro, procedente del plasma, lo que programaría a los enterocitos para un incremento de la absorción del hierro procedente de la dieta.

A pesar de que los datos sobre las proteínas IRP, TFR, Ferritina, DMT1 y FPN1 apuntan hacia la existencia de niveles bajos de hierro dentro de las células duodenales de los pacientes con HH, la hipótesis 1 contradice la función definida para la proteína hfe, ya que si su función normal es disminuir la absorción de hierro, su alteración produciría que no existiese este bloqueo en la absorción de hierro y por lo tanto no habría un límite o freno a la absorción de hierro y la célula absorbería más hierro y no menos en ausencia de la proteína hfe. Por lo tanto si la hipótesis es cierta, en el enterocito la ausencia de la proteína hfe realizaría una función contraria a la descrita para otros tejidos. Por otro lado es posible que los niveles de proteínas implicadas en el metabolismo del hierro y existentes en las células intestinales no estén reflejando directamente la existencia de un *pool* disminuido de hierro dentro de estas células.

A este respecto nuevos experimentos de microarrays que actualmente se están llevando a cabo en el laboratorio del Dr. Hentze y bajo la supervisión de la Dra. Muckenthaler (Heidelberg, EMBL) aportan una nueva hipótesis (**hipótesis 2**) sobre lo que puede estar pasando en el metabolismo del hierro de los pacientes con Hemocromatosis Hereditaria. Los microarrays permiten un análisis más global de la situación, abarcando no solo el estudio de los genes implicados directamente en la absorción del hierro, sino también el estudio de muchos otros genes. Diferentes experimentos que analizan la situación de sobrecarga de hierro versus a la deficiencia mediante microarrays demuestran que genes implicados en una respuesta a niveles elevados de hierro, como los genes del estrés oxidativo, están incrementados en el duodeno en la condición de sobrecarga de hierro. Esto apunta hacia que no existiría una deficiencia de hierro dentro de las células intestinales, sino todo lo contrario. Así pues lo que estaría fallando sería el sensor que detecta los niveles corporales de hierro dentro de las células intestinales y la vía metabólica de hierro en estas células, por lo que a pesar de la existencia de un exceso de hierro

dentro de las células de la cripta, éstas se programarían erróneamente para que al madurar a enterocito se absorbiese aún más hierro (Fig. 12).

Si como se ha hipotetizado la hepcidina es el regulador de los niveles de hierro almacenado (*store regulator*), debería existir una molécula en las células intestinales que fuese su receptor y que pudiese actuar como sensor de los niveles corporales de hierro. Así pues, si el receptor detectase mucha hepcidina, esto indicaría que existen reservas de hierro suficientes y que no hace falta absorber más hierro, por lo que la interacción hepcidina-receptor programaría las células de la cripta para que al madurar a enterocito se regulase la transcripción y traducción de las proteínas del metabolismo del hierro con el fin de que no se captase más hierro.

La proteína hfe es una proteína homóloga a las moléculas del HLA que reconocen péptidos para una función inmunogénica, por lo que sería posible que la proteína HFE pudiese reconocer el péptido de la hepcidina y ser su receptor, aunque esta hipótesis aún no ha sido comprobada, o quizás otra proteína que necesitase de la proteína hfe ejerza este papel de receptor de la hepcidina. La interacción hepcidina-HFE o hepcidina-proteína X-HFE resultaría en última instancia en una disminución de la absorción de hierro en condiciones normales. En la HH al no expresarse la proteína hfe la comunicación hepcidina-receptor fallaría resultando en una programación errónea del enterocito que continuaría absorbiendo más hierro (Fig. 12).

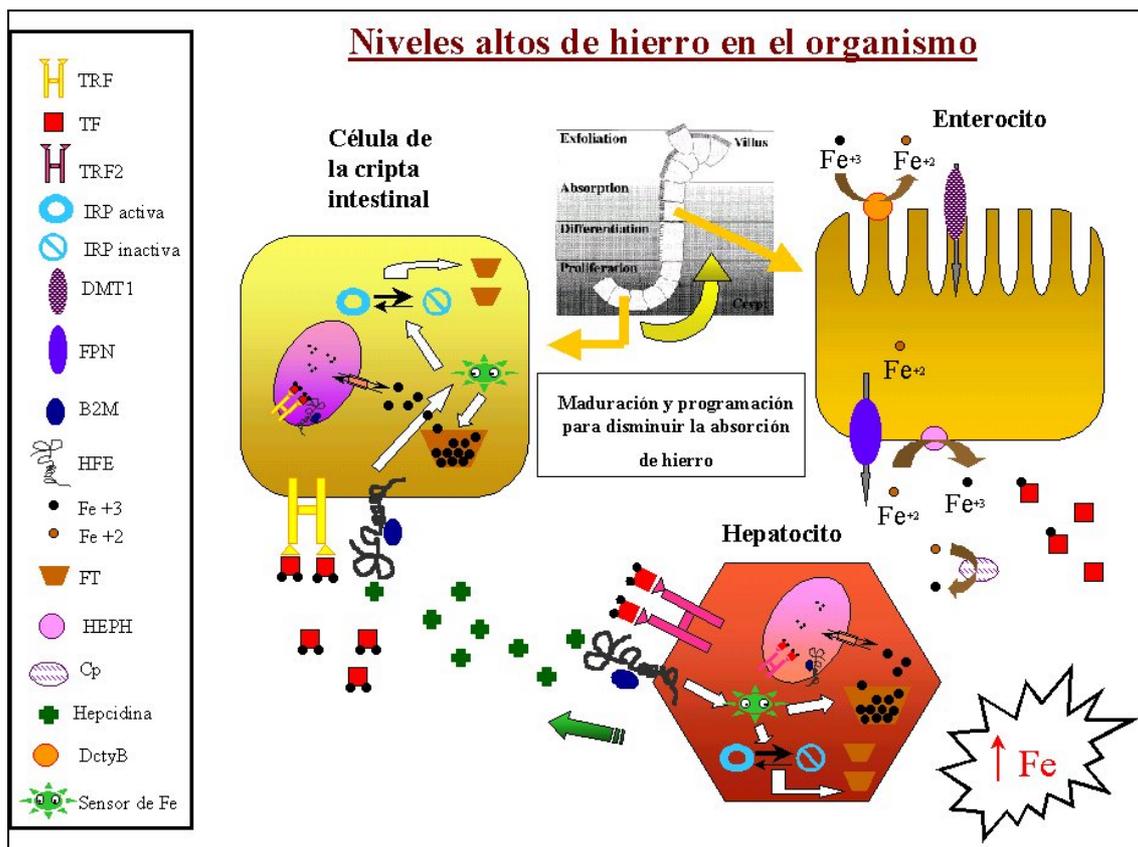


Figura 10. Modelo de absorción y metabolismo del hierro en condiciones de niveles altos de hierro.

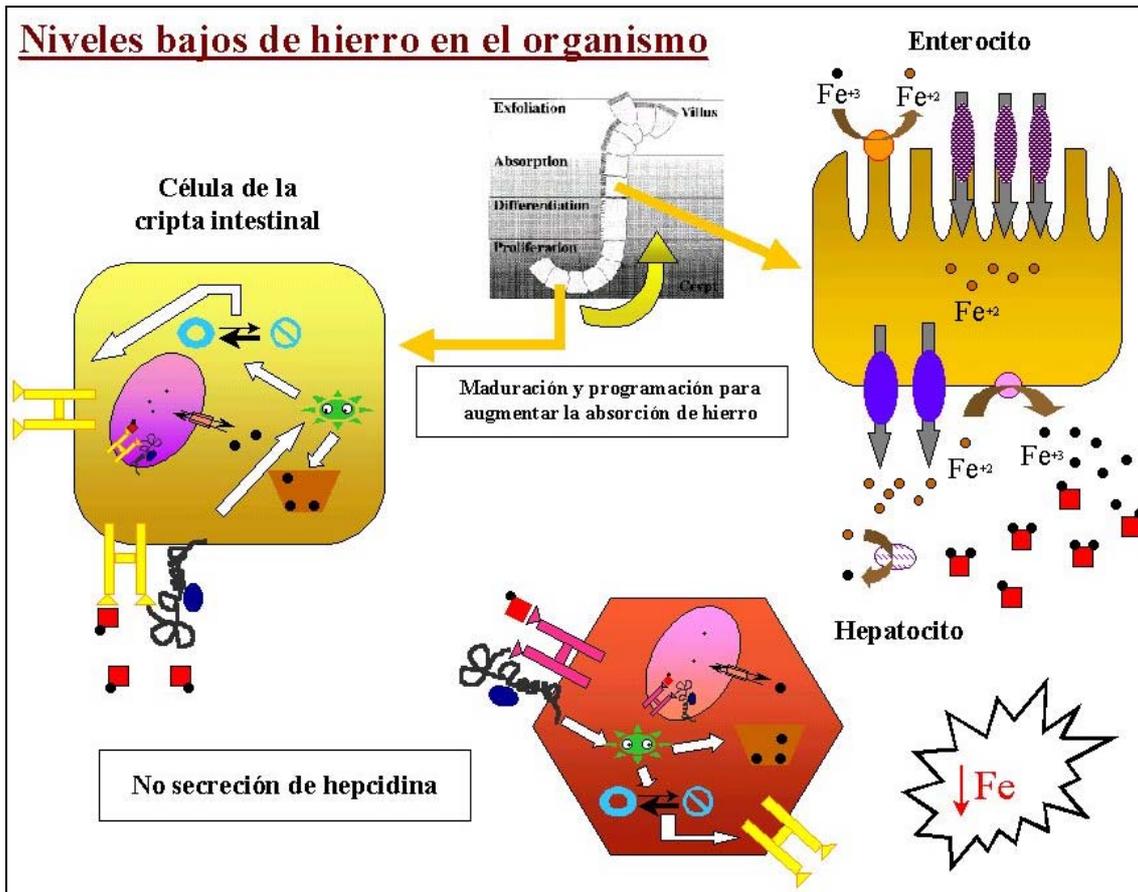


Figura 11. Modelo de absorción y metabolismo del hierro en condiciones de niveles bajos de hierro.

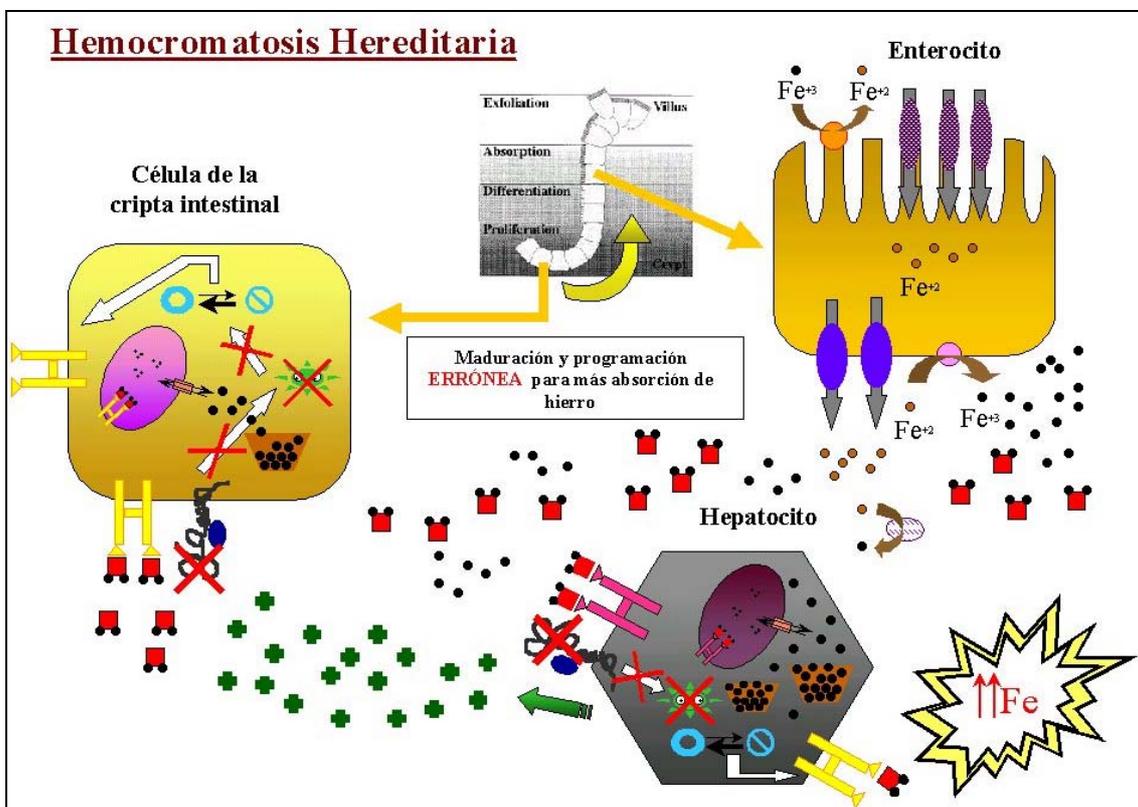


Figura 12. Modelo de absorción y metabolismo del hierro en situación de Hemocromatosis Hereditaria, según la hipótesis 2.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

La presente tesis pretende investigar sobre la Hemocromatosis Hereditaria y el papel del gen HFE en la Hemocromatosis Hereditaria a nivel clínico y básico. Para ellos nos planteamos los siguientes objetivos:

- 1.- Determinar la frecuencia de las mutaciones C282Y y H63D del gen HFE en pacientes con Hemocromatosis Hereditaria.
- 2.- Determinar la frecuencia de las mutaciones C282Y y H63D del gen HFE en la población general española
- 3.- Búsqueda de nuevas mutaciones en pacientes de HH sin los genotipados C282Y/C282Y ni C282Y/H63D.
 - 3.1.- Búsqueda de otras mutaciones en el gen HFE.
 - 3.2.- Búsqueda de mutaciones en otros genes (TFR2 y FPN)
- 4.- Estudio de la región promotora del gen HFE en humanos, rata y ratón.
- 5.- Estudio de las formas de *splicing* del gen HFE.
- 6.- Estudio y caracterización de la región 3' UTR del gen HFE en humanos y ratón.

ARTÍCULOS PUBLICADOS

ARTÍCULOS PUBLICADOS

En este apartado se han incluido cuatro artículos de investigación y dos artículos de carácter general y divulgativos sobre la Hemocromatosis Hereditaria.

Los cuatro artículos de investigación son:

- Prevalence of the Cys282Tyr and His63asp HFE gene mutations in Spanish patients with hereditary hemochromatosis and in controls. *Journal of Hepatology* 1998; 29, 725-728.
- Hereditary Hemochromatosis in Spain. *Genetic Testing* 2000; 4 (2):171-6.
- Cloning, sequencing and characterization of the rat HFE promoter. Comparison of the human, mouse and rat hemochromatosis HFE promoter regions. *Gene* 1998; 225: 77-87
- Complete characterization of the 3' region of the human and Mouse Hereditary Hemochromatosis Gene and detection of novel splicing forms. *Blood Cells, Molecules and Diseases* 2001; 27: 35-43.

El orden de presentación de los artículos se corresponde con el orden de la sección de objetivos y de la sección de resumen global de los resultados y discusión. Así pues los dos primeros artículos se centran en los estudios clínicos de la Hemocromatosis Hereditaria en pacientes con Hemocromatosis Hereditaria y población española y el estudio del gen HFE en pacientes sin los genotipos C282Y/C282Y o C282Y/H63D, descritos como responsables de la Hemocromatosis Hereditaria. El tercer y cuarto artículo se centran en el estudio básico del gen HFE. Concretamente el tercer artículo describe la caracterización y comparación de la zona promotora del gen HFE en tres especies: humana, ratón y rata y el artículo número cuatro estudia las formas de *splicing* del gen HFE humano y la zona 3' UTR del gen HFE humano y murino. La identificación de una zona nueva no descrita del gen HFE abrió la posibilidad de la búsqueda de nuevas mutaciones en esta zona en pacientes con Hemocromatosis Hereditaria sin los genotipos descritos como responsables de la enfermedad.

Todos los artículos de investigación que se presentan en esta tesis han sido publicados en inglés por lo que se ha incluido un breve resumen en castellano.

Los dos artículos de carácter general y divulgativos sobre la Hemocromatosis Hereditaria son:

- Hemocromatosis Hereditaria: utilización del diagnóstico genético molecular. *Medicina Integral* 1999; 33: 416-425.
- Utilidad clínica de la detección de las mutaciones del gen HFE en la Hemocromatosis. *Gastroenterología y Hepatología* 2000; 23: 433-435.

Estos artículos pretenden dar a conocer la enfermedad y la importancia del diagnóstico genético y van orientados especialmente al sector médico. Debido a que la Hemocromatosis Hereditaria es una enfermedad frecuente pero poco conocida una tarea divulgativa es importante para alcanzar un mayor conocimiento de la enfermedad, lo que conducirá a la detección precoz de los pacientes con Hemocromatosis Hereditaria y a su inclusión en el tratamiento evitándose las complicaciones derivadas del acúmulo de hierro y restaurando la esperanza de vida de estos pacientes.

ARTÍCULO 1

Prevalence of the Cys282Tyr and His63asp HFE gene mutations in Spanish patients with hereditary hemochromatosis and in controls.

Journal of Hepatology 1998; 29, 725-728.

Resumen en castellano

Prevalencia de las mutaciones Cys282Tyr y His63Asp del gen HFE en pacientes españoles de Hemocromatosis Hereditaria y en controles.

Antecedentes: La mutación Cys282Tyr del gen HFE ha sido descrita recientemente como la causa principal de Hemocromatosis Hereditaria en personas con origen norte-europeo, sin embargo su frecuencia es menor en Italia. Actualmente no existen datos sobre la prevalencia de esta mutación en España. Por lo tanto hemos iniciado este estudio para determinar si la mutación Cys282Tyr del gen HFE es también responsable de los casos de Hemocromatosis Hereditaria en España. Además en este estudio se ha estudiado la presencia de la mutación His63Asp del gen HFE tanto en pacientes como en controles.

Métodos: Treinta y un pacientes de Hemocromatosis Hereditaria y 485 controles han sido analizados para las mutaciones Cys282Tyr y H63Asp del gen HFE, usando la técnica de PCR seguida de digestión enzimática de los productos de PCR con el enzima RsaI y DpnII, respectivamente y de separación electroforética de los fragmentos. Las amplificaciones se han realizado partiendo de ADN genómico.

Resultados: 27 de 31 (87,1%) pacientes con Hemocromatosis Hereditaria son homocigotos para la mutación Cys282Tyr. Ninguno de los pacientes es homocigoto para la mutación His63Asp y dos pacientes (6,5%) son heterocigotos compuestos (Cys282Tyr/His63Asp). Solo 1 de 512 (0,2%) controles es homocigoto para la mutación Cys282Tyr, y 29 (5,7%) son heterocigotos. La mutación Cys282Tyr presenta una frecuencia alélica de $90,3 \pm 7,5$ % en pacientes con Hemocromatosis Hereditaria y una frecuencia alélica de un $3,0 \pm 1,1$ % en controles. Veinte de 487 (4,1%) controles son homocigotos para la mutación His63Asp y 171 (35,1%) son heterocigotos. La mutación His63Asp está presente en una frecuencia alélica de $21,7 \pm 2,7$ % en controles.

Conclusiones: La alta frecuencia de la mutación Cys282Tyr en pacientes con Hemocromatosis Hereditaria indica que esta mutación es el defecto principal asociado con la Hemocromatosis Hereditaria en España. La existencia de algunos pacientes con un genotipo normal en la posición 282 sugiere la existencia de otros cambios en el gen HFE o en otros loci que estén implicados en la enfermedad. En nuestra población hemos detectado una de las frecuencias alélicas más altas descritas para la mutación His63Asp ($21,7 \pm 2,7$).

Nota: Cys282Tyr = C282Y. His63Asp = H63D.

Prevalence of the Cys282Tyr and His63Asp HFE gene mutations in Spanish patients with hereditary hemochromatosis and in controls

Mayka Sánchez¹, Miquel Bruguera², Jaume Bosch², Joan Rodés², Francisca Ballesta¹ and Rafael Oliva¹

¹Genetics Service and ²Liver Unit, Institut Clinic de Malalties Digestives, IDIBAPS, Hospital Clinic and University of Barcelona, Villarroel, Barcelona Spain

Background/Aims: A mutation (Cys282Tyr) of the HFE gene has recently been reported to be present in most of the patients with hereditary hemochromatosis of Northern European ancestry, but in a lower frequency in Italy. No data are so far available on the prevalence of these mutations in Spain. Therefore, we initiated the present study to determine if the reported Cys282Tyr HFE mutation is also the main cause of hereditary hemochromatosis in Spain. In addition, we investigated the presence of the His63Asp HFE mutation in patients and in controls.

Methods: Thirty-one hereditary hemochromatosis patients and 485 controls were screened for the Cys282Tyr and the His63Asp mutations, using polymerase chain reaction amplification of genomic DNA, followed by digestion with the restriction enzymes Rsa I or Dpn II, respectively, and the separation of the products by electrophoresis.

Results: Twenty-seven out of 31 (87.1%) hereditary hemochromatosis patients were homozygous for the Cys282Tyr mutation. None of the patients was homozygous for the His63Asp mutation, and two patients (6.5%) were compound heterozygous (Cys282Tyr/His-

63Asp). Only one of 512 (0.2%) controls was homozygous for the Cys282Tyr mutation, and 29 (5.7%) were heterozygous. The Cys282Tyr mutation is present with an allelic frequency of $90.3 \pm 7.5\%$ in patients with hereditary hemochromatosis and $3.0 \pm 1.1\%$ in controls. Twenty out of 487 (4.1%) controls were His63Asp homozygous, while 171 (35.1%) were heterozygous. The His63Asp mutation is present with an allelic frequency of $21.7 \pm 2.7\%$ in controls.

Conclusions: The high frequency of the Cys282Tyr mutation in hereditary hemochromatosis patients indicates that this mutation is the most common defect associated with hereditary hemochromatosis in Spain. The finding of some patients with the wild genotype at position 282 suggests the existence of other changes in the HFE gene or in other loci involved in the disease. We have found one of the highest allelic frequencies reported for the His63Asp mutation in our controls ($21.7 \pm 2.7\%$).

Key words: Cys282Tyr mutation; Hemochromatosis; HFE gene; Iron overload.

HEREDITARY hemochromatosis is an autosomal recessive disease resulting in abnormally high intestinal iron absorption (1,2). The excess of body iron accumulates first in the liver and later in other organs, resulting in liver damage and other clinical disorders. Liver disease is characterized by progressive fibrosis leading to cirrhosis and hepatocellular carcinoma (1). Morbidity can be completely prevented, and life expect-

ancy can be restored to normal, if the disease is detected early, before the development of cirrhosis, and treated by phlebotomy (1). In the past there was the misconception that hemochromatosis was a rare disease, but it is now described as a paradigm of autosomal recessive disorders because of its extremely high prevalence: one in 300 individuals is affected and one in every eight individuals is heterozygous in Caucasian populations (3). The prevalence has been described as particularly high in populations with Northern European ancestry (3–8), but lower in other populations (9).

The recent discovery of the HFE gene, previously called HLA-H, is considered to be responsible for familial hemochromatosis (3). A mutation (Cys282Tyr) of

Received 6 April; revised 23 June; accepted 24 June 1998

Correspondence: Rafael Oliva, Genetics Service, Hospital Clínic, Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain. Tel: 34 93 227 55 10. Fax: 34 93 227 54 54. E-mail: oliva@medicina.ub.es

the HFE gene is found in 69–100% of the patients (3–9). Patients of Northern European descent have a much higher prevalence of the Cys282Tyr mutation than those from Southern Europe. Since the prevalence of hemochromatosis varies in different populations, knowledge of the allelic frequency of the HFE mutation may be useful in planning appropriate screening or diagnostic policies. One of the reasons why we initiated the present study was to determine the prevalence of the Cys282Tyr and His63Asp mutations in a sample from the Spanish population. Furthermore, we have genotyped a series of consecutive patients with primary hemochromatosis in order to determine if these mutations are responsible for the disease in most of the hemochromatosis patients in Spain.

Patients and Methods

Three groups of subjects were tested for the HFE Cys282Tyr and His63Asp mutations. The first group consisted of 31 unrelated Spanish patients with primary hemochromatosis (27 men and 4 woman) with a mean age of 57 ± 11 years. The diagnosis of hemochromatosis was based on clinical history, serum transferrin saturation above 55%, elevated ferritin concentration and exclusion of other causes of iron overload, and was confirmed by the finding of iron deposition in the liver graded 3 to 4 according to Scheuer's criteria (10) and hepatic iron index (hepatic iron concentration/age) above 1.9 (11) in all but three cases who did not agree

to a liver biopsy. In these three cases the diagnosis of hemochromatosis was confirmed by the mobilization of more than 5 g of iron by phlebotomies. The second group consisted of 420 blood donors (227 men and 193 women) with a mean age of 25 ± 8 years. Ninety-six percent of these controls were born in Catalonia (Northeast of Spain) and the rest were born in other Spanish regions. The third group consisted of 92 controls from paternity testing studies (49 men and 43 women) with a mean age of 35 ± 11 years.

DNA was extracted from peripheral leukocytes or from blood buffy coats, following standard proteinase K and chloroform extraction. The HFE gene was amplified using the primers and conditions described by Feder et al. (3). Polymerase chain reaction (PCR) was performed using a Perkin Elmer Thermal Cycler in a final volume of 25 μ l under standard conditions (annealing temperature of 58°C and 30 cycles). The PCR products were subsequently digested with the restriction enzymes Rsa I (Cys282Tyr mutation) or Dpn II (His63Asp mutation) (New England Biolabs), and the resulting fragments were separated by electrophoresis in a 3% agarose gel and visualized by ethidium bromide staining.

Results

The results of genotype analysis are summarized in Table 1. Twenty-seven out of 31 patients (87.1%) were found to be homozygous for the Cys282Tyr mutation,

TABLE 1
C282Y and H63D mutations in Spanish controls and hereditary hemochromatosis patients

	Genotypes		Controls				Patients	
	C282Y	H63D	Blood donors	Paternity	All controls		n	%
					n	%		
	+/+	-/-	0	1	1	0.2	27	87.1
	+/-	+/-	7	0	7	1.4	2	6.5
	+/-	-/-	19	1	20	4.1	0	0.0
	-/-	+/+	18	2	20	4.1	0	0.0
	-/-	+/-	136	28	164	33.8	1	3.2
	-/-	-/-	240	33	273	56.3	1	3.2
Total			420	65	485		31	
	+/+		0	1	1	0.2	27	87.1
	+/-		26	3	29	5.7	2	6.5
	-/-		394	88	482	94.1	2	6.5
Total			420	92	512		31	
		+/+	18	2	20	4.1	0	0.0
		+/-	143	28	171	35.1	3	9.7
		-/-	261	35	296	60.8	28	90.3
Total			422	65	487		31	
			Allelic frequency \pm 95% C.I.					
C282Y+			3.1 \pm 1.2	2.7 \pm 2.4	31/1024	3.0 \pm 1.1	56/62	90.3 \pm 7.5
H63D+			21.2 \pm 2.8	24.6 \pm 7.6	211/974	21.7 \pm 2.7	3/62	4.8 \pm 5.4

C.I.=confidence interval.

indicating that this mutation is also the most common defect causing hemochromatosis in our population. Two male patients had clinical and biochemical features typical of genetic hemochromatosis, but lacked the Cys282Tyr mutation. They were 57 and 59 years old at onset of symptoms, and had a family history of liver disease. The sister of one patient died of liver cirrhosis of unknown etiology, but clinical and biochemical data were not available. The other patient had a brother who died in another hospital from a hepatocellular carcinoma superimposed on liver cirrhosis with iron deposition. One of them required venesection therapy for 8 months to remove the excess of iron and the other is still being treated after 7 months. Two other patients were compound heterozygotes for the two mutations (Cys282Tyr/His63Asp), while none of the patients was homozygous for the His63Asp mutation.

No significant differences were found in the frequency of the two mutations between the two control groups ($p=0.444$). Overall, we found one control subject (0.2%) homozygous for the Cys282Tyr mutation, 29 heterozygotes (5.7%) and 482 (94.1%) with a normal genotype (Table 1). Concerning the His63Asp mutation, we found that 20 of our controls were homozygotes (4.1%), 171 were heterozygotes (35.1%) and 296 (60.8%) lacked this mutation. The Cys282Tyr mutation was detected in 31 of the 1024 control chromosomes, resulting in an allele frequency of $3.0\pm 1.1\%$. The carrier frequency in controls is 5.9% (31 out of 512). The His63Asp mutation was detected in 211 out of the 974 control chromosomes, resulting in one of the highest allelic frequencies ($21.7\pm 2.7\%$) reported for this mutation. The carrier frequency in controls was 33.9% (211 out of 487).

Discussion

In this study we found a strong association between the presence of the Cys282Tyr mutation (87.1%) in the HFE gene and hereditary hemochromatosis, confirming the findings in patients with genetic hemochromatosis from the USA (83%) (3,7), the UK (91%) (5), Brittany (92%) (6), Austria (77%) (8) and Australia (100%) (4). Our results differ from those reported by Italian investigators who found a lower frequency for the Cys282Tyr mutation (69%) (9).

Two compound Cys282Tyr/His63Asp heterozygotes were identified among the group of patients, resulting in a higher frequency (6.5%) at borderline significance ($p=0.0837$) than the frequency of compound heterozygotes present in the control group (1.4%). These results are consistent with those initially reported (3).

The two patients without the mutation fulfilled all

the criteria for hereditary hemochromatosis. Previous studies have not detected other mutations within the coding sequence of the HFE gene in patients with genetic hemochromatosis (3,9). Consequently, the existence of patients without the mutation suggests that either other non-coding mutations in the HFE gene or other minor loci are implicated in the disease. Further studies should be aimed at identifying these other potential mutations associated with hemochromatosis.

The allelic frequency of the Cys282Tyr mutation found in 512 Spanish controls (1024 alleles) was $3.0\pm 1.1\%$. This frequency is in agreement with the frequency previously reported ($3.2\pm 2.8\%$) in a small number of controls from Spain included in a global prevalence survey (12), and with the frequency found in the control population from Brittany (France) ($2.88\pm 2.01\%$) (6). Similar frequencies have been reported by Feder et al. (3) (3.2%) in the USA Caucasian population and by Datz et al. (8) (3.7%) in the Austrian population. However, the frequency described in the Italian population is much lower (1%) (9).

It has been proposed that hemochromatosis is of Celtic origin (1). Celts spread through Europe between the 2nd millennium and the 1st century BC. From the heartland of central Europe, they settled the area of France, occupied about half of the Iberian peninsula and crossed to the British Isles (13). They later moved South and Southwest further extending their initial areas of influence. Although sporadic Viking expeditions have also been reported in Spain between 844 and the 12th century, there is no evidence that they settled in Spain as the Celts did. Furthermore, the frequency of the Cys282Tyr mutation in Spain is comparable to that of France and UK, and thus our findings support the hypothesis of a Celtic, rather than a Nordic origin for hemochromatosis. The much lower frequency of this mutation found in Italy may indicate a lower Celtic genetic component in this country.

Knowledge of the allelic frequency of the most prevalent HFE mutation causing hereditary hemochromatosis in Spain (0.0303 ± 0.0107) also allows us to predict (based on the Hardy-Weinberg equilibrium) the homozygous (potentially affected) and the heterozygous (carrier) frequencies in our population. Thus, it can be calculated that the frequency of individuals homozygous for the Cys282Tyr mutation in Spain is 0.00092 (one in 1091 individuals in the general population could be potentially affected), and that the frequency of carriers is 0.05871 (one in 17 individuals in the general population should be a carrier). This theoretical prediction fits well with the number of carriers detected in our sample (one heterozygous carrier for every 18 individuals, 28/504). Similarly, the frequency

of individuals homozygous for the His63Asp mutation in Spain is 0.04693 (one in 21 individuals in the general population should be a homozygote), and the frequency of carriers is 0.33941 (one in three individuals in the general population should be a carrier). Thus, we describe one of the highest frequencies of the His63-Asp mutation reported.

The high proportion of the Cys282Tyr mutation detected in hereditary hemochromatosis patients supports the potential use of molecular genetic analysis as a confirmation test where there is clinical suspicion of the disease. Further pilot studies should be aimed at determining whether screening of the general population would be cost effective in the detection of potentially affected individuals and in the early prevention of manifestations of the disease.

Acknowledgements

The authors are grateful to Dr Mazzara, Hospital Clínic of Barcelona, Spain, and to Dr Manel Gené, University of Barcelona, Spain for kindly providing the controls. We acknowledge the excellent technical assistance provided by Margarita Villa and Loli Jiménez. This study was supported by grant (FIS98-0145) to Dr Oliva.

References

1. Bothwell TH, Charlton RW, Motulsky AG. Hemochromatosis. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. *The Metabolic and Molecular Basis of Disease*. New York: McGraw-Hill; 1995: p. 2237-69.
2. Riedel HD, Stremmel W. The hemochromatosis gene. *J Hepatol* 1997; 26: 941-4.
3. 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 hemochromatosis. *Nat Genet* 1996; 13: 399-408.
4. Jazwinska EC, Cullen LM, Busfield F, Pyper WR, Webb SI, Powell LW, et al. Hemochromatosis and HLA-A. *Nat Genet* 1996; 14: 249-51.
5. The UK Hemochromatosis Consortium. A simple genetic test identifies 90% of UK patients with hemochromatosis. *Gut* 1997; 41: 841-4.
6. Jouanelle AM, Fergelot P, Gandon G, Yaouanq J, Le Gall JY, David V. A candidate gene for hemochromatosis: frequency of the C282Y and H63D mutations. *Hum Genet* 1997; 100: 544-7.
7. Beutler E, Gelbart T, West C, Lee P, Adams M, Blackstone, et al. Mutation analysis in hereditary hemochromatosis. *Blood Cells Mol Dis* 1996; 22: 187-94.
8. Datz C, Lalloz MRA, Vogel W, Graziadei I, Hackl F, Vautier G, et al. Predominance of the HLA-H Cys282Tyr mutation in Austrian patients with genetic hemochromatosis. *J Hepatol* 1997; 27: 773-9.
9. Carella M, D'Ambrosio L, Totaro A, Grifa A, Valentino MA, Piperno A, et al. Mutation analysis of the HLA-H gene in Italian hemochromatosis patients. *Am J Hum Genet* 1997; 60: 828-32.
10. Scheuer PJ, Williams R, Muir AR. Hepatic pathology in relatives of patients with hemochromatosis. *J Pathol Bacteriol* 1992; 84: 53-64.
11. Basset ML, Halliday JW, Powel LW. Value of hepatic iron measurements in early hemochromatosis and determination of the critical iron level associated with fibrosis. *Hepatology* 1986; 6: 24-9.
12. Merryweather-Clarke AT, Pointon JJ, Shearman JD, Robson KJH. Global prevalence of putative hemochromatosis mutations. *J Med Genet* 1997; 34: 275-8.
13. Cremin A. *The Celts in Europe*. Australia: Center for Celtic Studies, University of Sydney; 1992.

ARTÍCULO 2**Hereditary Hemochromatosis in Spain.**

Genetic Testing 2000; 4 (2):171-6.

Resumen en castellano

Hemocromatosis Hereditaria en España.

La mutación C282Y del gen HFE en estado homocigoto se ha descrito como la principal causa de Hemocromatosis Hereditaria (HH). También se ha descrito una frecuencia incrementada del genotipo heterocigoto compuesto de las mutaciones C282Y y H63D en pacientes con Hemocromatosis Hereditaria, involucrándose de esta forma a la mutación no sinónima H63D en la patogenia de la enfermedad. Sin embargo estos dos genotipos no están presentes en todos los pacientes afectados de Hemocromatosis Hereditaria, lo que indica que pueden existir otras mutaciones en el gen HFE o en otros loci responsables de estos casos. Este trabajo describe las frecuencias de las mutaciones C282Y y H63D en 74 pacientes con Hemocromatosis Hereditaria y el resultado del análisis de secuenciación del gen HFE (exones, región flanqueante intrónica-exónica, regiones 5' y 3' UTR y 588 pb de la zona promotora) en 5 pacientes negativos para la mutación C282Y. Se ha detectado una alta frecuencia de la mutación C282Y en pacientes españoles de Hemocromatosis Hereditaria (85,1% de los casos) lo que indica que esta mutación es el defecto principal asociado a la enfermedad en España. El estudio de las regiones del gen HFE en nuestros pacientes de Hemocromatosis Hereditaria sin la mutación C282Y ha revelado la existencia de 5 polimorfismos. Sin embargo no se ha detectado nuevas mutaciones patológicas, por lo que otras zonas no secuenciadas del gen HFE o mutaciones en otros loci podrían ser responsables de estos casos.

Hereditary Hemochromatosis in Spain

MAYKA SÁNCHEZ,¹ MIQUEL BRUGUERA,² ENRIQUE QUINTERO,³ YSAMAR BARRIO,³
 ROBERTO MAZZARA,⁴ JOAN RODÉS,² and RAFAEL OLIVA¹

ABSTRACT

The C282Y mutation of the *HFE* gene has been reported as the main cause of hereditary hemochromatosis (HH). Another missense mutation (H63D) has also been detected at an increased frequency in a compound heterozygote state with the C282Y mutation in HH patients. However, these two mutations are not present in all of the HH patients, indicating that other mutations in the *HFE* gene, or in other loci, should exist. The present study reports the frequencies of the C282Y and H63D mutations in 74 Spanish HH patients and the results of the sequencing analysis of the *HFE* exons, intron-exon boundaries, and 588 bp of the 5' region in 5 patients negative for the C282Y mutation. We have detected a high frequency of the C282Y mutation (85.1%) in Spanish HH patients, indicating that this mutation is the most common defect associated with the disease in Spain. The screening of the *HFE* regions in our patients without the C282Y mutation has revealed the presence of five polymorphisms. However, no other pathological mutations have been found. Therefore, further efforts to characterize the unscreened part of the *HFE* gene or other loci should be taken to identify the potential genetic factors causing HH in the C282Y-negative patients.

INTRODUCTION

IN 1996, A MUTATION OF THE *HFE* GENE (C282Y) was identified as the main cause of hereditary hemochromatosis (HH) (Feder *et al.*, 1996). Since then, many studies performed in different countries have concluded that the C282Y mutation is present in 77–100% of the HH patients, (Beutler *et al.*, 1996; Jazwinska *et al.*, 1996; Jouanelle *et al.*, 1997; Datz *et al.*, 1997; The UK Haemochromatosis Consortium, 1997; Cardoso *et al.*, 1998; Gottschalk *et al.*, 1998; Sánchez *et al.*, 1998). However, in Italy the frequency of the common *HFE* mutation in HH patients has been reported to be much lower, accounting only for 64% of the patients (Carella *et al.*, 1997). In an initial survey in Spain, we found that 87.1% of our HH patients ($n = 31$) were homozygous for this mutation (Sánchez *et al.*, 1998). A second mutation in the *HFE* gene (H63D) was also detected at a higher frequency in a compound heterozygous state with the C282Y mutation in HH patients as compared to controls (Feder *et al.*, 1996). However, the C282Y/H63D compound heterozygotes have been reported to express the disease at a low penetrance (0.44–1.5%) (Beutler *et al.*, 1996; Feder *et al.*, 1996; Jouanelle

et al., 1996). Previously, we have reported that the frequency of the H63D mutation in the control Spanish population is the highest described worldwide ($21.7 \pm 2.7\%$) (Sánchez *et al.*, 1998).

In this study, we have screened for the C282Y and the H63D mutations in 74 HH Spanish patients. In addition, we have screened the *HFE* intron-exon boundaries, the *HFE* exons, and 588 bp of the *HFE* 5' region in patients lacking the C282Y mutation in a search for potential additional changes in the *HFE* gene.

METHODS

Patients and clinical criteria

Seventy-four unrelated Spanish patients with HH were included in the study (54 from the Hospital Clinic of Barcelona and 20 from the Hospital Universitario of the Canary Islands). The diagnosis of hemochromatosis was based on the clinical history, serum transferrin saturation above 55%, elevated fer-

¹Genetics Service, IDIBAPS Institut d'Investigacions Biomèdiques August Ri i Sunyer, Hospital Clinic and University of Barcelona, Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain.

²Liver Unit, IDIBAPS, Hospital Clinic and University of Barcelona, Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain.

³Molecular Laboratory, Unidad Mixta de Investigación, Hospital Universitario de Canarias, Spain.

⁴Servei de Hemoterapia i Hemostasia, IDIBAPS, Hospital Clinic and University of Barcelona, Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain.

ritin concentration, and exclusion of other causes of iron overload, and was confirmed by the finding of iron deposition in the liver, graded 3–4 according to Scheuer's criteria (Scheuer *et al.*, 1992), and hepatic iron index (hepatic iron concentration/age) above 1.9 (Basset *et al.*, 1986). In those cases that did not accept a liver biopsy, the diagnosis of hemochromatosis was confirmed by the mobilization of more than 5 grams of iron by phlebotomies.

DNA extraction and genotyping

DNA was extracted from peripheral leukocytes or from blood buffy coats following standard proteinase K and chloroform extraction. The genetic screening of the C282Y and H63D mutations was done through PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP), as previously described (Merryweather-Clarke *et al.*, 1997). All of the patients' genotypes were confirmed by an independent PCR-RFLP method (Stott *et al.*, 1999). PCR was performed using a Perkin Elmer Thermal Cycler in a final volume of 25 μ l at standard conditions. The PCR products were subsequently digested with *RsaI* for the C282Y mutation, with *DpnII* for the H63D mutation (Merryweather-Clarke *et al.*, 1997) and with *PmlI* for both mutations (Stott *et al.*, 1999). The resulting fragments were separated using electrophoresis in a 3% agarose gel and detected by ethidium bromide staining.

Sequencing

Intronic primers were designed to amplify the *HFE* exons and intron-exon boundaries from genomic DNA (Table 1). Primers sequences were designed according to the GenBank

HFE sequence Z92910. Exons 6 and 7 were divided in two overlapping fragments due to its long size. Primer Ex7U was designed to sequence exon 7 from the Ex71U-Ex71L amplification product, due to technical difficulties in the sequencing using the Ex71U primer (Table 1). The sequencing reactions were done using the Rhodamine terminator cycle sequencing kit (Perkin Elmer). The sequencing products were run in a 373 ABI PRISM™ or in an ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer sequencers. The sequences obtained were subsequently analyzed using the SEQMAN (DNASTAR program) to identify the presence of potential mutations.

Screening the different polymorphisms

The different polymorphisms were analyzed using PCR-PFLP method in 49–102 blood donor controls. The G/C change at position –467, the A/C change at position –410, the C/T change in intron 2, and the G/C change at position 124 of exon 7 were detected by PCR amplification with primers B-1, AdeU-AdeL, Exon 2U-Exon 2L, and Exon71U-Exon71L, respectively (Table 1). Restriction digestions with *Tail* (65°C), *Adel* (37°C), *Tail* (65°C), and *BsaMI* (65°C) were done, respectively, and the resulting fragments were separated by electrophoresis in a 2–4% agarose gel and detected by ethidium bromide staining (Fig. 1).

The AdeU and AdeL primers are mutagenized primers designed to detect the –410 A/C change (Table 1, mutated bases are underlined). The upper prime (AdeU) was designed to introduce a constitutive *Adel* (*DraIII*) restriction site, and an additional *Adel* site is created only if the C allele is amplified (Fig. 1).

TABLE 1. PRIMERS DESIGNED TO ANALYZE THE *HFE* GENE

Primer name	Primers sequence 5' → 3'	PCR fragment (bp)	Annealing temperature (°C)
Ex1U	AATCAACAACACCCCTTCAG	434	61
Ex1L	AGGTCCCTCCAAAGTTAGCAA		
Ex2U	GCTCCCTCCTACTACACAT	478	61
Ex2L	GGTCCCTATTTCCACCATCC		
Ex3U	AGGGACCTATTCCTTTGGTT	351	61
Ex3L	GGGGCAGAAGTGTGTTCCA		
Ex4U	TGGCAAGGGTAAACAGATCC	390	60
Ex4L	CTCAGGCACTCCTCTCAACC		
Ex5U	TATGGCAGTGAGATGAGGAT	230	55
Ex5L	TAAGAGACTTCCCCCTTGTT		
Ex6.1U	ATGCCTCTTTCCTGGGTCTC	592	57
Ex6.1L	GCTTGGTGACAGATGAGTTA		
Ex6.2U	AACTTTTCCTTTGAATCCTC	686	57
Ex6.2L	CTGGGACTACAGGCGTCTGC		
Ex7.1U	ATTCTGGGAAATCAGTTCAC	581	48
Ex7.1L	CTACAATGAGCGTAAATCAC		
Ex7U	TTTAGTAGAGACAGGGTTC		
Ex7.2U	CAGGTGCTTCAGGATACCATA	369	48
Ex7.2L	AATAAATGTCTCCAAAATGAC		
B	GCATGTGCCACCTTAGGGAA	896	64
I	CTCGGACTCACGCAGCAAGC		
AdeU	GGCTCA <u>C</u> TATGT <u>G</u> TAATCATTCCTCCAGATAAT	182	55
AdeL	TGACTTAGAAATATAAAGCTTTTTCAC <u>T</u> TTGT		

SCREENING FOR HFE GENE MUTATIONS IN SPAIN

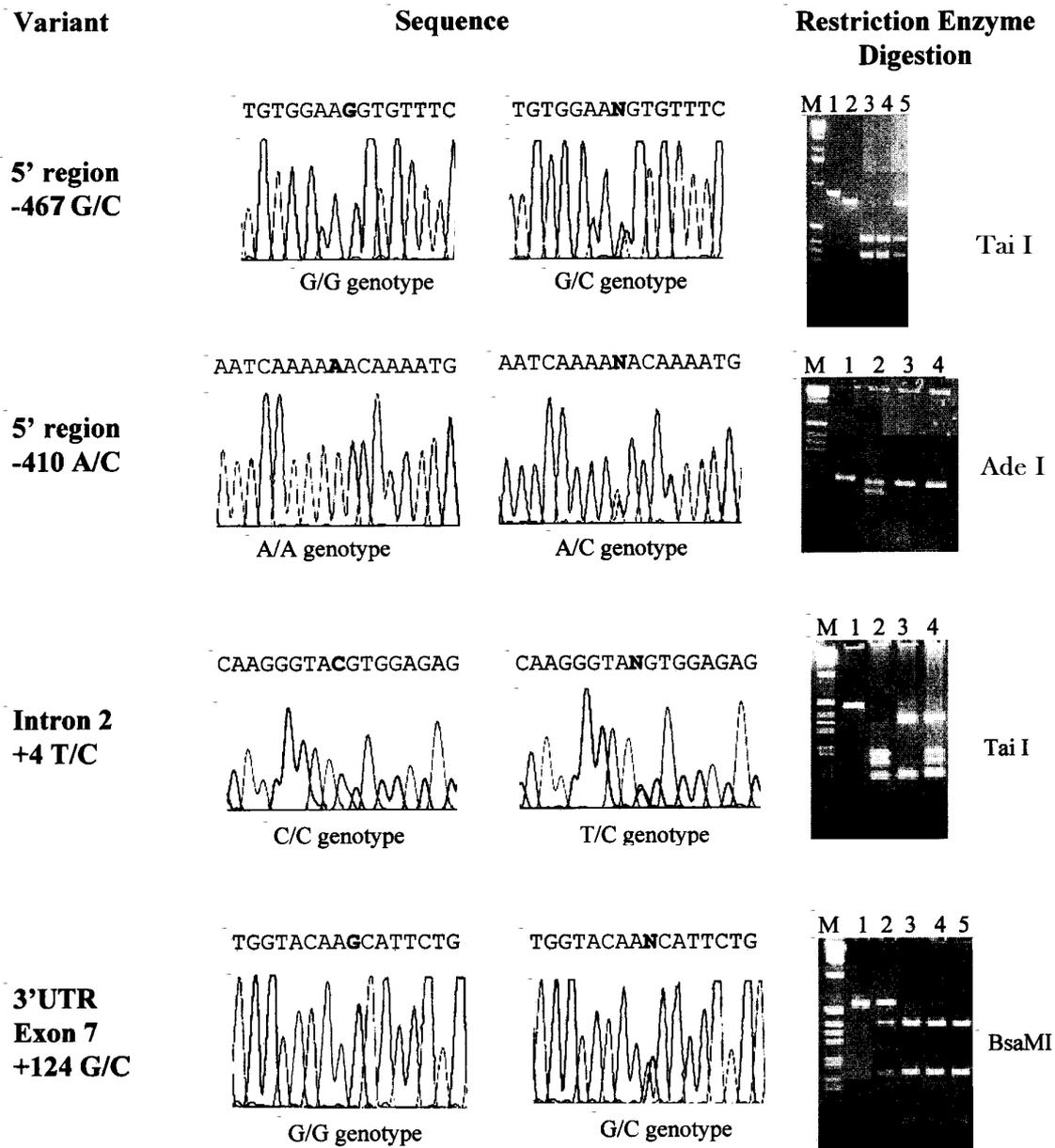


FIG. 1. Sequencing profiles and restriction enzyme digestion detection of the variants found in the *HFE* gene in Spanish non-C282Y HH patients. The restriction enzymes used are indicated next to the agarose gel photograph. M, 1-kb marker. The samples loaded in the lanes of the different agarose gels are as follows. 5' region -467 G/C variant: lane 1, nondigested PCR fragment; lane 2, G/G genotype; lanes 3 and 4, C/C genotype; lane 5, G/C genotype. 5' region -410 A/C variant: lane 1, nondigested PCR fragment; lane 2, A/C genotype; lanes 3 and 4, A/A genotype. Intron 2 +4 T/C variant: lane 1, nondigested PCR fragment; lane 2, C/C genotype; lane 3, T/T genotype; lane 4, T/C genotype. 3'UTR exon 7 +124 G/C variant: lane 1, nondigested PCR fragment; lane 2, C/G genotype; lanes 3, 4, and 5, G/G genotype.

RESULTS

After screening for the C282Y and H63D mutations in our 74 Spanish HH patients, we found 60 patients (81.1%) homozygous for the C282Y mutation, confirming that this mutation is also the most common defect causing hemochromatosis in our population.

Six of the patients were compound heterozygotes (C282Y/H63D). Eight patients lacked the C282Y mutation (4 of them were also H63D negative, 2 were H63D heterozygotes, and 2 were H63D homozygotes; Table 2). The frequencies of the C282Y and H63D mutations in the Spanish control population have been reported elsewhere (Sánchez *et al.*, 1998).

TABLE 2. PRESENCE OF THE CYS282TYR AND HIS63ASP MUTATIONS IN SPANISH HH PATIENTS AND CONTROLS

Genotypes		Patients		Controls	
C282Y	H63D	n	%	n	%
+/+	-/-	60	81.1	1	0.2
+/-	+/-	6	8.1	7	1.4
+/-	-/-	0	0.0	20	4.1
-/-	+/+	2	2.7	20	4.1
-/-	+/-	2	2.7	164	33.8
-/-	-/-	4	5.4	273	56.3
Total		74		485	

Five of the HH patients with a negative genotype for the C282Y mutation were screened for the 7 exons and the intron-exon boundaries of the *HFE* gene. The 5' region (588 bp) of the *HFE* was also screened in 5 patients negative for the C282Y mutation (Fig. 2). This approach allowed us to characterize the genotypes of all of the *HFE* variants reported to the present and, in addition, to identify two novel variants in the 5' region of the gene (Fig. 1).

Four changes were found in the regions studied, a G/C change at position -467, an A/C change at position -410, a C/T change in intron 2, and a G/C change at position 124 of exon 7. We also performed PCR-RFLP analysis on DNA from control blood donors to determine the frequency of these vari-

ants in the normal population. The genotypes and allele frequencies of these variants are reported in Table 3. No significant differences were found in the allele frequencies between patients and controls.

We have also detected a discrepancy between the sequence present in our patients as well as in one of the controls, and the *HFE* GenBank sequence (Z92910) used to compare the sequences. Specifically, at position +109 of intron 4, we found a G instead of an A as reported in the GenBank sequence Z92910.

DISCUSSION

In this study, we have found a strong association between the presence of the C282Y mutation (85.1%) in the *HFE* gene and HH in Spain. This result confirms the findings reported in patients from the United States (83%) (Beutler *et al.*, 1996; Feder *et al.*, 1996), UK (91%) (The UK Haemochromatosis Consortium, 1997), Brittany (92%) (Jouanelle *et al.*, 1997), Austria (77%) (Datz *et al.*, 1997), Australia (100%) (Jazwinska *et al.*, 1996), Sweden (Cardoso *et al.*, 1998), and Germany (Gottschalk *et al.*, 1998). Our results differ from those reported by Italian investigators who found a lower frequency for the C282Y mutation (69%) (Carella *et al.*, 1997). We have also detected six compound heterozygotes (C282Y/H63D) among the group of HH patients, resulting in a frequency slightly higher (8.1%) than that reported in our initial study (6.5%) (Sánchez *et al.*, 1998).

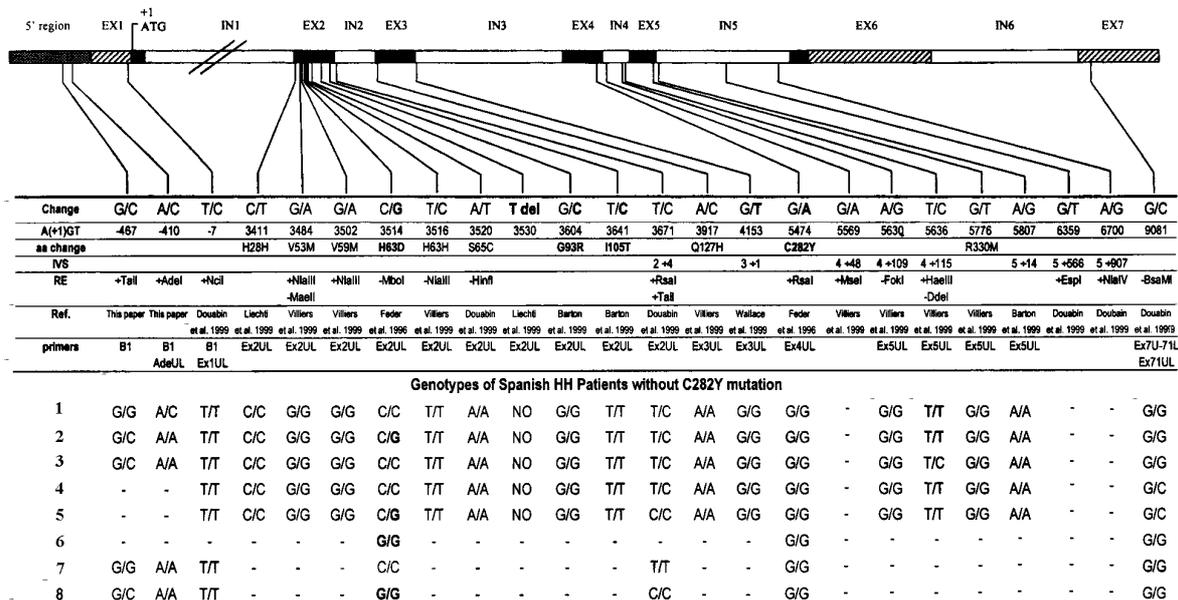


FIG. 2. Mutations and polymorphisms described in the *HFE* gene. A schematic representation of the *HFE* gene is shown at the top of the figure, and the positions of the different changes described below are indicated. Mutations associated with HH are shown in bold type. All positions are indicated taking as a reference the +1 A nucleotide of the ATG (A(+1)GT; GenBank *HFE* sequence accession number Z92910). IVS, Type of intronic sequence variant; RE, restriction enzyme used in the PCR-RFLP analysis. A plus sign indicates that a site is created and a minus sign indicates that a site is destroyed when the variant is present. The genotypes present at each position of the *HFE* gene are shown below for each of the 8 patients negative for the C282Y mutation. The minus sign denotes that the genotypes was not determined.

SCREENING FOR HFE GENE MUTATIONS IN SPAIN

TABLE 3. HFE VARIANTS FOUND IN THE SPANISH NON-C282Y HEMOCHROMATOSIS PATIENTS

Variant	Genotype		Allele frequency	
	Patients	Controls	Patients	Controls
G/C	G/G = 2	G/G = 35	G = 70.0%	G = 57.8%
-467	G/C = 3	G/C = 48	C = 30.0%	C = 42.2%
5' region	C/C = 0	C/C = 19		
	Total = 5	Total = 102		
A/C	A/A = 4	A/A = 74	A = 90.0%	A = 98.1%
-410	A/C = 1	A/C = 3	C = 10.0%	C = 1.9%
5' region	C/C = 0	C/C = 0		
	Total = 5	Total = 77		
T/C	T/T = 1	T/T = 19	T = 42.9%	T = 56.9%
IVS2+4	T/C = 4	T/C = 20	C = 57.1%	C = 43.1%
Intron2	C/C = 2	C/C = 12		
	Total = 7	Total = 51		
G/C	G/G = 6	G/G = 39	G = 70.0%	G = 89.8%
Base 124	G/C = 2	G/C = 10	C = 30.0%	C = 10.2%
Exon 7	C/C = 0	C/C = 0		
	Total = 8	Total = 49		

Eight of the patients were negative for the C282Y mutation and all met criteria for HH: 2 of them are homozygotes for the H63D mutation. The frequency of the H63D mutation is very high in our country (allelic frequency $21.7 \pm 2.7\%$), resulting in the presence of 4.1% of H63D homozygotes (Sánchez *et al.*, 1998). Therefore, it is not certain that the H63D/H63D genotype is responsible for the disease in these two patients.

The seven exons of the *HFE* gene were screened in 5 of the 8 HH patients who were negative for the C282Y mutation. The 588 bp of the 5' region of the *HFE* gene were also screened in 5 C282Y-negative patients (Fig. 2). Four polymorphisms have been detected: a G/C change at position -467, an A/C change at position -410, a C/T change in intron 2, and a G/C change at position 124 of exon 7 [3' untranslated region (UTR)]. The presence of these variants in our blood donor controls and their position in the noncoding region of the gene suggest these changes are polymorphisms rather than pathologic mutations. In addition, the IVS2+4 T/C and the exon 7, 124-base G/C changes have already been previously reported as polymorphisms (Douabin *et al.*, 1999). However, we have determined that the frequency of mutated C allele in the IVS2+4 T/C variant is slightly higher in our 7 HH non-C282Y patients than in the 51 controls (57.1% vs. 43.1%; Table 3). This observation is consistent with that previously reported in a South African study (Villier *et al.*, 1999).

We have also found a discrepancy at position +109 of intron 4, because all of our sequences have a "G" in a homozygous state instead of the "A" present in the GenBank data. Subsequently, we found that this position had also been reported as a polymorphism (Villier *et al.*, 1999). No other pathological mutations have been found in the screened *HFE* regions, and we have failed to detect any of the newly reported additional mutations in the *HFE* gene in 5 of our negative C282Y mutation HH patients (Fig. 2).

The high proportion of the C282Y mutation detected in Spanish HH patients supports the potential use of the molecular genetic analysis as a confirmation test upon clinical suspicion of

the disease. Further pilot studies could now be aimed at determining whether screening of the general population would be cost-effective in the detection of potentially affected individuals and in the early prevention of the disease manifestations. However, the existence of patients without the C282Y mutation points to potential additional noncoding *HFE* mutations or mutations in other minor loci, which should be further investigated.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Margarita Villa for her excellent technical assistance and to the sequencing support performed by the Serveis Científic-Tècnics, Universidad de Barcelona and the Servei de DNA of the Hospital Clinic. This work has been supported with grants from the Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS98-0145), MARATO TV3 (N° 981010 and 991510) to Dr. Oliva.

REFERENCES

- BASSET, M.L., HALLIDAY, J.W., and POWELL, L.W. (1986). Value of hepatic iron measurements in early hemochromatosis and determination of the critical iron level associated with fibrosis. *Hepatology* **6**, 24-29.
- BARTON, J.C., SAWADA-HIRAI, R., ROTHENBERG, B.E., and ACTON, R.T. (1999). Two novel missense mutations of the *HFE* gene (I105T and G93R) and identification of the S65C mutation in Alabama hemochromatosis probands. *Blood Cells Mol. Dis.* **15**, 147-155.
- BEUTLER, E., GELBART, T., WEST, C., LEE, P., ADAMS, M., BLACKSTONE, R., POCKROS, P., KOSTY, M., VENDITTI, C.P., PHATAK, P.D., SEESE, N.K., CHORNEY, K.A., TEN-ELSHOF, A.E., GERHARD, G.S., and CHORNEY, M. (1996). Mutation analysis in hereditary hemochromatosis. *Blood Cells Mol. Dis.* **22**, 187-194.

- CARDOSO, E.M.P., STAL, P., HAGEN, K., CABEDA, J.M., ESIN, S., DE SOUSA, M., and HULTCRANTZ, R. (1998). HFE mutations in patients with Hereditary Hemochromatosis in Sweden. *J. Intern. Med.* **243**, 203–208.
- CARELLA, M., D'AMBROSIO, L., TOTARO, A., GRIFA, A., VALENTINO, M.A., PIPERNO, A., GIRELLI, D., ROETTO, A., FRANCO, B., GASPARINI, P., and CAMASCHELLA, C. (1997). Mutation analysis of the HLA-H gene in Italian hemochromatosis patients. *Am. J. Hum. Genet.* **60**, 828–832.
- DATZ, C., LALLOZ, M.R.A., VOGEL, W., GRAZIADEI, I., HACKL, F., VAUTIER, G., LAYTON, D.M., MAIER-DOBERSBERGER, T., FERENCI, P., PENNER, E., SANDHOFER, F., BOMFORD, A., and PAULWEBER, B. (1997). Predominance of the HLA-H C282Y mutation in Austrian patients with genetic hemochromatosis. *J. Hepatology* **27**, 773–779.
- DOUABIN, V., MOIRAND, R., JOUANOLLE, A.M., BRISSOT, P., LE GALL, J.Y., DEUGNIER, Y., and DAVID, V. (1999). Polymorphisms in the HFE gene. *Hum. Hered.* **49**, 21–26.
- FEDER, J.N., GNIRKE, A., THOMAS, W., TSUCHIHASHI, Z., RUDDY, D.A., BASAVA, A., DORMISHIAN, F., DOMINGO, R., ELLIS, M.C., FULLAN, A., HINTON, L.M., JONES, N.L., KIMMEL, B.E., KRONMAL, G.S., LAUER, P., LEE, V.K., LOEB, D.B., MAPA, F.A., MCCLELLAND, E., MEYER, N.C., MINTIER, G.A., MOELLER, N., MOORE, T., MORIKANG, E., PRASS, C.E., QUINTANA, L., STARNES, S.M., SCHATZMAN, R.C., BRUNKE, K.J., DRAYNA, D.T., RISCH, N.J., BACON, B.R., and WOLFF, R.K. (1996). A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary hemochromatosis. *Nature Genet.* **13**, 399–408.
- GOTTSCHALK, R., SEIDL, C., LOFFLER, T., SEIFRIED, E., HOELZER, D., and KALTWASSER, J.P. (1998). HFE codon 63/282 (H63D/C282Y) dimorphism in German patients with genetic hemochromatosis. *Tissue Antigens* **51**, 270–275.
- JAZWINSKA, E.C., CULLEN, L.M., BUSFIELD, F., PYPER, W.R., WEBB, S.I., POWELL, L.W., MORRIS, C.P., and WALSH, T.P. (1996). Hemochromatosis and HLA-H. *Nature Genet.* **14**, 249–251.
- JOUANELLE, A.M., GANDON, G., JEZEQUEL, P., BLAYAU, M., CAMPION, M.L., YAOUANQ, J., MOSSER, J., FERGELOT, P., CHAUVEL, B., BOURIC, P., CARN, G., ANDRIEUX, N., GICQUEL, I., LE-GALL, J.Y., and DAVID, V. (1996). Haemochromatosis and HLA-H. *Nature Genet.* **14**, 251–252.
- JOUANELLE, A.M., FERGELOT, P., GANDON, G., YAOUANQ, J., LE GALL, J.Y., and DAVID, V. (1997). A candidate gene for hemochromatosis: frequency of the C282Y and H63D mutations. *Hum. Genet.* **100**, 544–7.
- LIECHTI-GALLATI, S., VARGA, D., and REICHEN, J. (1999). Screening for haemochromatosis in Switzerland: Detection of a new pathogenic mutation and two additional variants in exon 2 of the HFE gene. *Eur. J. Hum. Genet. Suppl.* **1**, P-422, 122.
- MERRYWEATHER-CLARKE, A.T., POINTON, J.J., SHEARMAN, J.D., and ROBSON, K.J.H. (1997). Global prevalence of putative Hemochromatosis mutations. *J. Med. Genet.* **34**, 275–278.
- SÁNCHEZ, M., BRUGUERA, M., BROSCH, J., RODES, J., BALLESTA, F., and OLIVA, R. (1998). Prevalence of the C282Y and H63D HFE gene mutations in Spanish patients with hereditary hemochromatosis and in controls. *J. Hepatol.* **29**, 725–728.
- SCHEUER, P.J., WILLIAMS, R., and MUIR, A.R. (1992). Hepatic pathology in relatives of patients with hemochromatosis. *J. Pathol. Bacteriol.* **84**, 53–64.
- STOTT, M.K., FELLOWES, A.P., UPTON, J.D., BURTAND, M.J., and GEORGE, M.P. (1999). Simple multiplex PCR for the simultaneous detection of the C282Y and H63D hemochromatosis (HFE) gene mutations. *Clin. Chem.* **45**, 426–428.
- THE UK HAEMOCHROMATOSIS CONSORTIUM. (1997). A simple genetic test identifies 90% of UK patients with hemochromatosis. *Gut* **41**, 841–844.
- VILLIERS, J.N.P. de, HILLERMANN, R., LOUBSER, L., and KOTZE, M.J. (1999). Spectrum of mutations in the HFE gene implicated in haemochromatosis and porphyria. *Hum. Mol. Genet.* **8**, 1517–1522.
- WALLACE, D.F., DOOLEY, J.S., and WALKER, A.P. (1999). A novel mutation of the HFE explains the classical phenotype of genetic hemochromatosis in a C282Y heterozygote. *Gastroenterology* **116**, 1409–1412.

Address reprint requests to:
Dr. Rafael Oliva
Genetics Service
Hospital Clínic
Villarroel 170
08036 Barcelona, Spain

E-mail: oliva@medicina.ub.es

Received for publication February 8, 2000; accepted March 2, 2000.

ARTÍCULO 3

Cloning, sequencing and characterization of the rat HFE promoter. Comparison of the human, mouse and rat hemochromatosis HFE promoter regions.

Gene 1998; 225: 77-87

Resumen en castellano

Clonación, secuenciación y caracterización del promotor del gen HFE de rata. Comparación de las regiones promotoras del gen HFE en humano, ratón y rata.

En este trabajo se han clonado y secuenciado 1398 pb de la región promotora del gen HFE de rata. El análisis comparativo de las secuencias promotoras del gen HFE en las especies humana, ratón y rata han revelado unas secuencias conservadas y presentes en regiones ortólogas o heterólogas en las tres especies. El análisis subsiguiente de las regiones identificadas como conservadas ha revelado la presencia de 10 elementos de transcripción presentes en la región promotora del gen HFE en humano, ratón y rata (GATA, NF-IL6, AP1, AP2, CREB, PEA3, γ -IRE, GFI1, HNF-3 β y HFH2). Experimentos de retardo en gel (*band-shift*) realizados con extractos nucleares de hígado de rata han confirmado la presencia de proteínas nucleares que se unen a algunos de los elementos de transcripción predichos. Este trabajo representa los primeros datos en relación con la identificación de elementos de transcripción potenciales presentes en el promotor del gen HFE de humano, ratón y rata. La expresión de los factores de transcripción que se unen a los elementos reguladores predichos es consistente con la función y expresión del gen HFE. El conocimiento de los elementos reguladores identificados en la secuencia promotora del gen HFE en humano, ratón y rata es una base para que posteriores estudios *in vivo* o *in vitro* conduzcan a la identificación de los mecanismos implicados en la regulación del metabolismo del hierro y para el diseño de posibles futuras terapias alternativas.



ELSEVIER

Gene 225 (1998) 77–87

GENE

AN INTERNATIONAL JOURNAL ON
GENES AND GENOMES

Cloning, sequencing and characterization of the rat hereditary hemochromatosis promoter: comparison of the human, mouse and rat *HFE* promoter regions

Mayka Sánchez^{a,b}, Rosa Queralt^a, Miquel Bruguera^c, Joan Rodés^c, Rafael Oliva^{a,b,*}

^a Human Genome Laboratory, Faculty of Medicine, University of Barcelona,

Institut de Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Casanova 143, 08036 Barcelona, Spain

^b Genetics Service, Hospital Clínic, Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain

^c Liver Unit, Institut Clínic de Malalties Digestives, IDIBAPS, Hospital Clínic and University of Barcelona, Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain

Received 7 July 1998; accepted 9 October 1998; Received by M. Salas

Abstract

We have cloned and sequenced 1398 bp of the rat *HFE* gene promoter region. The alignment of the rat promoter *HFE* sequence with the *HFE* promoter sequence from human and mouse detected several highly conserved sequences present at orthologous or heterologous positions in the three species. Subsequent analysis of the conserved promoter sequences identified the presence of 10 novel transcription elements present in the promoter regions of the human, mouse and rat *HFE* genes (GATA, NF-IL6, AP1, AP2, CREB, PEA3, γ -IRE, GFI1, HNF-3 β , HFH2). Different gel retardation analyses performed with rat-liver nuclear extracts have confirmed the presence of factors binding to some of these transcription elements. This represents the first data concerning the identification of potential transcriptional elements of the *HFE* promoter in these three species. The expression pattern of the transcription factors corresponding to the novel elements identified in the *HFE* promoter is consistent with the potential role of the *HFE* promoter in the transcription regulation and function of the *HFE* gene. Knowledge of the identified conserved elements in the *HFE* promoter from human, mouse and rat provides the basis for subsequent in-vitro or in-vivo studies leading to identification of the detailed mechanisms involved in the regulation of the iron metabolism and the design of potential future alternative therapies. © 1998 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Promoter; Rat; HFE regulation; HLA-H; Iron

1. Introduction

Hereditary hemochromatosis (HH) is an autosomal recessive disease involving an abnormally high intestinal iron absorption that leads to iron deposition in cells and subsequent dysfunction in several organs (Bothwell et al., 1995). This disease has been reported as the most

frequent recessive disorder, with an estimated carrier frequency in Europe of 1 in 10. In 1996, a single mutation (Cys282Tyr) in a MHC class I-like gene (*HFE* gene) was identified as the main cause for this disease (Feder et al., 1996). Subsequent reports confirmed the high frequency of this mutation in other populations (Beutler et al., 1996; Carella et al., 1997; Datz et al., 1997; Jouanelle et al., 1997; Worwood et al., 1997).

Mutant Cys282Tyr protein does not reach the cell membrane and therefore cannot regulate iron absorption. A second missense mutation (His63Asp) found in the *HFE* gene has shed further light on the functional role of the HFE protein, because it has been described that the mutated protein lacks the ability to reduce the affinity of the transferrin receptor for transferrin (Feder et al., 1998). Despite the finding of these two mutations, they do not account for 100% of the HH cases. It has

* Corresponding author. Tel: +34 3 227 55 10; Fax: +34 3 227 54 54; e-mail: oliva@medicina.ub.es

Abbreviations: AP1, activator protein 1; AP2, activator protein 2; CDS, coding sequences; CREB, c-AMP response element binding protein; γ -IRE, gamma interferon response element; GATA, 'GATA' binding protein; GFI1, growth factor independent 1; HFE, hemochromatosis gene; HFH2, hepatocyte factor homologue 2; HH, hereditary hemochromatosis; HNF-3 β , hepatocyte nuclear factor 3 beta; NF-IL6, nuclear factor IL6; PCR, polymerase chain reaction; PEA3, polyomavirus enhancer; TFD, Transcription factor Database.

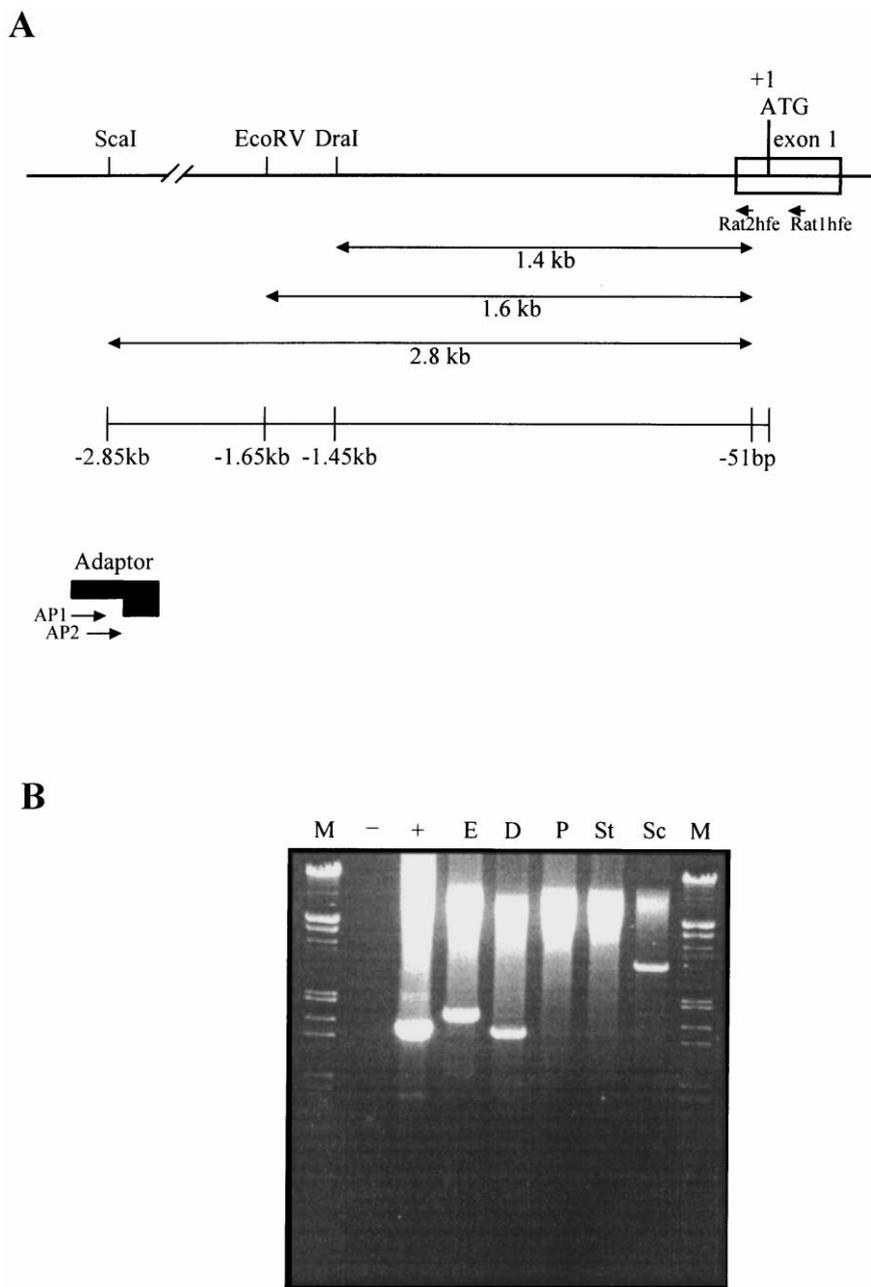


Fig. 1. Isolation of the rat *HFE* promoter through a genome walking strategy. (A) Schematic drawing of the promoter region of the *HFE* gene showing the key restriction enzymes used, the fragments amplified and the location of the adaptors and primers used. AP1 and AP2 correspond to the adaptor primers. The Rat1HFE and Rat2HFE arrows correspond to the specific primers designed from rat coding sequence (GenBank Accession No. AF008587). (B) Products of the second nested Touchdown-PCR. M, DNA size marker (λ -HindIII/EcoRI); ‘-’, negative control; ‘+’, positive control (genomic human *PvuII* library amplified with specific primers from tissue-type plasminogen activator locus); E = *EcoRV*, D = *DraI*, P = *PvuII*, St = *StuI*, Sc = *ScaI*. E, 1.6 kb; D, 1.4 kb; Sc, 2.8 kb. Nucleotide positions are indicated with reference to the ATG start codon.

been suggested that HH patients without the Cys282Tyr or His63Asp mutations could have a mutation in the regulatory region of the gene that could interfere with its regulation (Carella et al., 1997). However, no specific reports have been published so far towards the characterization of the regulatory elements present in the promoter region of the *HFE* gene. It is known that the comparison of promoter sequences corresponding to

different species is a useful approach that leads to the identification of conserved regulatory elements (Queralt and Oliva, 1993; Bey et al., 1998).

In this work, we have isolated and sequenced the promoter region of the rat *HFE* gene and identified several conserved potential regulatory sequences common to the rat, human and mice *HFE* promoter region, providing the first data concerning the identifi-

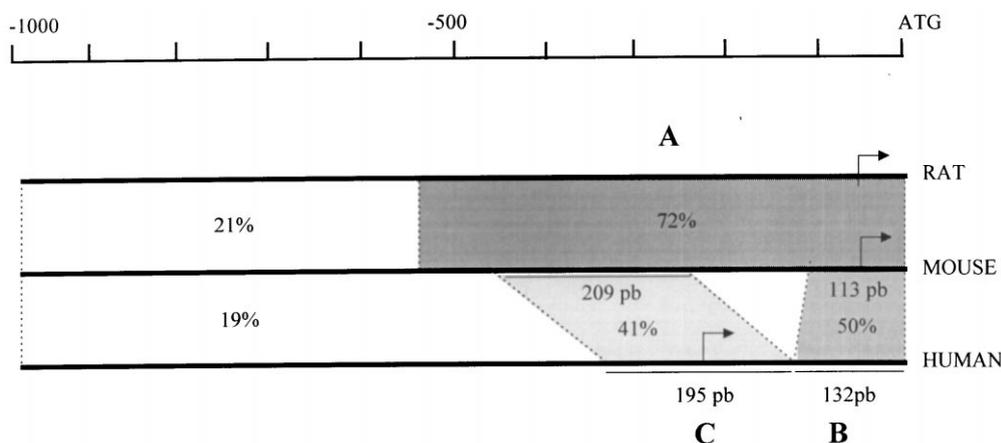


Fig. 2. Schematic representation of the homologies present among the rat, mouse and human *HFE* promoter sequences. Shaded boxes indicate the presence of conserved regions among the three species (the percentage similarity is indicated also). The arrows indicate the transcription initiation start sites according to the mRNA sequences available in GenBank. A, B and C correspond to the most well conserved segments found in the promoter region.

cation of the potential transcription elements present in the *HFE* gene in these species.

2. Materials and methods

2.1. Isolation and cloning of the rat *HFE* promoter region

The rat *HFE* promoter region (nearly 1.4 kb) was amplified using the Clontech (Palo Alto, CA) Universal GenomeWalker™ strategy (formerly known as the PromoterFinder™ Construction technique). Oligonucleotides specific for the rat sequence (Rat1HFE: 5'-AGCAGCAACAACAGCAGCAG-3' located in position +40 to +59 and Rat2HFE: 5'-TCCAAG-AAGTCACCCTGTAG-3' located in position -70 to -51) were designed using the OLIGO 4.0 program based on the rat coding region sequence (GenBank Accession No. AF008587). Aliquots of rat genomic DNA were digested independently using five different blunt-end restriction enzymes (*EcoRV*, *DraI*, *PvuII*, *StuI*, *ScaI*; Fig. 1). These five sets of digested products (called libraries) were ligated to the blunt-end adaptors provided in the kit. Subsequently, a Touchdown PCR (Don et al., 1991) was carried out using 1 µl of each library and primers AP1: 5'-GTAATACGACTCAC-TATAGGGC-3' and Rat1HFE. A second nested touchdown PCR was carried out with 1 µl of the first touchdown PCR using primers AP2: 5'-ACTATAG-GGCACGCGTGGT-3' and Rat2HFE. The Touchdown PCR conditions were: 300 nM each primer, 100 mM KCl, 20 mM Tris (pH 7.5), 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 0.5% (v/v) Tween 20, 0.5% Nonidet P40, 1.75 mM MgCl₂, 350 µM dNTPs, 2.6 u of Expand™ long template DNA polymerase mix (Boehringer 3.5 u/µl). The cycling conditions were: 94°C for 2 min, 10 cycles (five cycles in the nested PCR) at 94°C for 5 s, 65°C for 30 s (67°C in

the nested PCR), 68°C for 15 min; 25 cycles (15 cycles in the nested PCR) at 94°C for 5 s, 59°C for 30 s (63°C in the nested PCR), 68°C for 15 min plus additional 20 s per cycle and 68°C for 5 min.

The nested PCR products were run in a 1% agarose gel and visualized through ethidium bromide staining (Fig. 1), and the bands were isolated, purified and cloned into pBluescriptKS⁺ vector as described previously (Queralt and Oliva, 1991) for further sequencing using primers T7 and T3.

Nucleotide positions are indicated with reference to the ATG start codon.

2.2. DNA sequencing

Several independent clones were sequenced, covering both strands. Sequencing was performed using a LI-COR 4000L sequencer and the Thermosequense sequencing kit (Amersham, Cleveland, OH) with IRD-700 labelled primers (MWG Biotech). The sequencing reactions were performed according to the manufacturer's protocols (LI-COR). A total of 1398 bp from the rat *HFE* promoter region were obtained.

2.3. Computer-assisted analysis of the sequences

A comparison of the *HFE* promoter region of different species in the search for conserved regions was done using the MegAlign program (DNASTAR). A comparison to GenBank database was made using the BLAST search algorithm. The rat *HFE* promoter sequence as well as the mouse and human sequences were compared to the database TFD, using the SignalScan software (Prestidge, 1991), and TRANSFACT 3.1 using MatInspector software (Quandt et al., 1995). Repeats were found using the program REPEATS from PCGENE (IntelliGenetics).

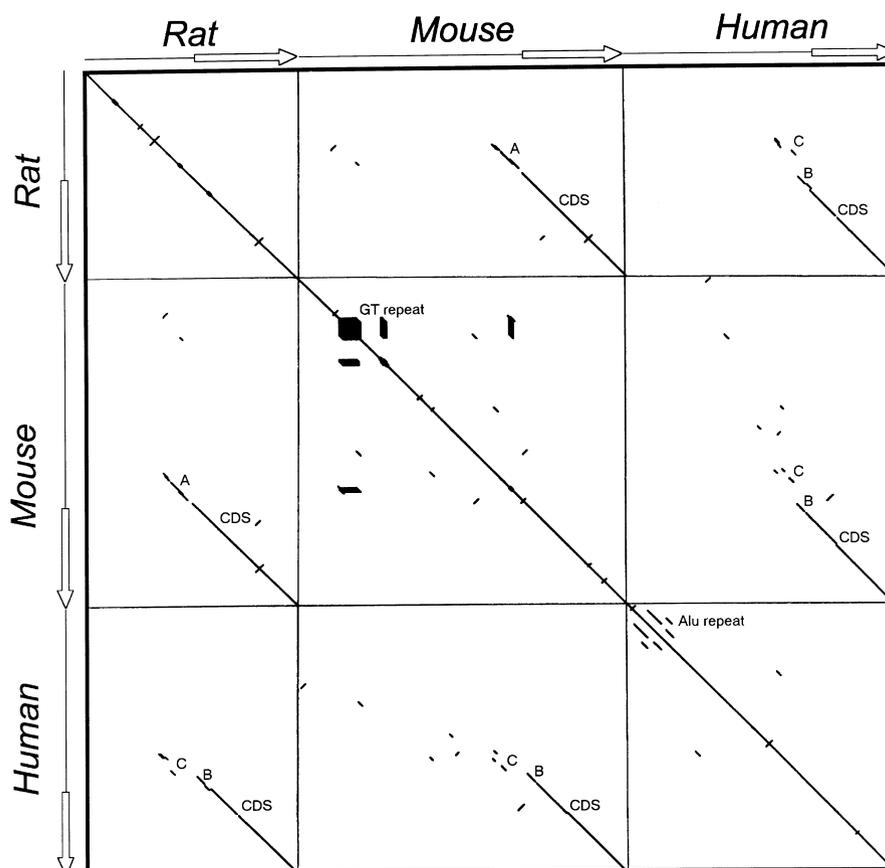


Fig. 4. Dot-plot analysis of the rat, mouse and human *HFE* promoter and coding region. Conserved and repeated sequences are evident from the detected diagonal lines. A, B and C indicate the presence of conserved fragments in the promoter region, which corresponds to the A, B and C alignments shown in Figs. 2 and 3. CDS and empty arrows indicate the coding sequence (introns have been excluded).

2.4. Gel retardation analysis

Four sets of complementary oligonucleotides corresponding to some predicted elements were designed in the rat promoter region. BS1.1: 5'-GGTCTCAAGTTGTGATAAGTTTTACAATCAACAATAT-3', BS1.2: 5'-GATATTGTTGATTGTGAAACTTATCACAAC-TTGAGA-3', BS2.1: 5'-GGATTTCAAGTTCTGGAT-ACTCTCTTGTCTTTTTAAT-3', BS2.2: 5'-GATT-AAAAAGAACAAGAGAGATCCAGAACTTGAA-AT-3', BS3.1: 5'-GGGTCACCTGGGTCAGTACTGTGACATAAG-3', BS3.2: 5'-GCTTATGTCACAGTCAGTGACCCAGGTGAC-3', BS4.1: 5'-GGCTACAGGGTGACTTCTTGGATCCTCCA-3', BS4.2: 5'-GTGGAGGATCCAAGAAGTCACCCTGTAG-3'.

The oligos were annealed and end-labelled by filling with [α - 32 P] dCTP. Ten micrograms of rat-liver nuclear

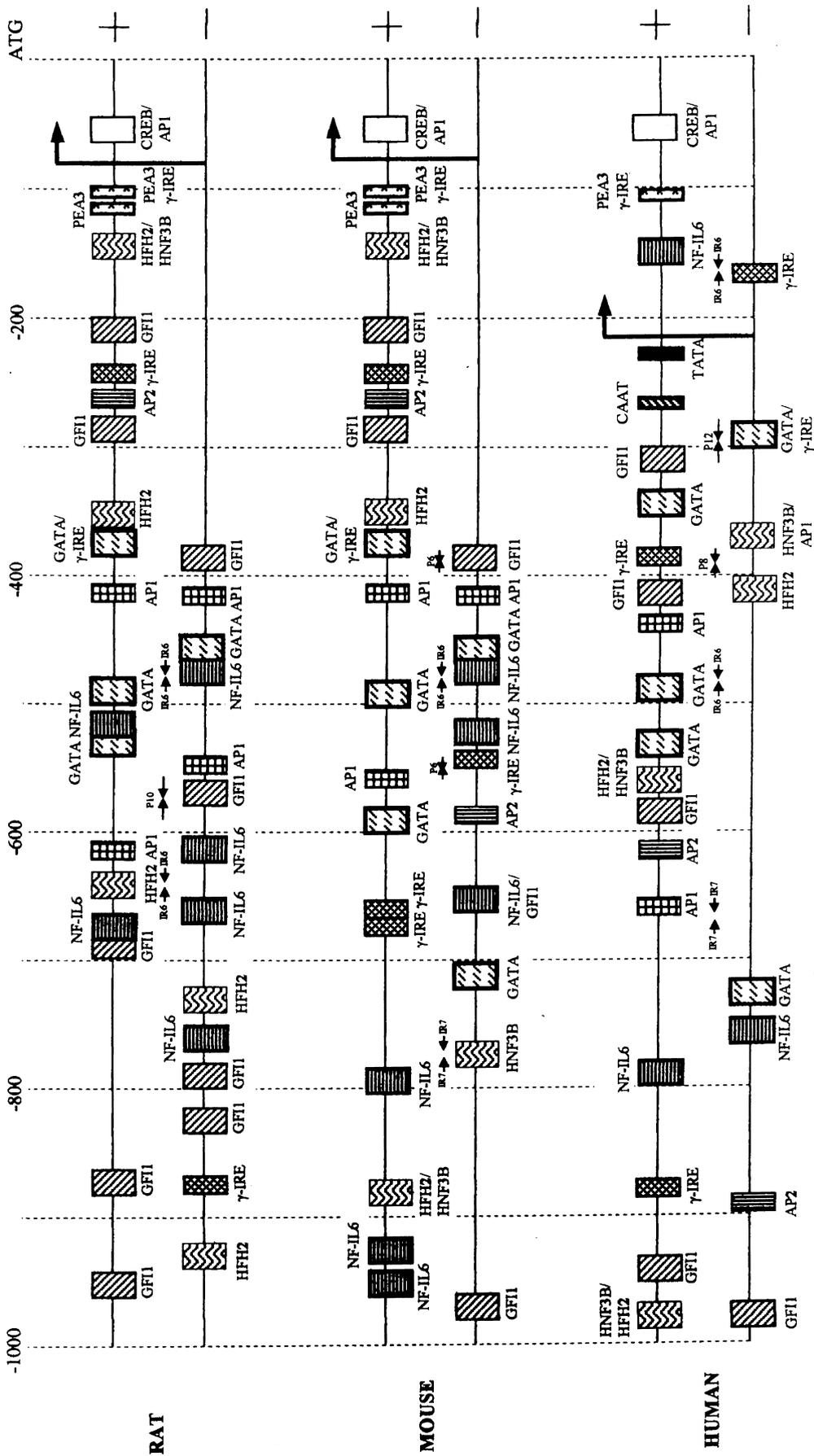
extracts were preincubated on ice for 10 min in 15 μ l with 0.2 μ g of poly (dA–dT), 0.8 μ g of poly (dI–dC) in 25 mM HEPES pH 7.6, 100 mM KCl, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA and 8% glycerol. The binding (20 Kcpm) was performed on ice for 30 min and electrophoresed on 4% polyacrylamide (pre-run) gels in 0.5 \times TBE buffer for 1 h at 250 V and 25°C, dried and exposed at -80°C . The nuclear extracts were performed following the method previously described (Queralt and Oliva, 1995).

3. Results and discussion

3.1. Cloning and sequencing of the *HFE* rat promoter

A genome walking strategy has been followed in order to clone the *HFE* rat promoter using the rat exon 1

Fig. 3. Alignments of the rat, mouse and human *HFE* promoter sequences. The A, B and C alignments correspond to the conserved A, B and C segments indicated in Fig. 2. The position of novel conserved transcription elements in each of the alignments is indicated. A continuous line indicates that the putative transcription element is present in the sense strand, and a discontinuous line indicates that the putative transcription element is present in the complementary strand. In segment C, the bold nucleotides indicate the human TATA and CAAT box. The transcription start site according to the mRNA sequences published in GenBank is indicated with a solid arrow. Inverted repeats within putative regulatory elements are also indicated. The asterisks indicate conserved nucleotides in all the species. The nucleotide positions are indicated, taking as a reference the ATG start codon (+1). The GenBank Accession Nos corresponding to the sequences shown are AJ005007 (rat), AF007558 (human), and HSU91328 (mouse). Nucleotide positions are indicated in reference to the ATG start codon.



specific primers (rat1HFE and rat2HFE) designed from the mRNA sequence (GenBank Accession No. AJ001517) and the adaptor primers (AP1 and AP2) provided by the Clontech kit (Siebert et al., 1995). Starting from five different libraries of adaptor-ligated rat genomic DNA fragments, we have obtained three PCR products in the second nested touchdown PCR of 1.4, 1.6 and 2.8 kb, corresponding to three of the five libraries (*EcoRV*, *DraI* and *ScaI* digested libraries) (Fig. 1). The 1398-bp *DraI*-AP2-rat2HFE fragment was subsequently isolated, cloned and sequenced (GenBank Accession No. AJ005007). The 3' end of the sequence obtained was identical over a 30-bp overlap to the known rat *HFE* cDNA sequence. In addition, the entire sequence has a high homology with the mouse promoter sequence (E value in the BLAST search $2e-29$), confirming that we have sequenced 1368 bp (1398 bp – 30 bp = 1368 bp) of the rat *HFE* promoter region.

3.2. Comparison of the rat, mouse and human promoters

The rat promoter sequence was compared with the mouse and human promoter sequences obtained from the GenBank database (Accession Nos AF007558 and Z92910). Comparison of the rat promoter region with the promoter region of the mouse revealed a substantial degree of homology (72%) within the first 550 bp upstream the ATG codon (Fig. 2). One of the most obvious differences among the three species is the size of the 5' UTR region (Fig. 2). In human, it extends 220 bp upstream from the translational start and is much longer than the 5' UTR region present in rat (72 bp) or mouse (80 bp) *HFE* promoters (Fig. 2). Several conserved potential regulatory elements have been identified, common to both rodent sequences (Fig. 3A). However, rodent *HFE* promoter sequences share a much lower degree of homology with the human sequence (50–41% identity in the 327 bp upstream ATG; Fig. 2). In addition, there is evidence for the presence of a rodent segment deleted in the orthologous position in the human sequence (Fig. 2).

Detailed alignments of the human, mouse and rat sequences have allowed the detection of conserved regions shared by the promoter regions of the three species (Fig. 3). Comparison of the human, mouse and rat sequences to regulatory element and transcription factor databases led to the identification of several novel potential regulatory elements present in the promoter region of the *HFE* gene (Fig. 3). Of relevance, these novel elements correspond to the conserved regions detected among the different species (Fig. 3).

A dot-plot analysis of the rat, mouse and human promoter region provides an overall measure of the similarities present among the different species (Fig. 4), but, in addition, it also detects several repeats in the region comprised between nucleotides –2103 and –1624 in the human sequence, with a high homology to Alu repeats, a GT repeat in the mouse sequence in the region comprised between –2387 and –2141, as well as other small repeated regions (Fig. 4).

3.3. Identification of putative regulatory elements

Despite the fact that there is little similarity at the orthologous positions among human and rodent promoter sequences (Fig. 4), 10 different highly conserved potential regulatory elements have been detected to be present at non-orthologous positions in the three species (GATA, 'GATA' binding protein; NF-IL6, nuclear factor IL6; AP1, activator protein 1; AP2, activator protein 2; CREB, c-AMP response element binding protein; PEA3, polyomavirus enhancer; γ -IRE, gamma interferon response element; GFII, growth factor independent 1; HNF-3 β , hepatocyte nuclear factor 3 beta; HFH2, hepatocyte factor homologue 2). A summary of these novel putative regulatory elements common to these three species is schematically represented in Fig. 5.

3.3.1. Transcription initiator element

No TATA consensus sequences have been found in the core promoter region of rat and mouse sequence, but we found two PEA3/EBS conserved motifs (5'-MGGAAR-3') near the putative transcription start site, positions –130 to –125 and –109 to –104 (Figs. 3 and 5). It has been found that two PEA3/EBS binding motifs have been located near the transcription start site of many TATA-less promoters act as minimal transcription initiator elements (Yu et al., 1997), so it is likely that this sequence may also play a similar role in the transcription initiation of the rat and mouse *HFE* gene. In the human promoter, only one of these PEA3/EBS sites is conserved, which could have resulted in the use of an alternative site further upstream in the promoter (Fig. 5). A potential TATA consensus sequence (TTTAAA) is present in the core promoter region of the human sequence. Although this sequence is too close (7 bp) to the non-experimental transcription initiation site deduced from the mRNA sequence (GenBank Accession No. U60319), its position aligns well with the human MHC class I genes TATA box (not shown).

Fig. 5. Schematic representation of the putative transcription elements identified in the –1000-bp *HFE* promoter region of the rat, mouse and human *HFE* genes. The transcription initiation according to the mRNA sequences described in GenBank is indicated with a solid arrow. '+', sense strand; '-', complementary strand. The small arrows indicate the presence of inverted repeats (IR) or palindromes (P) present within putative regulatory elements. Nucleotide positions are indicated with reference to the ATG start codon.

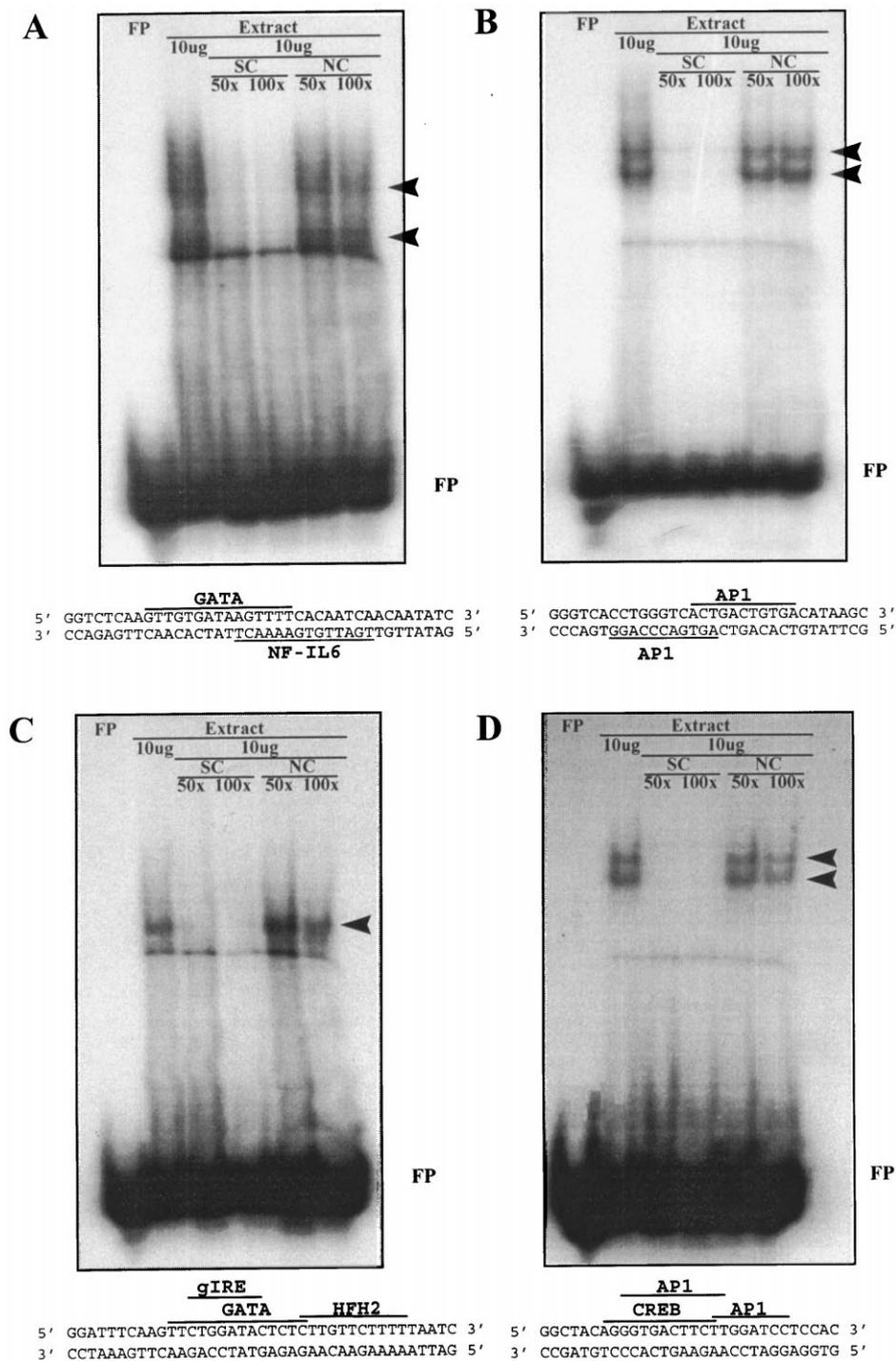


Fig. 6. Gel retardation analysis of four different regions of the rat HFE promoter. Lane labelled 'FP': free probe. Lanes labelled '10 μ g': probe incubated with 10 μ g of liver nuclear extracts. Lanes labelled 'SC' 50 \times or 100 \times : probes incubated with 10 μ g of liver nuclear extracts and 50 \times or 100 \times concentration of specific competitor (the same probe non-radiolabelled). Lanes labelled 'NC' 50 \times or 100 \times : probes incubated with 10 μ g of liver nuclear extracts and 50 \times or 100 \times concentration of non-specific competitor (a different non-radiolabelled probe). The sequence of the corresponding probes used and the putative regulatory sequences are indicated at the bottom of each figure.

3.3.2. GATA

One of the highly conserved sequences present several times in each of the *HFE* promoters corresponds to the GATA element (Figs. 3 and 5). GATA family transcription factors have a high binding affinity to a sequence

consensus motif (5'-WGATAR-3') that has been found in α and β globins locus control regions and in promoters of genes expressed in erythroid, megakaryocytic, mast and endothelial cells (Merika and Orkin, 1993). GATA-1 was initially identified as an erythrocyte-specific

DNA-binding factor present in the promoter enhancer region of the human and chicken globin genes and is essential for normal erythroid development. GATA-1 is expressed in cells of the erythroid lineage, in megakaryocytic and bone-marrow-derived cells, and in hematopoietic progenitor cells. It is very likely that the *HFE* gene could be regulated by the detected GATA transcription elements (Figs. 3 and 5) because of the high iron requirement at the time of hemoglobin synthesis in erythroid cells. It has also been reported that GATA-4 and GATA-5 are highly expressed in the epithelial cells of the gut (Laverriere et al., 1994) and this is one of the tissues where the *HFE* is expressed at high levels.

3.3.3. *NF-IL6*

Another conserved transcription element detected in the promoter region of the human, mouse and rat *HFE* gene is NF-IL6 (Figs. 3 and 5). NF-IL6 (consensus sequence: 5'-TKNNGNAAK-3') is a nuclear factor member of the C/EBP family (CCAAT/enhancer binding protein) and was initially described as a transcription factor regulating IL-6 gene expression, but it is also involved in the regulation of several other genes needed for acute-phase reaction, inflammation and hemopoiesis (Akira et al., 1990). The NF-IL6 gene is induced with lipopolysaccharide (LPS) and several cytokines, and is widely expressed in many tissues, but particularly at high levels in liver, the major organ affected in hemochromatosis.

3.3.4. *HNF-3 β* and *HFH-2*

HNF-3 β and HFH-2 elements (consensus sequences: 5'-NNNTRTTKRYTY-3' and 5'-NAWTGTTTRTTT-3') have also been detected in the rat, mouse and human *HFE* promoter sequences (Figs. 3 and 5). HNF-3 β and HFH-2 transcription factors are members of the hepatocyte nuclear factor 3 (HNF-3)/forkhead (fkh) family (Overdier et al., 1994). These transcription factors are involved in the transcription of numerous hepatocyte-enriched genes (Overdier et al., 1994). Of relevance, a HNF-3 β consensus has been found by computer-assisted research in the human transferrin gene (Overdier et al., 1994), another gene involved in iron metabolism. HNF-3 β is expressed in liver, intestine, lung, stomach and ovary and is an essential mediator in the transcription of liver-specific and lung-specific genes (Overdier et al., 1994). HFH-2 is expressed in brain, heart, intestine, kidney, liver, lung and spleen (Clevidence et al., 1993). One of the tissues where the *HFE* gene is expressed at high levels is the liver, so these liver-specific transcription factors (HNF-3 β and HFH-2) are probably also involved in the regulation of the *HFE* gene expression in the liver.

3.3.5. γ -*IRE*

Another important element identified in the *HFE* promoters corresponds to the γ -IRE (γ interferon response element; Figs. 3 and 5). Interferons are cytokines that mediate antiviral and immune responses and stimulate cell growth and differentiation through transcription activation of interferon-responsive genes (DeMaeyer and DeMaeyer-Guignard, 1988). The γ -IRE element (consensus sequence: CWKKANNY) has been identified in the regulatory sequence of the MHC class II gene (Yang et al., 1990). In addition, the MHC class I genes are also induced by γ -interferon (David-Watine et al., 1990), as well as the non-classical MHC class I HLA-E gene (Gustafson and Ginder, 1996). Therefore, the detection of several γ -IRE elements in the *HFE* promoter suggests that the *HFE*, a MHC class I-like gene, could also be another of this family of interferon-responsive genes.

3.3.6. *Other potential regulatory elements identified in the HFE promoters*

Other novel regulatory elements identified in the promoter region of the rat, mouse and human *HFE* genes are AP1, AP2 and CREB (Figs. 3 and 5). AP1 and CREB are ubiquitous elements and could be involved as basal transcription factors (Boyle et al., 1991; Paca-Uccaralartkun et al., 1994). AP2 has been found to bind and stimulate RNA synthesis of the human metallothionein IIA gene (Mitchell et al., 1987), a gene also involved in metal metabolism, as the *HFE* gene. Thus, the expression pattern of the transcription factors corresponding to the elements identified in the *HFE* gene promoters is also consistent with the expression and function of the *HFE* gene.

3.4. *Detection of specific binding through gel retardation assays*

In order to confirm the presence of factors binding to the predicted conserved elements, we have performed different pilot gel retardation assays. Four sets of oligonucleotides containing six of the 10 identified conserved elements were labelled and assayed with rat-liver extracts leading to the detection of gel retardation bands with 10 μ g of nuclear extract (Fig. 6A–D). The binding is specific in all cases tested as the gel shifted bands disappear upon addition of specific competitor, but not upon addition of a non-specific competitor (Fig. 6A–D).

4. Conclusion

In this work, we have isolated and sequenced 1398 bp of the rat *HFE* promoter region (GenBank Accession

No. AJ005007). Subsequently, we have identified several conserved potential regulatory elements present in the rat, human and mouse *HFE* promoter sequences. Further analysis using gel retardation assays demonstrates the presence of functional specific binding to four different promoter regions containing some of the identified elements (GATA, NF-IL6, AP1, γ -IRE, HFH2, CREB). Comparison of the rat sequence with the mouse promoter sequence revealed a high degree of homology within the first 550 bp upstream the ATG codon. To our knowledge, this is the first report describing the systematic analysis and the identification of several novel conserved potential regulatory elements in the *HFE* promoter region of the human, mouse and rat genes. Knowledge of the elements involved the transcription regulation is important in the understanding of the *HFE* gene function and in the design of alternative treatment therapies, perhaps involving the transfer and correct controlled expression of the normal *HFE* gene in homozygous affected Cys282Tyr cells. The possibility is now open to further test through in-vitro or in-vivo studies the specific mechanisms through which the reported conserved consensus elements are involved in the regulation of the expression of the *HFE* gene.

Acknowledgement

This work was supported by a Grant from the Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS98-0145) to Dr Oliva

References

- Akira, S., Isshiki, H., Sugita, T., Tanabe, O., Kinoshita, S., Nishio, Y., Nakajima, T., Hirano, T., Kishimoto, T., 1990. A nuclear factor for IL-6 expression (NF-IL6) is a member of a C/EBP family. *EMBO J.* 9, 1897–1906.
- Beutler, E., Gelbart, T., West, C., Lee, P., Adams, M., Blackstone, R., Pockros, P., Kosty, M., Venditti, C.P., Phatak, P.D., Seese, N.K., Chorney, K.A., Ten-Elshif, A.E., Gerhard, G.S., Chorney, M., 1996. Mutation analysis in hereditary hemochromatosis. *Blood Cells Mol. Dis.* 22, 187–194.
- Bey, L., Etienne, J., Tse, C., Brault, D., Noé, L., Raisonier, A., Arnault, F., Hamilton, M.T., Galibert, F., 1998. Cloning, sequencing and structural analysis of 976 base pairs of the promoter sequence for the rat lipoprotein lipase gene. Comparison with the mouse and human sequences. *Gene* 209, 31–38.
- Bothwell, T.H., Charlton, R.W., Motulsky, A.G., 1995. Hemochromatosis. In: Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D. (Eds.), *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. McGraw-Hill, New York, pp. 2237–2269.
- Boyle, W.J., Smeal, T., Defize, L.H.K., Angel, P., Woodgett, G.R., Karin, M., Hunter, T., 1991. Activation of protein kinase C decreases phosphorylation of c-Jun at sites that negatively regulate its DNA-binding activity. *Cell* 64, 573–584.
- Carella, M., D'Ambrosio, L., Totaro, A., Grifa, A., Valentino, M.A., Piperno, A., Girelli, D., Roetto, A., Franco, B., Gasparini, P., Camaschella, C., 1997. Mutation analysis of the HLA-H gene in Italian hemochromatosis patients. *Am. J. Hum. Genet.* 60, 828–832.
- Clevidence, D.E., Overdier, D.G., Tao, W., Qian, X., Pani, L., Lai, E., Costa, R.H., 1993. Identification of nine tissue-specific transcription factors of the hepatocyte nuclear factor 3/forkhead DNA-binding-domain family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 3948–3952.
- Datz, C., Laloz, M.R.A., Vogel, W., Graziadei, I., Hackl, F., Vautier, G., Layton, D.M., Maier-Dobersberger, T., Ferenci, P., Penner, E., Sandhofer, F., Bomford, A., Paulweber, B., 1997. Predominance of the HLA-H Cys282Tyr mutation in Austrian patients with genetic hemochromatosis. *J. Hepatol.* 27, 773–779.
- David-Watine, B., Israël, A., Kourilsky, P., 1990. The regulation and expression of MHC class I genes. *Immun. Today* 11, 286–292.
- DeMaeyer, E., DeMaeyer-Guignard, J., 1988. In: DeMaeyer, E., DeMaeyer-Guignard, J. (Eds.), *Interferons and Other Regulatory Cytokines*. Wiley, New York.
- Don, R.H., Cox, P.T., Wainwright, B.J., Baker, K., Mattick, J.S., 1991. 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res.* 19, 4008.
- Feder, J.N. et al., 1996. A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary hemochromatosis. *Nature Genet.* 13, 399–408.
- Feder, J.N., Penny, D.M., Irrinki, A., Lee, V.K., Lebrón, J.A., Watson, N., Tsuchihashi, Z., Sigal, E., Bjorkman, P.J., Schatzman, R.C., 1998. The hemochromatosis gene product complexes with the transferrin receptor and lowers its affinity for ligand binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 1472–1477.
- Gustafson, K.S., Ginder, G.D., 1996. Interferon- γ induction of the human leukocyte antigen-E gene is mediated through binding of a complex containing STAT1 α to a distinct interferon- γ -responsive element. *J. Biol. Chem.* 271, 20035–20046.
- Jouanelle, A.M., Fergelot, P., Gandon, G., Yaouanq, J., Le Gall, J.Y., David, V., 1997. A candidate gene for hemochromatosis: frequency of the C282Y and H63D mutations. *Hum. Genet.* 100, 544–547.
- Laverriere, A.C., MacNeill, C., Mueller, C., Poelmann, R.E., Burch, J.B.E., Evans, T., 1994. GATA-4/5/6, a subfamily of three transcription factors transcribed in developing heart and gut. *J. Biol. Chem.* 269, 23177–23184.
- Merika, M., Orkin, S.H., 1993. DNA-binding specificity of GATA family transcription factors. *Mol. Cell. Biol.* 13, 3999–4010.
- Mitchell, P.J., Wang, C., Tjian, R., 1987. *Cell* 50, 847–861.
- Overdier, D.G., Porcella, A., Costa, R.H., 1994. The DNA-binding specificity of the hepatocyte nuclear factor 3/forkhead domain is influenced by amino acid residues adjacent to the recognition helix. *Mol. Cell. Biol.* 14, 2755–2756.
- Paca-Uccaralertkun, S., Zhao, L.J., Adya, N., Cross, J.V., Cullen, B.R., Boros, I.M., Giam, C.Z., 1994. In vitro selection of DNA elements highly responsive to the human T-cell lymphotropic virus type I transcriptional activator. *Tax. Mol. Cell. Biol.* 14, 456–462.
- Prestidge, D.S., 1991. SIGNAL SCAN: A computer program that scans DNA sequences for eukaryotic transcriptional elements. *CABIOS* 7, 203–206.
- Quandt, K., Frech, K., Karas, H., Wingender, E., Werner, T., 1995. MatInd and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. *Nucleic Acids Res.* 23, 4878–4884.
- Queralt, R., Oliva, R., 1991. Protamine 1 gene sequence from the primate *Saguinus imperator* isolated with PCR using consensus oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.* 19, 5786.
- Queralt, R., Oliva, R., 1993. Identification of conserved regulatory sequences of the protamine-encoding p1 genes from ten different mammals. *Gene* 133, 197–204.
- Queralt, R., Oliva, R., 1995. Demonstration of trans-acting factors binding to the promoter region of the testis-specific rat protamine p1 gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 208, 802–812.
- Siebert, P.D., Chenchik, A., Kellogg, D.E., Lukyanov, K.A., Lukyanov, S.A., 1995. An improved method for walking in uncloned genomic DNA. *Nucleic Acids Res.* 23, 1087–1088.
- Worwood, M., Shearman, J.D., Wallace, D.F., Dooley, J.S.,

- Merryweather-Clarke, A.T., Pointon, J.J., Rosenberg, W.M.C., 1997. A simple genetic test identifies 90% of UK patients with hemochromatosis. *Gut* 41, 841–844.
- Yang, Z., Sugawara, M., Ponath, P.D., Wessendorf, L., Banerji, J., Li, Y., Strominger, J.L., 1990. Interferon γ response region in the promoter of the human DPA gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 9226–9230.
- Yu, M., Yang, X.-Y., Schmidt, T., Chinenov, Y., Wang, R., Martin, M.E., 1997. GA-binding protein-dependent transcription initiator elements. *J. Biol. Chem.* 272, 29060–29067.

ARTÍCULO 4

Complete characterization of the 3' region of the human and Mouse Hereditary Hemochromatosis Gene and detection of novel splicing forms.

Blood Cells, Molecules and Diseases 2001; 27: 35-43.

Resumen en castellano

Caracterización de la región 3' UTR del gen de la Hemocromatosis Hereditaria en humano y ratón y detección de nuevas formas de *splicing*.

El gen HFE humano fue identificado en 1996 como el gen cuyas mutaciones son responsables de la mayoría de pacientes con Hemocromatosis Hereditaria. Los análisis de expresión por *Northern blot* del gen indican un tamaño del mRNA de aproximadamente 4,1 kb. Sin embargo el cDNA publicado actualmente presenta solamente 2716 pb. Estos resultados indican que todavía faltan por identificar por lo menos 1,4 kb del mRNA del gen HFE. En este trabajo al analizar la secuencia genómica del gen HFE se han detectado varias secuencias de ESTs en posición 3'. El subsiguiente análisis de estos clones de ESTs y experimentos de RT-PCR, 3' RACE y *Northern blot* han revelado que el exón 7 del gen HFE humano presenta, de hecho, una longitud de 1944 pb y dos señales de poliadenilación. La nueva región del exón 7 del gen HFE se ha secuenciado en pacientes con Hemocromatosis Hereditaria y sin la mutación C282Y en busca de nuevas mutaciones. Experimentos de 3' RACE en la región 3' UTR de gen HFE murino (exón 6) también han extendido la secuencia previamente descrita. Además en este trabajo también se describe la identificación de 2 nuevas formas de terminación del gen HFE humano en el exón 6 detectadas por experimentos de 3' RACE y la identificación de nuevas formas de *splicing* de la línea celular HepG2.

Hemocromatosis hereditaria: utilidad del diagnóstico genético molecular

La hemocromatosis hereditaria es una enfermedad debida a una absorción excesiva de hierro a nivel del intestino, lo que ocasiona un cúmulo de hierro y daño celular, siendo frecuente la aparición de cirrosis hepática y cáncer de hígado. Se trata de la enfermedad recesiva más frecuente de todas, ya que uno de cada 17 españoles somos portadores del gen mutante. El reciente descubrimiento del gen HFE, cuyas mutaciones son responsables de esta enfermedad, facilita el diagnóstico precoz y permite establecer tratamientos preventivos restableciendo una esperanza de vida normal.

R. Oliva Virgili*, M. Bruguera Cortada**,
M. Sánchez Fernández* y J. Rodés Teixidor**
* Servicios de Genética y ** Hepatología.
Hospital Clínico y Provincial. Barcelona.

La hemocromatosis hereditaria (HH) es una enfermedad debida a una absorción excesiva de hierro a nivel del intestino, lo que ocasiona un cúmulo de hierro y daño celular en diversos órganos (fig. 1). La clínica depende del órgano afectado, siendo frecuente la aparición de hepatomegalia, cirrosis hepática, coloración oscura de la piel, artropatías (figs. 2, 3 y 4), diabetes e hipogonadismo debidos a la alteración de las glándulas endocrinas y la aparición de arritmias e insuficiencia cardíaca (tablas 1 y 2). La hemocromatosis es la enfermedad hereditaria monogénica más frecuente. Nada menos que uno de cada 17 individuos de la población española es portador del gen mutante, y uno de cada 1.110 es homocigoto y por tanto potencialmente afecto. Las consecuencias de la hemocromatosis son graves si la enfermedad no se diagnostica y trata precozmente. El descubrimiento del gen cuyas mutaciones son responsables de la HH, denominado HFE, facilita el diagnóstico precoz en fase presintomática, permitiendo establecer tratamientos preventivos del daño hepático y de los demás órganos.

Descubrimiento del gen y de las mutaciones responsables

El término de hemocromatosis fue acuñado por von Recklinghausen en 1889 para describir una enfermedad por cúmulo masivo de hierro en el hígado, que cursaba con cirrosis hepática, diabetes mellitus y pigmentación oscura de la piel¹ (fig. 1). La naturaleza hereditaria de la hemocromatosis fue reconocida por primera vez en 1935 por Sheldon (Edwards y Kushner, 1993)¹. Subsiguientemente, en estudios realizados en Europa y Estados Unidos entre 1931 y 1985 se demostró que entre los casos de autopsias la hemocromatosis estaba presente en aproximadamente uno de cada 500 individuos²⁻⁶. Un paso importante adicional en la comprensión del defecto genético responsable de la hemocromatosis se dio en 1975 al reconocer que la mayoría de individuos afectados de hemocromatosis presentaban una asociación con marcadores del sistema HLA, permitiendo avanzar la hipótesis de que el gen responsable debería hallarse en el brazo corto del cromosoma 6 (fig. 5)⁷. Más tarde, el análisis de genealogías mediante análisis de ligamiento demostró que esta hipótesis era correcta⁸. Más recientemente numerosos es-

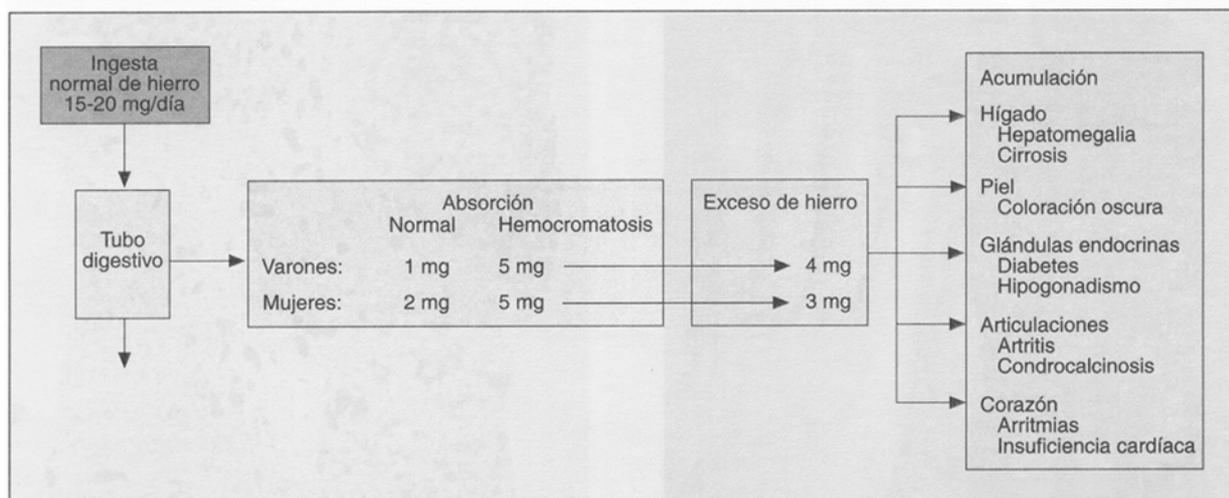


Fig. 1. Ingesta, absorción y acumulación de hierro en el organismo en la hemocromatosis. Las cifras se refieren a un adulto de 70 kg.

tudios de análisis de ligamiento y de construcción de mapas físicos han ido acotando la región genómica que contiene el gen responsable de la hemocromatosis (fig. 5A)⁹⁻¹². La identificación definitiva del gen, cuya mutación es responsable de la hemocromatosis, se ha producido recientemente (fig. 5)¹³. En este primer trabajo se demostró que la mutación Cys282Tyr en estado homocigoto estaba presente en la mayoría de enfermos con hemocromatosis de EE.UU. (n = 178). Artículos sucesivos al artículo de Feder et al¹³ han confirmado que el gen HFE es el gen responsable de la hemocromatosis y que la mutación Cys282Tyr es efectivamente la mutación pa-

togénica presente en la gran mayoría de casos en diversas poblaciones, incluyendo la española^{14, 15}. Una segunda mutación en el gen HFE, la mutación His63Asp en estado heterocigoto combinado con la mutación Cys282Tyr (genotipo Cys282Tyr/His63Asp) también se ha encontrado con mayor frecuencia en los enfermos de hemocromatosis. Pero las mutaciones Cys282Tyr y His63Asp no explican la totalidad de los casos de hemocromatosis familiar, ya que en una pequeña proporción de los enfermos ($\cong 10\%$) éstas no están presentes¹³. Esto indica que falta por identificar otras mutaciones del gen HFE, o bien mutaciones de



Fig. 2. Artropatía metacarpofalángica. Radiografía de las manos de un paciente con hemocromatosis primaria con artropatía que afecta a la segunda y tercera articulación metacarpofalángica de ambas manos, consistente en esclerosis y estrechamiento de la interlínea.



Fig. 3. Coloración oscura de la piel en un paciente con hemocromatosis (izquierda) comparado con un individuo control (derecha). Fotografía cedida por la doctora Carmen Herrero, del Servicio de Dermatología del Hospital Clínico de Barcelona.

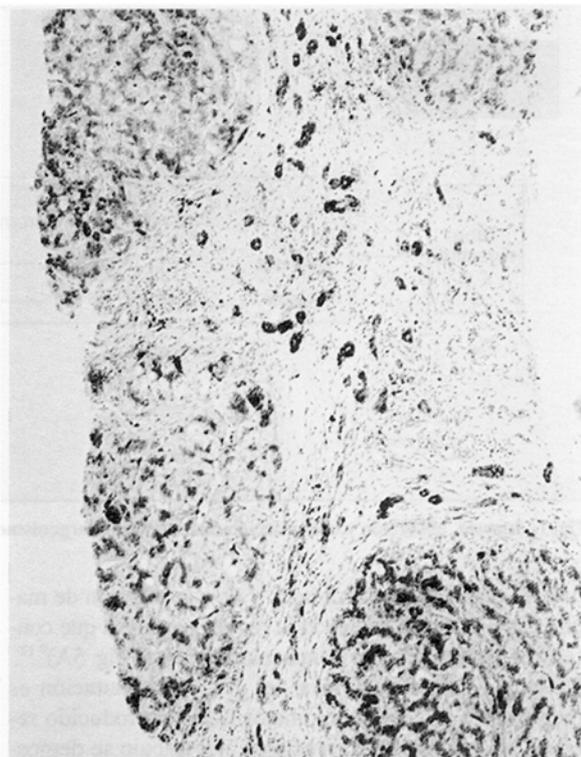


Fig. 4. Estudio histológico de biopsia hepática en un paciente cirrótico con hemosiderosis masiva. Puede observarse una intensa tinción que demuestra la presencia de hierro y una desestructuración de la arquitectura hepática con zonas de fibrosis.

otros genes que sean responsables de la enfermedad¹⁶. Intrigante es el hecho de que aun en los casos homocigotos para la mutación más típica, los enfermos presentan una cierta variación en el grado de acumulación de hierro y deterioro¹⁷, sugiriendo que factores genéticos adicionales o factores ambientales actúan en sinergismo con la presencia de la mutación genética.

Mecanismo patogénico

El mecanismo exacto de absorción de hierro y el papel específico de la proteína HFE todavía no se conocen en

TABLA 1
Complicaciones asociadas al cúmulo de hierro en la hemocromatosis y su frecuencia

	P
Cirrosis	0,22
Diabetes	0,17
Insuficiencia cardíaca	0,05
Cirrosis + diabetes	0,28
Cirrosis + insuficiencia cardíaca	0,13
Diabetes e insuficiencia cardíaca	0,06
Alteraciones globales de la enfermedad	0,5

Phatak et al, 1994³³.

detalle, pero es posible avanzar algunas hipótesis gracias a estudios recientes. Se conoce que la proteína

TABLA 2
Frecuencia (%) de síntomas y signos presentes en el momento del diagnóstico de hemocromatosis

	%
Síntomas iniciales	
Debilidad, letargia	83
Dolor abdominal	58
Diabetes mellitus	55
Artralgia	43
Disminución de la libido	38
Amenorrea	22
Disnea <i>on exertion</i>	15
Síntomas neurológicos	5
Signos de la enfermedad establecida	
Hepatomegalia	83
Pigmentación	75
Pérdida del pelo corporal	20
Esplenomegalia	13
Edema periférico	12
Ictericia	10
Ginecomastia	8
Ascitis	6

Niederau et al, 1985³².

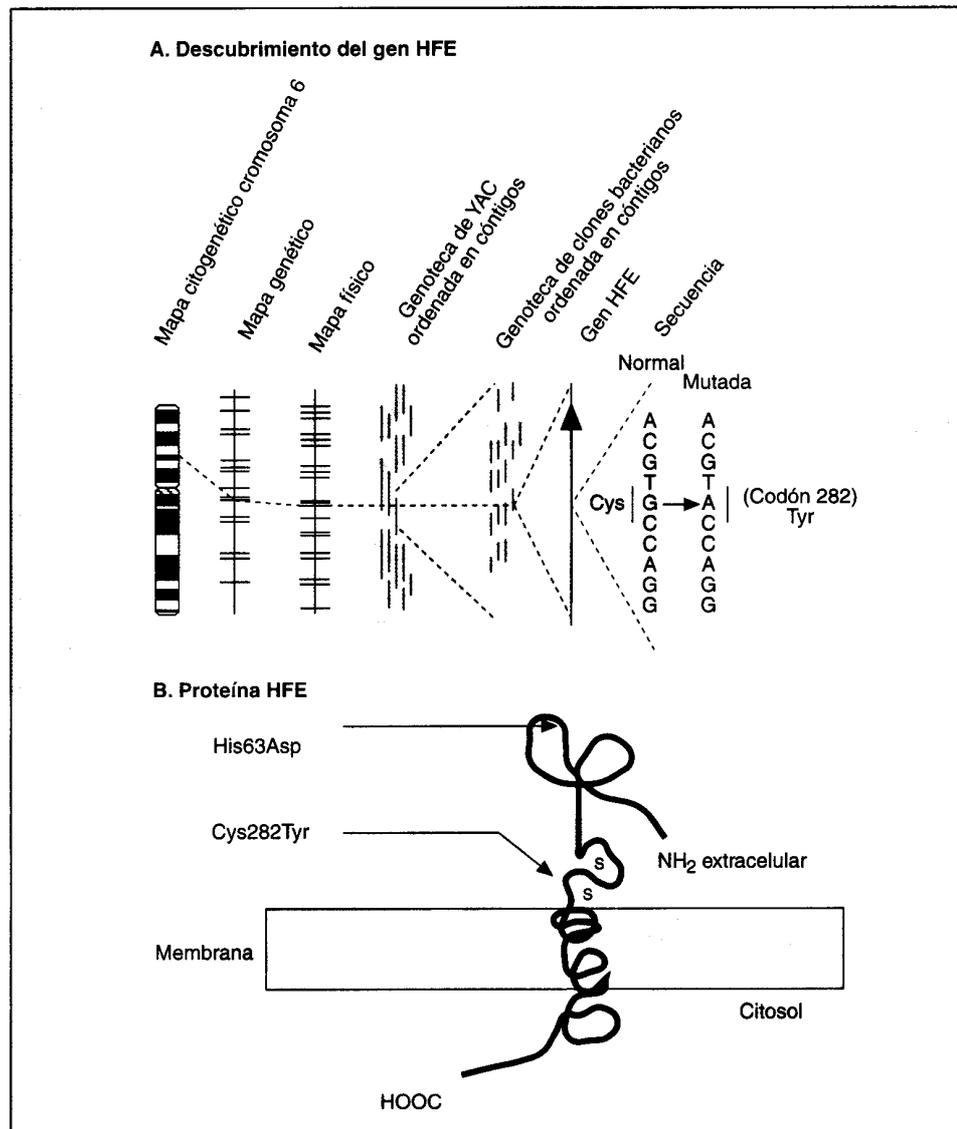


Fig. 5. Gen responsable de la hemocromatosis. A: Principales pasos conducentes al aislamiento del gen y al descubrimiento de la mutación responsable de hemocromatosis. Tras ser ubicado el locus candidato al cromosoma 6 mediante análisis de ligamiento se procedió al clonaje posicional de la región. Uno de los genes aislados de la región (denominado HFE) resultó estar mutado (Cys282Tyr) en estado homocigoto en diversos individuos afectados. B: El gen HFE codifica para una proteína de membrana. Se indica con una flecha la posición de las dos mutaciones asociadas a hemocromatosis (Cys282Tyr e His63Asp).

HFE se expresa en el intestino, en donde presenta una localización única intracelular y perinuclear, totalmente diferente a la localización en membrana que tendría en el hígado y en los demás tejidos¹⁸. Para poder comprender la función de la proteína HFE es preciso suponer que posee funciones distintas en la célula intestinal y en el hepatocito (fig. 6). En las células intestinales la función de la proteína HFE normal sería la de permitir la entrada del hierro circulante en sangre al interior de las células (fig. 6). Una vez dentro de la propia célula intestinal el hierro sería detectado por un sensor (proteínas IRP; *Iron Responsive Protein*) que regularían la cantidad de canales transportadores de hierro (DCT1) a nivel del lumen intestinal. De esta forma un incremento de hierro a nivel del organismo sería detectado por las proteínas IRP de la célula intestinal cambiando su con-

formación y bloqueando su función normal protectora de la estabilización del mRNA del transportador de hierro (DCT1). En consecuencia disminuiría la cantidad de canales de hierro a nivel de la célula intestinal y por consiguiente la absorción de hierro. Una disfunción de la proteína HFE debida a las mutaciones Cys282Tyr o His63Asp no permitiría que el hierro circulante entrase en la célula intestinal^{19, 20}. En este caso al no poder detectar la célula intestinal la cantidad de hierro corporal no se produciría la inhibición en la absorción intestinal de hierro. Esta primera hipótesis explicaría cómo en la hemocromatosis existe un incremento de absorción de hierro por parte del organismo, pero no explicaría cómo se acumula el hierro en las células hepáticas. Para comprender esto último es preciso considerar la función específica de la proteína HFE en el hepatocito En

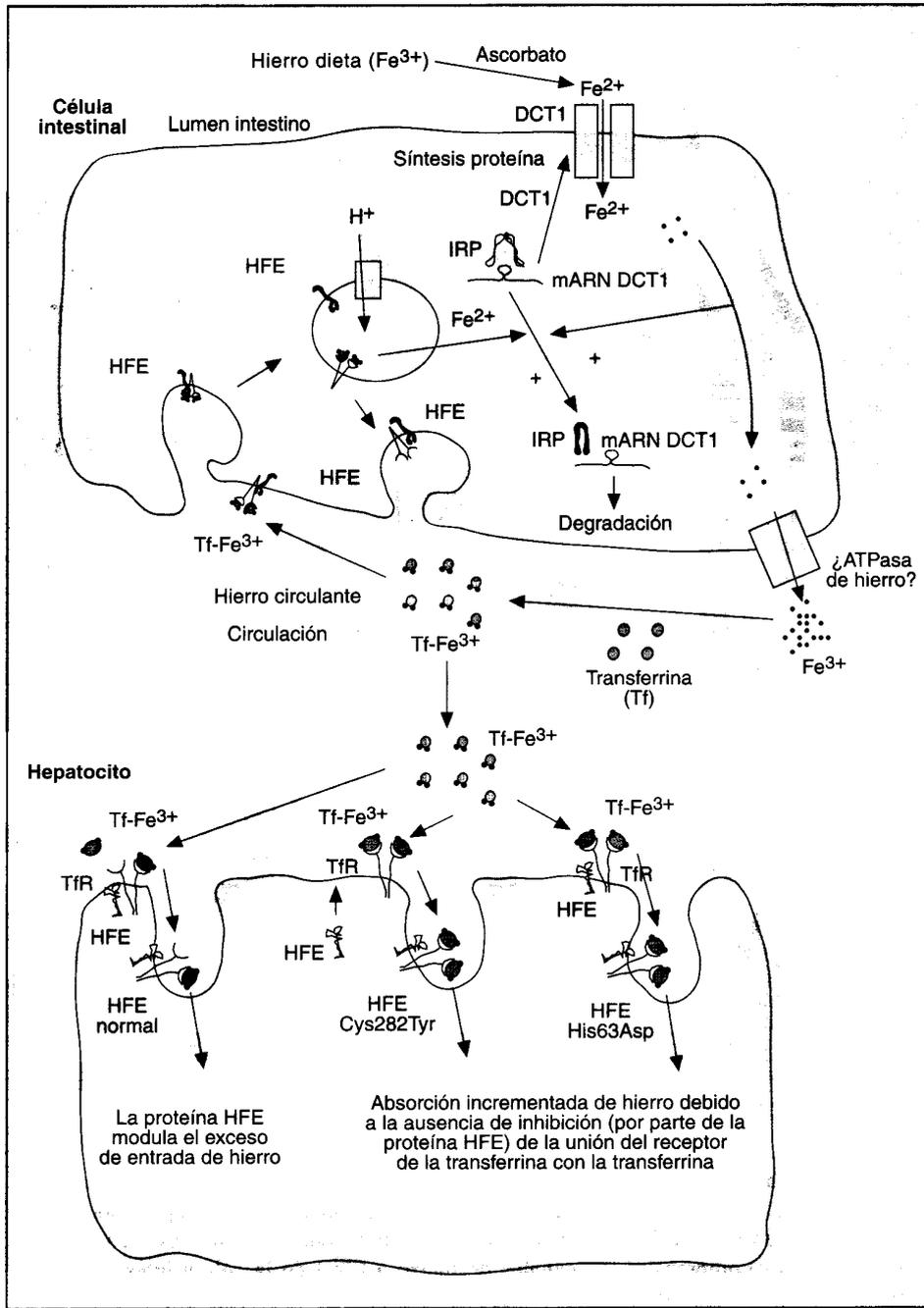


Fig. 6. Posible mecanismo patogénico en la hemocromatosis hereditaria. A nivel de las células intestinales, la función de la proteína HFE sería la de permitir la entrada del hierro circulante al espacio intracelular. Una vez dentro de la célula, el hierro sería detectado por sensores (proteínas IRP) que controlarían la cantidad de transportador de hierro a nivel del lumen intestinal. Cualquier mutación que impida la función normal de la proteína HFE resultaría en una pérdida de su capacidad de permitir la entrada del hierro circulante bloqueando el mecanismo de *feed-back* negativo sobre la absorción de hierro. A nivel del hepatocito la transferrina (Tf) entra en las células a través de una endocitosis mediada por el receptor de la transferrina (TfR). Una función de la proteína HFE normal parece ser la de unirse al receptor de la transferrina disminuyendo su afinidad para la transferrina (abajo, izquierda). La mutación Cys282Tyr impediría que la proteína HFE llegase a la membrana y por tanto no podría ejercer su acción inhibitoria sobre el receptor de la transferrina (abajo, centro). La mutación His63Asp permitiría que la proteína HFE llegase a la membrana, pero impediría buena parte de su función inhibitoria sobre el receptor de la transferrina (abajo, derecha).

el último estudio realizado por los descubridores del gen HFE²¹ se demuestra que la proteína HFE se asocia en membrana con el receptor de la transferrina (TfR) bajando su afinidad por su ligando: la transferrina (Tf), que es la proteína responsable del transporte de hierro desde la sangre a los diferentes órganos donde se requiere hierro (fig. 6). La mutación Cys282Tyr bloquea la llegada de la proteína HFE a la membrana (fig. 6), mientras que la mutación His63Asp impide que la pro-

teína HFE pueda ejercer su función normal inhibitoria de la afinidad del receptor de la transferrina hacia la transferrina (fig. 6). Así es que tanto la mutación Cys282Tyr como la His63Asp presentes en los enfermos de hemocromatosis resultan en la ausencia del papel inhibidor descrito de la proteína HFE normal modulando la afinidad del receptor de transferrina para la transferrina. En consecuencia, las mutaciones del gen HFE resultan en una entrada celular incrementada del

TABLA 3
Expectativa de vida en función de la presencia o ausencia de algunas de las alteraciones asociadas a la hemocromatosis

	EXPECTATIVA DE VIDA EN HOMBRES DE 50 AÑOS	EXPECTATIVA DE VIDA EN MUJERES DE 60 AÑOS
Normal	27	19
Cirrosis	10	10
Diabetes	8	8
Insuficiencia cardíaca	9	9
Hepatocarcinoma	1	1

Niederau et al, 1985²²; Phatak et al, 1994²³.

hierro en algunos tejidos, contribuyendo a la formación de depósitos de hierro (fig. 6).

Clínica

Típicamente, la hemocromatosis avanzada cursa con pigmentación (coloración bronceada) de la piel, y un repertorio adicional de clínica derivada del cúmulo de hierro en el organismo: cirrosis hepática y subsiguiente

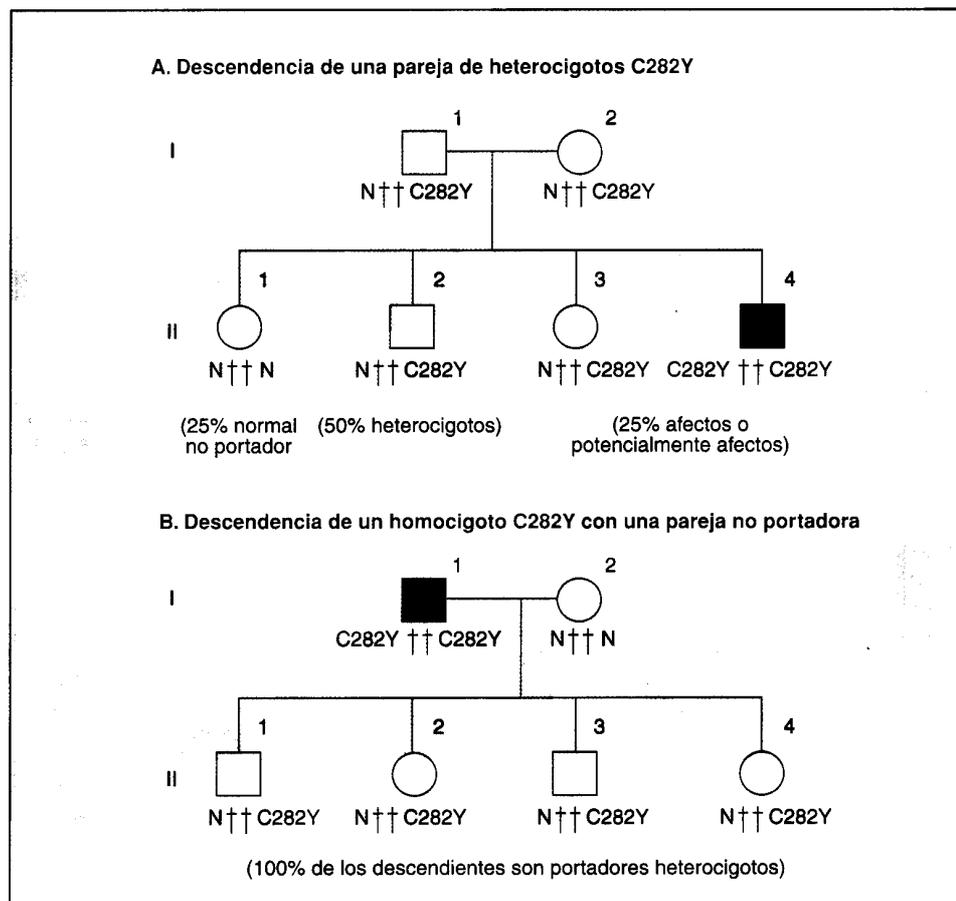
cáncer hepático, diabetes debida a la alteración el páncreas endocrino, cardiopatía debida al cúmulo de hierro en el corazón, artritis debidas a la acumulación de hierro en las articulaciones e hipogonadismo y disminución de la libido (figs. 1, 2, 3 y 4 y tablas 1 y 2)^{17, 22}. La importancia de efectuar un diagnóstico precoz o genético presintomático en la hemocromatosis radica en que el tratamiento precoz con flebotomías es muy efectivo y carente de efectos secundarios, previniendo la totalidad de las complicaciones asociadas al cúmulo de hierro (tablas 1 y 3)^{17, 22, 23}.

Prevalencia y herencia

Durante mucho tiempo ha existido la concepción errónea de que la hemocromatosis es una alteración rara o infrecuente²³, pero hoy se conoce que, de hecho, se trata de la alteración con herencia recesiva más frecuente. La prevalencia de homocigotos potencialmente afectados en la población general es de uno cada 1.100 individuos, y uno de cada 17 individuos es portador heterocigoto de la mutación Cys282Tyr^{1, 13, 15, 23-25}.

En la figura 7 se demuestran algunos de los principios de herencia asociados a la hemocromatosis. Cualquier paciente con hemocromatosis homocigoto para la muta-

Fig. 7. Herencia en la hemocromatosis hereditaria. **A:** Una de las situaciones más comunes es aquella en la que una pareja en donde cada miembro es portador heterocigoto para la mutación Cys282Tyr (miembros I.1 y I.2 del árbol genealógico) da lugar en su descendencia a un 25% de hijos/as homocigotos (Cys282Tyr/Cys282Tyr; miembro II.4 del árbol genealógico) y a un 50% de hijos/as portadores heterocigotos (II.2 y II.3). **B:** Cualquier individuo homocigoto Cys282Tyr/Cys282Tyr apareado con un individuo no portador dará lugar a la presencia de un 100% de portadores heterocigotos (individuos II.1 a II.4). La probabilidad de que un individuo heterocigoto escoja una pareja también portadora es de 1/17.



ción típica (genotipo Cys282Tyr/Cys282Tyr) originado a partir de dos padres heterocigotos tiene un 25% de probabilidad de tener otros hermanos también homocigotos y potencialmente afectados (fig. 7A). Cualquier paciente homocigoto que tenga descendencia con una persona no portadora tendrá hijos/as portadores heterocigotos en el 100% de los casos (fig. 7B). La probabilidad de que una persona heterocigota escoja una pareja también heterocigota es de uno entre 17 (fig. 7).

Diagnóstico

Tras la sospecha clínica, la prueba más elemental con la que iniciar el algoritmo diagnóstico consiste en determinar si existe una elevación de la ferritina sérica > 500 µg/ml, o bien si existe una elevación en el índice de saturación de la transferrina > 55% (fig. 8). En caso afirmativo puede repetirse la determinación pasado un cierto tiempo a fin de asegurarse de que el incremento

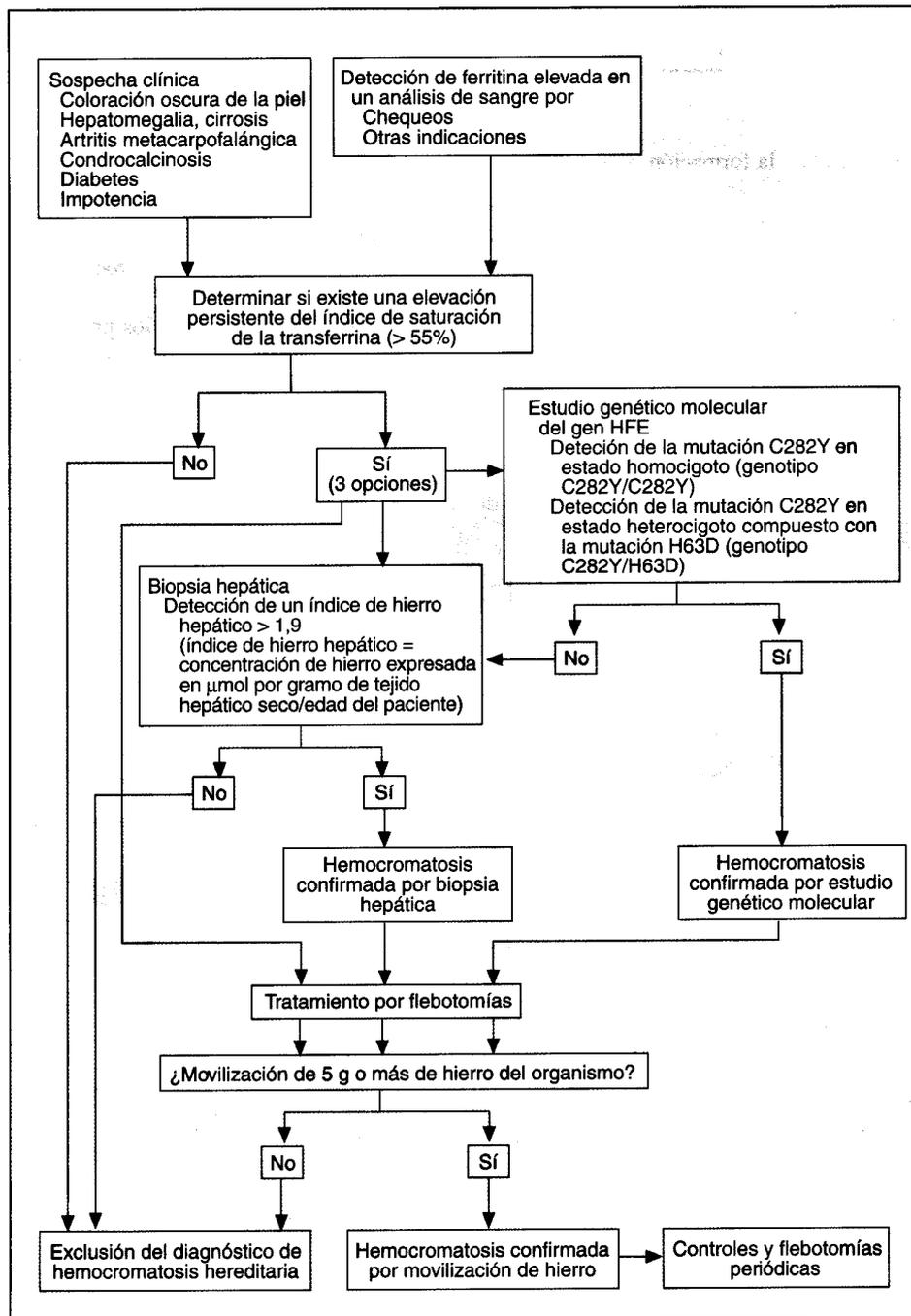


Fig. 8. Algoritmo diagnóstico en la hemocromatosis

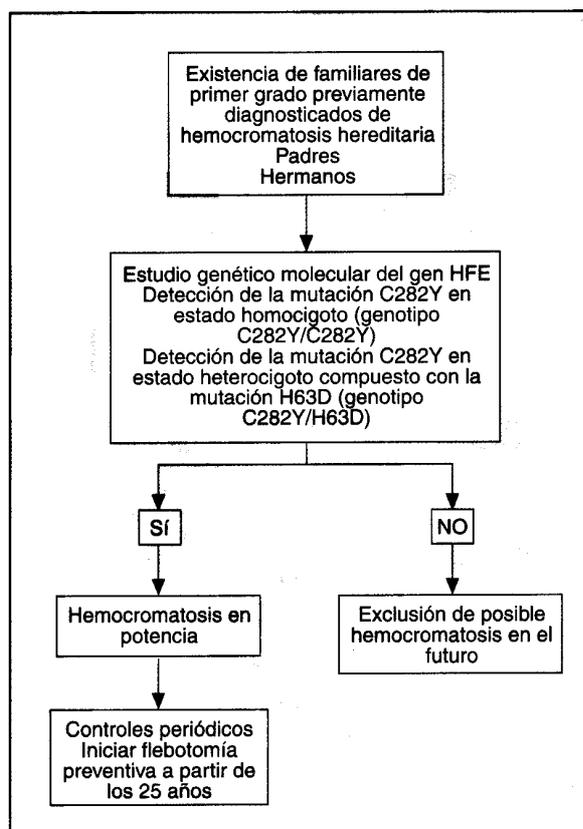


Fig. 9. Algoritmo a seguir ante familiares asintomáticos de pacientes diagnosticados de hemocromatosis hereditaria debida a mutaciones del gen HFE.

detectado es persistente y en cuyo caso estaría indicado proseguir en el algoritmo diagnóstico (fig. 8). Se plantean entonces 3 posibilidades.

La biopsia hepática sigue siendo actualmente el método de referencia para el diagnóstico de la HH (figs. 8 y 9) a través de la determinación del índice de hierro hepático ($\mu\text{mol Fe/g}$ de tejido hepático seco dividido por la edad del paciente en años). Se considera que el índice de hierro hepático es diagnóstico de la enfermedad si es superior a 1,9²⁶. La biopsia hepática está indicada cuando se detecta una anomalía persistente de diferentes parámetros del metabolismo del hierro detectables en sangre (ferritina, y en especial el índice de saturación de transferrina) (fig. 8). Estas determinaciones pueden identificar a la mayoría de los varones en riesgo, pero no permiten detectar a una gran proporción de las mujeres premenopáusicas²⁷.

Otra posibilidad ante un incremento persistente de la ferritina o de la saturación de la transferrina consistiría en iniciar un tratamiento por flebotomía. En el caso de detectar una mejoría en la sintomatología y una movilización de 5 o más gramos de hierro podríamos considerar que la respuesta positiva al tratamiento confirma la sospecha diagnóstica (fig. 8).

Pero actualmente existe la posibilidad de utilizar el diagnóstico genético molecular (detección de las mutaciones Cys282Tyr e His63Asp del gen HFE) ya sea como confirmación molecular de la hemocromatosis o bien como detección presintomática de un estado potencialmente afecto (figs. 8, 9 y 10). El estudio de los familiares de primer grado de los casos ya diagnosticados forma ya parte de la rutina en muchos centros. Este hecho hace que actualmente se detecte una tendencia a diagnosticar un número mucho mayor de casos asintomáticos lo que permite su prevención²⁸. Para realizar un estudio genético es preciso disponer de una muestra (≈ 14 ml) de sangre venosa anticoagulada en EDTA que debe ser remitida (a temperatura ambiente), a ser posible el mismo día de su extracción, al laboratorio de genética por cualquier sistema de mensajería. Una vez en el laboratorio se procede a la extracción de ADN y a la amplificación de gen HFE mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La detección del genotipo HFE se efectúa tras digestión de los productos de PCR con el enzima de restricción HhaI, separación de los fragmentos obtenidos por electroforesis y detección mediante tinción con bromuro de etidio (fig. 10).

Tratamiento

El tratamiento de elección en la hemocromatosis consiste en eliminar el hierro del organismo a través de flebotomías (1 por semana) hasta que se normalizan los parámetros bioquímicos del hierro. Una vez normalizada la cantidad de hierro en el organismo hay que mantener los niveles a través de flebotomías y controles periódicos. El tratamiento va enteramente encaminado a evitar las complicaciones asociadas al cúmulo de hierro y daño celular. Si la hemocromatosis se diagnostica y se trata de forma precoz es posible prevenir las alteraciones asociadas y restablecer una esperanza de vida normal (tabla 3). En los casos en donde no resulta posible o práctico realizar flebotomías es posible utilizar quelantes orales de hierro con el fin de reducir la absorción intestinal y de incrementar su excreción, aunque su eficacia es mucho menor.

Prevención

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) la HH cumple todos los criterios para ser considerada como subsidiaria de un *screening* de la población general, ya que:

- 1) Se trata de un problema médico importante y frecuente.
- 2) Se conoce la historia natural.
- 3) Existe una fase latente diagnosticable.
- 4) La prueba para hacer el *screening* es aceptable para la población general.

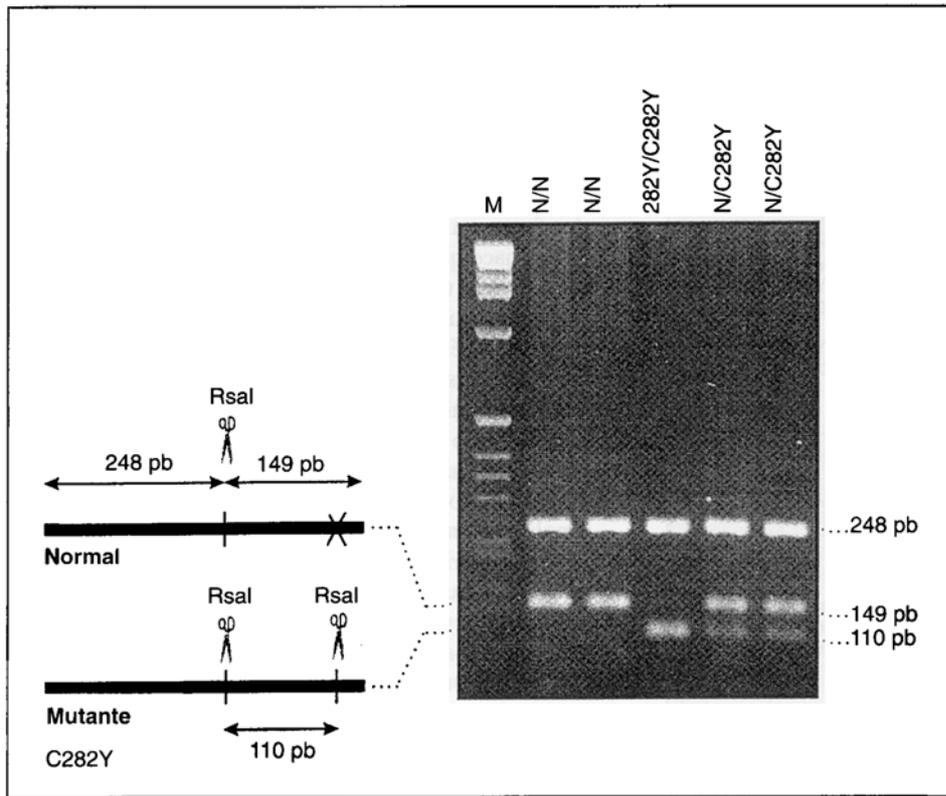


Fig. 10. Diagnóstico molecular en la hemocromatosis. Se muestra una fotografía correspondiente a una electroforesis de productos de PCR del gen HFE cortados con el enzima de restricción RsaI. El enzima corta dos veces en el caso de que exista la mutación Cys282Tyr, y sólo una vez cuando la secuencia es normal. Carril «M»: marcador de tamaño. N/N indica normal, N/Cys282Tyr indica portador heterocigoto, y Cys282Tyr/Cys282Tyr indica homocigoto afecto o potencialmente afecto.

5) El diagnóstico en la fase precoz implica mejoría del pronóstico, ya que existe un tratamiento efectivo y aceptable por la población general. Gracias a unos estudios recientes correspondientes a la población española se ha podido determinar que la hemocromatosis es también una enfermedad muy común en España, ya que aproximadamente una de cada 17 personas son heterocigotas y que una de cada 1.129 son homocigotas y afectas o potencialmente afectas de HH^{15, 25}. En los pacientes con HH hemos podido detectar que la mutación Cys282Tyr está presente en estado homocigoto en más del 90% de los casos. También hemos detectado que una de cada 75 personas de nuestra población son heterocigotas compuestas (Cys282Tyr/His63Asp) y por tanto presentan el riesgo de sobrecarga de hierro¹⁵.

El cribado de la población general o de los familiares de primer grado de pacientes mediante el diagnóstico genético permite el diagnóstico presintomático de la enfermedad incluso muchos años antes de la aparición de alteraciones bioquímicas detectables (fig. 9). Conceptualmente el diagnóstico molecular permite aumentar la eficacia del cribado respecto a métodos tradicionales basados en la determinación de parámetros de hierro en sangre e incluso podría permitir en un futuro, en algunos casos, hacer innecesaria la biopsia hepática para el diagnóstico de HH. Otra ventaja del diagnóstico genético respecto al tradicional es que permite distinguir con certeza los hete-

rocigotos de los homocigotos. En consecuencia permite esclarecer el curso evolutivo de las manifestaciones clínicas y estudiar (partiendo de grupos más homogéneos) los factores que influyen en la penetrancia de la enfermedad, tanto en homocigotos como en heterocigotos^{29, 30}.

Aparte de los casos homocigotos (Cys282Tyr) para alteraciones del gen HFE, se conoce también que los heterocigotos portadores (uno de cada 10 a 17 individuos de la población general) se hallan con un riesgo incrementado de desarrollar hemocromatosis respecto a los individuos no portadores. Esto es debido a que los individuos heterocigotos son más susceptibles a experimentar un cúmulo anómalo de hierro por factores ambientales (ingesta excesiva de alcohol que incrementa la absorción de hierro) o por la presencia de alteraciones genéticas adicionales que también condicionan un incremento en la absorción de hierro¹⁷. Además, varios estudios apuntan hacia la posibilidad de que los heterocigotos compuestos (Cys282Tyr/His63Asp) tengan un riesgo mayor de sobrecarga de hierro o hemocromatosis hereditaria que los solamente heterocigotos para la mutación Cys282Tyr^{14, 31}. De hecho se ha hipotetizado un modelo proteico en el que se explica el fenotipo más severo de la enfermedad en los pacientes heterocigotos compuestos (Cys282Tyr/His63Asp) respecto a los pacientes solamente heterocigotos para la mutación Cys282Tyr³¹. Así pues, ante un individuo con un genotipo HFE heterocigoto combinado

resulta también aconsejable realizar controles periódicos e iniciar un tratamiento preventivo en caso de detección de un aumento en el índice de saturación de la transferrina (fig. 9).

En conclusión, la posibilidad de estudios moleculares del gen HFE facilita la detección precoz de individuos potencialmente afectados y en consecuencia permite su seguimiento periódico y el inicio de tratamientos preventivos por flebotomía que restauran una esperanza de vida normal.

Bibliografía

1. Edwards CQ, Kushner JP. Screening for hemochromatosis. *N Engl J Med* 1993; 3:1.616-1.620.
2. Finch SC, Finch SA. Idiopathic hemochromatosis, an iron storage disease. *Medicine (Baltimore)* 1955; 34:381-340.
3. Stewart MJ. Precancerous lesions in the alimentary tract. *Lancet* 1931; 2:565-572.
4. MacDonald RA. Hemochromatosis and cirrhosis in different geographic areas. *Am J Med Sci* 1965; 249:36-46.
5. MacSween RNM, Scott AR. Hepatic cirrhosis: a clinicopathological review of 520 cases. *J Clin Pathol* 1973; 26:936-942.
6. Finch CA, Hubers H. Perspectives in iron metabolism. *N Engl J Med* 1982; 306:1.520-1.528.
7. Simon M, Pawlotsky Y, Bourel M, Fauchet R, Genetet B. Hemochromatose idiopathique: maladie associée à l'antigène tissulaire HLA-3? *Nouv Presse Med* 1975; 4:1.432.
8. Edwards CQ, Skolnick MH, Kushner JP. Hereditary haemochromatosis: contributions of genetic analyses. *Prog Hemathol* 1981; 12:43-71.
9. Gasparini P, Borgato L, Piperno A, Girelli D, Olivieri O, Gottardi E, et al. Linkage analyses of 6p21 polymorphic markers and the hereditary haemochromatosis: localization of the gene centromeric to HLA-F. *Hum Mol Genet* 1993; 2, 571-576.
10. Burt MJ, Smit DJ, Pyper WR, Powell LW, Jazwinska EC. A 4.5 megabase YAC contig and physical map over the hemochromatosis gene region. *Genomics* 1996; 33:153-158.
11. Calandro LM, Baer DM, Sensabaugh GF. Characterisation of a recombinant that locates the hereditary hemochromatosis gene telomeric to HLA-F. *Hum Genet* 1995; 96:339-342.
12. Totaro A, Rommens JM, Grifa A, Lunardi C, Carella M, Hui-zenga JJ, et al. Hereditary hemochromatosis: generation of a trans-cription map within a refined and extended map of the HLA class I region. *Genomics* 1996; 31:319-326.
13. 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 hemochromatosis. *Nature Genetics* 1996; 13:399-408.
14. Beutler E, Gelbart T, West C, Lee P, Adams M, Blackstone R, et al. Mutation analysis in hereditary hemochromatosis. *Blood Cells Molec Dis* 1996; 22:187-194.
15. Sánchez M, Bruguera M, Bosch J, Rodés J, Ballesta F, Oliva R. Prevalence of the HFE gene Cys282Tyr mutation in Spanish patients with hereditary hemochromatosis. *J Hepatol* 1998; 29:725-728.
16. Sánchez M, Queralt R, Bruguera M, Rodés J, Oliva R. Identification of conserved, potentially regulatory sequences of the HFE gene. *Gene* 1999 (en prensa).
17. Bothwell TH, Charlton RW, Motulsky AG. Haemochromatosis. En: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Stranbury JB, Wyn-gaarden JB, Fredrickson DS, eds. *The metabolic and biochemical basis of inherited disease* (7.ª ed) 1996; 2.237-2.269.
18. Parkkila S, Waheed A, Britton RS, Feder JN, Tsuchihashi Z, Schatzman RC, et al. Immunohistochemistry of HLA-H, the protein defective in patients with hereditary hemochromatosis, reveals unique pattern of expression in gastrointestinal tract. *Proc Natl Acad Sci* 1997; 94:2.534-2.539.
19. Waheed A, Parkkila S, Zhou XY, Tomatsu S, Tsuchihashi Z, Feder JN, et al. Hereditary hemochromatosis: effects of C282Y and H63D mutations on association with β_2 -microglobulin, intracellular processing, and cell surface expression of the HFE protein in COS-7 cells. *Proc Natl Acad Sci* 1997; 94:12.384-12.389.
20. Waheed A, Grubb JH, Zhou XY, Tomatsu S, Fleming RE, Parkkila S, et al. Function of the HFE gene product. Comunicación presentada en «Molecular Medicine and Hemochromatosis». Bethesda, 14-15 de mayo 1998, MD, USA.
21. Feder JN, Penny DM, Irrinki A, Lee VK, Lebrón JA, Watson N, et al. The hemochromatosis gene product complexes with the transferrin receptor and lowers its affinity for ligand binding. *Proc Natl Acad Sci* 1998; 95:1.472-1.477.
22. Powell LW, Isselbacher KJ. Hemochromatosis. En: Harrison's Principles of Internal Medicine, (12th ed). New York: McGraw Hill 1996; 1.825-1.829.
23. Barton JC, Bertoli LF. Hemochromatosis: the genetic disorder of the twenty-first century. *Nature Genetics* 1996; 2:394-395.
24. McKusick VA. Haemochromatosis (HFE). En: OMIM: on Line Mendelian Inheritance in Man (entrada 235200) en su versión actualizada consultable a través de Inetrad 1998 en <http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM/>.
25. 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.
26. Bonkovsky HL, Ponka P, Bacon BR, Drysdale J, Grace ND, Tavill AS. An update on iron metabolism: summary of the fifth international conference on disorders of iron metabolism. *Hepatology* 1996; 23:718-729.
27. Moirand R, Adams PC, Bicheler V, Brissot P, Deugnier clinical features of genetic hemochromatosis in women compared with men. *Ann Intern Med* 1997; 15:105-110.
28. Bacon BR, Sadiq SA. Hereditary hemochromatosis: presentation and diagnosis in the 1990s. *Am J Gastroenterol* 1997; 92:784-789.
29. Adams PC. Prevalence of abnormal iron studies in heterozygotes for hereditary hemochromatosis: an analysis of 255 heterozygotes. *Am J Hematol* 1994; 45:146-149.
30. Bulaj ZJ, Griffen LM, Jorde LB, Edwards CQ, Kushner JP. Clinical and biochemical abnormalities in people heterozygous for hemochromatosis. *N Engl J Med* 1996; 335:1.799-1.805.
31. Martínez PA, Biron C, Blanc F, Masmejean C, Jeanjean P, Michel H, Schved J-F. Compound heterozygotes for hemochromatosis gene mutation: may they help to understand the pathology of the disease? *Blood Cells Mol Dis* 1997; 23:269-276.
32. Niederau C, Fischer R, Sonnenber A, et al. Survival and causes of death in cirrhotic and in noncirrhotic patients with primary hemochromatosis. *N Engl J Med* 1985; 313:1.256-1.262.
33. Phatak P, Guzman G, Woll JE, Robeson A, Phelps CE. Cost-effectiveness of screening for hereditary hemochromatosis. *Arch Intern Med* 1994; 154:769-776.

Utilidad clínica de la detección de mutaciones del gen *HFE* en la hemocromatosis

R. Oliva, M. Sánchez, M. Bruguera^a y J. Rodés^a

Servei de Genètica y ^aUnitat d'Hepatologia. Institut Clínic de Malalties Digestives. Hospital Clínic. Barcelona.

La hemocromatosis hereditaria (HH) es una enfermedad potencialmente grave debida a una absorción intestinal excesiva de hierro que ocasiona una acumulación de este metal y el subsiguiente daño celular en diversos órganos¹⁻³. Si no se diagnostica y trata precozmente puede causar cirrosis hepática y hepatocarcinoma, diabetes mellitus e infertilidad, alteraciones en el corazón y lesiones articulares⁴.

El tratamiento de la hemocromatosis consiste en eliminar el hierro del organismo a través de flebotomías (400 o 500 ml por semana) hasta que se normalizan los parámetros bioquímicos del metabolismo del hierro. Una vez normalizada la cantidad de hierro en el organismo hay que mantener los depósitos de este metal en valores normales mediante flebotomías periódicas (1 a 3 meses). El tratamiento detiene la progresión de la enfermedad y mejora el pronóstico. De hecho, si la hemocromatosis se diagnostica y se trata de forma temprana, antes de que se desarrollen lesiones irreversibles, es posible prevenir las alteraciones asociadas y restablecer una esperanza de vida similar a la de la población general.

El diagnóstico de HH suele considerarse cuando se halla una elevación de la ferritina sérica (> 500 µg/ml) o bien una elevación del índice de saturación de la transferrina (> 55%). Conviene repetir estas determinaciones pasado un tiempo a fin de asegurarse de que el incremento detectado sea persistente, en cuyo caso deben efectuarse nuevos exámenes. La biopsia hepática se ha considerado el método más útil para el diagnóstico de la HH⁵ ya que permite determinar el índice de hierro hepático (µmol de Fe/g de tejido hepático seco dividido por la edad del paciente en años). Se considera que un índice de hierro hepático (IHH) superior a 1,9 es diagnóstico de la enfermedad⁶. Si no se puede efectuar una biopsia hepática, una alternativa

diagnóstica consistiría en iniciar un tratamiento con flebotomías. En el caso de detectar una mejoría en la sintomatología y una movilización de 5 g o más de hierro (20 sangrías o más) se podría considerar que la respuesta positiva al tratamiento confirma la sospecha diagnóstica, ya que los pacientes con sobrecarga de hierro de causa distinta a la HH no toleran las sangrías repetidas.

Ninguno de estos dos procedimientos está desprovisto de inconvenientes. En las formas iniciales de HH cuando la acumulación de hierro no es todavía muy elevada, el IHH puede ser inferior a 1,9 y se produce anemia antes de haber movilizado 5 g de hierro. Por contra, algunas cirrosis avanzadas de causas diversas pueden asociarse con depósitos muy elevados de hierro que determinan IHH superiores de 1,9⁷.

El reciente descubrimiento del gen de la HH (denominado *HFE*) y la identificación de mutaciones específicas de la enfermedad han permitido simplificar su diagnóstico. Una sola mutación (Cys282Tyr) en estado homocigoto en el gen *HFE* ocurre aproximadamente en el 90% de los casos de HH⁸⁻¹². Una segunda mutación en el gen *HFE*, la mutación His63Asp en estado heterocigoto combinado con la mutación Cys282Tyr (genotipo Cys282Tyr/His63Asp), también se ha encontrado con mayor frecuencia en los enfermos de hemocromatosis^{9,10,13}. La detección de la mutación C282Y en estado homocigoto en un paciente con clínica de hemocromatosis confirma el diagnóstico de HH. Aparte del interés diagnóstico, el descubrimiento del gen *HFE* también ha permitido determinar la prevalencia de individuos heterocigotos y homocigotos en la población general. Por ejemplo, tras el estudio de 512 controles en España ha sido posible determinar que nada menos que uno de cada 17 individuos de nuestra población es portador del gen mutante, y que uno de cada 1.110 es homocigoto y, por tanto, potencialmente afectado¹⁰.

Con toda esta información es conveniente plantear qué aporta el análisis genético de esta enfermedad a la práctica clínica^{2,3,10,14}. Las ventajas de la determinación genética en un paciente con sospecha de hemocromatosis son múltiples. Primero, la determinación genética supera las limitaciones de los procedimientos clásicos basados en la sa-

Correspondencia: Dr. R. Oliva.
Servei de Genètica. Hospital Clínic.
Villarroel, 170. 08036 Barcelona.
Correo electrónico: oliva@medicina.ub.es

Recibido el 24-1-00; aceptado para su publicación el 24-1-00.

(*Gastroenterol Hepatol* 2000; 23: 433-435)

turación de la transferrina y otras alteraciones bioquímicas de los parámetros del hierro, ya que éstos pueden estar influidos por el estado nutricional, pérdidas de sangre o incluso otros factores genéticos o ambientales. Por ejemplo, un paciente con hemocromatosis que previamente a la determinación hubiese perdido sangre de forma crónica podría tener unas cifras de saturación de transferrina relativamente normales, mientras que la determinación genética detectaría siempre el mismo genotipo.

Otra ventaja de la determinación genética ante una sospecha de HH es que puede hacer innecesaria la biopsia hepática en los casos en los que no resulte imprescindible determinar si existe lesión hepática. En un paciente relativamente joven con una elevación de la saturación de la transferrina pero sin alteraciones clínicas o analíticas que sugieran la existencia de daño hepático, la detección de un genotipo homocigoto para la mutación C282Y confirmaría la sospecha diagnóstica y justificaría iniciar el tratamiento por flebotomías sin necesidad de recurrir a una biopsia hepática^{2,3,14}.

La determinación del gen *HFE* podría, además, facilitar el reconocimiento de una hemocromatosis en pacientes atendidos en servicios de endocrinología, de reumatología o de urología en caso de que las manifestaciones clínicas iniciales o más destacadas de la enfermedad fuesen una diabetes mellitus, una condrocalcinosis o una impotencia *coendi*, respectivamente. De todos modos no hay todavía ningún estudio publicado sobre la relación coste-beneficio de incluir sistemáticamente esta determinación entre los exámenes que se deberían efectuar en los pacientes con alguna de las manifestaciones clínicas señaladas, pero sería razonable efectuarla en el caso de detectar alguna alteración de las pruebas hepáticas.

Las ventajas de la determinación genética no se acaban con su utilidad diagnóstica. La prueba genética también presenta claras ventajas para el cribado de familiares respecto al análisis bioquímico convencional. El análisis genético sólo es necesario realizarlo una vez y su diagnóstico es definitivo, en contraste con las periódicas pruebas bioquímicas, que se deben realizar antes de confirmar o descartar la existencia de una HH. Realizando un genotipado se distingue con certeza a los individuos heterocigotos de los homocigotos, cosa que no es factible con el método tradicional^{15,16}. Además, con los métodos clásicos había que cribar a todos los hijos. En cambio, actualmente, basta con realizar la determinación genética al cónyuge y, caso de que éste sea portador, proceder subsiguientemente al análisis de los hijos¹⁷. De esta forma, para cada conjunto de 17 enfermos se evita tener que examinar a los hijos de 16 de los pacientes, ya que es previsible que tan sólo uno de cada 17 cónyuges sea portador de la mutación C282Y del gen *HFE*. Por ejemplo, ante un paciente homocigoto C282Y/C282Y y un cónyuge no portador es posible deducir, sin necesidad de realizar ningún análisis adicional, que todos los hijos son portadores heterocigotos (C282Y/-) y ninguno homocigoto.

Por último, también de forma práctica, el análisis genético puede tener una gran repercusión en la identificación precoz de individuos homocigotos asintomáticos de la po-

blación. En concreto, la hemocromatosis es tan prevalente que el análisis genético se está planteando como una herramienta de cribado poblacional con el fin de detectar precozmente a los individuos potencialmente afectados. Por ejemplo, en España sería previsible la detección de hasta 40.000 individuos homocigotos (C282Y/C282Y) potencialmente afectados en los que a través de una detección precoz podría evitarse la aparición de enfermedad hepática y de la morbilidad asociada (cirrosis, cáncer de hígado, cardiomiopatía, diabetes, condrocalcinosis). También podrían beneficiarse unos 500.000 heterocigotos compuestos (C282Y/H63D) previsiblemente existentes en España que podrían tener un riesgo incrementado de desarrollo de sobrecarga de hierro. Actualmente, ya existen diversos estudios en marcha para evaluar la relación coste/beneficio a fin de determinar si puede estar justificado el cribado de toda la población general. Un valor añadido posible del cribado de la población general, aparte de la detección de individuos homocigotos potencialmente afectados de hemocromatosis, estaría en la detección de los individuos heterocigotos, ya que se ha observado en algunos estudios que poseen un riesgo incrementado de enfermedad cardiovascular^{18,19} o de episodios de tromboflebitis²⁰. Se especula que sería una disfunción mínima en el metabolismo del hierro la que podría estar relacionada con este tipo de alteraciones. De todas formas todavía hay que confirmar estas asociaciones con otros estudios. El estudio de este gen puede ayudar también a aclarar la patogenia de otras enfermedades en las que se conoce que también está implicado el hierro. Por ejemplo, se ha detectado que entre los pacientes con porfiria cutánea tarda una proporción significativamente elevada son homocigotos o heterocigotos compuestos para mutaciones del gen de la hemocromatosis²¹. Igualmente en la esteatohepatitis no alcohólica se ha detectado un incremento de heterocigotos y de homocigotos para las mutaciones del gen *HFE*²².

Para concluir, cabe mencionar que la detección de la mutación C282Y en estado homocigoto o en estado heterocigoto compuesto en aproximadamente el 90% de los pacientes con hemocromatosis diagnosticada por los criterios convencionales plantea la cuestión de cómo catalogar a este 10% restante de pacientes sin mutación del gen *HFE*. Las posibilidades son dos: la primera que exista otra mutación en la región reguladora del gen *HFE*²³ o en otro gen o genes todavía no descubiertos, y la segunda que este 10% sea debido a otras causas y que la alteración en los parámetros del metabolismo del hierro sea secundaria a éstas. Es previsible que diversos estudios actualmente en curso clarifiquen este punto en un futuro inmediato.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bothwell TH, Charlton RW, Motulsky AG. Haemochromatosis. En: Scriver et al, editores. The metabolic and biochemical basis of inherited disease (7.ª ed.). 1996; 2237-2269.
2. Oliva R, Bruguera M, Sánchez M, Rodés J. Hemocromatosis hereditaria: utilidad del diagnóstico genético molecular. Medicina Integral 1999; 33: 416-425.

3. Pardo A, Salido E, Quintero E. Hemocromatosis hereditaria: implicaciones clínicas del diagnóstico genético. *Gastroenterol Hepatol* 1999; 22: 415-428.
4. Edwards CQ, Griffin LM, Goldgard D et al. Prevalence of hemochromatosis among 11,065 presumably healthy blood donors. *N Engl J Med* 1988; 318: 1355-1362.
5. Kowdley K, Trainer TD, Saltzman JR et al. Utility of hepatic index in American patients with hereditary hemochromatosis. *Gastroenterology* 1997; 113: 1270-1277.
6. Bonkovsky HL, Ponka P, Bacon BR et al. An update on iron metabolism: summary of the fifth international conference on disorders of iron metabolism. *Hepatology* 1996; 23: 718-729.
7. Ludwig J, Hashimoto E, Porayko MK, Moyer TP, Balduz WP. Hemosiderosis in cirrhosis: a study of 447 native livers. *Gastroenterology* 1997; 112: 882-888.
8. Feder JN, Gnirke A, Thomas W et al. A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary hemochromatosis. *Nat Genet* 1996; 13: 399-408.
9. Beutler E, Gelbart T, West C et al. Mutation analysis in hereditary hemochromatosis. *Blood Cells Molec Dis* 1996; 22: 187-194.
10. Sánchez M, Bruguera M, Bosch J, Rodés J, Ballesta F, Oliva R. Prevalence of the HFE Cys282Tyr and His63Asp gene mutations in Spanish patients with hereditary hemochromatosis and in controls. *J. Hepatol* 1998; 29: 725-728.
11. 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.
12. Fabrega E, Castro B, Sánchez-Castro L et al. Prevalencia de la mutación Cys282Tyr del gen de la hemocromatosis en Cantabria en pacientes diagnosticados de hemocromatosis hereditaria. *Med Clin (Barc)* 1999; 12: 451-453.
13. Martínez PA, Biron C, Blanc F et al. Compound heterozygotes for hemochromatosis gene mutation: may they help to understand the pathology of the disease? *Blood Cells Mol Dis* 1997; 23: 269-276.
14. Moreno L, Vallcorba P, Boixeda D et al. Utilidad de la detección de las mutaciones Cys282Tyr e His63Asp en el diagnóstico de la hemocromatosis hereditaria. *Rev Clin Esp* 1999; 199: 632-636.
15. Adams PC. Prevalence of abnormal iron studies in heterozygotes for hereditary hemochromatosis: an analysis of 255 heterozygotes. *Am J Hematol* 1994; 45: 146-149.
16. Bulaj ZJ, Griffen LM, Jorde LB et al. Clinical and biochemical abnormalities in people heterozygous for hemochromatosis. *N Engl J Med* 1996; 335, 1799-1805.
17. Adams PC. Implications of genotyping of spouses to limit investigation of children in genetic hemochromatosis. *Clin Genet* 1998; 53: 176-178.
18. Roest M, Van der Schouw YT, De Valk B et al. Heterozygosity for a hereditary hemochromatosis gene is associated with cardiovascular death in women. *Circulation* 1999; 100: 1268-1273.
19. Tuomainen TP, Kontula K, Nyysönen K et al. Increased risk of acute myocardial infarction in carriers of the hemochromatosis gene Cys282Tyr mutation. *Circulation* 1999; 100: 1274-1279.
20. Xie YG, Lillicrap DP, Taylor SAM. An association between the common hereditary hemochromatosis mutation and the factor V Leiden allele in a population with thrombosis. *Blood* 1998; 92: 1461-1462.
21. Enríquez R, Morales P, Castro MJ et al. The most frequent HFE allele linked to porphyria cutanea tarda in Mediterraneans is His63Asp. *Hepatology* 1999; 30: 819-820.
22. Bonkovsky HL, Jawaid Q, Totorelli K et al. Non-alcoholic steatohepatitis and iron: increased prevalence of mutation of the HFE gene in non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* 1999; 31: 421-429.
23. Sánchez M, Queralt R, Bruguera M, Rodés J, Oliva R. Cloning, sequencing and characterisation of the rat hereditary hemochromatosis promoter. Comparison of the human, mouse and rat HFE promoter regions. *Gene* 1998; 225: 77-87.

RESUMEN GLOBAL DE LOS RESULTADOS Y DISCUSIÓN

RESUMEN GLOBAL DE LOS RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se describen los resultados de la presente tesis y se presenta una discusión sobre ellos. Una discusión complementaria de estos resultados también se da en las publicaciones presentes en esta tesis (páginas 85 a 137).

1.-Búsqueda de mutaciones responsables de la Hemocromatosis Hereditaria

En la Hemocromatosis Hereditaria tipo 1 (HH) se han implicado dos mutaciones del gen HFE como causantes de la mayoría de los casos de pacientes con HH, la mutación C282Y y la mutación H63D. Concretamente los genotipos C282Y/C282Y y C282Y/H63D han sido implicados en la enfermedad. En la presente tesis pretendemos estudiar la Hemocromatosis Hereditaria en España por lo que se investigaron estas mutaciones en pacientes con HH españoles así como en la población general.

1.1.-Pacientes españoles de HH

Tras el descubrimiento del gen HFE como responsable de la HH en 1996 (Feder *et al.*, 1996) se comenzaron a realizar diversos estudios en los que se detectaron la mutación C282Y y/o la mutación H63D en pacientes afectados de HH de diferentes poblaciones. En estudios realizados en países del norte de Europa, Australia y EE.UU. la mutación C282Y en homocigosis explica entre el 72 y el 100% de los casos. Sorprendentemente en el sur de Italia la mutación sólo explica un 33% de los casos (Piperno *et al.*, 1998a). Los resultados de los estudios publicados sobre la detección de las mutaciones C282Y y H63D en pacientes con HH de origen europeo se resumen en la tabla 6 (página 43).

En España no habían datos previos referentes a la frecuencia de estas mutaciones en pacientes con Hemocromatosis Hereditaria por lo que nos planteamos estudiar si mutaciones en el gen HFE eran responsables o no de nuestros pacientes con Hemocromatosis Hereditaria (HH).

En un primer estudio se detectó la presencia de las mutaciones C282Y y H63D en 31 casos de pacientes con HH procedentes del Servicio de Hepatología del Hospital Clínico. En este estudio se demostró que la mutación C282Y en homocigosis era la responsable de un 87,1% de los casos y que el genotipo heterocigoto compuesto (C282Y/H63D) lo era de otro 6,5% de los casos.

Estos resultados se describen en el artículo 1 incluido en la presente tesis y titulado: *Prevalence of the Cys282Tyr and His63asp HFE gene mutations in Spanish patients with hereditary hemochromatosis and in controls. Journal of Hepatology 1998; 29, 725-728.*

En un posterior estudio se amplió la muestra de pacientes a 74 pacientes y se determinó que la mutación C282Y en homocigosis explicaba un 81,1% de nuestros casos de enfermos con HH y que el genotipo heterocigoto compuesto (C282Y/H63D) era responsable de la enfermedad en un 8,1% de casos. Además en este estudio se secuenció el gen HFE en aquellos casos de

pacientes con Hemocromatosis Hereditaria que no presentaban un genotipo de riesgo de desarrollo de la enfermedad (ver sección 1.3)

Estos resultados se describen en el artículo 2 incluido en la presenta tesis y titulado: *Hereditary Hemochromatosis in Spain. Genetic Testing 2000; 4 (2):171-6.*

El diagnóstico de Hemocromatosis en estos pacientes se ha basado en la historia clínica, una saturación de transferrina mayor del 50%, elevados niveles de ferritina sérica, biopsia hepática con HII >1,9 y/o depósito de hierro en grado 3 a 4 (en aquellos pacientes donde se realizó la biopsia hepática) o movilización de más de 4 gramos de hierro por flebotomía y por la exclusión de otras causas de sobrecarga de hierro como son la presencia de hepatitis vírica o alcoholismo, que darían lugar a una Hemocromatosis secundaria.

Actualmente la detección de las mutaciones C282Y y H63D se realizan como una prueba genética asistencial de rutina en el Servicio de Genética del Hospital Clínico de Barcelona. La detección de las mutaciones C282Y y H63D se realiza mediante la amplificación por PCR de DNA genómico y una posterior digestión enzimática. Para la detección de la mutación C282Y se utiliza el enzima RsaI y para la mutación H63D se utiliza el enzima DpnII (isoesquizomero del enzima MboI). Los *primers* utilizados en la amplificación se describen en la tabla A1.2. del apéndice.

Entre Mayo de 1997 y Noviembre de 2001 se ha realizado la detección de las mutaciones C282Y y H63D del gen HFE en el Servicio de Genética del Hospital Clínico en un total de 418 individuos. Estos casos proceden tanto del Hospital Clínico de Barcelona como de otros centros hospitalarios o clínicas públicas y/o privadas. Aproximadamente en un 20% de estos casos se ha identificado al menos una causa asociada a la sobrecarga de hierro, principalmente hepatitis vírica o enolismo, es decir, probablemente presentan una Hemocromatosis secundaria. Un total de 107 individuos han sido identificados como enfermos de Hemocromatosis Hereditaria. Debido al carácter hereditario de la enfermedad se ha realizado el genotipado de las mutaciones C282Y y H63D del gen HFE a 126 familiares de pacientes con HH. Los resultados del genotipado de los individuos con HH y de sus familiares se presentan en la tabla 13.

Tabla 13. Estudio de las mutaciones C282Y y H63D del gen HFE en pacientes con HH y en familiares.

Genotipado		Pacientes HH		Familiares de HH	
C282Y	H63D	N	%	N	%
+/+	-/-	74	69,2	6	4,8
+-	+/-	24	22,4	16	12,7
+/-	-/-	0	0,0	58	46,0
-/-	+/+	1	0,9	1	0,8
-/-	+/-	3	2,8	24	19,0
-/-	-/-	5	4,7	21	16,7
Total		107		126	

Los resultados de la detección de las mutaciones C282Y y H63D del gen HFE en pacientes con una clínica de HH demuestran que en España la HH se debe principalmente a los genotipos C282Y/C282Y y C282Y/H63D del gen HFE (91,6%). La mutación C282Y del gen

HFE en homocigosis representa un 69,2 % de nuestros casos de HH, mientras que el genotipo C282Y/H63D representa un 22,4% de nuestros casos.

Otros estudios de las mutaciones C282Y y H63D del gen HFE en pacientes con HH de otras regiones de España (Cantabria y Madrid), en los que se han estudiado un número menor de casos ($n = 60$, $n = 22$), han descrito un 66,7 y un 81,8% de pacientes con la mutación C282Y en homocigosis, respectivamente (Fábrega *et al.*, 1999; Moreno *et al.*, 1999). Estos porcentajes concuerdan con el que hemos obtenido en nuestro estudio (69,2%). En pacientes europeos, exceptuando los de Italia y Grecia, el porcentaje de pacientes con HH C282Y/C282Y varía entre el 100% y el 66% (Tabla 6, página 43). Por lo tanto con nuestro estudio podemos concluir que la HH en pacientes españoles, al igual que en pacientes del norte de Europa, se debe principalmente a mutaciones en el gen HFE.

Aún así actualmente se disponen de 9 pacientes (8,4% de pacientes con HH) que presentan una clínica de HH y que no presentan el genotipo C282Y/C282Y ni el genotipo C282Y/H63D del gen HFE en los que se ha continuado investigando (ver apartado 1.3).

A diferencia de lo publicado en Italia, en España no se ha encontrado una gran heterogeneidad respecto a la Hemocromatosis ya que sólo un 8,4% de pacientes españoles con HH no presenta ni el genotipo C282Y/C282Y ni el genotipo C282Y/H63D, descritos ambos como causa de la enfermedad.

El genotipo C282Y/H63D es significativamente más frecuente ($p < 0,0001$) en pacientes con HH (24 de 107) que en nuestra población general (74 de 5370, tabla 14). Este hecho también ha sido descrito por otros autores (Feder *et al.*, 1996; Beutler *et al.*, 1997) y demuestra que este genotipo está implicado en la patogenia de la Hemocromatosis Hereditaria.

1.2.-Población general española

La Hemocromatosis Hereditaria se ha descrito como la enfermedad monogénica recesiva más frecuente en personas de origen europeo. Se sabe que la frecuencia de la mutación C282Y decrece conforme nos desplazamos de norte a sur de Europa (Fig. 2, página 28), siendo la frecuencia más alta publicada la descrita en la población Irlandesa, un 14% (Ryan *et al.*, 1998). En la presente tesis nos propusimos determinar la frecuencia poblacional de las mutaciones C282Y y H63D en la población española.

La frecuencia alélica de la mutación C282Y en un total de 512 personas (65 DNAs de paternidades y en 485 DNAs de donantes de sangre) es de un 3,0 % \pm 1,1 % y la frecuencia alélica de la mutación H63D en 487 personas (65 DNAs de paternidades y en 422 DNAs de donantes de sangre) es de un 21,7 % \pm 2,7 %, solamente superada por la descrita en un pequeño grupo de individuos de los Países Bajos, Bulgaria y Portugal (Tabla7, páginas 47 y 48). Cabe destacar que la frecuencia de la mutación H63D en España es una de las más elevada publicadas en todo el mundo. En este primer estudio sólo se detectó una persona homocigota para la mutación C282Y, dentro del grupo de paternidades. Estas frecuencias alélicas nos permiten calcular por la ley de Hardy-Weinberg que en España 1 de cada 1091 serían homocigotas para la mutación C282Y y potencialmente afectadas de HH. La frecuencia de portadores para la mutación C282Y sería de 1 de cada 17.

Estos resultados se describen en el artículo 1 incluido en la presenta tesis y titulado: *Prevalence of the Cys282Tyr and His63asp HFE gene mutations in Spanish patients with hereditary hemochromatosis and in controls. Journal of Hepatology 1998; 29, 725-728.*

La frecuencia de la mutación C282Y descrita en nuestro trabajo es menor que las publicadas para otras poblaciones del norte de Europa pero es mayor que las publicadas en Italia (de un 2,3 % a un 1,3 %) y comparable con la publicada en el sur de Francia por Aguilar-Martínez y colaboradores (3,3 %) (Tabla 7, páginas 47 y 48). Las frecuencias poblacionales de las mutaciones C282Y y H63D descritas en estudios de poblaciones europeas, inmigrante e indígena se describen en las tablas 7, 8 y 9 respectivamente (páginas 47 a 50).

En este primer estudio el genotipo se realizó sobre muestras anónimas de las que sólo se disponía de los datos de sexo y edad del individuo, únicamente para realizar una primera estimación de las frecuencias de las mutaciones C282Y y H63D en la población española y para poder comparar con los resultados obtenidos en nuestros pacientes con Hemocromatosis Hereditaria.

En una etapa posterior nos planteamos la posibilidad de realizar un estudio sobre un mayor número de individuos a los que se les pediría consentimiento para proceder a realizar análisis genéticos y bioquímicos de las muestras y así poder realizar un posterior seguimiento y asesoramiento de estas personas. Para ello se redactó una carta de consentimiento informado sobre la Hemocromatosis que fue evaluada y aceptada por el Comité ético del Hospital Clínico (ver A.3). En este estudio se detectaron las mutaciones C282Y y H63D del gen HFE en 5370 donantes de sangre (1903 mujeres y 3467 hombres) procedentes tanto de donantes que habían acudido al banco de sangre del Hospital Clínico (escalera 1, planta 1), como de las campañas externas de recolección de sangre realizadas por el Hospital Clínico principalmente en diferentes facultades de la Universidad de Barcelona. Para el estudio se utilizaron las mismas muestras que se emplean para la detección rutinaria de virus realizado en el Servicio de Hematología y Hemostasia del Hospital Clínico, con lo que se evitaba obtener más sangre de los donantes. De cada individuo se disponía de dos muestras, una de sangre total y otra de suero. Las muestras de suero fueron etiquetadas y almacenadas a -80°C para su posterior análisis. Las muestras de sangre se utilizaron para la extracción de DNA y el posterior análisis mutacional del gen HFE en un sistema de placas de 96 pocillos. Todos los participantes fueron informados del resultado del estudio por correo. Se crearon 7 modelos de cartas según el resultado genético y bioquímico de las muestras. Estos modelos se pueden resumir en:

a) Carta de personas con genotipo C282Y/C282Y y alteraciones en los parámetros bioquímicos. Estas personas fueron contactadas para repetirles los análisis genéticos y bioquímicos y prestarles asesoramiento médico.

b) Carta de personas con genotipo C282Y/C282Y y sin alteraciones en los parámetros bioquímicos. Estas personas fueron contactadas para repetirles los análisis genéticos y bioquímicos y prestarles asesoramiento médico.

c) Carta de personas con genotipo C282Y/H63D y alteraciones en los parámetros bioquímicos. Estas personas fueron contactadas para repetirles los análisis genéticos y bioquímicos y prestarles asesoramiento médico.

d) Carta de personas con genotipo C282Y/H63D y sin alteraciones en los parámetros bioquímicos.

e) Carta de personas con genotipo C282Y/normal. A estas personas se les informó de que eran portadoras para la mutación C282Y y se les ofreció un análisis genético a su posible pareja para descartar un posible estado heterocigoto y riesgo de homocigosidad en la descendencia.

f) Carta de personas con el resto de genotipos (H63D/normal, H63D/H63D y normal/normal)

g) Carta de personas en las que no se pudo realizar el estudio genético.

Los modelos de cartas enviadas se describen en el apéndice A4.

Los resultados de la detección de las mutaciones C282Y y H63D del gen HFE en 5370 donantes de sangre se presentan en la tabla 14.

Una vez finalizado el estudio todos aquellos individuos detectados con un genotipo C282Y/C282Y con o sin alteraciones bioquímicas y los individuos C282Y/H63D con alteraciones bioquímicas fueron invitados a asistir al dispensario de Genética donde se procedió a la repetición de los análisis tanto genéticos como bioquímicos y se les informó sobre los riesgos de la enfermedad y sobre las posibilidades de prevenirla.

Tabla 14. Estudio de las mutaciones C282Y y H63D del gen HFE en 5370 donantes de sangre

Genotipos		N	%
C282Y	H63D		
+/+	-/-	8	0,15
+/-	+/-	74	1,38
+/-	-/-	249	4,64
-/-	+/+	248	4,62
-/-	+/-	1664	30,99
-/-	-/-	3127	58,23
Total		5370	

En este estudio los valores de los parámetros bioquímicos (saturación de transferrina y ferritina sérica) considerados como indicativos de una expresión fenotípica a nivel bioquímico de la HH son: saturación de transferrina >50% y ferritina sérica >300ng/ml en hombres y >200ng/ml en mujeres. Se ha descrito que la saturación de transferrina es el mejor parámetro bioquímico para cribar la HH, sin embargo también se sabe que este parámetro detecta a la mayoría pero no a todos los individuos homocigotos para la mutación C282Y (Moirand *et al.*, 1997a). En nuestro estudio dos de los 8 homocigotos para la mutación C282Y (25% de los casos) (caso 1 y 3, mujer y hombre, tabla 15) presentan una saturación de transferrina < 50 % (21 y 24 respectivamente), mientras que un individuo (caso 8, mujer) presenta una saturación de transferrina de justo un 50% (Tabla 15).

En el estudio se detectaron 8 personas homocigotas para la mutación C282Y, posteriormente confirmadas (Tabla 15). Las segundas bioquímicas realizadas también han confirmado los valores obtenidos en las primeras analíticas (Tabla 15). Cuatro de estos individuos C282Y homocigotos presentaban una bioquímica elevada (saturación de transferrina >50% y ferritina sérica ≥ 200 ng/ml en mujeres y ≥ 300 ng/ml en hombres) (sujetos: 2, 5, 6 y 7) (Tabla 15). El sujeto 7 presentaba una ferritina sérica muy elevada (1100 ng/ml) confirmada en

una segunda analítica (ferritina sérica de 1252 ng/ml) y fue remitido al servicio de Hepatología del Hospital Clínico (Dr. Bruguera). Tres de los individuos detectados (sujetos: 2, 5 y 7) han empezado el tratamiento por eritroaféresis o por sangrías terapéuticas en el Servicio de Hemoterapia y Hemostasia en el Hospital Clínico de Barcelona, bajo la supervisión de la Dra. Cristina Sanz.

El sujeto 2, a pesar de que es joven (27 años) presentaba en el momento de la realización del estudio parámetros bioquímicos elevados (TS 104 %, ferritina sérica 632 ng/ml), este sujeto ha finalizado la fase inicial de expolio de hierro siendo necesario la extracción de 16 concentrados de hematíes mediante eritroaféresis, lo que equivale a 3520 mg de hierro. Éste sujeto volverá dentro de 3 meses para seguir con la fase de mantenimiento del tratamiento (unos 3 concentrados al año).

El sujeto 5 empezó la terapia por eritroaféresis en octubre y hasta la fecha lleva 6 sesiones de dos concentrados de hematíes lo que supone la extracción de 2640 mg de hierro.

El sujeto 7 ha realizado hasta la fecha 12 sangrías terapéuticas de 450 ml de sangre total que supone la extracción de 2700 mg de hierro.

Tabla 15. Individuos homocigotos para la mutación C282Y del gen HFE detectados en el cribado de 5370 donantes de sangre

Sujeto Nº	Edad	Sexo	1ª Bioquímica			2ª Bioquímica			Unidades de sangre*
			TS (%)	Ferritina sérica ng/mL	Hierro sérico ug/dL	TS (%)	Ferritina sérica ng/mL	Hierro sérico ug/dL	
1	24	M	21	39	45	5	7	15	3
2	27	H	104	632	228	103	745	227	4
3	29	H	24	18	92	-	-	-	4
4	29	M	81	91	200	62	99	165	4
5	36	H	104	473	274	95	646	230	6
6	42	H	76	355	189	-	-	-	8
7	57	H	64	1100	179	104	1252	236	3
8	62	M	50	35	149	-	-	-	31

Sexo: M: mujer; H: hombre. TS: saturación de transferrina. *Unidades de sangre: unidades de sangre donadas antes del análisis genético.

En la tabla 15 se especifica además de los datos de sexo, edad y los valores bioquímicos de los 8 individuos C282Y homocigotos, el número de donaciones de sangre que estos individuos habían realizado antes de su identificación como homocigotos para la mutación C282Y del gen HFE. Se ha descrito que el número de donaciones de sangre realizadas anteriormente al diagnóstico genético en personas con la mutación C282Y en homocigosis no evita la necesidad del tratamiento (Barton *et al.*, 2001). En nuestro estudio en hombres, exceptuando el caso 3, cuanto mayor es el número de donaciones menor es la concentración de ferritina sérica, aún así el hecho de haber realizado más donaciones de sangre, caso 6 (8 donaciones) no reduce los niveles de ferritina sérica por debajo de un valor normal (<300 ng/ml). El sujeto número 3 (hombre) realizó el mismo número de donaciones y presenta una edad similar al caso 2 (hombre), sin embargo no presenta alteraciones bioquímicas y podría tratarse de un individuo que no exprese la enfermedad a pesar de presentar la mutación C282Y en homocigosis; el seguimiento en el tiempo de este caso responderá a esta cuestión.

Ante un cribado poblacional de la HH existen dos posibles estrategias a seguir: la realización de un estudio fenotipo/genotipo, en el que el primer test sería la realización de pruebas bioquímicas (normalmente la saturación de transferrina) seguido de un análisis genético selectivo o la realización de un estudio genotipo/fenotipo, en el que el primer test es el análisis genético. En nuestro estudio de cribado de 5370 donantes se ha optado por la realización de un cribado genotipo/fenotipo para identificar así a todos los individuos con un genotipo de riesgo de desarrollar la enfermedad (genotipos C282Y/C282Y y C282Y/H63D) y evaluar su evolución con el paso de los años comprobando cuantos de ellos necesitarán de tratamiento. En el estudio 4 individuos (1 hombre y 3 mujeres) (50% de individuos C282Y/C282Y) no hubiesen sido detectados mediante una estrategia fenotipo/genotipo ya que no presentan alteraciones bioquímicas, entendiéndose como tales la detección de niveles elevados tanto de ferritina sérica como de saturación de transferrina. El seguimiento de estos casos desvelará si estos individuos con el tiempo desarrollarán o no un aumento en los parámetros bioquímicos.

En este estudio se han analizado grupos de sueros de genotipo conocidos, así como todos los sueros de aquellas personas con un genotipo C282Y/C282Y (n=8) y C282Y/H63D (n=74) (Tabla 16).

La media de la saturación de transferrina en el grupo de homocigotos para la mutación C282Y (65 ± 32) presenta diferencias significativas respecto al grupo de heterocigotos compuestos ($p < 0,01$), heterocigotos para la mutación C282Y ($p < 0,01$), homocigotos para la mutación H63D ($p < 0,05$) y con el grupo de negativos para la mutación C282Y y heterocigotos o negativos para la mutación H63D ($p < 0,001$) (Tabla 16). También existen diferencias significativas en el valor de la saturación de transferrina entre el grupo homocigoto para la mutación H63D (42 ± 20) y el grupo de negativos para la mutación C282Y y heterocigotos o negativos para la mutación H63D (28 ± 11) ($p < 0,05$).

Respecto a los niveles de hierro la media de los valores para los homocigotos C282Y (170 ± 73) presenta diferencias significativas respecto al grupo de heterocigotos para la mutación C282Y y el grupo de negativos para la mutación C282Y y heterocigotos o negativos para la mutación H63D ($p < 0,01$) (Tabla 16).

Estas diferencias entre los grupos de genotipos y los parámetros de saturación de transferrina y niveles de hierro sérico son debidos a las diferencias existentes en el grupo de los hombres, ya que en mujeres no se han encontrado diferencias significativas.

Los parámetros de ferritina sérica y la edad han sido valorados mediante un test no-paramétrico (test U de Mann-Whitney) ya que no siguen una distribución normal.

En la comparación de las edades los grupos H63D homocigotos y C282Y wt/H63D ht ó wt presentan diferencias significativas respecto al grupo de C282Y homocigotos ($p < 0,05$) (Tabla 16).

Tabla 16. Parámetros bioquímicos en el estudio de 5370 donantes de sangre

	Genotipos	N	Hierro Sérico ug/dL			TS (%)			Ferritina Sérica ng/mL			Edad años		
			M	DT	p	M	DT	p	m	(rango)	p	m	(rango)	p
Hombres	C282Y homocigoto	5	192 ± 67			74 ± 33			473 (18-1110)			36 (27-57)		
Mujeres	C282Y homocigoto	3	131 ± 79			51 ± 30			39 (35-91)			29 (24-62)		
Todos	C282Y homocigotos	8	170 ± 73			65 ± 32			223 (18-1110)			33 (24-62)		
Hombres	C282Y/H63D	44	117 ± 47 **			39 ± 17 ***			76 (76-588) §			36 (19-66)		
Mujeres	C282Y/H63D	30	105 ± 76			34 ± 26			13 (4-110) §			26 (19-65)		
Todos	C282Y/H63D	74	112 ± 60 .052			37 ± 21 **			38 (4-588) §			31 (19-66)		
Hombres	C282Y heterocigotos	18	89 ± 28 ***			32 ± 13 ***			81 (29-593)			35 (18-62)		
Mujeres	C282Y heterocigotos	8	99 ± 90			37 ± 38			13 (3-54) §			25 (19-31)		
Todos	C282Y heterocigotos	26	92 ± 53 **			34 ± 23 **			48 (3-593)			30 (18-62)		
Hombres	H63D homocigotos	13	135 ± 42			43 ± 12 **			46 (8-213) §			26 (18-48)		
Mujeres	H63D homocigotos	12	127 ± 83			40 ± 27			26 (6-216)			21 (18-56) .050		
Todos	H63D homocigotos	25	131 ± 64			42 ± 20 *			36 (6-216) §			23 (18-56) §		
Hombres	C282Y wt/H63D ht ó wt	34	99 ± 33 ***			29 ± 10 ***			66 (6-243) §			29 (18-42) .050		
Mujeres	C282Y wt/H63D ht ó wt	17	92 ± 38			26 ± 11			15 (3-69) §			21 (18-52)		
Todos	C282Y wt/H63D ht ó wt	51	96 ± 34 **			28 ± 11 ***			42 (3-243) §			27 (18-52) §		

C282Y wt/H63D ht ó wt, individuos con genotipo negativo para la mutación C282Y y heterocigotos o negativos para la mutación H63D.

M=media, DT= desviación típica; m=mediana. TS saturación de transferrina.

*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 diferencias significativas respecto al grupo C282Y homocigoto según el test ANOVA de comparaciones múltiples utilizando la corrección Bonferroni y asumiendo una distribución normal de los valores dentro de cada grupo, programa SPSS 10.

§p<0,05 diferencias significativas respecto al grupo C282Y homocigoto según el test no-paramétrico U de Mann-Whitney, programa SPSS 10.

Dentro de cada uno de los genotipos existen diferencias significativas entre los valores de ferritina sérica respecto al sexo (p<0,001), presentando los hombres valores más elevados. Los valores de ferritina sérica en el grupo de homocigotos para la mutación C282Y presenta diferencias significativas respecto al grupo de heterocigotos compuestos, homocigotos para la mutación H63D y con el grupo de negativos para la mutación C282Y y heterocigotos o negativos para la mutación H63D (p<0,05), estas diferencias son más acusadas dentro del subgrupo de los hombres (Tabla 16).

Todas estas comparaciones nos permiten concluir que la presencia del genotipo C282Y/C282Y esta asociado con una alteración de los parámetros bioquímicos, saturación de transferrina y ferritina sérica, sobretodo en hombres. Otros estudios también describen resultados similares (Beutler *et al.*, 2002).

El análisis de 5370 donantes de sangre está derivando en el estudio de familiares de estas personas, por lo que es probable que en un futuro se detecten más personas con un genotipo de riesgo para la HH. Actualmente se han estudiado 16 familiares de personas que se realizaron el estudio, de estos 16 familiares un 50% presentan la mutación C282Y en heterocigosis.

En este estudio en el momento del diagnóstico, de los 8 pacientes detectados con un genotipo C282Y/C282Y 4 presentaban una bioquímica alterada (saturación de transferrina >50% y ferritina sérica >300 ng/ml), esto supondría que el genotipo C282Y/C282Y presenta una penetrancia incompleta del 50%, a la espera de ver si alguno de los otros individuos C282Y homocigotos presenta una alteración en los parámetros bioquímicos con el tiempo, lo que haría

necesario su inclusión en el tratamiento. Si diferenciamos por sexo, estos 4 individuos con genotipo C282Y/C282Y y bioquímica alterada son todos hombres ($n=5$) (media de edad 38 ± 12) por lo que la penetrancia de la mutación C282Y sería de un 80% en hombres, en cambio ninguna de las mujeres ($n=3$) presentaba parámetros bioquímicos alterados en el momento del cribado (media de edad 38 ± 21). Así pues, podemos concluir que las mujeres con la mutación C282Y en homocigosis presentan una penetrancia más reducida de la enfermedad que los hombres, pudiéndose calcular esta penetrancia para los hombres (80%), y que al igual que se describe en otros estudios, la Hemocromatosis Hereditaria presentar una penetrancia diferente respecto al sexo, afectado en mayor grado a los hombres.

Sólo 1 de los 74 individuos con un genotipo C282Y/H63D presentaba una bioquímica alterada, lo que nos da una penetrancia de dicho fenotipo del 1,35 % (0,0135). Esta baja penetrancia del genotipo C282Y/H63D concuerda con la publicadas en otros trabajos (1,5-0,44%) (Feder *et al.*, 1996; Jouanolle *et al.*, 1996).

La Hemocromatosis Hereditaria se ha descrito como la enfermedad genética monogénica más frecuente que afecta a personas de origen europeo. Estudios en poblaciones europeas han descrito frecuencias alélicas de la mutación C282Y de entre un 14 a un 1,3 % (Tabla 7, página 47 y 48). En España, la frecuencia alélica poblacional de la mutación C282Y, según este estudio de cribado de 5370 donantes de sangre, es de $3,16 \% \pm 0,34\%$, lo que permite realizar una estimación de 1 persona homocigota de cada 1004 (según la ley de Hardy-Weinberg). La prevalencia del genotipo C282Y en nuestro estudio de 5370 donantes de sangre es de 1 en 671 (8 en 5370). Otros estudios poblacionales realizados en España describen una frecuencia alélica para la mutación C282Y de entre el 2,3 al 4,4% (Tabla7, página 46).

Para la mutación H63D nuestro estudio detecta una frecuencia alélica del $20,80 \% \pm 0,78\%$, valor comprendido entre las frecuencias descritas por otros autores (15,7 a 30,4%) al estudiar muestras de tamaño más reducido (Tabla 7, página 48). Es interesante remarcar que en la población Vasca es donde se ha encontrado la frecuencia alélica más elevada de la mutación H63D (30,4 y 27,5 %) (Merryweather-Clarke *et al.*, 1997; Baiget *et al.*, 1998).

La HH es una enfermedad que presenta un periodo asintomático donde poder detectar a aquellas personas que desarrollaran la enfermedad. Mediante un análisis genético se pueden detectar aquellas personas homocigotas para la mutación C282Y del gen HFE y realizarles un seguimiento periódico de los valores bioquímicos de hierro para determinar cuando estas personas desarrollan una sobrecarga de hierro. Una vez detectada una sobrecarga de hierro, indicada por el incremento de la ferritina sérica, estas personas pueden someterse a tratamiento por flebotomías y así reestablecer y controlar los niveles de hierro corporales evitando un daño tisular irreversible.

La sangre procedente de los pacientes de HH no presenta ninguna contraindicación biológica para ser utilizada en transfusiones y actualmente se utiliza para este fin en algunos países (Noruega, Suecia, Sud-África y Canadá). En la actualidad, en España, solo limitaciones de ámbito legal impiden la utilización de esta sangre, ya que por una concepción anticuada y errónea no se permite la utilización para transfusiones de sangre de personas “no sanas” o de personas con enfermedades hepáticas debido a la asociación generalizada de enfermedad

hepática con la hepatitis vírica. En el caso de los enfermos de HH se ha publicado que no existe una frecuencia incrementada de hepatitis vírica en dichos pacientes respecto a la población general. Además ninguno de los 107 casos identificados como pacientes con HH en nuestro laboratorio presentan hepatitis vírica. Por lo tanto, En España es necesario una reforma de la ley y una interpretación más adecuada de casos como el de la sangre procedente de personas con Hemocromatosis para su uso en transfusiones, ya que además de ser una sangre que no presenta ningún impedimento a nivel biológico para su uso, los pacientes de HH son donantes reiterativos seguros y muy bien caracterizados.

Actualmente se está llevando a cabo un debate sobre la conveniencia de realizar un cribado poblacional de la Hemocromatosis Hereditaria, debido a la alta prevalencia de la enfermedad. Para la realización de un cribado poblacional de una enfermedad además de presentarse con una frecuencia relativamente alta, el cribado debe ser coste-eficaz y la enfermedad debe tener una penetrancia elevada. A este respecto el último estudio sobre la penetrancia del genotipo C282Y/C282Y ha concluido que menos del 1% de individuos con este genotipo presentan manifestaciones clínicas de Hemocromatosis (Beutler *et al.*, 2002), aunque artículos anteriores describen una penetrancia más elevada de entre el 20 al 80%. A pesar de la controversia sobre la penetrancia de la mutación C282Y, el genotipo C282Y/C282Y está asociado con un claro incremento de los parámetros bioquímicos de hierro. Es probable que se necesite del acúmulo de otros factores (ambientales y/o genéticos) para llegar al desarrollo de manifestaciones clínicas de la Hemocromatosis Hereditaria. Sin embargo ante la detección de un individuo con una bioquímica de hierro alterada y un genotipo de riesgo de Hemocromatosis no sería ético no aplicarle el tratamiento y el potencial de beneficio de una detección precoz de la enfermedad en estos individuos es evidente.

Con nuestro estudio de cribado de 5370 donantes de sangre se han detectado 4 personas con una bioquímica alterada (50% de los casos) que, de no haberse detectado, probablemente hubieran desarrollado manifestaciones clínicas de HH, además otras 4 personas también presentan el genotipo C282Y/C282Y y aunque todavía no se ha observado una expresión fenotípica de la enfermedad (elevación de los parámetros bioquímicos) el seguimiento de estas personas en el tiempo desvelará cual es su evolución y se podrán tratar antes de que enfermen.

En España y en otros países de Europa a diferencia de EE.UU. se dispone de un sistema de sanidad pública que se beneficiaría de hacer frente al coste de un cribado precoz de la enfermedad, respecto al no cribado y sus consecuencias (coste de un transplante hepático es de 12.000.000 pesetas). Según nuestros estudios 1 de cada 1004 personas serían homocigotas para la mutación C282Y y por lo tanto podría desarrollar la enfermedad, esto supone un volumen de 39.841 personas (España 40.000.000 habitantes), aún suponiendo una penetrancia del 50 % un total de 19.920 personas desarrollarían la enfermedad. En nuestro país con el cribado de 5370 donantes de sangre se pretende dar el primer paso para abrir un debate interno sobre la necesidad del cribado de esta enfermedad, aplicado concretamente a nuestro país.

1.3.-Pacientes con Hemocromatosis sin el genotipo C282Y/C282Y o el genotipo C282Y/H63D

Un pequeño porcentaje de nuestros pacientes diagnosticados de Hemocromatosis Hereditaria (8,4%) no presentan el genotipo C282Y/C282Y o el genotipo C282Y/H63D que son los genotipos descritos como responsables de la HH. Los 9 pacientes que actualmente disponemos con estas características se resumen en la tabla 17. Ninguno de estos pacientes presenta hepatitis vírica o enolismo.

Debido que existen algunos casos publicados, aunque poco frecuentes, de nuevas mutaciones en el gen HFE (ver tabla 5, página 31) en estos pacientes se comenzó por secuenciar el gen HFE para determinar si existía alguna otra mutación o mutaciones distintas a la C282Y y a la H63D que pudiesen explicar la presencia de la enfermedad en estos casos.

La secuenciación del gen HFE comprendió la zona codificante (exones 1 a 6), las zonas flanqueantes intrónicas-exónicas del gen HFE, la zona promotora (588 pb), la zona 3' UTR descrita (exones 6 y 7a) y la zona 3' UTR no descrita y presentada en esta tesis (exón 7b) (ver apartado 2.3). Ninguno de estos nueve pacientes presentan ninguna de las mutaciones del gen HFE descritas como causantes de la HH y recogidas en la tabla 5 (página 31) o mutaciones nuevas no descritas. La secuenciación del gen HFE en estos pacientes ha permitido la identificación de un total de 7 polimorfismos situados en regiones intrónicas, UTRs o en el promotor (Tabla 18).

Tabla 17. Pacientes con HH sin el genotipo C282Y/C282Y o el genotipo C282Y/C282Y

Paciente	Sexo	edad	Edad Diagn.	C282Y	H63D	Tratamiento Flebotomias	Biopsia Hepática (HII)	Síntomas	Familiares ^b
1 MLPB	M	48	36	-/-	-/-	si	si (3,6)	Panhipopituitarismo Amenorrea Artritis	Hermana
2 JMO	H	56	46	-/-	-/-	si	si (4,5)	Artritis	
3 FSB	H	62	60	-/-	-/-	si	no	Diabetes	Hermano
4 JACF	H	52	49	-/-	+/-	si	si (0,7)	Asintomático Hemosiderosis hepática	
5 ASJ	H	73	69	-/-	+/-	si	si (2,4)	Disfunción endocrina Cirrosis Hepatomegalia Pigmentación piel Diabetes	
6JTL	H	57	44	-/-	+/-	si ^a	si ^c	Impotencia Talasemia menor	
7 MLM	H	68	55	-/-	-/-	si ^a	si (2,0)	Cirrosis, HCC Talasemia menor	
8 MBG	M	72	66	-/-	+/+	si	si	Cirrosis hepática Transplante hepático	
9 CAR	M	74	51	-/-	-/-	si	si (2,6)	Cirrosis hepática	

Sexo: M: mujer, H: hombre. IHH: índice de hierro hepático. HCC: hepatocarcinoma.

^a intolerancia a las flebotomías por talasemia menor. ^b familiares con síntomas o signos de sobrecarga de hierro.

^c Biopsia hepática realizada fuera del Hospital Clínico.

La identificación de una parte previamente no descrita del gen HFE, en el 3'UTR, (ver apartado 2.3), a parte de completar la caracterización básica del gen, abría la posibilidad de la

presencia de nuevas mutaciones en esta zona no descrita y por lo tanto no secuenciada en aquellos pacientes con HH y sin los genotipos C282Y/C282Y o C282Y/H63D. La HH es debida principalmente a la mutación C282Y del gen HFE que impide la unión con la proteína β -2MG y el transporte del complejo a la membrana (Waheed *et al.*, 1997), por lo que la mutación anula la función de la proteína. Se ha descrito que mutaciones en el 3'UTR pueden producir un mRNA más inestable o interferir en el procesamiento y la exportación citoplasmática del mRNA, estos mecanismos impiden una adecuada traducción y dan lugar a unos niveles nulos o bajos de la proteína (Conne *et al.*, 2000). Por tanto, una mutación en el 3' UTR del gen podría explicar la aparición de Hemocromatosis en pacientes sin las mutaciones C282Y o H63D. A pesar de esto, la secuenciación de esta zona 3' UTR no ha resultado en la detección de ninguna mutación causante de Hemocromatosis y solo se ha identificado el polimorfismo C-T en la posición 760 del exón 7 (Tabla 18).

Las variantes del gen HFE -467 G/C, -410 A/C, IVS2+4 T/C y exón 7 +124 G/C así como sus frecuencias en la población general han sido descritas en el artículo 2 incluido en la presenta tesis y titulado: *Hereditary Hemochromatosis in Spain. Genetic Testing 2000; 4 (2):171-6.*

Tabla 18. Variantes del gen HFE detectados en pacientes sin genotipo C282Y/C282Y o C282Y/H63D.

	Promotor		Exón 2	Intrón 2	Exón 4	Intrón 4		Exon 7-3'UTR	
	-467 G-C	-410 A-C	H63D C-G	IVS2+4 T-C	C282Y G-A	IVS4-50 A-G	IVS4-44 T-C	G-C base 124	C-T base 760
1 MLPB	G/C	A/A	C/C	T/C	G/G	G/G	T/C	G/G	T/T
2 JMO	G/C	A/A	C/C	T/C	G/G	G/G	T/T	G/C	C/T
3 FSB	G/G	A/C	C/C	T/C	G/G	G/G	T/T	G/G	C/C
4 JACF	G/G	A/A	C/G	C/C	G/G	G/G	T/T	G/C	C/C
5 ASJ	G/C	A/A	C/G	T/C	G/G	G/G	T/T	G/G	C/C
6 JTL	G/G	A/A	C/G	T/C	G/G	G/G	T/T	G/G	C/T
7 MLM	G/C	A/A	C/C	T/T	G/G	G/G	T/T	G/G	T/T
8 MBG	G/C	A/A	G/G	C/C	G/G	G/G	T/T	G/G	C/C
9 CAR	G/G	A/A	C/C	T/T	G/G	G/G	T/T	G/G	C/T

IVS intron variant sequence

El polimorfismo -410 A/C presente en la región promotora del gen HFE y detectado en estado heterocigoto tanto en un paciente español de HH como en uno italiano fue estudiado más a fondo debido a que existía un elemento de transcripción predicho (HFH2, *hepatic factor homologue 2*) en la zona. Mediante experimentos de *band-shift* o retardo en gel se estudió si la presencia del polimorfismo podía afectar a la transcripción del gen HFE alterando la unión de proteínas reguladoras de la de transcripción. El experimento consistió en la creación de dos sondas una con la mutación y la otra sin ésta y la realización del *band-shift* con extractos nucleares de riñón de rata. Los resultados revelaron dos bandas de retardación en el gel que indican la unión de proteínas nucleares a la sonda, sin embargo ambas bandas se detectaron también en la sonda mutada y ésta competía en frío específicamente por el extracto nuclear lo que indica que el cambio no altera la unión de las proteínas nucleares a la sonda en las condiciones del experimento (Fig. 13). Por lo tanto podemos concluir que la presencia del

polimorfismo -410 A/C presente en la región promotora del gen HFE no afecta la unión de extractos nucleares a la región en las condiciones del experimento.

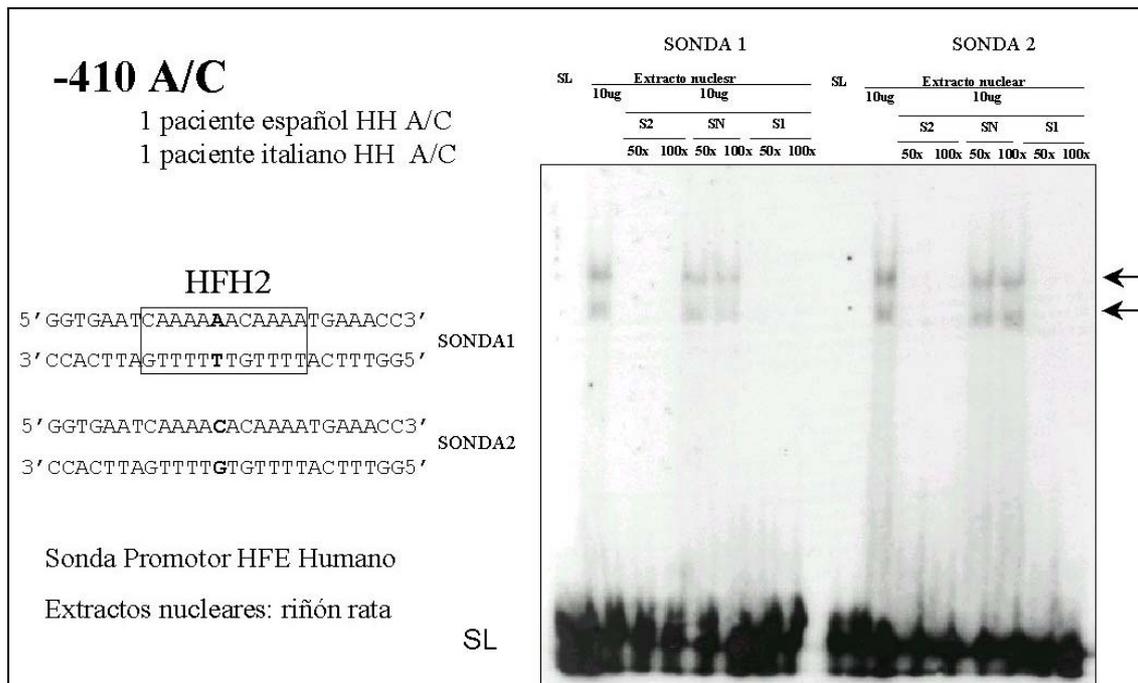


Figura 13. Experimento de retardo en gel del polimorfismo -410 A/C del promotor del gen HFE.

En colaboración con el grupo italiano de Dr. Antonello Pietrangelo (Moneda, Italia) se secuenciaron 896 pb del gen HFE que comprenden a 588 pb de la zona promotora más el exón 1 (5' UTR y codificante) en 25 pacientes italianos de HH sin las mutaciones C282Y ni H63D. Un cambio en heterocigosis en el 5' UTR -48 C/G se detectó de uno de estos pacientes (Fig. 14). Este cambio no fue detectado en 100 cromosomas de donantes de sangre ni ha sido descrito anteriormente. La presencia de esta variación fue comprobada mediante PCR seguida de digestión enzimática con el enzima MwoI (Fig. 14).

En este paciente no se tiene constancia de la presencia de ninguna otra mutación en el gen HFE. En la literatura se han descrito otros dos casos de pacientes con Hemocromatosis Hereditaria en los que sólo se ha detectado una mutación en heterocigosis (mutación R330M y mutación P160ΔC, ver tabla 5 página 33) (de Villiers *et al.* 1999a; Pointon *et al.*, 2000). Ante la falta de detección de una segunda mutación en el gen HFE en estos casos, se puede hipotetizar que mutaciones en otros genes podrían contribuir a la aparición de la enfermedad en sinergismo con mutaciones en heterocigosis halladas en el gen HFE o que en ciertos casos mutaciones en heterocigosis en el gen HFE puedan actuar de forma dominante.

La mutación -48 C/G coincide con un potencial elemento regulador llamado caja C/G que une al factor de transcripción Sp1. Este elemento regulador ha sido recientemente implicado, en estudios preliminares, en la transcripción del gen HFE (BIOIRON 2001, Mura *et al.*, 2001). Por lo tanto este cambio podría estar implicado en la disminución de la transcripción del gen HFE y representar una nueva mutación no descrita o en su defecto un polimorfismo de baja frecuencia.

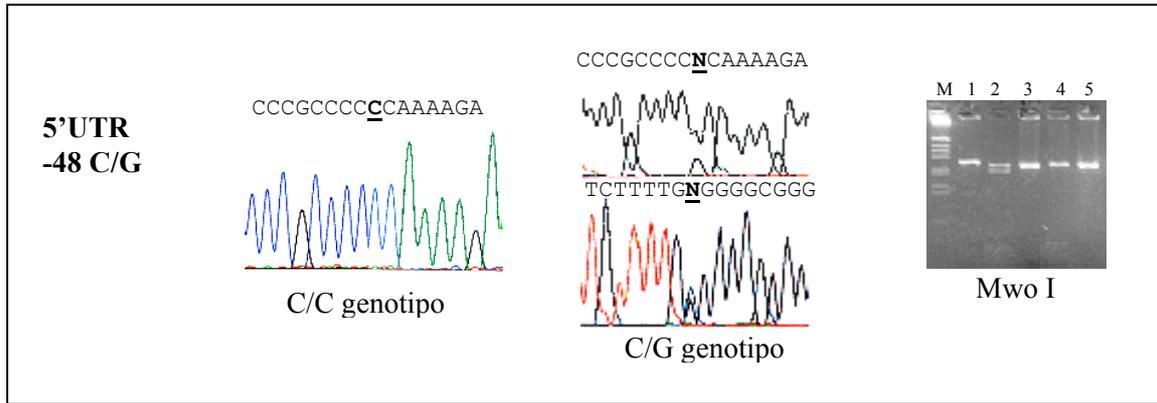


Figura 14. Variante -48 C/G hallada en un paciente italiano con HH. Gel agarosa: M: marcador 1kb, 1,3,4 y 5: controles, 2: paciente Italiano sin las mutaciones C282Y o H63D del gen HFE.

Recientemente se ha descrito la existencia de otros tipos de Hemocromatosis (HFE3 y HFE4) con mutaciones en el gen TFR2 y FPN1, respectivamente (ver sección I.2.3 y I.2.4). La clínica que presentan los pacientes descritos con Hemocromatosis tipo 3 y 4 es muchas veces muy similar a una Hemocromatosis Hereditaria tipo 1, por lo que se abordó la secuenciación de dichos genes en nuestros 9 pacientes que no presentaban el genotipo C282Y/C282Y o el C282Y/H63D. La zona codificante de estos genes, así como la región flanqueante exónica-intrónica se secuenció en estos pacientes en busca de posibles mutaciones que pudiesen explicar la clínica que presentan.

La secuenciación del gen FPN1 en nuestros pacientes sin el genotipo C282Y/C282Y o C282Y/H63D del gen HFE reveló la presencia de 4 polimorfismos: una repetición del trinucleótido (CGG)_n presente en la zona 5' al exón 1, 2 polimorfismos en la región 5' UTR (exón 1) y una mutación sinónima V221V presente en el exón 6 del gen FPN1 (Tabla 19). El estudio de las frecuencias poblacionales de estos polimorfismos se abordó mediante análisis por SSCP (V221V, Fig. 15) y PCR seguida de digestión enzimática (polimorfismos -98 G-C y -8 C-G). Las frecuencias alélicas de los distintos polimorfismos no difieren significativamente entre el grupo de controles y el de pacientes.

Tabla 19. Variantes del gen FPN1 detectados en pacientes sin el genotipo C282Y/C282Y o C282Y/H63D.

	5'	5' UTR Exón 1		Exón 6
	(CGG) _n	-98 G-C	-8 C-G	V221V C-T
1 MLPB	8-8	G/G	C/C	C/T
2 JMO	8-7	G/C	G/G	C/T
3 FSB	7-7	G/C	C/G	C/T
4 JACF	8-7	G/G	C/C	C/C
5 ASJ	8-7	G/C	G/G	T/T
6 JTL	8-7	G/G	C/C	C/T
7 MLM	8-8	G/G	C/C	C/C
8 CAR	8-7	G/G	C/C	C/T
9 MBG	8-7	G/C	G/G	C/T

La secuenciación del gen TFR2 reveló la presencia de 2 polimorfismos intrónicos (IVS4+41 C/G y IVS9+90 C/G) sin que se detectasen cambios en la regiones codificantes.

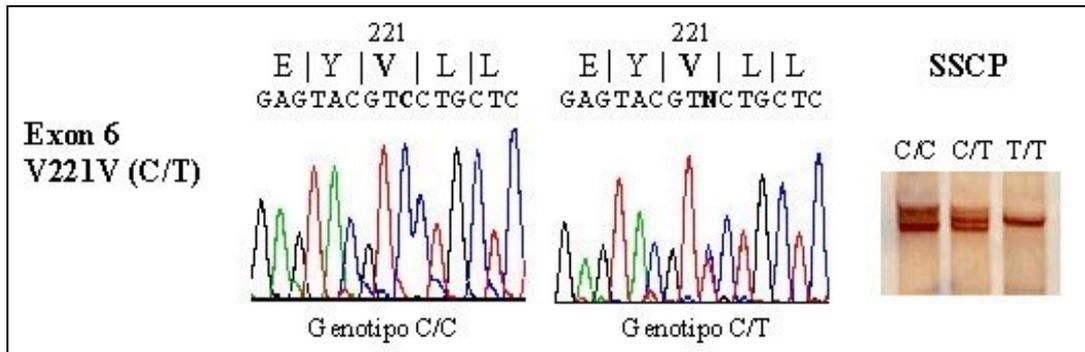


Fig. 15. Detección de la mutación sinónima V221V del exón 6 del gen FPN1.

Otros trabajos donde también se ha estudiado los genes TFR2 y FPN1 en pacientes sin un genotipo descrito como causante de Hemocromatosis tampoco han revelado la presencia de nuevas mutaciones que pudiesen explicar la clínica de estos pacientes (Aguilar-Martínez *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2001). En estos estudios se ha concluido que las mutaciones detectadas en el gen TFR2 y el gen FPN1 son poco frecuentes y exclusivas de ciertas familias y/o individuos. Otros genes candidatos del metabolismo del hierro como la ceruloplasmina, el TFR clásico, la β 2M y las ferritinas H y L también han sido estudiados en pacientes con sobrecarga de hierro y sin mutaciones en el gen HFE; no obstante hasta la fecha no se ha descrito ninguna mutación en estos genes causantes de la sobrecarga de hierro de estos pacientes (Beutler, 2001). Por lo tanto todavía queda por identificar la causa genética de la sobrecarga de hierro en unos pocos pacientes de HH, y queda abierta la posibilidad de que mutaciones en otros genes implicados en el metabolismo de hierro (conocidos o no) den lugar a una Hemocromatosis.

2.-Estudio del gen HFE

2.1.-Estudio de la región promotora del gen HFE en humano, rata y ratón.

Como inicio al estudio de la HH desde una vertiente más básica nos planteamos el estudio y caracterización de la zona promotora del gen HFE en distintas especies. Debido a la estrategia seguida para descubrir el gen responsable de la HH en la que se secuenciaron 250 kb de la zona del cromosoma 6 donde liga la enfermedad, ya se disponía de una amplia región secuenciada que comprendía la región promotora del gen HFE en la especie humana, pero al iniciar el estudio no se disponían de la secuencia promotora del gen HFE en rata ni en ratón, por lo que nos propusimos clonar y secuenciar esta región en rata y ratón.

Para la clonación y secuenciación de la región promotora del gen HFE en rata y ratón se siguió una estrategia llamada *Promoter Finder Construction* en la que se crea unas genotecas de DNA cortadas con diferentes enzimas de restricción que crean extremos romos (EcoRV, DraI, PvuII, StuI y ScaI); a este DNA se le liga unos adaptadores y se realiza unas amplificaciones por *touch-down* PCR con *primers* situados en el adaptador y *primers* situados en la región más 5' conocida.

Mientras se llevaba a cabo esta estrategia apareció publicada la secuencia de ratón de la zona promotora (GenBank número AF007558) por lo que nos centramos más en conseguir la de rata.

Mediante la estrategia descrita se obtuvieron 3 bandas de productos de PCR de 2.8, 1.6 y 1.4 kb correspondientes a la zona promotora de rata. Se clonaron y secuenciaron 1398 pb correspondientes a la zona promotora de rata del gen HFE y previamente no descritos. La secuencia fue introducida en el GenBank con el número de acceso AJ005007.

Una vez obtenida la secuencia de rata se procedió a un análisis comparativo de las secuencias promotoras de rata, ratón y humano. Mediante herramientas computacionales de predicción de factores de transcripción (programas MatInspector, <http://transfac.gbf.de/cgi-bin/matSearch/matsearch.pl>, y SignalScan, <http://bimas.dcrf.nih.gov/molbio/signal/>) se analizaron y compararon 1000 pb de las secuencias de humano, rata y ratón desde la secuencia del ATG hacia el 5'. Este análisis reveló la presencia de elementos de regulación génica, identificándose 10 elementos reguladores conservados (GATA, NF-IL6, AP1, AP2, CREB, PEA3, γ -IRE, GFI1, HNF-3 β y HFH2).

A continuación se pasó a realizar experimento de *band-shift* o de retardo en gel para determinar si la presencia de algunos de estos elementos reguladores detectados computacionalmente en la secuencia promotora de rata eran reconocidos por proteínas procedentes de extractos nucleares de hígado de rata. Para ello se diseñaron 7 parejas de oligonucleótidos que fueron utilizadas como sondas en los experimentos de *band-shift* (ver A1.4). La especificidad del retardo en gel se demostró por competencia con sondas no marcadas y con sondas de tamaño parecido pero secuencia diferente (sondas inespecíficas). Cuatro de estas parejas de oligonucleótidos revelaron una unión específica de proteínas nucleares, estas cuatro sondas contiene la secuencia de DNA necesaria para la unión de los siguientes factores de transcripción predichos: γ -IRE, GATA, HFH2, AP1, CREB y NF-IL6.

Todos estos resultados se han publicado en el artículo 3 que se incluye en la presente tesis titulado: *Cloning, sequencing and characterization of the rat HFE promoter. Comparison of the human, mouse and rat hemochromatosis HFE promoter regions. Gene 1998; 225: 77-87.*

Los elementos reguladores de unión a la familia de factores de transcripción GATA identificados en el promotor del gen HFE humano y de roedor por análisis computacional, así como en nuestros experimentos de retardo en gel con sondas correspondientes al promotor de rata, también han sido implicados en la regulación de la transcripción del gen HFE en estudios preliminares realizados por otro grupo y recientemente presentados en el congreso BIOIRON 2001 (Mura *et al.*, 2001).

Debido a la homología estructural de la proteína HFE con las proteínas del MHC de clase I se comparó la región promotora del gen HFE humano con los promotores de los genes del MHC de clase I clásico HLA-A2, HLA-B39 y HLA-Cw1 y con el promotor del gen del MHC de clase I no clásico HLA-G (Fig. 16) (Números de GenBank utilizados: L36528, 82912, M16272, L36549 y Z92910). La alineación de todas estas secuencias promotoras revelaron que los elementos reguladores típicos de los genes del MHC de clase I clásicos están o bien mutados (enhancer B, Fig. 16) o bien delecionados (enhancer A y secuencia IRS, Fig. 16) tanto en el promotor del gen HLA-G como en el promotor del gen HFE. Por lo tanto, a pesar de la similitud

a nivel de estructura proteica del gen HFE humano con los genes del MHC de clase I clásicos, la regulación transcripcional del gen HFE no está mediada por las cajas reguladoras descritas en los genes del MHC de clase I clásicos.

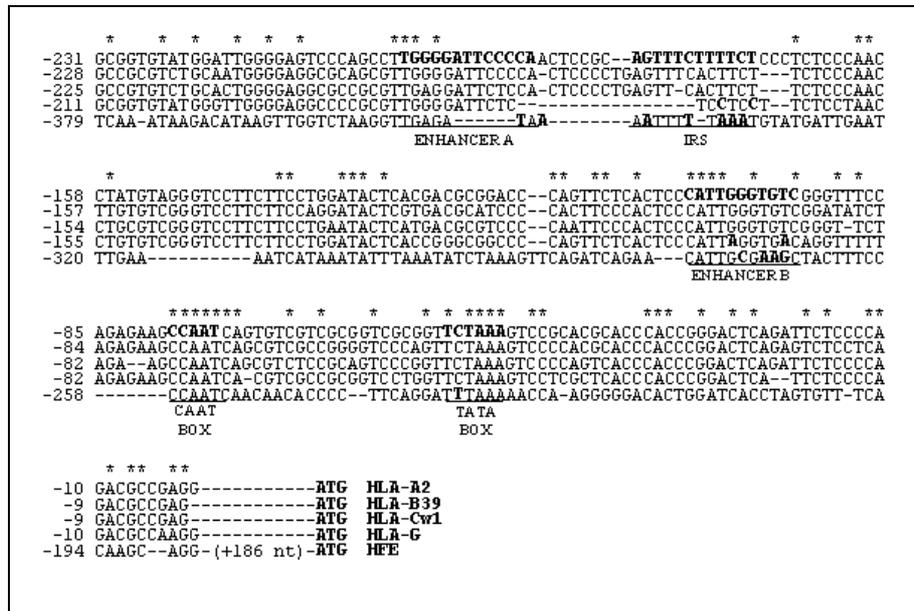


Figura 16. Comparación de las regiones promotoras de los genes del MHC de clase I clásicos HLA-A2, HLA-B39 y HLA-Cw1 y los genes del MHC de clase I no-clásicos: HLA-G y HFE. Los nucleótidos en negrita de la secuencia del HLA-A2 indican la presencia de secuencias reguladoras (TATA box, CAAT box, enhancer A y B y secuencia IRS, *interferon response sequence*). Los nucleótidos en negrita de las secuencias del HLA-G y del HFE indican la presencia de cambios en las cajas reguladoras. La posición de los nucleótidos se indica con referencia al ATG (A = +1).

Para continuar con el estudio del promotor del gen HFE se llevó a cabo experimentos de *Reporter Gene* con luciferasa en colaboración con el laboratorio del Dr. Gabriel Pons y del Dr. Joan Gil del departamento de Ciencias Fisiológicas II, Campus de Bellvitge, Universidad de Barcelona. En este estudio se diseñaron y clonaron 3 fragmentos de 685, 1151 y 1505 pb que comprendían al 5' UTR y la región promotora del gen HFE humano. El vector utilizado fue pGL2Basic (Promega), el método de transfección fue por fosfato calcio en células de la línea celular HepG2, comúnmente utilizadas como modelo de células de hígado. En el esquema de la figura 17 se pueden apreciar las construcciones realizadas y el resultado del estudio de *Reporter Gene*.

En el experimento se puede observar como las construcciones más pequeñas presentan por sí sola una actividad promotora mayor, lo que apunta hacia la existencia de regiones represoras en las regiones más alejadas del inicio de transcripción. Este resultado concuerda con los resultados preliminares presentados por un grupo independiente en el congreso BIOIRON 2001 (Mura *et al.*, 2001). Este grupo obtuvo la máxima actividad promotora en su ensayo de *Reporter gene* con luciferasa también con su construcción más pequeña (558 pb).

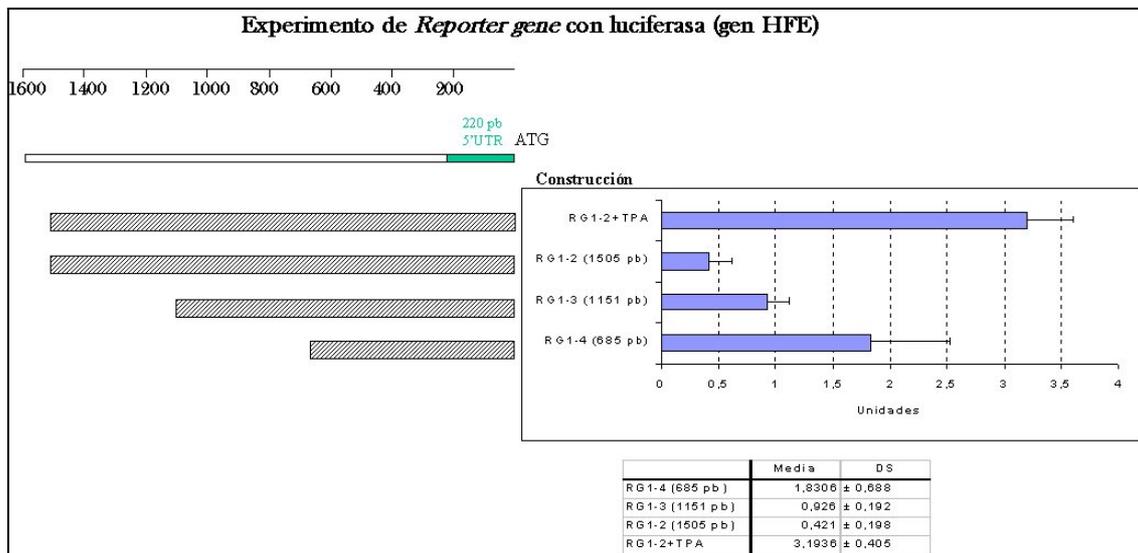


Figura 17. Experimento de *Reporter gene* con luciferasa en el promotor del gen HFE humano. DS: desviación standard.

Debido a que los ésteres de forbol han sido descritos como activadores génicos de genes del MCH de clase I y II (Brockmann *et al.*, 1999; Setterblad *et al.*, 1998) quisimos analizar que efecto producían sobre la actividad promotora del gen HFE. Así pues la construcción más larga (1505 pb) fue también analizada tras la incubación de las células con 100 nM de TPA (*12-O-tetradecanoyl-13-phorbol acetate*) durante 7 horas. Nuestro experimento confirma el papel de activador génico del TPA ya que la construcción incubada con TPA presenta la mayor actividad promotora.

El mecanismo por el cual se ha descrito la activación de genes del MHC de clase I y II por ésteres de forbol es vía la inducción de la expresión del factor de transcripción AP1 por PKC (Brockmann *et al.*, 1999; Setterblad *et al.*, 1998). En la región promotora del gen HFE humano y de roedor hemos predicho la existencia de elementos reguladores de unión a AP1 y experimentos de retardo en gel en secuencias del promotor de rata han revelado la unión de proteínas nucleares a sondas que contienen estos elementos AP1 (sondas B y D del artículo 3). Por lo tanto la activación génica del gen HFE por el éster de forbol TPA podría realizarse por la misma vía descrita para los genes del MHC de clase I y II.

2.2.-Formas de *splicing* del gen HFE

La estructura del gen HFE humano se ha descrito en comparación con su homología con las proteínas HLAs, así pues la parte transcrita del exón 1 codificaría para un péptido *leader*, los exones 2, 3 y 4 corresponderían a los dominios de inmunoglobulina $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$, el exón 5 comprendería al domino transmembrana y la zona traducida del exón 6 sería la cola corta citoplasmática. Los dominios $\alpha 2$ y $\alpha 3$ en las moléculas del HLA tienen la función de presentar péptidos antigénicos a las células T.

En la actualidad se conocen la existencia de diferentes formas de *splicing* alternativo del gen HFE humano (Rhodes *et al.*, 1999; Jeffrey *et al.*, 1999b; Thénie *et al.*, 2000). Las formas de *splicing* descritas consisten principalmente en la eliminación de exones enteros. En la presente

tesis se describe la detección de 5 formas de *splicing* alternativos del gen HFE (3 de las cuales, AJ249335, AJ250635 y AJ249338, no habían sido previamente descritas) detectadas tras la retrotranscripción de mRNA de células HepG2, línea celular comúnmente utilizada como modelo de células de hígado (Fig. 18). Todas las formas de *splicing* detectadas fueron introducidas en la base de datos del GenBank (números de accesos: AJ249335, AJ249336, AJ249337, AJ249338 y AJ250635).

La forma de *splicing* descrita por Jeffrey y colaboradores (1999b) que carece del exón 5 y por lo tanto de la región transmembrana de la proteína dando lugar a una proteína soluble, no ha sido detectada en los análisis de RT-PCR realizados en células HepG2.

Actualmente se desconoce si estas formas de *splicing* descritas presentan algún papel biológico en el metabolismo del hierro y es posible que estas 3 nuevas formas de *splicing* descritas sean específicas de la línea celular HepG2.

Estos resultados fueron publicados en el artículo presente en esta tesis que lleva por nombre: *Complete characterization of the 3' region of the human and Mouse Hereditary Hemochromatosis Gene and detection of novel splicing forms. Blood Cells, Molecules and Diseases 2001; 27: 35-43.*

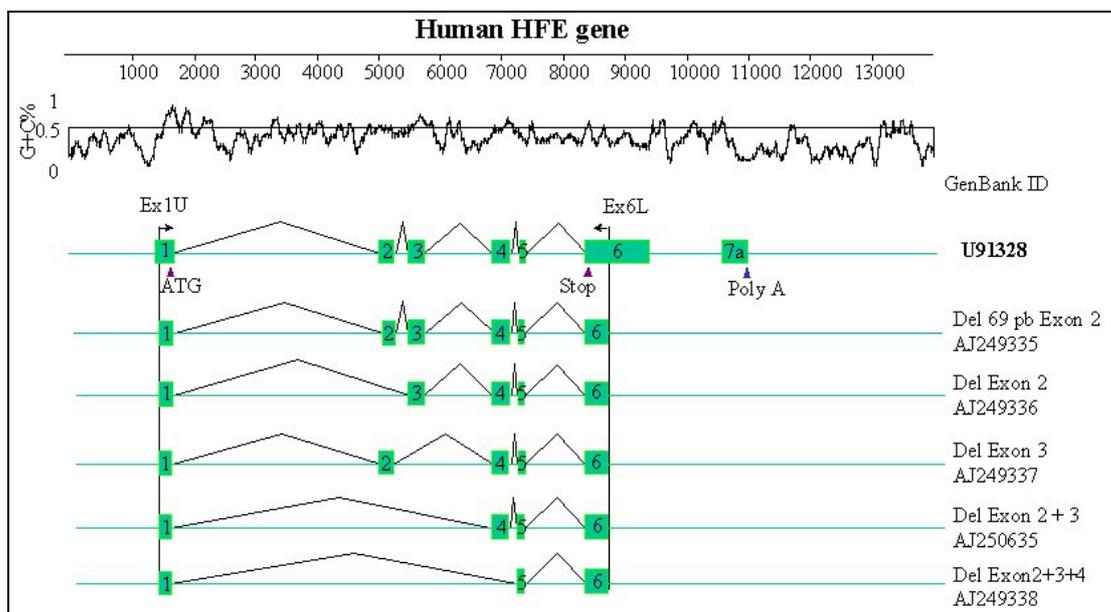


Figura 18. Formas de *splicing* del gen HFE detectadas en la línea celular HepG2.

2.3.-La región 3' UTR del gen HFE en humano y ratón.

En el artículo del descubrimiento del gen HFE: Feder *et al.*, (1996) *A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. Nature Genet.* 13: 399-408 se presenta un *Northern Blot* con diversos tejidos humanos y se precisa que el tamaño del mRNA es de 4,1 kb, posteriores trabajos han reportado incluso tamaños mayores (6,1 kb y 5,7 kb) y nuestros experimentos de *Northern Blot* también han detectado una banda mayoritaria de 4,2 kb utilizando una sonda específica de la zona codificante del gen HFE. Teniendo en cuenta que el cDNA depositado en la base de datos era de solo 2,7 kb (GenBank número U60319) quedaban por descubrir como mínimo 1,4 kb del mRNA del gen HFE, que podrían estar

presentes tanto en el 5' UTR como en 3'UTR del gen. Por otro lado la secuencia descrita de ratón (AF007558) no presentaba la señal de poliadenilación lo que supone que la secuencia tampoco estaba completa.

A partir de estos datos nos propusimos extender el gen HFE en humano y en ratón, para lo cual se empezó por comparar la secuencia genómica presente en el banco de datos (humana: U91328, ratón: NM010424) con la base de datos de EST (*Expressed sequence tags*) del GenBank usando el programa BLASTN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>). Previamente a la comparación de las secuencias con el GenBank se ocultaron o enmascararon las secuencias repetitivas para evitar obtener EST que contuviesen secuencia repetitiva, para ello se utilizó el programa Repeat Masker (<http://ftp.genome.washington.edu/cgi-bin/RepeatMasker>). La comparación con la base de datos reveló una serie de ESTs tanto en humanos como en ratón.

En humanos se detectaron 3 ESTs (AI760080, AI290427 y AI278822) que distaban del final del exón 7 entre 648 pb a 1054 pb. Estos ESTs fueron comprados al consorcio I.M.A.G.E (<http://image.llnl.gov/>) y fueron totalmente secuenciados en un secuenciador LICOR 4000L obteniéndose un contigo de 1246 pb que se encontraba a 267 pb del final del exón 7. A continuación se diseñaron *primers* para comprobar si la secuencia de los ESTs pertenecía al gen HFE en forma de un nuevo exón o pertenecía al exón 7, para ello se diseñaron 2 *primers* (ver A1.3) uno en la zona del contigo de ESTs y otro en el exón 6 y se realizaron experimentos de RT-PCR. Por RT-PCR se detectó una banda de 1205pb correspondiente a la secuencia del cDNA en todos los tejidos analizados (bazo, testículo, hígado, músculo, intestino delgado, intestino grueso, páncreas, pulmón, leucocitos, riñón y la línea celular HepG2), la amplificación procedente de bazo y riñón fueron clonadas y secuenciadas. Además se diseñaron *primers* (ver A1.3) para la realización de experimentos de 3' RACE que confirmasen la existencia de esta nueva región del cDNA del gen HFE (Fig. 18) y se realizaron varios *Northern Blots* con sondas correspondientes a los nuevos ESTs y a la zona codificante. Por lo tanto mediante la combinación de estas estrategias, búsqueda de ESTs mediante BLAST, RT-PCR, 3'-RACE (*rapid amplification of cDNA ends*) y *Northern Blot*, se consiguió alargar la parte 3'UTR del gen HFE humano en 1512 pb previamente no identificadas, con lo que el exón 7 del gen HFE humano pasó de tener 432 pb a tener 1944 pb, siendo el exón más largo y presentando dos secuencias consensos de señal de poliadenilación (la primera AATAAA en la base 411 a la 416 del exón 7 y la segunda ATTAAA en la base 1923 a la 1928 del exón 7) (Fig. 19). Esta nueva secuencia fue registrada en el banco de datos del GenBank con el número AJ404378.

En humano la técnica de 3'-RACE permitió además descubrir dos nuevas formas de terminación del gen HFE ambas en el exón 6 (Fig. 19). La forma 6a se adentra 427 pb en el intrón 6 y presenta una secuencia AATAAA de señal de poliadenilación (GenBank número: AJ298839). La segunda forma (forma 6b; GenBank número: AJ298840) se adentra en el intrón 6 286 pb, presenta dos posibles secuencias de señal de poliadenilación ambas con secuencia AATAAA y mediante análisis comparativo BLAST con la base de datos de los ESTs se detectaron varias secuencias correspondientes a ESTs de glioblastoma con idéntica terminación, lo que reafirma la existencia de esta forma.

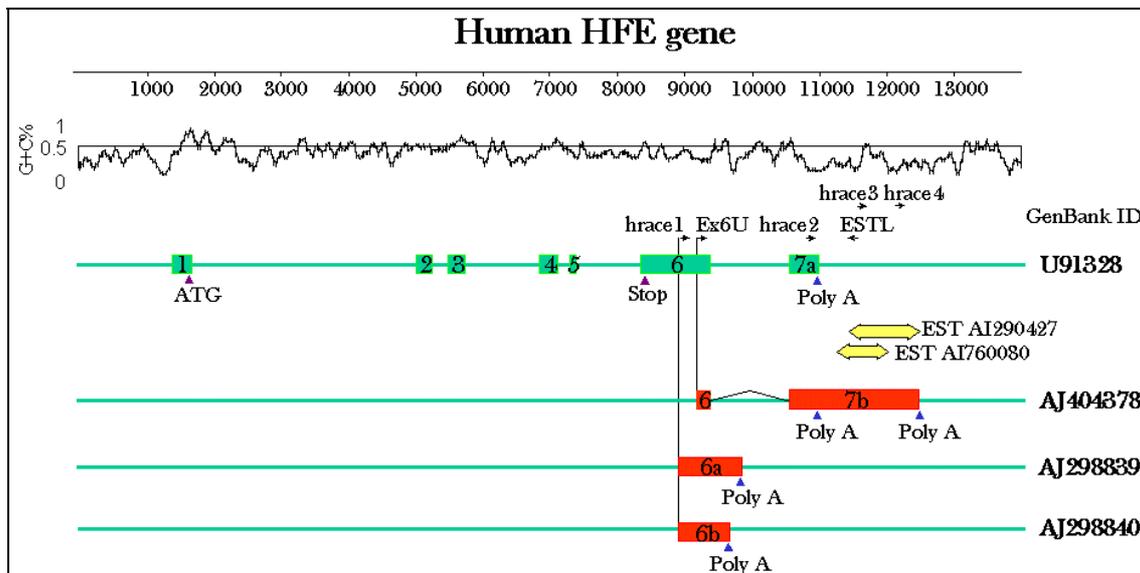


Figura 19. Representación esquemática del gen HFE humano con las nuevas secuencias descritas.

En ratón mediante experimentos de 3'-RACE se alargó la secuencia del último exón, en este caso el exón 6, en 167 pb y se identificó la secuencia de poliadenilación previamente no descrita, secuencia AATAAA en la base 558 del exón 6 (Fig. 20). Esta nueva secuencia fue registrada en el banco de datos del GenBank con el número AJ298838.

Estos resultados fueron publicados en el artículo presente en esta tesis que lleva por nombre: *Complete characterization of the 3' region of the human and Mouse Hereditary Hemochromatosis Gene and detection of novel splicing forms. Blood Cells, Molecules and Diseases 2001; 27: 35-43.*

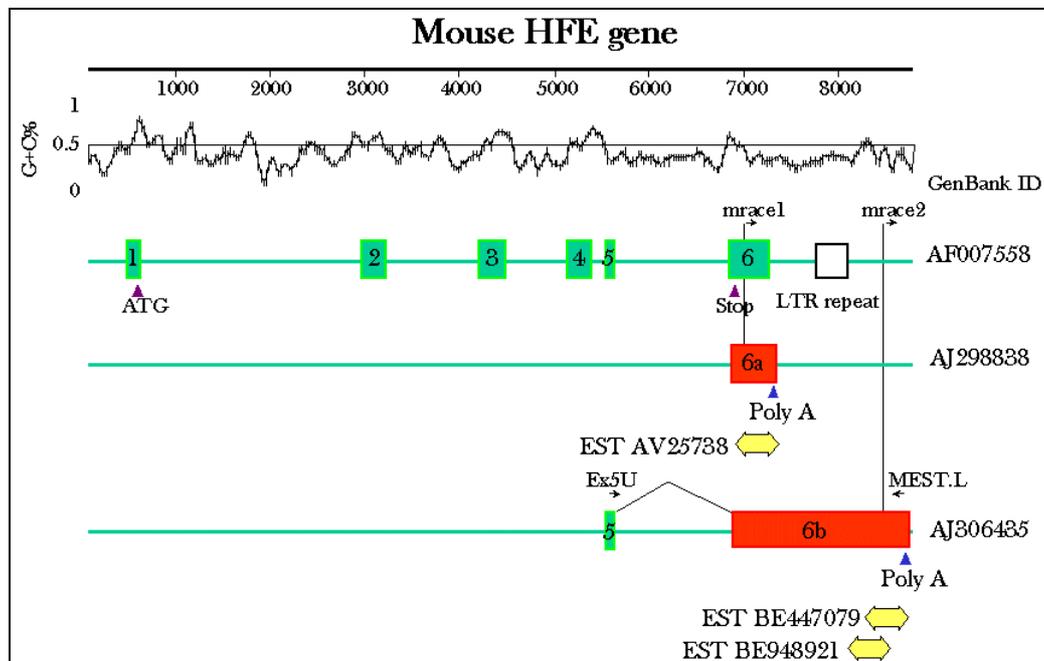


Figura 20. Representación esquemática del gen HFE murino con las nuevas secuencias descritas.

Con posterioridad se han identificado nuevos EST de ratón (BE447697, BE447079 y BE948921) que han permitido alargar aún más el 3'UTR de ratón en 1823 pb adicionales mediante RT-PCR a partir de un *primer* situado en el exón 5 (Ex5.U) y de otro situado en la zona de estos nuevos ESTs (MEST.L) partiendo de RNA de hígado (Fig. 20 y 21). También se realizaron experimentos de 3' RACE (*primers*: mrace1, mrace2) para verificar y completar la secuencia. En conclusión, el exón 6 del gen HFE murino presenta un total de 2401 pb y dos señales de poliadenilación. Esta nueva secuencia fue registrada en el banco de datos del GenBank con el número AJ306435.

Esta nueva secuencia del gen HFE en murino (forma 6b Fig. 20) fue presentada en el póster: *Extending Human and Mouse Hereditary Hemochromatosis HFE mRNA*, presentado en el congreso BIOIRON 2001 celebrado en Cairns, Australia.

En el apéndice A2 se presentan dos tablas (tabla A2.1 y A2.2) donde se describen los ESTs humanos y murinos presentes en la región del gen HFE y detectados mediante el programa BLAST utilizando la base de datos de ESTs (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

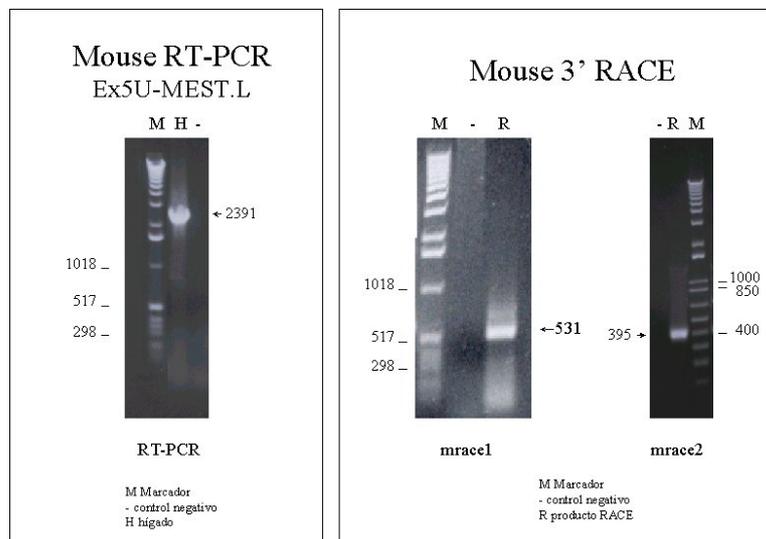


Figura 21. RT-PCR y 3'RACE en el gen HFE de ratón.

La identificación de todas estas nuevas secuencias pertenecientes al gen HFE humano y murino ha permitido completar la caracterización básica del gen en ambas especies. La alta complejidad de formas de *splicing* presentes en el mRNA del gen HFE, la existencia de diferentes colas 3'UTR y el bajo grado de expresión del gen en todos los tejidos hace muy difícil la asignación de una forma concreta a las bandas detectadas por *Northern Blot*, muchas de estas formas descritas pueden ser minoritarias, y no se saben si presentan alguna relevancia a nivel de estabilidad del mRNA o a nivel proteico.

3.-Líneas de futuro

La presentación y exposición de un trabajo experimental siempre abre nuevas hipótesis que corroborar y que permitan avanzar en el conocimiento del tema que se investiga.

En la presente tesis se describe la mutación C282Y en homocigosis como la causa principal de la Hemocromatosis Hereditaria. No obstante también se han descrito 9 pacientes en los que no se presenta ninguno de los dos genotipos asociados con la enfermedad (C282Y/C282Y y C282Y/H63D). La secuenciación del gen HFE y de los genes TFR2 y FPN1 no han resultado en la detección de nuevas mutaciones que puedan explicar la aparición de la enfermedad. Actualmente se está llevando a cabo unas campañas de recolección de pacientes con iguales características y de sus familiares. En estos casos se pretende realizar estudios de asociación con microsatélites de los cromosomas donde se encuentran los genes HFE, TFR2 y FPN1 para analizar si la enfermedad cosegrega con marcadores cercanos a alguno de estos genes y acotar de esta forma el gen responsable de estos casos. Hay que tener en cuenta que la existencia de una penetrancia incompleta de la enfermedad dificulta este tipo de estudios, ya que hermanos jóvenes de pacientes afectos podrían ser también afectos y ser asintomáticos en el momento del estudio. Tampoco se descarta la posibilidad de analizar en estos pacientes nuevos genes de reciente implicación en el metabolismo del hierro como es el caso de la hepcidina.

Además queda por analizar la posible alteración de la transcripción del gen HFE producida por la mutación -48 C/G y hallada en un paciente italiano con Hemocromatosis Hereditaria.

Otra línea de investigación que también se quiere abordar es el estudio de la expresión de los genes implicados en el metabolismo del hierro como factores contribuyentes a una expresión fenotípica diferencial de la Hemocromatosis en pacientes que presentan un mismo tipo de mutación en el gen HFE. Para estos análisis se pretende recurrir a estudios con microarrays en tejidos de biopsias hepáticas, duodenales y muestras sanguíneas.

La caracterización de la región promotora del gen HFE presentada en esta tesis pretende ser un primer paso para profundizar en la regulación génica del gen HFE. De igual manera los experimentos de *Reporter gene* presentados y la activación por TPA del gen HFE en la línea celular HepG2 deben ser complementados con más estudios que revelen la concreta identidad de los factores de transcripción implicados y que resuelvan las hipótesis que se han formulado al respecto en esta tesis.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- 1.- En España la Hemocromatosis Hereditaria está causada principalmente por mutaciones en el gen HFE (91,6% de 107 pacientes con HH analizados). Un 69,2% de pacientes españoles afectados de Hemocromatosis Hereditaria presentan la mutación C282Y del gen HFE en homocigosis y un 22,4% son heterocigotos compuestos para las mutaciones C282Y y H63D del gen HFE.
- 2.- La frecuencia alélica poblacional de la mutación C282Y del gen HFE en 5370 donantes de sangre es del $3,16\% \pm 0,34\%$. Esta frecuencia permite realizar una estimación para España de 1 individuo homocigoto para la mutación C282Y del gen HFE de cada 1004 y de 1 individuo portador de la mutación C282Y de cada 16.
- 3.- La frecuencia alélica poblacional de la mutación H63D del gen HFE en 5370 donantes de sangre es del $20,80\% \pm 0,78\%$. Esta frecuencia es una de las más altas que se han descrito en todo el mundo.
- 4.- El estudio de las mutaciones C282Y y H63D del gen HFE en un total de 5370 donantes de sangre permitió identificar a 8 homocigotos para la mutación C282Y y a 74 heterocigotos compuestos para las mutaciones C282Y y H63D. Cuatro de los 8 homocigotos detectados presentaban parámetros bioquímicos (ferritina y saturación de transferrina) elevados, tres de los cuales han iniciado el tratamiento. Solo 1 de 74 heterocigotos compuestos presentaba parámetros bioquímicos alterados, lo que permite calcular una penetrancia del genotipo C282Y/H63D del gen HFE respecto a un fenotipo bioquímico alterado del 1,35%.
- 5.- Los valores bioquímicos de ferritina y saturación de transferrina en personas con el genotipo C282Y/C282Y del gen HFE son significativamente más elevados respecto a los valores de los restantes genotipos.
- 6.- La Hemocromatosis Hereditaria presenta una penetrancia incompleta y diferente respecto al sexo afectando en mayor grado a hombres que a mujeres. La penetrancia de la mutación C282Y del gen HFE en homocigosis respecto de un fenotipo de alteración bioquímica es de un 80% en hombres.
- 7.- El genotipo heterocigoto compuesto C282Y/H63D del gen HFE es significativamente más frecuente en pacientes con Hemocromatosis Hereditaria que en nuestra población general.
- 8.- Un 8,4% de pacientes con Hemocromatosis Hereditaria no presentan el genotipo C282Y/C282Y o el genotipo C282Y/H63D del gen HFE descritos como causantes de la enfermedad. En estos pacientes la secuenciación de los genes HFE, Ferroportina 1 (FPN1) y receptor de transferrina 2 (TFR2) no ha revelado la presencia de ninguna mutación que pueda explicar la clínica presente en dichos pacientes, por lo que mutaciones en otros genes implicados en el metabolismo del hierro pueden ser responsables de estos casos.
- 9.- Se ha detectado la mutación -48 C/G situada en la región 5' UTR del gen HFE en heterocigosis en un paciente Italiano con Hemocromatosis Hereditaria y sin las mutaciones C282Y o H63D del gen HFE.
- 10.- El estudio por retardo en gel del polimorfismo -410 A/C situado en la zona promotora del gen HFE y donde estaba predicho la unión del factor de transcripción HFH2 ha revelado la existencia de dos bandas de retardo en gel usando extractos nucleares de rata. Sin embargo, este patrón no se ve alterado por la presencia de uno u otro alelo, por lo que la presencia del

polimorfismo -410 A/C en las condiciones utilizadas *in vitro* no es determinante para la unión de lo o los factores de transcripción que puedan unirse a la zona.

11.- Se han identificado 1398 pb de la región promotora del gen HFE de rata que han sido comparadas computacionalmente con la región promotora del gen HFE de ratón y humana identificándose 10 elementos reguladores conservados (GATA, NF-IL6, AP1, AP2, CREB, PEA3, γ -IRE, GFI1, HNF-3 β y HFH2).

12.- El estudio por retardo en gel de la región promotora de rata del gen HFE ha permitido identificar uniones específicas de proteínas nucleares de rata en regiones con los siguientes elementos de regulación predichos: γ -IRE, GATA, HFH2, AP1, CREB y NF-IL6.

13.- El estudio mediante *Reporter Gene* con luciferasa del promotor humano del gen HFE ha revelado que el fragmento más pequeño analizado (685 pb) presenta la mayor actividad promotora y que la incubación con el éster de forbol TPA incrementa la transcripción génica del gen HFE.

14.- Se han identificado mediante RT-PCR 5 formas de *splicing* alternativo del gen HFE humano en la línea celular HepG2, 3 de ellas previamente no descritas.

15.- En el estudio de la región UTR del gen HFE humano y murino, mediante una estrategia combinada de búsqueda de EST, experimentos de RT-PCR, RACE y *Northern Blots*, se ha extendido las correspondientes regiones 3' UTR en 1512 y 1990 pb de los exones 7 y 6, respectivamente.

16.- A través de experimentos de 3'RACE se han identificado 2 nuevas formas de terminación del gen HFE humano en el exón 6 (6a y 6b).

APÉNDICE

APÉNDICE

Debido al formato de recopilación de artículos en el que se basa la presentación de esta tesis he creído conveniente la introducción de un apartado en forma de apéndice en el que se incluyen una serie de datos y documentos importantes; de esta forma se pretende facilitar la rápida consulta de dichos datos.

Los datos que aquí se presentan son varias tablas en las que se describen los *primers* utilizados para los diferentes experimentos que se describen en esta tesis, además de dos tablas de ESTs (humanos y murinos) identificados mediante la comparación de la región genómica del gen HFE con la base de datos de ESTs utilizando el programa BLAST.

Los documentos incluidos en este apéndice corresponden a un modelo de carta de consentimiento informado utilizada para el estudio de las mutaciones del gen HFE en 5370 donantes de sangre y a los modelos de cartas con los posibles resultados del estudio que fueron enviadas a los participantes.

A1 Tablas de *primers* diseñados

Los *primers* que se describen a continuación fueron diseñados sobre secuencia genómica utilizando el programa OLIGO 4.0 de Machintosh.

A1.1. Tabla de *primers* diseñados para la secuenciación los exones del gen HFE

Primer	Secuencia 5'-3'	Localización	Exón	pb	Ta	Comentarios
HFEExon1.U	AATCAACAACACCCCTTCAG	5'				
HFEExon1.L	AGGTCCTCCAAAGTTAGCAA	IN 1	1	434	61	
HFEExon2.U	GCTCCCCTCCTACTACACAT	IN 1	2	478	61	
HFEExon2.L	GGTCCCTATTTCCACCATCC	IN 2				
HFEExon3.U	AGGGACCTATTCCTTTGGTT	IN 2	3	351	61	
HFEExon3.L	GGGGCAGAAGTGTGTTTCCA	IN 3				
C282Y-F	TGGCAAGGGTAAACAGATCC	IN 3	4	390	60	
C282Y-R	CTCAGGCACTCCTCTCAACC	IN4				
HFEExon5.U	TATGGCAGTGAGATGAGGAT	IN 4	5	230	55	
HFEExon5.L	TAAGAGACTTCCCCTTGTT	IN 5				
HFEExon61.U	ATGCCTCTTTCCTGGGTCTC	IN 5	6	592	57	
HFEExon61.L	GCTTGGTGACAGATGAGTTA	Ex 6				
HFEExon62.U	AACTTTTCTTTGAATCCTC	Ex 6	6	886	57	
HFEExon62.Lnew	CCTGTTTCTATCACTGACAA	IN 6				
HFEExon62.L	CTGGGACTACAGGCGTCTGC	IN 6				Secuenciación exón 6
HFEExon71.U	ATTCTGGGAAATCAGTTCAC	IN 6	7a	581	48	
HFEExon71.L	CTACAATGAGCGTAAATCAC	Ex 7a				
HFEExon7.U	TTTAGTAGAGACAGGGTTTC	IN 6				Secuenciación exón 7
HFEExon72.U	CAGGTGCTTCAGGATACCATA	Ex 7a	7	898	58	
HFEExon73.L	GAATGGTTTTGCCAGAGGTGAATA	Ex7b				
HFEExon74.U	ACATTGTCGTCTAAGTTGTAAG	Ex7b	7	1522	58	
HFEExon75.L	AGATTCAGAACACAGCCTAATA	3'				
HFEExon7.L	CCGTAAGACAAAATGTAAAG	Ex7b				Secuenciación exón 7
HFEExon72.L	AATAAATGTCTCCAAAATGAC	Ex7b				Secuenciación exón 7
HFEExon78.U	CTGAGGGTTTTCTGAAGGTAA	Ex7b				Secuenciación exón 7
HFEExon79.L	GAACACATTATACCCAAAGCCT	Ex7b				Secuenciación exón 7

pb : pares de bases de la amplificación

Ta : temperatura de *annealing* de la PCR

A1.2. Tabla de *primers* y enzimas de restricción utilizados en la detección de las mutaciones o polimorfismos del gen HFE

Primer	Secuencia 5'-3'	Localización	pb	Ta	Mutación/ Polimorfismo	Enzima restricción	Comentarios
C282Y-F	TGGCAAGGGTAAACAGATCC	IN 3					Diagnóstico Hospital
C282Y-R-New	TACCTCCTCAGGCACTCCTC	IN4	396	58	C282Y	Rsal	
C282Y-R1	CCACTGATGACTCCAATGACTA	Ex5 L					PCR Alelo específico
C282Y-Rm	CCTGGGTGCTCCACCTGGT	Ex 4					Proyecto cribado donantes
C282Y-Fw	GGGAAGAGCAGAGATATACGTG	Ex 4		63	C282Y		
C282Y-F	TGGCAAGGGTAAACAGATCC	IN 3					
H63D-F	ACATGGTTAAGGCCTGTTGC	IN 1	294	58	H63D	DpnII	Diagnóstico Hospital
H63D-R	CTTGCTGTGGTTGTGATTTTC	Ex 2					
63Fw	AGCTGTTGCTGTTCTATGATC	Ex 2					PCR Alelo específico
HFE187Gas	CTCCACACGGCGACTCTCATC	Ex 2		62	H63D		Proyecto cribado donantes
HFEEx2U	GCTCCCCTCCTACTACACAT	IN 1					
HFEEx2L	GGTCCCTATTTCCACCATCC	IN 2					
282 mut	GTACCCCTGGGGAGAGCAGAGATA <u>CA</u>	Ex 4					Múltiple PCR
282 rev	CCATCCCCTAACAAAGAGCAGATCCTC	IN 4		55	C282Y + H63D	BbrPLI	Proyecto cribado donantes
63fwd	CACACTCTGCACTACCTCTT	Ex 2					verificación de resultados
63 mut	GGCTCCACACGGCGACTC <u>CGT</u>	Ex 2					
H63D-F	ACATGGTTAAGGCCTGTTGC	IN 1	294	58	S65C	Hinfl	
H63D-R	CTTGCTGTGGTTGTGATTTTC	Ex 2					
HFE.b	GCATGTGCCACCTTAGGGAA	5'	896	64	-467 G/C	Tail	Secuenciación
HHFE.1	CTCGGACTCACGCAGCAAGC	Ex1-IN 1					promotor + ex1
AdeU	GCCTCA <u>CT</u> ATGTGTAATCATTCTCCAGATAAT	5'	182	55	-410 A/C	Adel	
AdeL	TGACTTAGAAATATAAGCTTTTTCAC <u>T</u> TTTGT	5'					
HFE.e	CCAGATAATCCCAACTACTGT	5'	186	58	-467 C/G y -410 A/C		Secuenciación
HFE.f	CAACCTTAGACCAACTTATG	5'					
HFEExon1.U	AATCAACAACACCCCTTCAG	5'	260	58	-48 C/G	Mwol	
Mwop	TTCGTGCGCGTAACACCAATT	Ex1					
HFEExon2.U	GCTCCCCTCCTACTACACAT	IN 1	478	61	IVS2+4 T/C	Tail	
HFEExon2.L	GGTCCCTATTTCCACCATCC	IN 2					
HFEExon71.U	ATTCTGGGAAATCAGTTCAC	IN 6	581	48	Ex7+124 G/C	BsaMI	
HFEExon71.L	CTACAATGAGCGTAAATCAC	Ex 7a					
HFEExon74.U	ACATTGTCGTCTAAGTTGAAG	Ex7b	443	58	C/T		SSCP
HFEExon73.L	GAATGGTTTTGCCAGAGGTGAATA	Ex7b					

pb : pares de bases de la amplificación

Ta : temperatura de *annealing* de la PCR

SSCP: single strand polymorphysm conformation

A1.3. Tabla de *primers* utilizados en los experimentos de RT-PCR y de 3' RACE en el gen HFE (humano y murino)

Primer	Secuencia 5'-3'	Localización	pb*	Ta**	Comentarios
HFE HUMANO					
Ex1U	CTAAAGTTCTGAAAGACCTGTTGCT	Ex1	1349	55	RT-PCR ex 1 - ex 6
Ex6L	GAAGGCTAAAATCAAGGAGTTCGTC	Ex6			
Ex6U	GATAAAGCACTTACTTCGTGTCC	Ex6	1205	60	RT-PCR ex 6 - ex 7b
ESTL	GAATGGTTTTGCCAGAGGTGAATA	Ex7b			
3' RACE (Smart kit)	AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGTAC(T) ₃₀ VN				3' RACE (Kit Clontech)
UPM 10x	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTAACAACGCAGAGT CTAATACGACTCACTATAGGGC				3' RACE (Kit Clontech)
hrace 1	TGGTGCCTTCATTTGGGATGCTACT	Ex6	593 734 739	62	Detección formas: 6b 6a 7a
hrace 2	CAGGTGCTTCAGGATACCATA	Ex7a	368	62	Detección forma 7a
hrace 3	CTGAGGGTTTTCTGAAGGTAA	Ex7b	896	62	Detección forma 7b
hrace 4	CATTCTGGTATCTCAAGCATTCTAT	Ex7b	219	62	Detección forma 7b
HFE MURINO					
MEx5.1U	CACCATCTGTGCCATCTTCTTAG	Ex 5			RT-PCR ex 5 - ex 6b
MEST.L	GTGGTCTTTGTCACTTATTGAGG	Ex6b	2391	60	
3' RACE (Smart kit)	AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGTAC(T) ₃₀ VN				3' RACE (Kit Clontech)
UPM 10x	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTAACAACGCAGAGT CTAATACGACTCACTATAGGGC				3' RACE (Kit Clontech)
mrace1	CAAAGACTTGGAGGGGGGCACACT	Ex6a	531	68	Detección forma 6a
mrace2	ATTTGCCTGCGTCTCCGTGGTAT	Ex6b	395	62	Detección forma 6b

*pb : pares de bases del cDNA

**Ta : temperatura de *annealing* de la PCR

A1.4. Tabla de *primers* utilizados en los experimentos de retardo en gel o *Band-shift*

Primer	Secuencia 5'-3'	Sonda	Comentarios
HUMANO			
HBS1.1	GGTGAATCAAAAACAAAATGAAA	1	
HBS1.2	GGTTTCATTTTGTGTTTTGATTCA		Polimorfismo -410 A/C
HBS2.1	GGTGAATCAAAAACAAAATGAAA	2	
HBS2.2	GGTTTCATTTTGTGTTTTGATTCA		
RATA			
RHFEB5.1	GGTCTCAAGTTGTGATAAGTTTTACAATCAACAATAT	A	GATA, NF-IL6
RHFEB5.2	GATATTGTTGATTGTGAAAACCTATCACAACCTTGAGA		
RHFEB5.2.1	GGATTTCAAGTTCTGGATACTCTTGTCTTTTTAAT	C	gIRE, GATA, HFH2
RHFEB5.2.2	GATTAAGAAAGAAACAAGAGAGTATCCAGAACCTGAAAT		
RHFEB5.3.1	GGGTCACCTGGGTCACCTGACTGTGACATAAG	B	2 AP1
RHFEB5.3.2	GCTTATGTCACAGTCAGTGACCCAGGTGAC		
RHFEB5.4.1	GCTGTAGCCCAAGCCATCCTGTAATTTACTCT		
RHFEB5.4.2	GGAGAGTAAATTACAGGATGGCTTGGGCTACAG		
RHFEB5.5.1	GGATGTCCCGGAAAGGGATCCAGCTTGCCAGGAAGTTTTGT		
RHFEB5.5.2	GACAAAACCTTCTGGCAAGCTGGATCCCTTTCCGGGACAT		
RHFEB5.6.1	GCCACTGGTACTTGTCTTTCCCAATGT		
RHFEB5.6.2	GGACATTGGGAAAGAAACAAGTACCAGTGG		
RHFEB5.7.1	GGCTACAGGGTGACTTCTGGATCCTCCA	D	CREB, 2 AP1
RHFEB5.7.2	GTGGAGGATCCAAGAAGTCAACCCTGTAG		

A1.5. Tabla de *primers* utilizados en los experimentos de *Reporter Gene* (gen HFE humano)

Primer	Secuencia 5'-3'	Localización	pb	Ta	Comentarios
HFERG1(Xho I diana)	GAGTCTCGAG TTCCCAGCTCTGGCCGCA	Ex1	1505	58	
HFERG2 (Mlul diana)	GAGGACGCGT TATCCTGTTTGATTTTCTTG	5'			
HFERG1(Xho I diana)	GAGTCTCGAG TTCCCAGCTCTGGCCGCA	Ex1	1151	58	
HFERG3 (Mlul diana)	AAGCACGCGT AAGCAAAGTTTATTGAAG	5'			
HFERG1(Xho I diana)	GAGTCTCGAG TTCCCAGCTCTGGCCGCA	Ex1	685	58	
HFERG4 (Mlul diana)	TTCAACGCGT GTCTTAGTGACAGCCTTTC	5'			
GLprimer1	TGTATCTTATGGTACTGTAAGT				Secuenciación
GLprimer2	CTTTATGTTTTGGCGTCTTCCA				vector pGL2Basic

pb : pares de bases de la amplificación

Ta : temperatura de *annealing* de la PCR

La secuencia en negrita es la secuencia añadida para introducir la diana de restricción deseada.

A1.6. Tabla de *primers* diseñados para la secuenciación de los exones del gen TFR2

Primer	Secuencia 5'-3'	Localización	Exones	pb	Ta	Comentarios
TFR2-Ex1.U	GTGAGGAGCAGCCTTGGTTCAGG	5'	1	272	60	
TFR2-Ex1.L	GGAAGAAGCGAGGTCAGGACACG	IN 1				
TFR2-Ex2-3.U	CTATTCCAGAGAGCGGTAAGACT	Ex 1-IN 1	2 y 3	913	56	
TFR2-Ex2-3.L	GAGGGGGACCCAGACACCAGAGG	IN3				
TFR2-Ex4-6.U	CCCACGTCTCTGGCATCCTT	IN 3	4, 5 y 6	720	62	1 M Betaina
TFR2-Ex4-6.L	TCTCACAGCACCCGTAACGA	IN 6				
TFR2-Ex7-8.U	GGTTTCTCCTGCCCTTATGAATC	IN 6	7 y 8	501	60	
TFR2-Ex7-8.L	TCTCTGCTTCTCCTCTTCTGGT	IN 8				
TFR2-Ex9.U	GGAAAGAAATAAGGAAAAGAGTG	IN 8	9	414	56	
TFR2-Ex9.L	GCCACCATCAGACCCAGTTCAGC	IN 9				
TFR2-Ex10.U	TCTTTAGGGACTGGAGGGACTGC	IN 9	10	429	56	1 M Betaina
TFR2-Ex10.L	GGTGACGAAATAGAGGTGAAGTG	IN 10				
TFR2-Ex11-14.U	GGACCAGGACAGAAGAAGACAAG	IN 10	11, 12	654	58	1 M Betaina
TFR2-Ex11-14.L	CCCCCAACTTACACCTCAGCATC	Ex 14-IN 14	13 y 14p			
TFR2-Ex14-16.U	AATAGGGGGTGAAGGGGAGTAGG	IN 13	14, 15 y	845	62	1 M Betaina
TFR2-Ex14-16.L	CTGGAGGCAGGATGAAGGGAGTG	IN 16	16			
TFR2-Ex17.U	GCCTCCAGCACTCTGCCTCGTC	IN 16	17	510	58	1 M Betaina
TFR2-Ex17.L	GCCCTCCCTGTCCATTTTCATCAC	IN 17				

pb : pares de bases de la amplificación

Ta : temperatura de *annealing* de la PCR

A1.7. Tabla de *primers* diseñados para la secuenciación de los exones del gen FPN1

Primer	Secuencia 5'-3'	Localización	Exón	pb	Ta	Comentarios
FPN1U	GGCGGCCCCAGTCGGAGGTC	5'	1	496	68	
FPN1L	TGTCTCAAAGCCCCACCTG	IN1				
FPN2U	GCATTCTGCCCTCAGTCAT	IN1	2	237	62	
FPN2L	TAAGTCTTGACAAAACCTG	IN2				
FPN3U	TTTTGATAAGGAAGCAACTT	IN2	3	302	58	1mM MgCl ₂
FPN3L	GAGGTAGCTCAGGCATTGGT	IN3				
FPN4U	GTGGATAAGAACAGTCTCAC	IN3	4	252	55	
FPN4L	AAGCATTTTCATCCTTTACC	IN4				
FPN5U	TTCCACCAAAGACTATTTTA	IN4	5	291	58	
FPN5L	CATTATCACCACCGATTTA	IN5				
FPN6U	GCTTTGTATTGTGTAATGG	IN5	6	427	55	
FPN6L	CACTGGTAATAAACCTGAT	IN6				
FPN7U	TGGGAAGGGGAATAGAAGGA	IN6	7	842	55	1mM MgCl ₂
FPN7L	ATTAACATTTAGGGAACATT	IN7				
FPN8.1U	TGCATATGTCAACAGATTTT	IN7	8	897	55	
FPN8.1L	CAATAGGATCAATAAGGATA	EX8				
FPN8.2U	CAAACTCACTCTTGTTCAA	EX8	8	988		
FPN8.2L	ACAAGTTACCCAAAACAGAT	3'				

pb : pares de bases de la amplificación

Ta : temperatura de *annealing* de la PCR

A2 Tablas de ESTs

Los siguientes ESTs (Expressed sequence tags) fueron encontrados mediante análisis computacionales con el programa BLAST-base de datos de EST. La posición de los EST respecto al genómico fue determinada por alineamiento utilizando el programa SeqMan del software DNASTAR.

A2.1. EST (*expressed sequence tags*) del gen HFE humano

Nº GenBank	IMAGE clone	sentido	Posición del EST	Fuente	pb EST	pb inserto
AA319758		=>	pEx6...	tumor glándula adrenal	308	
AA876054	1161797	<=	...Ex7a	NCICGAPCo10 (colon)	439	865
AA918942	1536110	<=	...Ex5-Ex6p	NCICGAPKid5 (riñón)	148	1339
AI040303	1665328	<=	...Ex7a	fibroblastos senescentes	380	874
AI122894	1509384	<=	...Ex7a	NSF-F8-9W-OT-PA-P-S1	392	538
AI127651	1711165	<=	...Ex7a	útero	438	669
AI127951	1711350	<=	...Ex7a	útero	492	674
AI763178	2398203	<=	...Ex7a	NCICGAPKid12 (riñón)	393	
R07647	125808	<=	...Ex7a	Hígado-bazo fetal	299	1191
R07696	125808	=>	pEx6...	Hígado-bazo fetal	419	1191
R47761	153324	=>	pEx6...	Pecho	343	1071
R50398	153324	<=	...Ex7a	Pecho	258	1071
W21141	307162	=>	pEx5-pEx6...	pulmón	268	1642
N93736	307162	<=	...pEx6-Ex7a	pulmón	520	1642
BE272926	3544803	=>	pEx1-DelEx2-Ex3-pEx4...	NIH_MGC_14, carcinoma renal	570	
AW902003		<=	pEx6...	NN1022 sistema nervioso	334	
AI949947	2470305	<=	Ex7-Del62pbex6-Ex6...	NCI_CGAP_Kid12 (riñón)	520	
AI278822	1911933	<=	Ex7b	NCICGAPCo8 (colon)	403	1091
AI290427	1912854	<=	Ex7b	NCICGAPCo8 (colon)	462	1097
AI760080	2385306	<=	Ex7b	NCICGAPKid11(riñón)	385	824
AI358948	2012980	<=	...Ex6-In6 (forma 6b)	NCICGAP-Brn23 (glioblastoma)	454	909
AI160732	1703419	<=	...Ex6-In6 (forma 6b)	NCICGAP-Brn23 (glioblastoma)	457	876
AI079088	1669410	<=	...Ex6-In6 (forma 6b)	NCICGAP-Brn23 (glioblastoma)	384	915

Los clones en negrita fueron pedidos al consorcio I.M.A.G.E para su secuenciación.

=> sentido 5'-3'. <= sentido 3'-5'. P = parcial. Pb= pares de bases.

A2.2. EST (*expressed sequense tags*) del gen HFE de ratón

Nº GenBank	IMAGE clon	sentido	Posición del EST	Fuente (librería, tejido)	pb EST
BB606288		=>	Ex1...	RIKEN cDNA clon E130003F20 5'	253
BF465475		=>	Ex1...	NIH_BMAP_Ret4_S2 (retina)	
AA065412	515624	=>	Ex1-pex2	Stratagene cDNA testículo ratón	218
BE994943		=>	pEx1-ex2-pex3...	NIH_BMAP_Ret4_S2 (retina)	489
AI850020		=>	pEx1-DelEx2-Ex3-pEx4...	NIH_BMAP_MSC	457
AA217236	652689	<=	...pEx1-Ex2-pEx3	Soares mouse lymph node NbMLN (nódulo linfático)	464
BE995172		=>	pEx1-DelEx2-Ex3-pEx4...	NIH_BMAP_Ret4_S2 (retina)	455
BF464345		=>	pEx1-DelEx2-Ex3...	NIH_BMAP_Ret4_S2 (retina)	394
AA255260	719514	=>	pEx3-pEx4...	Soares mouse NML spinal-cord	193
AA717575	1179063	=>	pEx5-delpEx6-Ex6...	Soares_mammary_gland_NbMMG (glándula mamaria)	506
W11889	313224	=>	pex5-pex6...	Soares mouse p3NMF19.5 feto	323
BE911301	3962613	=>	pEx6...	NCL_CGAP_Mam1 (glándula mamaria)	554
AA265447	693674	=>	pEx6...	Soares mouse NML (hígado)	486
AA880866	1276978	=>	pEx6...	Stratagene mouse lung (pulmón)	329
BB312114		=>	pEx6...	RIKEN cDNA clon B230331J20 (corpora quadrigemina)	337
BB315910		=>	pEx6...	RIKEN cDNA clon B230361L09 (corpora quadrigemina)	325
BB518298		=>	pEx6...	RIKEN cDNA clon D830028L22 (corazón neonatal)	310
BB536943		=>	pEx6...	RIKEN cDNA clon E130003F20 (ojo neonatal)	290
AV165187		=>	pEx6...	RIKEN cDNA clon 3110032K20 (cabeza, embrión 13 días)	287
BB539144		=>	pEx6...	RIKEN cDNA clon E130016L14 (ojo neonatal)	283
AV266378		=>	pEx6...	RIKEN cDNA clon 4930517C10 (testículo)	262
BB537914		=>	pEx6...	RIKEN cDNA clon E130008H13 (ojo neonatal)	271
BB496329		=>	pEx6...	RIKEN cDNA clon D630002I23 (riñón neonatal)	274
AV257380		=>	pEx6...	RIKEN cDNA clon 4921536E15 (testículo, ratón adulto)	255
AV366524		=>	pEx6...	RIKEN cDNA clon (pulmón)	246
AV251328		=>	pEx6...	RIKEN cDNA clon 4833430K06 (cabeza, neonatal)	232
AV281856		=>	pEx6...	RIKEN cDNA clon 4933426P19 (testículo, ratón adulto)	213
AV087757		=>	pEx6...	RIKEN cDNA clon 2310032M04 (lengua)	185
BE654559		<=	...pEx6	NIH_BMAP_MSC_N spinal-cord	111
BE948921		=>	Ex6b...	NIH_BMAP_M_S4 (cerebro)	603
BE447697	3329650	=>	Ex6b...	Soares mouse 3NbMS (bazo)	448
BE447079	3329650	<=	...Ex6b	Soares mouse 3NbMS (bazo)	464

Los clones en negrita fueron pedidos al consorcio I.M.A.G.E para su secuenciación.

=> sentido 5'-3'. <= sentido 3'-5'. P = parcial. Pb= pares de bases.

A.3. Modelo de carta de consentimiento en la participación del estudio de las mutaciones del gen HFE (proyecto de cribado de donantes de sangre para la Hemocromatosis Hereditaria)



Hospital Universitari

PROGRAMA DE PREVENCIÓN DE LA HEMOCROMATOSIS.

La HEMOCROMATOSIS es una enfermedad frecuente debida a la acumulación de hierro que al cabo de los años puede producir cirrosis del hígado y otras enfermedades. El diagnóstico precoz permite evitar estas complicaciones.

En este Hospital se está realizando un estudio de prevención de la hemocromatosis. En el caso de que usted desee participar se analizará su sangre sin que ello comporte ninguna molestia para usted (se utilizarán las mismas muestras de sangre que utilizamos para nuestras analíticas). Si detectásemos que usted puede desarrollar la enfermedad se lo comunicaremos y pondremos a su disposición el consejo y el tratamiento a seguir.

Si usted desea participar en este programa de prevención debe darnos su consentimiento escrito:

D/Dña....., con DNI he sido informado de que se me efectuará un análisis para detectar mi posible predisposición a desarrollar la hemocromatosis y de que se me informará tanto si el resultado es negativo como positivo. Sé que los resultados serán tratados de forma anónima y que no se utilizarán para otro fin que el indicado. Por ello decido dar mi consentimiento para colaborar en este estudio, aunque en cualquier momento puedo denegar mi participación si así lo decidiese.

Firma del paciente..... Fecha..... Teléfono de contacto

A.4. Modelos de cartas del proyecto Hemocromatosis

A continuación se presentan los 7 modelos de cartas de los resultados del genotipado y análisis bioquímico realizado dentro del programa de prevención de la Hemocromatosis Hereditaria realizado en el Hospital Clínico de Barcelona. Estos modelos se pueden resumir en:

- a) Carta de personas con genotipado C282Y/C282Y y alteraciones en los parámetros bioquímicos.
- b) Carta de personas con genotipado C282Y/C282Y y sin alteraciones en los parámetros bioquímicos.
- c) Carta de personas con genotipado C282Y/H63D y alteraciones en los parámetros bioquímicos.
- d) Carta de personas con genotipado C282Y/H63D y sin alteraciones en los parámetros bioquímicos.
- e) Carta de personas con genotipado C282Y/normal.
- f) Carta de personas con el resto de genotipados (H63D/normal, H63D/H63D y normal/normal)
- g) Carta de personas en las que no se pudo realizar el estudio genético.



Servei de Genètica

*Nombre Apellido1 Apellido2
Calle N°, piso
Código postal- Ciudad*

Día de Mes de Año

Resultado del análisis que se le ha efectuado como participante en el programa de prevención de la hemocromatosis:

Se ha detectado que presenta un genotipo de riesgo de HEMOCROMATOSIS (genotipo C282Y/C282Y del gen HFE). Además se han detectado alteraciones en los parámetros del hierro en su análisis.

Es conveniente que se ponga en contacto con nosotros para ampliarle la información e iniciar una prevención que consistiría esencialmente en análisis periódicos y en seguir donando sangre bajo la supervisión de un especialista. Con esta intervención tan sencilla es previsible que la esperanza de vida sea absolutamente normal.

Este estudio tiene una fiabilidad del 99%.

Para cualquier aclaración acerca del resultado puede ponerse en contacto con nosotros al teléfono 93 2275510.

Atentamente,

Dr. R. Oliva



Servei de Genètica

*Nombre Apellido1 Apellido2
Calle N°, piso
Código postal- Ciudad*

Día de Mes de Año

Resultado del análisis que se le ha efectuado como participante en el programa de prevención de la hemocromatosis:

Se ha detectado que presenta un genotipo de riesgo de desarrollar una HEMOCROMATOSIS (genotipo C282Y/C282Y del gen HFE), si bien no se han detectado alteraciones en los parámetros del hierro en su análisis. Esto quiere decir que no ha desarrollado esta enfermedad. No obstante, resultaría muy recomendable que se pusiera en contacto con nosotros para ampliarle la información e iniciar en un futuro, si es preciso, una prevención que consistiría esencialmente en análisis periódicos y en seguir donando sangre bajo la supervisión de un especialista.

Este estudio tiene una fiabilidad del 99%.

Para cualquier aclaración acerca del resultado puede ponerse en contacto con nosotros al teléfono 93 2275510.

Atentamente,

Dr. R. Oliva



Servei de Genètica

*Nombre Apellido1 Apellido2
Calle N°, piso
Código postal- Ciudad*

Día de Mes de Año

Resultado del análisis que se le ha efectuado como participante en el programa de prevención de la hemocromatosis:

Se ha detectado que presenta un genotipo de riesgo leve de desarrollar HEMOCROMATOSIS (genotipo C282Y/H63D del gen HFE). Además se han detectado alteraciones en los parámetros del hierro en su análisis.

Esto quiere decir que no se halla, a corto plazo, bajo un riesgo de desarrollar esta enfermedad. No obstante existe evidencia de que, a largo plazo, un pequeño porcentaje de personas con este genotipo pueden desarrollar hemocromatosis. Por lo tanto resultaría recomendable que muestre esta carta a su médico de cabecera para que valore la pertinencia de realizarle un análisis de sangre cada 1-2 años (consistente en medir la saturación de la transferrina) con el fin de iniciar una prevención en el supuesto de que en algún momento el resultado indicase un posible acúmulo de hierro.

También hay que señalar que, dado que usted es portador de la mutación C282Y del gen HFE, existe 1 posibilidad entre 17 de que su posible cónyuge también sea portador de la misma mutación. En este caso el 25% de sus posibles hijos/as serían homocigotos (C282Y/C282Y) y potencialmente afectados de la enfermedad a partir de la mayoría de edad. La hemocromatosis tiene una prevención muy sencilla consistente en análisis periódicos y en donar sangre periódicamente bajo la supervisión de un especialista. Por lo tanto resultaría conveniente el análisis del cónyuge. Para ello debe de ponerse en contacto con su médico de cabecera mostrándole esta carta con el fin de que valore y tramite, si lo considera oportuno, la solicitud de análisis genético de hemocromatosis (detección de mutaciones en el gen HFE) para su cónyuge.

Este estudio tiene una fiabilidad del 99%.

Para cualquier aclaración acerca del resultado puede ponerse en contacto con nosotros al teléfono 93 2275510.

Atentamente,

Dr. R. Oliva

Servei de Genètica

*Nombre Apellido1 Apellido2
Calle N°, piso
Código postal- Ciudad*

Día de Mes de Año

Resultado del análisis que se le ha efectuado como participante en el programa de prevención de la hemocromatosis:

Se ha detectado que presenta un genotipo de riesgo leve de desarrollar HEMOCROMATOSIS (genotipo C282Y/H63D del gen HFE), si bien no se han detectado alteraciones en los parámetros del hierro en su análisis.

Esto quiere decir que no se halla, a corto plazo, bajo un riesgo de desarrollar esta enfermedad. No obstante existe evidencia de que, a largo plazo, un pequeño porcentaje de personas con este genotipo pueden desarrollar hemocromatosis. Por lo tanto resultaría recomendable que muestre esta carta a su médico de cabecera para que valore la pertinencia de realizarle un análisis de sangre cada 1-2 años (consistente en medir la saturación de la transferrina) con el fin de iniciar una prevención en el supuesto de que en algún momento el resultado indicase un posible acúmulo de hierro.

También hay que señalar que, dado que usted es portador de la mutación C282Y del gen HFE, existe 1 posibilidad entre 17 de que su posible cónyuge también sea portador de la misma mutación. En este caso el 25% de sus posibles hijos/as serían homocigotos (C282Y/C282Y) y potencialmente afectados de la enfermedad a partir de la mayoría de edad. La hemocromatosis tiene una prevención muy sencilla consistente en análisis periódicos y en donar sangre periódicamente bajo la supervisión de un especialista. Por lo tanto resultaría conveniente el análisis del cónyuge. Para ello debe de ponerse en contacto con su médico de cabecera mostrándole esta carta con el fin de que valore y tramite, si lo considera oportuno, la solicitud de análisis genético de hemocromatosis (detección de mutaciones en el gen HFE) para su cónyuge.

Este estudio tiene una fiabilidad del 99%.

Para cualquier aclaración acerca del resultado puede ponerse en contacto con nosotros al teléfono 93 2275510.

Atentamente,

Dr. R. Oliva



Servei de Genètica

*Nombre Apellido1 Apellido2
Calle N°, piso
Código postal- Ciudad*

Día de Mes de Año

Resultado del análisis practicado formando parte del programa de prevención hemocromatosis:

HETEROCIGOTO (ya que su genotipo es C282Y/normal). Esto quiere decir que la probabilidad de que usted desarrolle hemocromatosis en un futuro es remota.

No obstante usted es portador heterocigoto de la mutación C282Y. Esto quiere decir que existe 1 posibilidad entre 17 de que su posible cónyuge también sea portador de la misma mutación. En este caso el 25% de sus posibles hijos/as serían homocigotos (C282Y/C282Y) y potencialmente afectados de la enfermedad a partir de la mayoría de edad. La hemocromatosis tiene una prevención muy sencilla consistente en análisis periódicos y en donar sangre periódicamente bajo la supervisión de un especialista. Por lo tanto resultaría conveniente el análisis del cónyuge. Para ello debe de ponerse en contacto con su médico de cabecera mostrándole esta carta con el fin de que valore y tramite, si lo considera oportuno, la solicitud de análisis genético de hemocromatosis (detección de mutaciones en el gen HFE).

Este estudio tiene una fiabilidad del 99%.

Para cualquier aclaración acerca del resultado puede ponerse en contacto con nosotros al teléfono 93 2275510.

Atentamente,

Dr. R. Oliva



Servei de Genètica

*Nombre Apellido1 Apellido2
Calle N°, piso
Código postal- Ciudad*

Día de Mes de Año

Resultado del análisis practicado formando parte del programa de prevención hemocromatosis:

NORMAL (ya que no se ha detectado la mutación C282Y del gen HFE responsable de la mayoría de casos de hemocromatosis).

Este estudio tiene una fiabilidad del 99%.

Para cualquier aclaración acerca del resultado puede ponerse en contacto con nosotros al teléfono 93 2275510.

Atentamente,

Dr. R. Oliva



Servei de Genètica

*Nombre Apellido1 Apellido2
Calle N°, piso
Código postal- Ciudad*

Día de Mes de Año

En relación con el análisis practicado formando parte del programa de prevención hemocromatosis no ha sido posible obtener ningún resultado debido a problemas técnicos. No obstante aprovechamos esta ocasión para agradecer su desinteresada colaboración,

Atentamente,

Dr. R. Oliva

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFIA

- Abboud, S. and Haile, D.J. A novel mammalian iron-regulated protein involved in intracellular iron metabolism. *J Biol Chem* 275: 19906–19912 (2000). PMID: 10747949
- Adams, P.C. Implications of genotyping of spouses to limit investigation in children in genetic hemochromatosis. *Clin Genet.* 53: 176-178 (1998). PMID: 9630070
- Adams, P.C. Nonexpressing homozygotes for C282Y hemochromatosis: minority or majority of cases? *Mol Genet Metab* 71:81-6 (2000a). PMID: 11001800
- Adams, P.C. Population screening for haemochromatosis. *Gut* 46:301-303 (2000b). PMID: 10673284
- Adams, P.C. Population screening for haemochromatosis. *Hepatology* 29:1324-1327 (1999b).
- Adams, P.C. Prevalence of abnormal iron studies in heterozygotes for hereditary hemochromatosis: an analysis of 255 heterozygotes. *Am J Hematol* 45:146-9 (1994). PMID: 8141120
- Adams, P.C. Role of genetic testing and liver biopsy in the diagnosis of hemochromatosis. *Curr Gastroenterol Rep* 1:27-9 (1999a). PMID: 10980923
- Adams, P.C., Campion, M.L., Gandon, G., LeGall, J.Y., David, V., Jouanolle, A.M. Clinical and family studies in genetic hemochromatosis: microsatellite and HFE studies in five atypical families. *Hepatology.* 26:986-90 (1997). PMID: 9328324
- Adams, P.C., Kertesz, A.E., and Valberg, L.S. Clinical presentation of hemochromatosis: a changing scene. *Am. J. Med.* 90:445-449 (1991). PMID: 2012084
- Adams, P.C., Kertesz, A.E., McLaren, C.E., Barr, R., Bamford, A., and Chakrabarti, S. Population screening for hemochromatosis: a comparison of unbound iron binding capacity, transferrin saturation and C282Y genotyping in 5,211 voluntary blood donors. *Hepatology* 31: 1160-4 (2000). PMID: 10796893
- Agostinho, M.F., Arruda, V.R., Basseres, D.S., Bordin, S., Soares, M.C., Menezes, R.C., Costa, F.F., Saad, S.T. Mutation analysis of the HFE gene in Brazilian populations. *Blood Cells Mol Dis* 25:324-7 (1999). PMID: 10660479
- Aguilar-Martinez, P., Biron, C., Blanc, F., Masméjean, C., Jeanjean, P., Michel, H., Schved, J.F. Compound heterozygotes for hemochromatosis gene mutations: may they help to understand the pathophysiology of the disease? *Blood Cells Mol Dis* 23:269-76 (1997). PMID: 9410470
- Aguilar-Martinez, P., Esculie-Coste, C., Bismuth, M., Giansily-Blaizot, M., Larrey, D., Schved, J.F. Transferrin receptor-2 gene and non-C282Y homozygous patients with hemochromatosis. *Blood Cells Mol Dis* 27:290-3 (2001). PMID: 11358390
- Aguilar-Martinez, P., Thelcide, C., Jeanjean, P., Masméjean, C., Giansily, M., Schved, J.F. Haplotype analysis of the HFE gene: implications for the origins of hemochromatosis related mutations. *Blood Cells Mol Dis* 25:166-9 (1999). PMID: 10575542
- Ajioka, R.S., Jorde, L.B., Gruen, J.R., Yu, P., Dimitrova, D., Barrow, J., Radisky, E., Edwards, C.Q., Griffen, L.M., Kushner, J.P. Haplotype analysis of hemochromatosis: evaluation of different linkage-disequilibrium approaches and evolution of disease chromosomes. *Am J Hum Genet* 60:1439-47 (1997). PMID: 9199565
- Anderson, G. J., Murphy, T. L., Cowley, L., Evans, B. A., Halliday, J. W., McLaren, G. D. Mapping the gene for sex-linked anemia: an inherited defect of intestinal iron absorption in the mouse. *Genomics* 48: 34-39 (1998). PMID : 9503013
- Andrews, N. C. Disorders of iron metabolism. *New Eng. J. Med.* 341: 1986-1995 (1999). PMID : 10607817
- Andrews, N., Fleming, M., Gunshin, H. Iron transport across biologic membranes. *Nutr. Rev.* 57, 114–123 (1999). PMID: 10228348
- Andrikovics, H., Klein, I., Kalmar, L., Bors, A., Jermendy, G., Petri, I., Kalasz, L., Varadi, A., Tordai, A. A new method of molecular testing in the differential diagnosis of hereditary hemochromatosis. *Orv Hetil* 140:2517-22 (1999). PMID: 10586619
- Arredondo, M., Muñoz, P., Mura, C. and Núñez, M.T. HFE inhibits apical iron uptake by intestinal epithelial Caco-2) cells. *FASEB J.* 15:1276-8 (2001). PMID: 11344112
- Arya, N., Chakrabarti, S., Hegele, R.A., Adams, P.C. HFE S65C variant is not associated with increased transferrin saturation in voluntary blood donors. *Blood Cells Mol Dis* 25:354-7 1999. PMID: 10660483
- Asberg, A., Hveem, K., Thorstensen, K., Ellekjer, E., Kannelonning, K., Fjosne, U., Halvorsen, T.B., Smethurst, H.B., Sagen, E., Bjerve, K.S. Screening for hemochromatosis: high prevalence and low morbidity in an unselected population of 65,238 persons. *Scand J Gastroenterol* 36:1108-15 (2001). PMID: 11589387
- Bacon, B.R. and Sadiq, S.A. Hereditary hemochromatosis: presentation and diagnosis in the 1990s. *Am J Gastroenterol* 92:784-789 (1997). PMID: 9149185
- Bacon, B.R. Hemochromatosis: diagnosis and management. *Gastroenterology* 120:718-725, 2001. PMID: 11179246
- Bacon, B.R., Olynyk, J.K., Brunt, E.M., Britton, R.S., Wolff, R.K. HFE genotype in patients with hemochromatosis and other liver diseases. *Ann Intern Med* 130:953–962 (1999a). PMID: 10383365
- Bacon, B.R., Powell, L.W., Adams, P.C., Kresina, T.F., and Hoofnagle, J.H. Molecular medicine and hemochromatosis: at the crossroads. *Gastroenterology* 116: 193-207 (1999b). PMID: 9869618
- Baer, D. Hereditary iron overload and African Americans. *Am. J. Med.* 101: 5-8 (1996). PMID : 8686715

- Bahram, S., Gilfillan, S., Kuhn, L. C., Moret, R., Schulze, J. B., Lebeau, A., Schumann, K. Experimental hemochromatosis due to MHC class I HFE deficiency: immune status and iron metabolism. *Proc Nat Acad Sci* 96: 13312-13317 (1999). PMID : 10557317
- Baiget, M., Barcelo, M.J., Gimferrer, E. Frequency of the HFE C282Y and H63D mutations in distinct ethnic groups living in Spain. *J Med Genet* 35:701 (1998). PMID: 9719385
- Bannerman, R. M. Genetic defects of iron transport. *Fed Proc* 35: 2281-2285 (1976). PMID : 782924
- Barisani, D., Parafioriti, A., Armiraglio, E., Meneveri, R., Conte, D. Duodenal expression of a putative stimulator of Fe transport and transferrin receptor in anemia and hemochromatosis. *Gastroenterology* 120:1404-11 (2001). PMID: 11313310
- Barton, J. C., Edwards, C. Q., Bertoli, L. F., Shroyer, T. W., Hudson, S. L. Iron overload in African Americans. *Am J Med* 99: 616-623 (1995). PMID : 7503084
- Barton, J. C., McDonnell, S. M., Adams, P. C., Brissot, P., Powell, L. W., Edwards, C. Q., Cook, J. D., Kowdley, K. V. and the Hemochromatosis Management Working Group: Management of hemochromatosis. *Ann Intern Med* 129: 932-939 (1998). PMID : 9867745
- Barton, J. C., Patton, M. A., Edwards, C. Q., Griffen, L. M., Kushner, J. P., Meeks, R. G., Leggett, R. W. : Blood lead concentrations in hereditary hemochromatosis. *J Lab Clin Med* 124: 193-198 (1994). PMID : 8051482
- Barton, J.C. and Bertoli, L.F. Hemochromatosis: the genetic disorder of the twenty-first century. *Nat Me.* 2:394-5 (1996). PMID: 8597942
- Barton, J.C., Preston, B.L., McDonnell, S.M., Rothenberg, B.E. Severity of iron overload in hemochromatosis: effect of volunteer blood donation before diagnosis. *Transfusion* 41: 123-9 (2001). PMID: 11161257
- Barton, J.C., Sawada-Hirai, R., Rothenberg, B.E., Acton, R.T. Two novel missense mutations of the HFE gene (I105T and G93R) and identification of the S65C mutation in Alabama Hemochromatosis Probands. *Blood Cells Molec Dis* 25: 146-154 (1999). PMID: 10575540
- Barton, J.C., Shih, W.W.H., Sawada-Hirai, R., Acton, R.T., Harmon, L., Rivers, C., and Rothenberg, B.E. Genetic and clinical description of hemochromatosis probands and heterozygotes: evidence that multiple genes linked to the major histocompatibility complex are responsible for hemochromatosis. *Blood Cells Mol. Dis.* 23: 135-145 (1997). PMID: 9215758
- Barton, L.C., and Acton, R.T. Population screening for hemochromatosis: Has the time finally come? *Cuff. Gastroenterol Rep* 2: 1-9 (2000). PMID: 10980999
- Bassett, M. L., Doran, T. J., Halliday, J. W., Bashir, H. V., Powell, L. W. Idiopathic hemochromatosis: demonstration of homozygous-heterozygous mating by HLA typing of families. *Hum Genet* 60: 352-356 (1982). PMID : 7106771
- Battiloro, E., Ombres, D., Pascale, E., D'Ambrosio, E., Verna, R., Area, M. Haemochromatosis gene mutations and risk of coronary artery disease. *Eur J Hum Genet* 8: 389-92 (2000). PMID: 10854101
- Baty, D., Terron-Kwiatkowski, A., Mechan, D., Harris, A., Pippard, M.J., and Goudie, D. Development of a multiplex ARMS test for mutations in the I1FE gene associated with hereditary haemochromatosis. *J Clin Pathol* 51: 73-74, (1998). PMID: 9577377
- Beckman, J.S., Beckman, T.W., Chen, J., Marshall, P.A., Freeman, B.A. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: Implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 1620-4 (1990). PMID: 2154753
- Beckman, L. E., Saha, N., Spitsyn, V., Van Landeghem, G., Beckman, L. Ethnic differences in the HFE codon 282 (Cys/Tyr) polymorphism. *Hum Hered* 47: 263-267 (1997). PMID : 9358014
- Beinker, N.K., Voigt, M.D., Arendse, M., Smit, J., Stander, I.A., Kirsch, R.E. Threshold effect of liver iron content on hepatic inflammation and fibrosis in hepatitis B and C. *J Hepatol* 25: 633-638 (1996). PMID: 8938538
- Bell, H., Thordal, C., Raknerud, N., Hansen T, Bosnes V, Halvorsen R, Heier HE, Try K, Leivestad T, Thomassen Y. Prevalence of hemochromatosis among first-time and repeat blood donors in Norway. *J Hepatol* 26: 272-279 (1997). PMID: 9059946
- Bernard, P.S., Aroka, R.S., Kushner, LP., and Wittwer, C.T. Homogeneous multiplex genotyping of hemochromatosis mutations with fluorescent hybridisation probes. *Am J Pathol* 153: 1055-1061 (1998). PMID: 9777937
- Best LG, Harris PE, Spriggs EL. Hemochromatosis mutations C282Y and H63D in 'cis' phase. *Clin Genet* 60: 68-72 (2001). PMID: 11531973
- Beutler, E. and Gelbart, T. HLA-H mutations in the Ashkenazi Jewish population. *Blood Cells Molec Dis* 23: 95-98 (1997). PMID: 9215754
- Beutler, E. and Gelbart, T. Large-scale screening for HFE mutations: methodology and cost. *Genet Test* 4:131-42 (2000). PMID: 10953952
- Beutler, E. and West, C. New diallelic markers in the HLA region of chromosome 6. *Blood Cells Mol Dis* 23:219-29 (1997). PMID: 9268673
- Beutler, E. Mutation of Transferrin Receptor 2 (Tfr-2) and iron store disease. *Blood Cells Mol Dis* 27:294-295 (2001). PMID: 11358391
- Beutler, E. The significance of the 187G (H63D) mutation in hemochromatosis. (Letter) *Am J Hum Genet* 61: 762-764 (1997). PMID : 9326341

- Beutler, E., Felitti, V.J., Koziol, J.A., Ho, N.J., Gelbart, T. Penetrance of 845G-A (C282Y) HFE hereditary haemochromatosis mutation in the USA. *The Lancet* 359: 211-218 (2002). PMID: 11812557
- Beutler, E., Gelbart, T., West, C., Lee, P., Adams, M., Blackstone, R., Pockros, P., Kosty, M., Venditti, C. P., Phatak, P. D., Seese, N. K., Chorney, K. A., Ten Elshof, A. E., Gerhard, G. S., Chorney, M. Mutation analysis in hereditary hemochromatosis. *Blood Cells Molec Dis* 22: 187-194 (1996). PMID: 8931958
- Beutler, E., West, C., Gelbart, T. HLA-H and associated proteins in patients with hemochromatosis. *Molec Med* 3: 397-402 (1997). PMID: 9234244
- Bollhalder, M., Mura, C., Landt, O. and Maly, F.E. LightCycler PCR assay for simultaneous detection of H63D and S65C mutations in HFE hereditary hemochromatosis gene based on opposite melting temperature shifts. *Clin Chem* 45: 2275-2278 (1999). PMID: 10585367
- Bonkovsky, H.L., Jawaid, Q., Tortorelli, K., LeClair, P., Cobb, J., Lambrecht, R.W., Banner, B.F. Non-alcoholic steatohepatitis and iron: increased prevalence of mutations of the HFE gene in non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* 31: 421-9 (1999). PMID: 10488699
- Bonkovsky, H.L., Poh-Fitzpatrick, M., Pimstone, N., Obando, J., Di Bisceglie, A., Tattrie, C., Tortorelli, K., Eclair, P., Mercurio, M.G., Lambrecht, R.W. Porphyrria cutanea tarda, hepatitis C, and HFE gene mutations in North America. *Hepatology* 27:1661-1669 (1998). PMID: 9620340
- Bonkovsky, H.L., Ponka, P., Bacon, B.R., Drysdale, J., Grace, N.D., Tavill, A.S. An update on iron metabolism: summary of the Fifth International Conference on Disorders of Iron Metabolism. *Hepatology* 24:718-29 (1996). PMID: 8781349
- Borecki, I. B., Lathrop, G. M., Bonney, G. E., Yaouanq, J., Rao, D. C. Combined segregation and linkage analysis of genetic hemochromatosis using affection status, serum iron, and HLA. *Am J Hum Genet* 47: 542-550 (1990). PMID : 2393027
- Borgna-Pignatti, C., Solinas, A., Bombieri, C., Micciolo, R., Gamberini, M.R., De Stefano, P., De Menis, E., Pignatti, P.F. The haemochromatosis mutations do not modify the clinical picture of thalassaemia major in patients regularly transfused and chelated. *Br J Haematol* 103: 813-6 (1998). PMID: 9858237
- Borot, N., Roth, M.-R, Malfoy, L., Demangel, C., Vinel, J-R, Pascal, L-R, And Coppin, H. Mutations in the MHC class I-like candidate gene for hemochromatosis in French patients. *Immunogenetics* 45: 320-324 (1997). PMID: 9038104
- Bosserhoff, X-K., Seegers, S., Hellerbrand, C., Scholmerich, L, And Botiner, R. Rapid genetic screening for hemochromatosis using automated SSCP-based capillary electrophoresis (SSCP-CE). *BioTechniques* 26: 1105-1109 (1999). PMID: 10376150
- Bothwell, T. H., Cohen, I., Abrahams, O. L., Perold, S. M. A familial study in idiopathic hemochromatosis. *Am J Med* 27: 730-738 (1959).
- Bothwell, T.H. Contributions of the Brisbane Liver Group to knowledge of iron metabolism. *J Gastroenterol Hepatol* 11: 1025-7 (1996). PMID: 8985821
- Bothwell, T.H., Charlton, R.W. and Motulsky, A.G. (1995). Hemochromatosis. In: *The metabolic and molecular basis of disease*. Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Eds., pp.2237-69. McGraw-Hill, New York.
- Bradbury, R., Fagan, E., Payne, S.J. Two novel polymorphisms (E277K and V212V) in the haemochromatosis gene HFE. *Hum Mutat* 15: 120 (2000). PMID: 10612845
- Bradley, L.A., Johnson, D.D., Palomaki, G.E., Haddow, J.E., Robertson, N.H., Ferrie, R.M. Hereditary haemochromatosis mutation frequencies in the general population. *J Med Screen* 5: 34-6 (1998). PMID: 9575458
- Braun, J., Donner, H., Plock, K., Rau, H., Usadel, K.H., Badenhop, K. Hereditary haemochromatosis mutations (HFE) in patients with Type II diabetes mellitus. *Diabetologia* 41: 983-4 (1998). PMID: 9726605
- Brockmann, D., Putzer, B.M., Lipinski, K.S., Schmucker, U., Esche, H. A multiprotein complex consisting of the cellular coactivator p300, AP-1/ATF, as well as NF-kappaB is responsible for the activation of the mouse major histocompatibility class I (H-2K(b)) enhancer A. *Gene Expr* 8: 1-18 (1999). PMID: 10543727
- Brown, N. M., Anderson, S. A., Steffen, D. W., Carpenter, T. B., Kennedy, M. C., Walden, W. E. and Eisenstein, R. S. Novel role of phosphorylation in Fe-S cluster stability revealed by phosphomimetic mutations at Ser-138 of iron protein-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 15235-15240 (1998). PMID: 9860952
- Brunt, E.M., Olynyk, J.K., Britton, R.S., Janney, C.G., Di Bisceglie, A.M., Bacon, B.R. Histological evaluation of iron in liver biopsies: relationship to HFE mutations. *Am J Gastroenterol* 95:1788-1793 (2000). PMID: 10925986
- Bulaj, Z. J., Griffen, L. M., Jorde, L. B., Edwards, C. Q., Kushner, J. P. : Clinical and biochemical abnormalities in people heterozygous for hemochromatosis. *New Eng J Med* 335: 1799-1805 (1996). PMID : 8943161
- Bulaj, Z.J., Phillips, J.D., Ajioka, R.S., Franklin, M.R., Griffen, L.M., Guinee, D.J., Edwards, C.Q., Kushner, J.P. Hemochromatosis genes and other factors contributing to the pathogenesis of porphyria cutanea tarda. *Blood* 95:1565-1571 (2000). PMID: 10688809
- Burt, M. J., George, P. M., Upton, J. D., Collett, J. A., Frampton, C. M. A., Chapman, T. M., Walmsley, T. A., Chapman, B. A. The significance of haemochromatosis gene mutations in the general population: implications for screening. *Gut* 43: 830-836 (1998). PMID : 9824612
- Burt, M.J., Smit, D.J., Pyper, W.R., Powell, L.W., Jazwinska, E.C. A 4.5 megabase YAC contig and physical map over the hemochromatosis gene region. *Genomics* 33: 153-158 (1996). PMID: 8660962

- Burt, M.J., Upton, J.D., Morison, I.M., Chapman, B.A., Faed, J.M., George, P.M.. Molecular analysis of HLA-H gene mutations in New Zealand patients with haemochromatosis. *N Z Med J* 110: 429-32 (1997). PMID: 9418837
- Byrnes, V., Ryan, E., Mayne, P., and Crowe, J. Neonatal screening for the HFE mutation in Irish population. *Gut* 45: (Suppl V) A144, (1999).
- Cairo, G. and Pietrangelo, A. Iron regulatory proteins in pathobiology. *Biochem J* 352: 241-250 (2000). PMID: 11085915
- Cairo, G., Recalcati, S., Montosi, G., Castrusini, E., Conte, D. and Pietrangelo, A. Inappropriately high iron regulatory protein activity in monocytes of patients with genetic hemochromatosis. *Blood* 89, 2546-2553 (1997). PMID: 9116301
- Calado, R.T., Franco, R.F., Pazin-Filho, A., Simoes, M.V., Marin-Neto, J.A., Zago, M.A. HFE gene mutations in coronary atherothrombotic disease. *Braz J Med Biol Res* 33: 301-6 (2000). PMID: 10719381
- Calandro, L. M., Baer, D. M., Sensabaugh, G. F. Characterization of a recombinant that locates the hereditary hemochromatosis gene telomeric to HLA-F. *Hum Genet* 96: 339-342 (1995). PMID : 7649553
- Calandro, L., Thorsen, T., Barcellos, L., Griggs, J., Baer, D., and Sensabaugh, G.F. Mutation analysis in hereditary hemochromatosis-Commentary. *Blood Cells Mol Dis* 22: 194A-194B (1996).
- Camaschella, C. Juvenile hemochromatosis. *Baillieres Clin. Gastro.* 12, 227-235 (1998).
- Camaschella, C., Roetto, A., Cali, A., De Gobbi, M., Garozzo, G., Carella, M., Majorano, N., Totaro, A., Gasparini, P. The gene TFR2 is mutated in a new type of haemochromatosis mapping to 7q22. *Nature Genet* 25: 14-15 (2000). PMID : 10802645
- Camaschella, C., Roetto, A., Cicilano, M., Pasquero, P., Bosio, S., Gubetta, L., Di Vito, F., Girelli, D., Totaro, A., Carella, M., Grifa, A., Gasparini, P. Juvenile and adult hemochromatosis are distinct genetic disorders. *Eur J Hum Genet* 5: 371-375 (1997). PMID: 9450181
- Cardoso, E.M., Stal, P., Hagen, K., Cabeda, J.M., Esin, S., de Sousa, M., Hultcrantz, R. HFE mutations in patients with hereditary haemochromatosis in Sweden. *J Intern Med* 243:203-8 (1998). PMID: 9627157
- Carella, M., D'Ambrosio, L., Totaro, A., Grifa, A., Valentino, M. A., Piperno, A., Girelli, D., Roetto, A., Franco, B., Gasparini, P., Camaschella, C. Mutation analysis of the HLA-H gene in Italian hemochromatosis patients. *Am J Hum Genet* 60: 828-832 (1997). PMID : 9106528
- Cassanelli, S., Pignatti, E., Montosi, G., Garuti, C., Mariano, M., Campioli, D., Carbonieri, A., Baldini, E., Pietrangelo, A. Frequency and biochemical expression of C282Y/H63D hemochromatosis (HFE) gene mutations in the healthy adult population in Italy. *J Hepatol* 34: 523-8 (2001). PMID: 11394651
- Cavalli-Sforza, L.L., Menozzi, P., and Piazza, P. (1994) *The History and Geography of Human Gene*. Princeton University Press. Princeton, New Jersey.
- Cazzola, M., Ascari, E., Barosi, G., Claudiani, G., Dacco, M., Kaltwasser, J. P., Panaiotopoulos, N., Schalk, K. P., Werner, E. E. Juvenile idiopathic haemochromatosis: a life-threatening disorder presenting as hypogonadotropic hypogonadism. *Hum Genet* 65: 149-154 (1983). PMID: 6418636
- Cazzola, M., Cerani, P., Rovati, A., Iannone, A., Claudiani, G., Bergamaschi, G. Juvenile genetic hemochromatosis is clinically and genetically distinct from the classical HLA-related disorder. (Letter) *Blood* 92: 2979-2981 (1998). PMID : 9763590
- Chang, J.G., Liu, T.C., Lin, S.F. Rapid diagnosis of the HLA-H gene Cys 282 Tyr mutation in hemochromatosis by polymerase chain reaction--a very rare mutation in the Chinese population. *Blood* 89: 3492-3 (1997). PMID: 9129062
- Chapman, R.W., Morgan, M.Y., Laulicht, M., Hoffbrand, A.V., Sherlock, S. Hepatic iron stores and markers of iron overload in alcoholics and patients with idiopathic hemochromatosis. *Dig Dis Sci* 27:909-916 (1982). PMID: 7117074
- Chen, X., Zwnbauer, B., Gnrke, A., and Kwok, R-Y. Fluorescence energy transfer detection as a homogeneous DNA diagnostic method. *Proc. Nati. Acad. Sci. USA* 94: 10756-10761 (1997).
- Clayton, P. T., Leonard, J. V., Lawson, A. M., Setchell, K. D. R., Andersson, S., Egestad, B., Sjoval, J. Familial giant cell hepatitis associated with synthesis of 3-beta,7-alpha-dihydroxy- and 3-beta,7-alpha,12-alpha-trihydroxy-5-cholenoic acids. *J Clin Invest* 79: 1031-1038 (1987). PMID : 3470305
- Cogswell, M.E., McDonnell, S.M., Khoury, M1, Franks, A.L., Burke, W., and Brittenham, G. Iron overload, public health, and genetics: evaluating the evidence for hemochromatosis screening. *Ann Intern Med* 129: 971-979 (1998). PMID: 9867750
- Conne, B., Stutz, A., Vassalli, J.D. The 3' untranslated region of the messenger RNA: A molecular «hotspot» for pathology? *Nat Med* 6: 637-641 (2000). PMID: 10835679
- Connor, J.R., Milward, E.A., Moalem, S., Sampietro, M., Boyer, P., Percy, M.E., Vergani, C., Scott, R.J., and Chorney, M. BIOIRON 2001- World Congress on Iron Metabolism (Cairns, Australia) O49 (2001).
- Corsi, B., Levi, S., Cozzi, A., Corti, A., Altimare, D., Albertini, A., Arosio, P. Overexpression of the hereditary hemochromatosis protein, HFE, in HeLa cells induces an iron-deficient phenotype. *FEBS Lett* 22: 149-152 (1999). PMID: 10571078
- Cortes, J.M., Oliva, H., Paradinas, F.J., Hernandez-Guio, C. The pathology of the liver in porphyria cutanea tarda. *Histopathology* 4: 471-485 (1980). PMID : 6253381.

- Cottier, H. Über ein der Hämochromatose vergleichbares Krankheitsbild bei Neugeborenen. *Schweiz Med Wochenschr* 37: 39-43 (1957).
- Cragg, S. J., Darke, C., Worwood, M. HLA class I and H ferritin gene polymorphisms in normal subjects and patients with haemochromatosis. *Hum Genet* 80: 63-68 (1988). PMID : 2843458
- Cragg, S. J., Drysdale, J., Worwood, M. Genes for the 'H' subunit of human ferritin are present on a number of human chromosomes. *Hum. Genet.* 71: 108-112 (1985). PMID : 3862645
- Crawford, D.H., Jazwinska, E.C., Cullen, L.M., Powell, L.W. Expression of HLA-linked hemochromatosis in subjects homozygous or heterozygous for the C282Y mutation. *Gastroenterology* 114: 1003-8 (1998). PMID: 9558290
- Crawford, D.H., Powell, L.W., Leggett, B.A., Francis, J.S., Fletcher, L.M., Webb, S.I., Halliday, J.W., Jazwinska, E.C. Evidence that the ancestral haplotype in Australian hemochromatosis patients may be associated with a common mutation in the gene. *Am J Hum Genet* 57: 362-7 (1995).PMID: 7668262
- Cullen, L. M., Gao, X., Easteal, S., Jazwinska, E. C. The hemochromatosis 845 G-to-A and 187 C-to-G mutations: prevalence in non-Caucasian populations. *Am J Hum Genet* 62: 1403-1407 (1998).PMID : 9585606
- Custodio, A.O., Fleming, M.D., Levy, J.E., Dietrich, W.F., and Andrews, N.C. A genetic screen for quantitative trait loci conferring iron storage differences among two inbred mouse strain. BIOIRON 2001- World Congress on Iron Metabolism (Cairns, Australia) O83 (2001).
- Dadone, M., Skolnick, M., Edwards, C. Linkage between hereditary hemochromatosis and HLA. (Abstract) *Cytogenet Cell Genet* 32: 261-262, 1982.
- Datz, C., Haas, T., Rinner, H., Sandhofer, F., Patsch, W., Paulweber, B. Heterozygosity for the C282Y mutation in the hemochromatosis gene is associated with increased serum iron, transferrin saturation, and hemoglobin in young women: a protective role against iron deficiency? *Clin Chem* 44: 2429-32 (1998). PMID: 9836708
- Datz, C., Lalloz, M.R., Vogel, W., Graziadei, I., Hackl, F., Vautier, G., Layton, D.M., Maier-Dobersberger, T., Ferenci, P., Penner, E., Sandhofer, F., Bomford, A., Paulweber, B. Predominance of the HLA-H Cys282Tyr mutation in Austrian patients with genetic haemochromatosis. *J Hepatol* 27: 773-9 (1997). PMID: 9382962
- David, V., Papadopoulos, P., Yaouanq, J., Blayau, M., Abel, L., Zappone, E., Perichon, M., Drysdale, J., Le Gall, J.-Y., Simon, M. Ferritin H gene polymorphism in idiopathic hemochromatosis. *Hum Genet* 81: 123-126 (1989). PMID : 2563249
- Davis, W.D. and Arrowsmith, W.R. The effect of repeated phlebotomies in hemochromatosis: report of three cases. *J Lab Clin Med* 39: 526-32 (1952).
- De Sousa, M., Reimao, R., Lacerda, R., Hugo, P., Kaufmann, S. H. E., Porto, G. Iron overload in beta-2-microglobulin-deficient mice. *Immun Lett* 39: 105-111 (1994). PMID: 8013958
- De Villiers, J. N. P., Hillermann, R., Loubser, L., Kotze, M. J. Spectrum of mutations in the HFE gene implicated in haemochromatosis and porphyria. *Hum. Molec Genet* 8: 1517-1522 (1999a). PMID : 10401000
- De Villiers, J.N.P., and Kotze, M. Significance of linkage disequilibrium between mutation C282Y and *MseI* polymorphism in population screening and DNA diagnosis of hemochromatosis. *Blood Cells Mol Dis* 25: 250-252 (1999b).
- Debre, R., Dreyfus, J.-C., Frezal, J., Labie, D., Lamy, M., Maroteaux, P., Schapira, F., Schapira, G. Genetics of haemochromatosis. *Ann Hum Genet* 23: 16-30 (1958).
- Delahunty, C., Ankener, W, Deng, Q., Eng, L, And Nickerson, D.A. Testing the feasibility of DNA typing for human identification by PCR and an oligonucleotide ligation assay. *Am J Hum Genet* 58: 1239-1246 (1996). PMID: 8651301
- Devaney, J.M., Pettit, E.L., Kaler, S.G., Vallone, P.M., Butler, J.M., Marino, M.A. Genotyping of two mutations in the HFE gene using single-base extension and high-performance liquid chromatography. *Anal Chem* 73: 620-4 (2001). PMID: 11217771
- Di Bisceglie, A.M., Bonkovsky, H.L., Chopra, S., Flamm, S., Reddy, R.K., Grace, N., Killenberg, P., Hunt, C., Tamburro, C., Tavill, A.S., Ferguson, R., Krawitt, E., Banner, B., Bacon, B.R. Iron reduction as an adjuvant to interferon therapy in patients with chronic hepatitis C who have previously not responded to interferon: a multicenter, prospective, randomized, controlled trial. *Hepatology* 32:135-138 (2000). PMID: 10869301
- Distante, S., Berg, J.P., Lande, K., Haug, E., Bell, H. High prevalence of the hemochromatosis-associated Cys282Tyr HFE gene mutation in a healthy Norwegian population in the city of Oslo, and its phenotypic expression. *Scand J Gastroenterol* 34: 529-34 (1999). PMID: 10423072
- Donovan, A., Brownlie, A., Zhou, Y., Shepard, J., Pratt, S.J., Momyhan, J., Paw, B.H., Drejer, A., Barut, B., Zapata, A., Law, T.C., Brugnara, C., Lux, S.E., Pinkus, G.S., Pinkus, J.L., Kinsley, P.D., Palis, J., Fleming, M.D., Andrews, N.C., Zon, L.I. Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. *Nature* 403: 776-781 (2000). PMID: 10693807
- Dooley, J.S. and Walker, A.P. Genetic hemochromatosis: detection, management, and population screening. *Genet Test* 4: 97-101 (2000). PMID: 10953946
- Dooley, J.S., Wallace, D.F. and Walker, A.P. Familial adult haemochromatosis with normal HFE sequence. *J. Hepatol.* 30 (Suppl. 1), 160 (1999).
- Douabin, V., Mouland, R., Jouanolle, X-M., Brissott, R, Le Gall, L-Y., Deugnier, Y., And David, V. Polymorphisms in the HFE gene. *Hum. Hered.* 49, 21-26, 1999. PMID: 9858853

- Dubois-Laforgue, D., Caillat-Zucman, S., Djilali-Saiah, I., Larger, E., Mercadier, A., Boitard, C., Bach, J.F., Timsit, J. Mutations in HFE, the hemochromatosis candidate gene, in patients with NIDDM. *Diabetes Care* 21:1371-2 (1998). PMID: 9702455
- Dugast, I. J., Papadopoulos, P., Zappone, E., Jones, C., Theriault, K., Handelman, G. J., Benarous, R., Drysdale, J. W. Identification of two human ferritin H genes on the short arm of chromosome 6. *Genomics* 6: 204-211 (1990). PMID : 2307464
- Edwards, C. Q., Griffen, L. M., Goldgar, D., Drummond, C., Skolnick, M. H., Kushner, J. P. Prevalence of hemochromatosis among 11,065 presumably healthy blood donors. *New Eng J Med* 318: 1355-1362 (1988). PMID : 3367936
- Edwards, C. Q., Skolnick, M. H., Kushner, J. P. Hereditary hemochromatosis: contributions of genetic analyses. *Prog Hemat* 12: 43-71 (1981). PMID : 7339703
- Edwards, C.Q. and Kushner, J.P. Screening for hemochromatosis. *N Engl J Med* 328, 1616-1620 (1993).
- Edwards, J. A., Hoke, J. E., Mattioli, M., Reichlin, M. Ferritin distribution and synthesis in sex-linked anemia. *J. Lab. Clin. Med.* 90: 68-76, 1977. PMID : 874373
- Eisenstein, R.S. Iron regulatory proteins and the molecular control of mammalian iron metabolism. *Annu Rev Nutr* 20:627-62 (2000). PMID: 10940348
- Elder, G.H. Porphyria cutanea tarda. *Semin Liver Dis* 18: 67-75 (1998). PMID: 9516680
- Escobar, G. J., Heyman, M. B., Smith, W. B., Thaler, M. M. Primary hemochromatosis in childhood. *Pediatrics* 80: 549-554 (1987). PMID : 3658574
- European Haemochromatosis Consortium. Polymorphism in intron 4 of HFE does not compromise haemochromatosis mutation results. (Letter) *Nature Genet.* 23: 271 only (1999).
- Fabrega, E., Castro, B., Sanchez-Castro, L., Benito, A., Fernandez-Luna, J.L., Pons-Romero, F. The prevalence of the Cys282Tyr mutation in the hemochromatosis gene in Cantabria in patients diagnosed with hereditary hemochromatosis. *Med Clin (Barc)* 112: 451-3 (1999). PMID: 10320958
- Falconer, D. S., Isaacson, J. H. The genetics of sex-linked anaemia in the mouse. *Genet Res* 3: 248-250 (1962).
- Fargion, S., Fracanzani, A.L., Sampietro, M., Molteni, V., Boldorini, R., Mattioli, M., Cesana, B., Lunghi, G., Piperno, A., Valsecchi, C., Fiorelli, G. Liver iron influences the response to interferon a therapy in chronic hepatitis C. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 9:497-503 (1997). PMID: 9187884
- Farrell, F.J., Nguyen, M., Woodley, S., Imperial, J.C., Garcia-Kennedy, R., Man, K., Esquivel, C.O. and Keeffe, E.B. Outcome of liver transplantation in patients with hemochromatosis. *Hepatology* 20, 404-410 (1994). PMID: 8045502
- Feder, J. N., Gnirke, A., Thomas, W., Tsuchihashi, Z., Ruddy, D. A., Basava, A., Dormishian, F., Domingo, R., Jr., Ellis, M. C., Fullan, A., Hinton, L. M., Jones, N. L., Kimmel, B. E., Kronmal, G. S., Lauer, P., Lee, V. K., Loeb, D. B., Mapa, F. A., McClelland, E., Meyer, N. C., Mintier, G. A., Moeller, N., Moore, T., Morikang, E., Prass, C. E., Quintana, L., Starnes, S. M., Schatzman, R. C., Brunke, K. J., Drayna, D. T., Risch, N. J., Bacon, B. R., Wolff, R. K. : A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nature Genet* 13: 399-408 (1996). PMID : 8696333
- Feder, J. N., Penny, D. M., Irrinki, A., Lee, V. K., Lebron, J. A., Watson, N., Tsuchihashi, Z., Sigal, E., Bjorkman, P. J., Schatzman, R. C. : The hemochromatosis gene product complexes with the transferrin receptor and lowers its affinity for ligand binding. *Proc Nat Acad Sci* 95: 1472-1477 (1998). PMID : 9465039
- Feder, J. N., Tsuchihashi, Z., Irrinki, A., Lee, V. K., Mapa, F. A., Morikang, E., Prass, C. E., Starnes, S. M., Wolff, R. K., Parkkila, S., Sly, W. S., Schatzman, R. C. The hemochromatosis founder mutation in HLA-H disrupts beta2-microglobulin interaction and cell surface expression. *J Biol Chem* 272: 14025-14028 (1997). PMID : 9162021
- Felsher, B. F., Carpio, N. M., Engleking, D. W., Nunn, A. T. Decreased hepatic uroporphyrinogen decarboxylase activity in porphyria cutanea tarda. *New Eng J Med* 306: 766-769 (1982). PMID : 7062951
- Fleming, M.D., Romano, M.A., Su, M.A., Garrick, L.M., Garrick, M.D., Andrews, N.C. Nramp2 is mutated in the anemic Belgrade (b) rat: evidence of a role for Nramp2 in endosomal iron transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 1148-53 (1998). PMID: 9448300
- Fleming, M.D., Trenor, C.C. 3rd, Su, M.A., Foerzler, D., Beier, D.R., Dietrich, W.F., Andrews, N.C. Microcytic anaemia mice have a mutation in Nramp2, a candidate iron transporter gene. *Nat Genet* 16: 383-6 (1997). PMID: 9241278
- Fleming, R. E., Migas, M. C., Zhou, X. Y., Jiang, J., Britton, R. S., Brunt, E. M., Tomatsu, S., Waheed, A., Bacon, B. R., Sly, W. S. Mechanism of increased iron absorption in murine model of hereditary hemochromatosis: increased duodenal expression of the iron transporter DMT1. *Proc Nat Acad Sci* 96: 3143-3148 (1999). PMID: 10077651
- Fleming, R.E. and Sly, W.S. Hepcidin: a putative iron-regulatory hormone relevant to hereditary hemochromatosis and the anemia of chronic disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 8160-2 (2001). PMID: 11459944
- Fong, T-L., Han, S.H., Tsai, N.C-S., Morgan, T.R., Mizokami, M., Qian, D., Phan, C., Goad, K., Redeker, A.G. A pilot randomized, controlled trial of the effect of iron depletion on long-term response to a-interferon in patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol* 28: 369-374 (1998). PMID: 9551672

- Fontana, R.J., Israel, J., Eclair, P., Banner, B.F., Tortorelli, K., Grace, N., Levine, R.A., Fiarman, G., Thiim, M., Tavill, A.S., Bonkovsky, H.L. Iron reduction before and during interferon therapy of chronic hepatitis C: results of a multicenter, randomized, controlled trial. *Hepatology* 31:730–736 (2000). PMID: 10706565
- Fracanzani, A.L., Fargion, S., Romano, S., Piperno, A., Arosio, P., Ruggeri, G., Ronchi, G., Fiorelli, G. Immunohistochemical evidence for a lack of ferritin in duodenal absorptive epithelial cells in idiopathic hemochromatosis. *Gastroenterology* 96:1071–1078 (1989). PMID: 2647574
- Franco, R.F., Zago, M.A., Trip, M.D., ten Cate, H., van den Ende, A., Prins, M.H., Kastelein, J.J., Reitsma, P.H. Prevalence of hereditary haemochromatosis in premature atherosclerotic vascular disease. *Br J Haematol* 102:1172–5 (1998). PMID: 9753040
- Frayling, T., Ellard, S., Grove, J., Walker, M., Hattersley, A.T. C282Y mutation in HFE (haemochromatosis) gene and type 2 diabetes. *Lancet* 351:1933–4 (1998). PMID: 9654270
- Furuyama, K., Kondo, M., Hirata, K., Fujita, H., Sassa, S. Extremely rare association of HFE mutations with porphyria cutanea tarda in Japanese patients. (Letter) *Hepatology* 30: 1532-1533 (1999). PMID : 10610355
- Gangaidzo, I. T., Moyo, V. M., Saungweme, T., Khumalo, H., Charakupa, R. M., Gomo, Z. A. R., Loyevsky, M., Stearman, R., La Vaute, T., Enquist, E. G., Rouault, T. A., Gordeuk, V. R. Iron overload in urban Africans in the 1990s. *Gut* 45: 278-283 (1999). PMID : 10403742
- Garry, P.J., Montoya, G.D., Baumgartner, R.N., Liang, H.C., Williams, T.M., Brodie, S.G. Impact of HLA-H mutations on iron stores in healthy elderly men and women. *Blood Cells Mol Dis* 23: 277-87 (1997). PMID: 9410471
- Gasparini, P., Borgato, L., Piperno, A., Girelli D, Olivieri O, Gottardi E, Roetto A, Dianzani I, Fargion S, Schinaia G. Linkage analysis of 6p21 polymorphic markers and the hereditary haemochromatosis: localization of the gene centromeric to HLA-F. *Hum Mol Genet* 2, 571-576 (1993). PMID: 8518796
- George, D.K., Goldwurm, S., MacDonald, G.A., Cowley, L.L., Walker, N.I., Ward, P.J., Jazwinska, E.C., Powell, L.W. Increased hepatic iron concentration in nonalcoholic steatohepatitis is associated with increased fibrosis. *Gastroenterology* 114:311–318 (1998). PMID: 9453491
- Girelli, D., Bozzini, C., Roetto, A., Daraio, F., Colombari, R., Corrocher, R. and Camaschella, C. A new mutation in transferrin receptor 2 gene in Hemochromatosis type 3. BIOIRON 2001- World Congress on Iron Metabolism (Cairns, Australia) O82 (2001).
- Gomez, P.S., Parks, S., Ries, R., Tran, T.C., Gomez, P.F., Press, R.D. Polymorphism in intron 4 of HFE does not compromise haemochromatosis mutation results (Letter) *Nature Genet.* 23: 272 (1999). PMID : 10545944
- Gordeuk, V. R., McLaren, C. E., MacPhail, A. P., Deichsel, G., Bothwell, T. H. Associations of iron overload in Africa with hepatocellular carcinoma and tuberculosis: Strachan's 1929 thesis revisited. *Blood* 87: 3470-3476 (1996). PMID : 8605366
- Gordeuk, V., Mukiibi, J., Hasstedt, S. J., Samowitz, W., Edwards, C. Q., West, G., Ndambire, S., Emmanuel, J., Nkanza, N., Chapanduka, Z., Randall, M., Boone, P., Romano, P., Martell, R. W., Yamashita, T., Effler, P., Brittenham, G. Iron overload in Africa: interaction between a gene and dietary iron content. *New Eng J Med* 326: 95-100 (1992). PMID : 1727237
- Gottschalk, R., Seidl, C., Loffler, T., Seifried, E., Hoelzer, D., And Kaltwasser, J.P. HFE codon 63/282 (H63D/C282Y) dimorphism in German patients with genetic hemochromatosis. *Tissue Antigens* 51, 270-275 (1998). PMID: 9550327
- Grewal, M. S. A sex-linked anaemia in the mouse. *Genet Res* 3: 238-247 (1962).
- Griffiths, W. and Cox, T. Haemochromatosis: novel gene discovery and the molecular pathophysiology of iron metabolism. *Hum Mol Genet* 9: 2377-82 (2000). PMID: 11005792
- Griffiths, W.J.H. and Cox, T.M. Transferrin receptor 2 interacts with HFE and is implicated in crypt cell iron signalling. BIOIRON 2001- World Congress on Iron Metabolism (Cairns, Australia) O11 (2001).
- Grove, J., Daly, A. K., Burt, A. D., Guzail, M., James, O. F. W., Bassendine, M. F., Day, C. P. Heterozygotes for HFE mutations have no increased risk of advanced alcoholic liver disease. *Gut* 43: 262-266 (1998). PMID : 10189855
- Gunshin, H., Mackenzie, B., Berger, U. V., Gunshin, Y., Romero, M. F., Boron, W. F., Nussberger, S., Gollan, J. L. and Hediger, M. A. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature* 388, 482-488 (1997). PMID: 9242408
- Gutierrez, J., Yu, J., Rivera, S., Wessling-Resnick, M. Functional expression cloning and characterization of SFT, a stimulator of Fe transport. *J Cell Biol* 139:895–905 (1997). PMID: 9362508
- Gutierrez, J.A., Yu, J., Wessling-Resnick, M. Characterization and chromosomal mapping of the human gene for SFT, a stimulator of Fe transport. *Biochem Biophys Res Commun* 253: 739–742 (1998). PMID: 9918797
- Guttridge, M.G., Thompson, L., Worwood, M., And Darke, C. Rapid detection of genetic mutations associated with haemochromatosis. *Vox Sang* 75, 253-256 (1998). PMID: 9852416
- Guyader, D., Jacquelinet, C., Moirand, R., Turlin, B., Mendler, M.H., Chaperon, L., David, V., Brissot, P.M., Adams, R., and Deugnier, Y. Noninvasive prediction of fibrosis in C282Y homozygous hemochromatosis. *Gastroenterology* 115,929-936 (1998). PMID: 9753496
- Hacia, Lg. and Collins, F.S. Mutational analysis using oligonucleotide microarrays. *J Med Genet* 36, 730-736 (1999). PMID: 10528850

- Haddow, J.E. and Bradley, L.A. Hereditary haemochromatosis: to screen or not. Conditions for screening are not yet fulfilled. *Br Med J* 319, 532-533 (1999). PMID: 10463879
- Haddy, T. B., Castro, O. L., Rana, S. R. Hereditary hemochromatosis in children, adolescents, and young adults. *Am J Pediat Hemat Oncol* 10: 23-34 (1988). PMID: 3056060
- Haile, D.J. Assignment of Slc11a3 to mouse chromosome 1 band 1B and SLC11A3 to human chromosome 2q32 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 88: 328-9 (2000). PMID: 10828623
- Hardy, L., Hansen, J. L., Kushner, J. P., Knisely, A. S. Neonatal hemochromatosis: genetic analysis of transferrin-receptor, H-apoferritin, and L-apoferritin loci and of the human leukocyte antigen class I region. *Am. J. Path.* 137: 149-153 (1990). PMID : 1973598
- Harrison, P.M. and Arosio, P. The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochim Biophys Acta* 1275(3):161-203 (1996). PMID: 8695634
- Hashimoto, K., Hirai, M., Kurosawa, Y. A gene outside the human MHC related to classical HLA class I genes. *Science* 269: 693-695 (1995). PMID : 7624800
- Hashimoto, K., Hirai, M., Kurosawa, Y. Identification of a mouse homolog for the human hereditary haemochromatosis candidate gene. *Biochem Biophys Res Commun* 230: 35-39 (1997). PMID : 9020055
- Haywood J. (1995) *The Penguin Historical Atlas of Vikings*. (Penguin Books, London).
- Hegele, R.A., Harris, S.B., Zinman, B. Hemochromatosis and diabetes mellitus [Letter]. *Ann Intern Med* 129:587 (1998). PMID: 9758583
- Henz, S., Reichen, J. and Liechti-Gallati, S. HLA-H gene mutations and haemochromatosis: the likely association of H63D with mild phenotype and the detection of S65C, a novel variant in exon 2. *J Hepatol* 26 (Suppl. 1), 57 (1997).
- Hertzberg, M.S., McDonald, D., And Mirochink, O. Rapid diagnosis of hemochromatosis gene Cys282Try mutation by SSCP analysis. *Am. J. Hematol.* 57, 260-261 (1998). PMID: 9495384
- Hezode, C., Cazeneuve, C., Coue, O., Roudot-Thoraval, F., Lonjon, I., Bastie, A., Duvoux, C., Pawlotsky, J.M., Zafrani, E.S., Amselem, S., Dhumeaux, D. Liver iron accumulation in patients with chronic active hepatitis C: prevalence and role of hemochromatosis gene mutations and relationship with hepatic histological lesions. *J Hepatol* 31:979-984 (1999). PMID: 10604569
- Hickman, P. E., Hourigan, L. F., Powell, L. W., Cordingley, F., Dimeski, G., Ormiston, B., Shaw, J., Ferguson, W., Johnson, M., Ascough, J., McDonnell, K., Pink, A., Crawford, D. H. G. Automated measurement of unsaturated iron binding capacity is an effective screening strategy for C282Y homozygous haemochromatosis. *Gut* 46: 405-409 (2000). PMID : 10673305
- Hubert, N. and Hentze, M.W. Regulation of the iron transporter DMT1 in Caco2 cells. BIOIRON 2001- World Congress on Iron Metabolism (Cairns, Australia) P146 (2001).
- Ivanova, A., von Ahsen, N., Adjarov, D., Krastev, Z., Oellerich, M., Wieland, E. : C282Y and H63D mutations in the HFE gene are not associated with porphyria cutanea tarda in Bulgaria. (Letter) *Hepatology* 30: 1531-1532 (1999). PMID: 10610354
- Jackson, H.A., Bowen, D.J.. And Worwood, M. Rapid genetic screening for haemochromatosis using heteroduplex technology. *Br. J. Haematol.* 98, 856-859 (1997). PMID: 9326178
- Jackson, H.A., Carter, K., Darke, C., Guttridge, M.G., Ravine, D., Hutton, R.D., Napier, J.A., Worwood, M. HFE mutations, iron deficiency and overload in 10,500 blood donors. *Br J Haematol* 114:474-84 (2001). PMID: 11529872
- Jackson, H.A., Carter, K., Guttridge, M.G., Darke, C., Napier, J.A., Ravine, D., Worwood, M. Haemochromatosis- prevalence and penetrance in blood donors resident in Wales. *Blood* 94, (Suppl 1), 407a (1999).
- Jazwinska, E. C., Cullen, L. M., Busfield, F., Pyper, W. R., Webb, S. I., Powell, L. W., Morris, C. P., Walsh T. P. Haemochromatosis and HLA-H. (Letter) *Nature Genet* 14: 249-251 (1996). PMID : 8896549
- Jazwinska, E. C., Lee, S. C., Webb, S. I., Halliday, J. W., Powell, L. W. Localization of the hemochromatosis gene close to D6S105. *Am J Hum Genet* 53: 347-352 (1993). PMID : 8328453
- Jeffery, S., Crosby, A., Plange-Rhule, J., Amoah-Danquah, J., Acheampong, J.W., Eastwood, J.B., Malik, A.K. Evidence from a Ghanaian population of known African descent to support the proposition that hemochromatosis is a Caucasian disorder. *Genet Test* 3: 375-7 (1999). PMID: 10627947
- Jeffrey, G. and Adams, P.C. Blood from patients with hereditary hemochromatosis--a wasted resource. *Transfusion* 39: 549-50 (1999). PMID: 10378831
- Jeffrey, G. P., Chakrabarti, S., Hegele, R. A., Adams, P. C. Polymorphism in intron 4 of HFE may cause overestimation of C282Y homozygote prevalence in haemochromatosis. (Letter) *Nature Genet* 22: 325-326 (1999a). PMID : 10431233
- Jeffrey, G.P., Basclain, K., Hajel, J, Chakrabarti S, Adams PC. Alternative splicing produce solubles form of the hereditary hemochromatosis protein HFE. *Blood Cells Mol Dis* 25: 61-67 (1999b). PMID: 10349514
- Jezequel, P., Bargain, M., Lellouche, F., Geffroy, F., Dorval, I. Allele frequencies of hereditary hemochromatosis gene mutations in a local population of west Brittany. *Hum Genet* 102: 332-3 (1998). PMID: 9544848
- Johnson, G. B., Jr. and Frey, W. G. Familial aspects of idiopathic hemochromatosis. *J.A.M.A.* 179: 747-751, 1962.

- Jouanolle, A. M., Gandon, G., Jezequel, P., Blayau, M., Champion, M. L., Yaouanq, J., Mosser, J., Fergelot, P., Chauvel, B., Bouric, P., Carn, G., Andrieux, N., Gicquel, I., Le Gall, J.-Y., David, V. Haemochromatosis and HLA-H. (Letter) *Nature Genet* 14: 251-252 (1996). PMID : 8896550
- Jouanolle, A.M., Fergelot, P., Gandon, G., Yaouanq, J., Le Gall, J.Y., David, V. A candidate gene for hemochromatosis: frequency of the C282Y and H63D mutations. *Hum Genet* 100: 544-547 (1997). PMID : 9341868
- Jouanolle, A.M., Fergelot, P., Raoul, M.L., Gandon, G., Roussey, M., Deugnier, Y., Feingold, J., Le Gall, J.Y., David, V. Prevalence of the C282Y mutation in Brittany: penetrance of genetic hemochromatosis? *Ann Genet* 41: 195-8 (1998). PMID: 9881181
- Kaler, S.G., Devaney, J.M., Pettit, E.L., Kirshman, R., Marino, M.A. Novel method for molecular detection of the two common hereditary hemochromatosis mutations. *Genet Test* 4: 125-9 (2000). PMID: 10953951
- Kawabata H, Yang R, Hiramata T, Vuong PT, Kawano S, Gombart AF, Koeffler HP. Molecular cloning of transferrin receptor 2. A new member of the transferrin receptor-like family. *J Biol Chem* 274: 20826-32 (1999). PMID: 10409623
- Kawabata, H., Germain, R. S., Vuong, P. J., Nakamaki, T., Said, J. W. and Koeffler, H. P. Transferrin receptor 2alpha supports cell growth both in iron-chelated cultured cells and in vivo. *J Biol Chem* 275: 16618-16625 (2000). PMID: 10748106
- Kazemi-Shirazi, L., Datz, C., Maier-Dobersberger, T., Kaserer, K., Hackl, F., Polli, C., Steindl, P.E., Penner, E., Ferenci, P. The relation of iron status and hemochromatosis gene mutations in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 116:127-134 (1999). PMID: 9869610
- Kelly, A. L., Rhodes, D. A., Roland, J. M., Schofield, P., Cox, T. M. Hereditary juvenile haemochromatosis: a genetically heterogeneous life-threatening iron-storage disease. *Quart J Med* 91: 607-618 (1998). PMID: 10024915
- Knisely, A. S., Magid, M. S., Dische, M. R., Cutz, E. Neonatal hemochromatosis. *Birth Defects Orig. Art. Ser.* XXIII: 75-102 (1987). PMID: 3580564
- Krause, A., Neitz, S., Magert, H.J., Schulz, A., Forssmann, W.G., Schulz-Knappe, P., Adermann, K. LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. *FEBS Lett* 480: 147-50 (2000). PMID: 11034317
- Kruta, V. (1990). *Les Celtes* (Presses Universitaires de France)
- Kushner, J. P., Edwards, C. Q., Dadone, M. M., Skolnick, M. H. Heterozygosity for HLA-linked hemochromatosis as a likely cause of the hepatic siderosis associated with sporadic porphyria cutanea tarda. *Gastroenterology* 88: 1232-1238 (1985). PMID : 3979748
- Kwan, T., Leber, B., Ahuja, S., Carter, R., Gerstein, H.C. Patients with type 2 diabetes have a high frequency of the C282Y mutation of the hemochromatosis gene. *Clin Invest Med* 21:251-7 (1998). PMID: 9885759
- Kyger, E.M., Krevolin, M.D., and Powell, M.J. Detection of the hereditary hemochromatosis gene mutation by real-time fluorescence polymerase chain reaction and peptide nucleic acid clamping. *Anal Biochem* 260, 142-148 (1998). PMID: 9657870
- Lebron, J. A., Bennett, M. J., Vaughn, D. E., Chirino, A. J., Snow, P. M., Mintier, G. A., Feder, J. N., Bjorkman, P. J. Crystal structure of the hemochromatosis protein HFE and characterization of its interaction with transferrin receptor. *Cell* 93: 111-123 (1998). PMID : 9546397
- Lebron, J.A. and Bjorkman, P.J. The transferrin receptor binding site on HFE, the class I MHC-related protein mutated in hereditary hemochromatosis. *J Mol Biol* 289: 1109-18 (1999). PMID: 10369785
- Lebron, J.A., West, A.P. Jr, Bjorkman, P.J. The hemochromatosis protein HFE competes with transferrin for binding to the transferrin receptor. *J Mol Biol* 294: 239-45 (1999). PMID: 10556042
- Lee, G. R., Nacht, S., Lukens, J. N., Cartwright, G. E. Iron metabolism in copper-deficient swine. *J Clin Invest* 47: 2058-2069 (1968). PMID : 5675426
- Lee, P.L., Halloran, C., West, C., Beutler, E. Mutation analysis of the transferrin receptor-2 gene in patients with iron overload. *Blood Cells Mol Dis* 27: 285-9 (2001). PMID: 11358389
- Levi, S., Corsi, B., Bosisio, M., Invernizzi, R., Volz, A., Sanford, D., Arosio, P., Drysdale, J. A human mitochondrial ferritin encoded by an intronless gene. *J Biol Chem* 276: 24437-40 (2001). PMID: 11323407
- Levy, J. E., Montross, L. K., Andrews, N. C. (2000) Genes that modify the hemochromatosis phenotype in mice. *J. Clin. Invest.* 105, 1209-1216
- Levy, J.E., Jin, O., Fujiwara, Y., Kuo, F., Andrews, N.C. Transferrin receptor is necessary for development of erythrocytes and the nervous system. *Nat Genet* 21: 396-9 (1999a). PMID: 10192390
- Levy, J.E., Montross, L.K., Cohen, D.E., Fleming, M.D., Andrews, N.C. The C282Y mutation causing hereditary hemochromatosis does not produce a null allele. *Blood* 94: 9-11 (1999b). PMID: 10381492
- Liechti-Gallati, S., Schneider, V., Neeser, D., Kraemer, R. Two buffer PAGE system-based SSCP/HD analysis: a general protocol for rapid and sensitive mutation screening in cystic fibrosis and any other human genetic disease. *Eur J Hum Genet* 7: 590-8 (1999). PMID: 10439967
- Longo, F., Zecchina, G., Sbaiz, L., Fischer, R., Piga, A., Camaschella, C. The influence of hemochromatosis mutations on iron overload of thalassemia major. *Haematologica* 84: 799-803 (1999). PMID: 10477452

- Lord, D.K., Dunham, I., Campbell, R.D., Bomford, A., Strachan, T., Cox, T.M. Molecular analysis of the human MHC class I region in hereditary haemochromatosis: a study by pulsed-field gel electrophoresis. *Hum. Genet* 85: 531-536 (1990). PMID : 2227939
- Lucotte G, Mercier G. Celtic origin of the C282Y mutation of hemochromatosis. *Genet Test* 4: 163-9 (2000). PMID: 10953956
- Lucotte, G. and Hazout, S. Geographic and ethnic distributions of the more frequent cystic fibrosis mutations in Europe show that a founder effect is apparent for several mutant alleles. *Hum Biol* 67: 562-76 (1995). PMID: 7649531
- Malfroy, L., Coppin, H., Calandro, L.M. A new microsatellite marker at the RFP locus on chromosome 6p22 definitely located the haemochromatosis gene at least one megabase telomeric to HLA-A. *Eur J Hum Genet* 5: 105 (1996).
- Mangasser-Stephan, K., Tag, C., Reiser, A., And Gressner, A.M. Rapid genotyping of hemochromatosis gene mutations on the LightCycler with fluorescent hybridisation probes. *Clin Chem* 45: 1875-1878 (1999). PMID: 10508142
- Marshall, D.S., Linfert, D.R., Tsongalis, G.J. Prevalence of the C282Y and H63D polymorphisms in a multi-ethnic control population. *Int J Mol Med* 4: 389-93 (1999). PMID: 10493980
- Martinelli, A.L., Franco, R.F., Villanova, M.G., Figueiredo, J.F., Secaf, M., Tavella, M.H., Ramalho, L.N., Zucoloto, S., Zago, M.A. Are haemochromatosis mutations related to the severity of liver disease in hepatitis C virus infection? *Acta Haematol* 102:152-156 (2000). PMID: 10692680
- McDonnell, S.M., Hover, A., Gloe, D., Ou, C-Y., Cogswell, M.E. and Glummer-Stawn, L. Population-based screening for hemochromatosis using phenotypic and DNA testing among employees of health maintenance organizations in Springfield, Missouri. *Am J Med* 107: 30-37 (1999). PMID: 10403350
- McDonnell, S.M., Phatak, P.D., Feliti, V., Hover, A., and McLaren, G.D. Screening for hemochromatosis in primary care settings. *Ann Intern Med* 129: 962-970 (1998). PMID: 9867749
- McGill, J.R., Naylor, S.L., Sakaguchi, A.Y., Moore, C.M., Boyd, D., Barrett, K.J., Shows, T.B., Drysdale, J.W. Human ferritin H and L sequences lie on ten different chromosomes. *Hum Genet* 76: 66-72 (1987). PMID: 3032771
- McKie, A.T., Barrow, D., Latunde-Dada, G.O., Rolfs, A., Sager, G., Mudaly, E., Mudaly, M., Richardson, C., Barlow, D., Bomford, A., Peters, T.J., Raja, K.B., Shirali, S., Hediger, M.A., Farzaneh, F., Simpson, R.J. An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron. *Science* 291: 1755-1759 (2001). PMID : 11230685
- McKie, A.T., Marciani, P., Rolfs, A., Brennan, K., Wehr, K., Barrow, D., Miret, S., Bomford, A., Peters, T.J., Farzaneh, F., Hediger, M.A., Hentze, M.W., Simpson, R.J. A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation. *Mol Cell* 5: 299-309 (2000). PMID: 10882071
- McNamara, L., MacPhail, A. P., Gordeuk, V.R., Hasstedt, S.J., Rouault, T. Is there a link between African iron overload and the described mutations of the hereditary haemochromatosis gene? *Brit J Haemat* 102: 1176-1178 (1998). PMID : 9753041
- Meissner, P.N., Dailey, T.A., Hift, R.J., Ziman, M., Corrigan, A.V., Roberts, A.G., Meissner, D.M., Kirsch, R.E., Dailey, H.A. A R59W mutation in human protoporphyrinogen oxidase results in decreased enzyme activity and is prevalent in South Africans with variegate porphyria. *Nat Genet* 13: 95-7 (1996). PMID: 8673113
- Mendez, M., Sorkin, L., Rossetti, M. V., Astrin, K. H., Batlle, A. M. del C., Parera, V. E., Aizencang, G., Desnick, R. J. : Familial porphyria cutanea tarda: characterization of seven novel uroporphyrinogen decarboxylase mutations and frequency of common hemochromatosis alleles. *Am J Hum Genet* 63: 1363-1375 (1998). PMID: 9792863
- Mercier, B., Mura, C., Ferec, C. Putting a hold on 'HLA-H.' (Letter) *Nature Genet* 15: 234 (1997). PMID : 9054932
- Mercier, G., Bathelier, C., Lucotte, G. Frequency of the C282Y mutation of hemochromatosis in five French populations. *Blood Cells Mol Dis* 24: 165-6 (1998a). PMID: 9642097
- Mercier, G., Burckel, A., Bathelier, C., Boillat, E., Lucotte, G. Mutation analysis of the HLA-H gene in French hemochromatosis patients, and genetic counseling in families. *Genet Couns* 9: 181-6 (1998b). PMID: 9777338
- Merryweather-Clarke, A.T., Lui, Y-T., Shearman, J.D., Pointon, LL, And Robson, K.J.H. A rapid non-invasive method for the detection of the haemochromatosis C282Y mutation. *Br J Haematol* 99: 460-463, (1997b). PMID: 9375773
- Merryweather-Clarke, A.T., Pointon, J.J., Jouanolle, A.M., Rochette, J., Robson, K.J. Geography of HFE C282Y and H63D mutations. *Genet Test* 4: 183-98 (2000). PMID: 10953959
- Merryweather-Clarke, A.T., Pointon, J.J., Shearman, J.D., Robson, K.J.H. Global prevalence of putative haemochromatosis mutations. *J Med Genet* 34: 275-278, (1997a). PMID: 9138148
- Merryweather-Clarke, A.T., Pointon, LL, Shearman, J.D., Robson, K.J.H., Jouanolle, A.M., Mosser, A., David, V., Le Gall, L-Y., Halsall, D.J., Elsey, T.S., Kelly, A., Chette, L, Borot, N., Coppin, H., Roth, M-R., Ryan, E., Crowe, L, Totaro, A., Gasparini, P., Roe7to, A., Camaschella, C., Darke, C., Wallace, D.F., Saeb-Parsy, K., Dooley, Ls., Worwood, M. and Walker, A.P. Polymorphism in intron 4 of HFE does not compromise haemochromatosis mutation results. *Nature Genet.* 23, 271 (1999a).

- Merryweather-Clarke, A.T., Simonsen, H., Shearman, J.D., Pointon, J.J., Norgaard-Pedersen, B., Robson, K.J.H. A retrospective anonymous pilot study in screening newborns for HFE mutations in Scandinavian populations. *Hum Mutat* 13: 154-159 (1999b). PMID : 10094552
- Merryweather-Clarke, A.T., Worwood, M., Parkinson, L., Mattock, C., Pointon, J.J., Shearman, J.D., And Robson, K.J.H. The effects of HFE mutations on serum ferritin and transferrin saturation in the Jersey population. *Br J Haematol* 101: 369-373 (1998).
- Miedzymbrodzka, Z., Loughlin, S., Baty, D., Terron, A., Kelly, K., Dean, J., Greaves, M., Pippard, M., Haites, N. Haemochromatosis mutations in North-East Scotland. *Br J Haematol* 106: 385-7 (1999). PMID: 10460595
- Mikelsaar, A-V., Beckman, L., Tasa, G. and Pearlist, P. Regional differences of hemochromatosis mutations in Estonian population. *Eur J Hum Genet* 7 (Suppl. I), P-595 (1999).
- Milman, N., Graudal, N., Nielsen, L. S., Fenger, K. HLA determinants in 70 Danish patients with idiopathic haemochromatosis. *Clin Genet* 33: 286-292 (1988). PMID : 3359685
- Moirand, R., Adams, P.C., Bicheler, V., Brissot, P., Deugnier Y. Clinical features of genetic hemochromatosis in women compared with men. *Ann Intern Med* 15:105-110 (1997a). PMID: 9229998
- Moirand, R., Jouanolle, A.M., Brissot, P., Le Gall, J.Y., David, V., Deugnier, Y. Phenotypic expression of HFE mutations: a French study of 1110 unrelated iron-overloaded patients and relatives. *Gastroenterology* 116: 372-7 (1999). PMID: 9922318
- Moirand, R., Mortar, A.M., Lortal, O., Paillard, R., Brissot, R., And Deugnier, Y. A new syndrome of liver iron overload with normal transferrin saturation. *Lancet* 349: 95-97 (1997b). PMID: 8996422
- Monaghan, K.G., Rybicki, B.A., Shurafa, M., Feldman, G.L. Mutation analysis of the HFE gene associated with hereditary hemochromatosis in African Americans. *Am J Hematol* 58: 213-217 (1998). PMID : 9662273
- Montosi, G., Paglia, P., Garuti, C., Guzman, C.A., Bastin, J.M., Colombo, M.P., Pietrangelo, A. Wild-type HFE protein normalizes transferrin iron accumulation in macrophages from subjects with hereditary hemochromatosis. *Blood* 96: 1125-1129 (2000). PMID: 10910932
- Montosi, G., Donovan, A., Totaro, A., Garuti, C., Pignatti, E., Cassanelli, S., Trenor CC., Gasparini, P., Andrews, N.C., and Pietrangelo, A. Autosomal dominant hemochromatosis is associated with a mutation in the ferroportin (SCL11A3) gene. *J Clin Invest* 108: 619-23 (2001). PMID: 11518736
- Moreno, L., Vallcorba, P., Boixeda, D., Cabello, P., Bermejo, F., San Roman, C. The usefulness of the detection of Cys282Tyr and His63Asp mutations in the diagnosis of hereditary hemochromatosis. *Rev Clin Esp* 199 :632-6 (1999). PMID: 10589245
- Moyo, V.M., Gangaidzo, I.T., Gordeuk, V.R., Kiire, C.F., MacPhail, A.P. Tuberculosis and iron overload in Africa: a review. *Cent Afr J Med* 43: 334-339 (1997). PMID: 9631102
- Moyo, V.M., Mandishona, E., Hasstedt, S.J., Gangaidzo, I.T., Gomo, Z.A.R., Khumalo, H., Saungweme, T., Kiire, C.F., Paterson, A.C., Bloom, P., MacPhail, A.P., Rouault, T., Gordeuk, V.R. Evidence of genetic transmission in African iron overload. *Blood* 91: 1076-1082 (1998). PMID : 9446671
- Mullighan, C.G., Bunce, M., Fanning, G.C., Marshall, S.E. and Welsh, K.I. A rapid method of haplotyping HFE mutations and linkage disequilibrium in a Caucosoid population. *Gut* 42,566-569 (1998). PMID: 9616322
- Mura, C., Le Gac, G., Fére, C. Identification of promoter elements and regulatory proteins of the human HFE gene. BIOIRON 2001- World Congress on Iron Metabolism (Cairns, Australia) O88 (2001).
- Mura, C., Raguene, O., Ferec, C. HFE mutations analysis in 711 hemochromatosis probands: evidence for S65C implication in mild form of hemochromatosis. *Blood* 93: 2502-2505 (1999). PMID : 10194428
- Murphy, S., Curran, M.D., McDougall, N., Callender, M.E., O'Brien, C.J., Middleton, D. High incidence of the Cys 282 Tyr mutation in the HFE gene in the Irish population--implications for haemochromatosis. *Tissue Antigens* 52: 484-8 (1998). PMID: 9864039
- Murray, K.F. and Kowdley, K.V. Neonatal hemochromatosis. *Pediatrics* 108: 960-4 (2001). PMID: 11581451
- Nassar, B.A., Zayed, E.M., Title, L.M., O'Neill, B.J., Bata, I.R., Kirkland, S.A., Dunn, J., Dempsey, G.I., Tan, M.H., Johnstone, D.E. Relation of HFE gene mutations, high iron stores and early onset coronary artery disease. *Can J Cardiol* 14:215-20 (1998). PMID: 9520858
- Negro, F., Samii, K., Rubbia-Brandt, L., Quadri, R., Male, P.J., Zarski, J.P., Baud, M., Giostra, E., Beris, P., Hadengue, A. Hemochromatosis gene mutations in chronic hepatitis C patients with and without liver siderosis. *J Med Virol* 60:21-27 (2000). PMID: 10568758
- Nicolas, G., Bennoun, M., Devaux, I., Beaumont, C., Grandchamp, B., Kahn, A., Vaulont, S. 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* 98: 8780-5 (2001). PMID: 11447267
- Niederau, C., Fischer, R., Purschel, A., Stremmel, W., Haussinger, D., and Strohmeyer, G. Long-term survival in patients with hereditary hemochromatosis. *Gastroenterology* 110: 1107-1119 (1996). PMID: 8613000
- Nielsen, P., Carpinteiro, S., Fischer, R., Cabeda, J.M., Porto, G., Gabbe, E.E. Prevalence of the C282Y and H63D mutations in the HFE gene in patients with hereditary haemochromatosis and in control subjects from Northern Germany. *Br J Haematol* 103: 842-5 (1998). PMID: 9858243
- Nielsen, P., Zyriax, B., Fischer, R., Boeing, H. and Windler, E. Prevalence of the HFE-gene mutations and iron parameters in women with coronary heart disease (CORA-STUDY). BIOIRON 2001- World Congress on Iron Metabolism (Cairns, Australia) O74 (2001).

- Njajou, O.T., Vaessen, N., Joosse, M., Berghuis, B., Dongen, J.W.F., Breuning, M.H., Snijders, P.J.L.M., Rutten, W.P.F., Sandkuijl, L.A., Oostra, B.A., Duijn C.M., and Heutink, P. A mutation in SLC11A3 is associated with autosomal dominant hemochromatosis. *Nat Genet* 28: 213-214 (2001). PMID: 11431687
- Noll, W.W., Belloni, D.R., Stenzel, T.T., Grody, W.W. Polymorphism in intron 4 of HFE does not compromise haemochromatosis mutation results (Letter) *Nature Genet* 23: 271-272 (1999).
- Oberkanins, C., Moritz, A., de Villiers, J.N., Kotze, M.J., Kury, F. A reverse-hybridization assay for the rapid and simultaneous detection of nine HFE gene mutations. *Genet Test* 4: 121-4 (2000). PMID: 10953950
- Olynyk, J.K., Cullen, D.J., Aquilia, S., Rossi, E., Summerville, L., Powell, L. W. A population-based study of the clinical expression of the hemochromatosis gene. *New Eng J Med* 341: 718-724 (1999). PMID: 10471457
- Olynyk, J.K., Reddy, K.R., Di Bisceglie, A.M., Jeffers, L.J., Parker, T.I., Radick, J.L., Schiff, E.R., Bacon, B.R. Hepatic iron concentration as a predictor of response to interferon a therapy in chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 108:1104–1109 (1995). PMID: 7698578
- OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man. <http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/>
- Osaki, S., Johnson, D.A., Frieden, E. The possible significance of the ferrous oxidase activity of ceruloplasmin in normal human serum. *J Biol Chem* 241: 2746-51 (1966). PMID: 5912351
- Papanikolaou, G., Politou, M., Terpos, E., Fourlemadis, S., Sakellaropoulos, N., Loukopoulos, D. Hereditary hemochromatosis: HFE mutation analysis in Greeks reveals genetic heterogeneity. *Blood Cells Mol Dis* 26 :163-8 (2000). PMID: 11001626
- Park, C.H., Valore, E.V., Waring, A.J., Ganz, T. Hcpidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J Biol Chem* 276: 7806-10 (2001). PMID: 11113131
- Parkkila, S., Waheed, A., Britton, R.S., Bacon, B.R., Zhou, X.Y., Tomatsu, S., Fleming, R.E., Sly, W.S. Association of the transferrin receptor in human placenta with HFE, the protein defective in hereditary hemochromatosis. *Proc Nat Acad Sci* 94: 13198-13202 (1997a). PMID : 9371823
- Parkkila, S., Waheed, A., Britton, R.S., Feder, J.N., Tsuchihashi, Z., Schatzman, R.C., Bacon, B.R., Sly, W.S. Immunohistochemistry of HLA-H, the protein defective in patients with hereditary hemochromatosis, reveals unique pattern of expression in gastrointestinal tract. *Proc Nat Acad Sci* 94: 2534-2539 (1997b). PMID: 9122230
- Phatak, P.D., Sham, R.L., Raubertas, R.F., Dunnigan, K., O'Leary, M.T., Braggins, C., Cappuccio, J.D. Prevalence of hereditary hemochromatosis in 16,031 primary care patients. *Ann Intern Med* 129: 954-961 (1998). PMID: 9867748
- Phelps, G., Chapman, I., Hall, P., Braund, W., Mackinnon, M. Prevalence of genetic haemochromatosis among diabetic patients. *Lancet* 2: 233-4 (1989). PMID: 2569052
- Pier, G.B., Grout, M., Zaidi, T., Meluleni, G., Mueschenborn, S.S., Bainting, G., Ratcliff, R., Evans, M.J. and Colledge, W.H. *Salmonella typhi* uses CFTR to enter intestinal epithelial cells. *Nature* 393: 79-82 (1998). PMID: 9590693
- Pietrangelo, A., Casalgrandi, G., Quaglino, D., Gualdi, R., Conte, D., Milani, S., Montosi, G., Cesarini, L., Ventura, E. and Cairo, G. Duodenal ferritin synthesis in genetic hemochromatosis. *Gastroenterology* 108: 208-217 (1995). PMID: 7806043
- Pietrangelo, A., Montosi, G., Totaro, A., Garuti, C., Conte, D., Cassanelli, S., Fraquelli, M., Sardini, C., Vasta, F., Gasparini, P. Hereditary hemochromatosis in adults without pathogenic mutations in the hemochromatosis gene. *New Eng J Med* 341: 725-732 (1999). PMID : 10471458
- Pietrangelo, A., Rocchi, E., Casalgrandi, G., Rigo, G., Ferrari, A., Perini, M., Ventura, E., Cairo, G. Regulation of transferrin, transferrin receptor and ferritin genes in human duodenum. *Gastroenterology* 102: 8002–8009 (1992). PMID: 1537518
- Pigeon, C., Ilyin, G., Courselaud, B., Leroyer, P., Turlin, B., Brissot, P., Loreal, O. A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. *J Biol Chem* 276: 7811-9 (2001). PMID: 11113132
- Piperno, A., Sampietro, M., D'Alba, R., Roffi, L., Fargion, S., Parma, S., Nicoli, C., Corbetta, N., Pozzi, M., Arosio, V., Boari, G., Fiorelli, G. Iron stores, response to α -interferon therapy, and effects of iron depletion in chronic hepatitis C. *Liver*16:248–254 (1996). PMID: 8877995
- Piperno, A., Sampietro, M., Pietrangelo, A., Arosio, C., Lupica, L., Montosi, G., Vergani, A., Fraquelli, M., Girelli, D., Pasquero, P., Roetto, A., Gasparini, P., Fargion, S., Conte, D., Camaschella, C. Heterogeneity of hemochromatosis in Italy. *Gastroenterology* 114: 996-1002 (1998a). PMID : 9558289
- Piperno, A., Vergani, A., Malosio, I., Parma, L., Fossati, L., Ricci, A., Bovo, G., Boari, G., Mancina, G. Hepatic iron overload in patients with chronic viral hepatitis: role of HFE gene mutations. *Hepatology* 28: 1105–1109 (1998b). PMID: 9755249
- Pointon, J.J., Wallace, D., Merryweather-Clarke, A.T., Robson, K.J. Uncommon mutations and polymorphisms in the hemochromatosis gene. *Genet Test* 4: 151-61 (2000). PMID: 10953955
- Porto, G. and De Sousa, M. (2000) Variation of hemochromatosis prevalence and genotype in national groups. In: *Hemochromatosis Genetics, Pathophysiology, Diagnosis, and Treatment*. J. Barton and C. Edwards (eds.) (Cambridge University Press, Cambridge, UK) pp. 51-62.
- Porto, G., Alves, H., Rodrigues, P., Cabeda, J.M., Portal, C., Ruivo, A., Justica, B., Wolff, R., De Sousa, M. Major histocompatibility complex class I associations in iron overload: evidence for a new link between the HFE

- H63D mutation, HLA-A29, and non-classical forms of hemochromatosis. *Immunogenetics* 47(5):404-10 (1998). PMID: 9510559
- Powell, L.W. and Isselbacher, K.J. Hemochromatosis. En: Harrison's Principles of Internal Medicine, 12th edition. pp 1825-1829 (1996)
- Powell, L.W. Does transplantation of the liver cure haemochromatosis. *J Hepatol* 16: 259-261 (1992). PMID: 1487600
- Powell, L.W. Hemochromatosis: the impact of early diagnosis and therapy. *Gastroenterology* 110, 1304-1307, 1996. PMID: 8613021
- Powell, L.W. Hereditary hemochromatosis. *Pathology* 32: 24-36 (2000). PMID: 10740801
- Powell, L.W., George, D. K., McDonnell, S. M., Kowdley, K. V. Diagnosis of hemochromatosis. *Ann. Intern. Med.* 129: 925-931 (1998). PMID : 9867744
- Raha-Chowdhury, R., Bowen, D.J., Burnett, A.K., Worwood, M. Allelic associations and homozygosity at loci from HLA-B to D6S299 in genetic haemochromatosis. *J Med Genet* 32: 442-452 (1995). PMID: 7666396
- Rasmussen, M.L., Folsom, A.R., Catellier, D.J., Tsai, M.Y., Garg, U., Eckfeldt, J.H. A prospective study of coronary heart disease and the hemochromatosis gene (HFE) C282Y mutation: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Atherosclerosis* 154: 739-46 (2001). PMID: 11257277
- Remacha, A.F., Barcelo, M.J., Sarda, M.P., Blesa, I., Altes, A., Baiget, M. The S65C mutation in Spain. Implications for iron overload screening. *Haematologica* 85: 1324-5 (2000). PMID: 11114141
- Restagno, G., Gomez, A.M., Sbaiz, L., De Gobbi, M., Roetto, A., Bertino, E., Fabris, C., Fiorucci, G.C., Fortina, P., Camaschella, C. A pilot C282Y hemochromatosis screening in Italian newborns by TaqMan technology. *Genet Test* 4: 177-81 (2000). PMID: 10953958
- Rhodes, D. A., Raha-Chowdhury, R., Cox, T. M., Trowsdale, J. Homozygosity for the predominant Cys282Tyr mutation and absence of disease expression in hereditary haemochromatosis. *J Med Genet* 34: 761-764 (1997). PMID: 9321765
- Rhodes, D.A. and Trowsdale, J. Alternative splice variants of the hereditary hemochromatosis protein HFE. *Immunogenetics* 49: 357-359 (1999). PMID: 10079302
- Riedel, H., Muckenthaler, M., Gehrke, S., Mohr, I., Brennan, K., Herrmann, T., Fitscher, B., Hentze, M., Stremmel, W. HFE downregulates iron uptake from transferrin and induces iron-regulatory protein activity in stably transfected cells. *Blood* 94: 3915-3921 (1999). PMID: 10572108
- Risch, N. Haemochromatosis, HFE and genetic complexity. (Letter) *Nature Genet* 17: 375-376 (1997). PMID: 9398831
- Ritter, B., Safwenberg, J., Olsson, K. S. HLA as a marker of the hemochromatosis gene in Sweden. *Hum Genet* 68: 62-66 (1984). PMID : 6500556
- Rivard, S.R., Mura, C., Simard, H., Simard, R., Grimard, D., Le Gac, G., Raguene, O., Ferec, C., De Braekeleer, M. Mutation analysis in the HFE gene in patients with hereditary haemochromatosis in Saguenay-Lac-Saint-Jean (Quebec, Canada). *Br J Haematol* 108: 854-8 (2000). PMID: 10792295
- Roberts, A.G., Whatley, S.D., Morgan, R.R., Worwood, M., Elder, G.H. Increased frequency of the haemochromatosis Cys282Tyr mutation in sporadic porphyria cutanea tarda. *Lancet* 349: 321-323 (1997). PMID: 9024376
- Robson, K.J., Merryweather-Clarke, A.T., Pointon, J.J., Shearman, J.D., Halsall, D.J., Kelly, A., Cox, T.M., Rosenberg, W.M., Howell, M., Eccles, D., Patch, C., Fowler, A.V., Wallace, D.F., Camaschella, C., Roetto, A., Zecchina, G., De Gobbi, M., Gasparini, P., Cadet, E., Vandwalle, J-L., Capron, D., Rochette, J., Borot, N., Demangel, C., Dery, R., Vinel, J.P., Pascal, J.P., Coppin, H. and Roth, M.P. Diagnosis and management of hemochromatosis since the discovery of the HFE gene: a European experience. *Br J Haematol* 108: 31-39 (2000). PMID: 10651721
- Rochette, J., Pointon, J.J., Fisher, C.A., Perera, G., Arambepola, M., Kodikara Arichchi, D.S., De Silva, S., Vandwalle, J.L., Monti, J.P., Old, J.M., Merryweather-Clarke, A. T., Weatherall, D. J., Robson, K. J. H. Multicentric origin of hemochromatosis gene (HFE) mutations. *Am J Hum Genet* 64: 1056-1062 (1999). PMID: 10090890
- Roest, M., van der Schouw, Y.T., de Valk, B., Marx, J.J.M., Tempelman, M.J., de Groot, P.G., Sixma, J.J., Banga, J.D. Heterozygosity for a hereditary hemochromatosis gene is associated with cardiovascular death in women. *Circulation* 100: 1268-73 (1999). PMID: 10491369
- Roetto, A., Alberti, F., Daraio, F., Cali, A., Cazzola, M., Totaro, A., Gasparini, P., Camaschella, C. Exclusion of ZIRT1 as candidate gene of Juvenile Hemochromatosis and refinement of the critical interval on 1q21. *Blood Cells Mol Dis* 26: 205-210 (2000). PMID: 10950940
- Roetto, A., Totaro, A., Cazzola, M., Cicilano, M., Bosio, S., D'Ascola, G., Carella, M., Zelante, L., Kelly, A. L., Cox, T. M., Gasparini, P., Camaschella, C. Juvenile hemochromatosis locus maps to chromosome 1q. *Am J Hum Genet* 64: 1388-1393 (1999). PMID: 10205270
- Roetto, A., Totaro, A., Piperno, A., Piga, A., Longo, F., Garozzo, G., Cali, A., De Gobbi, M., Gasparini, P., Camaschella, C. New mutations inactivating transferrin receptor 2 in hemochromatosis type 3. *Blood* 97: 2555-60 (2001). PMID: 11313241

- Roth, M-P., Giraldo, P., Hariti, G., Poloni, E.S., Sanchez-Mazas, A., De Stefano, G.F., Dugoujon, J-M., Coppin, H. Absence of the hemochromatosis gene Cys282Tyr mutation in three ethnic groups from Algeria (Mzab), Ethiopia, and Senegal. *Immunogenetics* 46: 222-225 (1997). PMID: 9211748
- Rothenberg, B.E. and Volland, J.R. Beta-2 knockout mice develop parenchymal iron overload: a putative role for class I genes of the major histocompatibility complex in iron metabolism. *Proc Nat Acad Sci* 93: 1529-1534 (1996). PMID: 8643666
- Roy, C.N., Penny, D.M., Feder, J.N., Enns, C.A. The hereditary hemochromatosis protein, HFE, specifically regulates transferrin-mediated iron uptake in HeLa cells. *J Biol Chem* 274: 9022-9028 (1999). PMID: 10085150
- Ruiz-Arguelles, G.J., Garcés-Eisele, J., Reyes-Núñez, V., Sánchez-Anzaldo, J., Ruiz-Delgado, G.J., Jiménez-González, C., Carrera, B. Heterozygosity for the H63D mutation in the hereditary hemochromatosis (HFE) gene may lead into severe iron overload in beta-thalassemia minor: observations in a thalassaemic kindred. *Rev Invest Clin* 53: 117-20 (2001). PMID: 11421105
- Ryan, E., O'Keane, C., Crowe, J. Hemochromatosis in Ireland and HFE. *Blood Cells Molecules Dis* 24: 428-432 (1998). PMID: 9851896
- Saddi, R. and Feingold, J. Idiopathic haemochromatosis: an autosomal recessive disease. *Clin Genet* 5: 234-241 (1974). PMID: 4838891
- Salonen, J.T., Tuomainen, T.P., Nyyssonen, K., Lakka, H.M., Punnonen, K. Relation between iron stores and non-insulin dependent diabetes in men: case-control study. *BMJ* 317: 727 (1998). PMID: 9732340
- Santos, M., Clevers, H. C., Marx, J. J. M. :Mutations of the hereditary hemochromatosis candidate gene HLA-H in porphyria cutanea tarda. (Letter) *New Eng J Med* 336: 1327-1328 (1997). PMID: 9132598
- Sargent, T.III, Lim, T.H., Jenson, R.L. Reduced chromium retention in patients with hemochromatosis, a possible basis of hemochromatotic diabetes. *Metabolism* 28: 70-79 (1979). PMID: 104124
- Scully, R.E., Mark, E.J., McNeely, B.U. Case records of the Massachusetts General Hospital: Case 25-1983. *New Eng J Med* 308: 1521-1529 (1983). PMID: 6855826
- Setterblad, N., Onyango, I., Pihlgren, U., Rask, L., Andersson, G. The role of protein kinase C signaling in activated DRA transcription. *J Immunol* 161: 4819-24 (1998). PMID: 9794414
- Shaheen, N.J., Bacon, B.R., Grimm, I.S. Clinical characteristics of hereditary hemochromatosis patients who lack the C282Y mutation. *Hepatology* 28: 526-9 (1998). PMID: 9696020
- Sham, R.L., Ou, C.Y., Cappuccio, J., Braggins, C., Dunnuigan, K. and Phatak, P.D. Correlation between genotype and phenotype in hereditary hemochromatosis: analysis of 61 patients. *Blood Cells Mol Dis* 23: 314-320 (1997). PMID: 9410475
- Sheldon, J.H. Hemochromatosis. London: Oxford Univ. Press (pub.) pp. 19 (1935).
- Shoda, T., Yanai, J., Soejima, H. and Tamura, K. Frequencies in the Japanese population of HFE gene mutations. *Biochem Genet* 37: 63-68 (1999). PMID: 10429833
- Simon, M., Bourel, M., Fauchet, R., Genetet, B. Association of HLA-A3 and HLA-B14 antigens with idiopathic haemochromatosis. *Gut* 17: 332-334 (1976). PMID: 1278715
- Simon, M., Bourel, M., Genetet, B., Fauchet, R. Idiopathic hemochromatosis: demonstration of recessive transmission and early detection by family HLA typing. *New Eng J Med* 297: 1017-1021 (1977). PMID: 909547
- Simon, M., Fauchet, R., Hespel, J.P., Beaumont, C., Brissot, P., Hary, B., De Nercy, H.Y.H., Genetet, B., Bourel, M. Idiopathic hemochromatosis: a study of biochemical expression in 247 heterozygous members of 63 families: evidence for a single major HLA-linked gene. *Gastroenterology* 78: 703-708 (1980). PMID: 7353757
- Simon, M., Fauchet, R., Le Gall, J.Y., Brissot, P., Bourel, M. Immunogenetics of idiopathic hemochromatosis and secondary iron overload. In: Farid, N. R. Immunogenetics of Endocrine Disorders. New York: Alan R. Liss (pub.) pp. 345-371 (1988).
- Simon, M., Pawlotsky, Y., Bourel, M., Fauchet, R., Genetet, B. Hemochromatose idiopathique: maladie associée à l'antigène tissulaire HLA-3?. *Nouv Presse Med* 4: 1432 (1975).
- Simonsen, K., Dissing, L., Rudbeck, L., And Schwartz, M. Rapid and simple determination of hereditary haemochromatosis mutations by multiplex PCR-SSCR detection of a new polymorphic mutation. *Ann Hum Genet* 63: 193-197 (1999). PMID: 10738531
- Simpson, P.C., Roach, D., Woolley, A.T., Thorsen, T., Johnston, R., Sensabaugh, G.F., and Mathies, R.A. High-throughput genetic analysis using microfabricated 96 sample capillary array electrophoresis microplates. *Proc Nat Acad Sci USA* 95: 2256-2261 (1998). PMID: 9482872
- Sly, W.S., Fleming, R.E., Holden, C.C., Tomatsu, S., Brunt, E.M., Britton, R.S., Waheed, A., Bacon, B.R., Sproule, T.J., Jawwinska, E.C. and Roopenian, D.C. Strain differences in susceptibility to iron accumulation in two murine models of Hereditary Hemochromatosis provide evidence for naturally variant modifier genes influencing the phenotype of murine HH. BIOIRON 2001- World Congress on Iron Metabolism (Cairns, Australia) O84 (2001).
- Smillie, D.A. PCR-SSP method for detecting the His63Asp mutation in the HFE gene associated with hereditary haemochromatosis. *J Clin Pathol Mol Pathol* 51: 232-233 (1998). PMID: 9893753
- Smith, B.C., Gorge, J., Guzail, M.A., Day, C.P., Daly, A.K., Burt, A.D., Bassendine, M.F. Heterozygosity for hereditary hemochromatosis is associated with more fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology* 27: 1695-1699 (1998). PMID: 9620344

- Somerville, M.L., Sprysak, K.A., Hicks, M., Elyas, B.G., And Vicen-Wyhony, L. An HFE intronic variant promotes misdiagnosis of hereditary hemochromatosis. *Am J Hum Genet* 65: 924-926 (1999). PMID: 10441599
- Sproule, T.J., Jazwinska, E.C., Britton, R.S., Bacon, B.R., Fleming, R.E., Sly, W.S., Roopenian, D.C. Naturally variant autosomal and sex-linked loci determine the severity of iron overload in beta 2-microglobulin-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 5170-4 (2001). PMID: 11309500
- Steffensen, R., Varming, K. and Jersild, C. Determination of gene frequencies for two common haemochromatosis mutations in the Danish population by a novel polymerase chain reaction with sequence-specific primers. *Tissue Antigens* 52: 230-235 (1998). PMID: 9802602
- Stone, C., Pointon, J.J., Jazwinska, E.C., Halliday, J.W., Powell, L.W., Robson, K.J., Monaco, A.P., Weatherall, D.J. Isolation of CA dinucleotide repeats close to D6S105: linkage disequilibrium with haemochromatosis. *Hum Mol Genet* 3: 2043-2046 (1994). PMID: 7874124
- Stott, M.K., Fellowes, A.P., Upton, J.D., Burt, M.J and George, P.M. Simple multiplex PCR for the simultaneous detection of the C282Y and H63D hemochromatosis (HFE) mutations. *Clin Chem* 45: 426-428 (1999). PMID: 10053052
- Stuart, K.A., Busfield, F., Jazwinska, E.C., Gibson, P., Butterworth, L.A., Cooksley, W.G., Powell, L.W., Crawford, D.H.G. The C282Y mutation in the haemochromatosis gene (HFE) and hepatitis C virus infection are independent cofactors for porphyria cutanea tarda in Australian patients. *J Hepatol* 28: 404-409 (1998). PMID: 9551677
- Su, M.A., Trenor, C.C., Fleming, J.C., Fleming, M.D., Andrews, N.C. The G185R mutation disrupts function of the iron transporter Nramp2. *Blood* 92: 2157-63 (1998). PMID: 9731075
- Sullivan, J.L. Iron and the sex difference in heart disease risk. *Lancet* 1: 1293-4 (1981). PMID: 6112609
- Szakony, S., Balogh, I., Muszbek, L. The frequency of the haemochromatosis C282Y mutation in the ethnic Hungarian and Romany populations of eastern Hungary. *Br J Haematol* 107: 464-5 (1999). PMID: 10583244
- Takeuchi, T., Soerma, H., Faed, Lm., And Yun, K. Efficient large-scale screening for hemochromatosis susceptibility gene mutation. *Blood* 90: 2848-2849 (1997). PMID: 9326257 [
- Thénié, A., Orhant, M., Gicquel, I., Fergelot P, Le Gall, J.Y., David, V., Mosser, J. The HFE gene undergoes alternative splicing process. *Blood Cells Mol Dis* 26: 155-162 (2000). PMID: 11001625.
- Thomas, W., Fullan, A., Loeb, D.B., McClelland, E.E., Bacon, B.R., Wolff, R.K. A haplotype and linkage disequilibrium analysis of the hereditary hemochromatosis gene region. *Hum Genet* 102: 517-25 (1998). PMID: 9654199
- Thompson, E.A. and Neel, J.V. Allelic disequilibrium and allele frequency distribution as a function of social and demographic history. *Am J Hum Genet* 60: 197-204 (1997). PMID: 8981963
- Thompson, K., Menzies, S., Beard, J.L., Torti, S.V., Torti, F.M. and Connor, J.R. BIOIRON 2001- World Congress on Iron Metabolism (Cairns, Australia) O39 (2001).
- Thorstensen, K., Asberg, A., Kvitland, M., Svaasand, E., Hveem, K., Bjerve, K.S. Detection of an unusual combination of mutations in the HFE gene for hemochromatosis. *Genet Test* 4: 371-6 (2000). PMID: 11216661
- Tordai, A., Andrikovics, H., Kalmar, L., Rajczy, K., Penzes, M., Sarkadi, B., Klein, I., Varadi, A. High frequency of the haemochromatosis C282Y mutation in Hungary could argue against a Celtic origin of the mutation. *J Med Genet* 35:878-9 (1998). PMID: 9783719
- Totaro, A., Grifa, A., Carella, M., D'ambrosio, L., Valentino, M., Roth, M.P., Borot, N., Coppin, H., Roetto, A., Camaschella, C., And Gasparim, P. Hereditary hemochromatosis: a *HpaI* polymorphism within the HLA-H gene. *Mol Cell Probes* 11: 229-230 (1997). PMID: 9232622
- Totaro, A., Rommens, J. M., Grifa, A., Lunardi, C., Carella, M., Huizenga, J. J., Roetto, A., Camaschella, C., De Sandre, G., Gasparini, P. Hereditary hemochromatosis: generation of a transcription map within a refined and extended map of the HLA class I region. *Genomics* 31: 319-326 (1996). PMID: 8838313
- Trinder, D., Macey, D.J., Olynyk, J.K. The new iron age. *Int J Mol Med* 6: 607-12 (2000). PMID: 11078817
- Trousseau, A. Clinique Med. de l'Hotel de Paris. (pub.) II pp. 663-698 (1865).
- Tuomainen, T-R., Kontula, K., Nyysönen, K., Lakka, T.A., Helio, T. and Salonen, T. Increased risk of acute myocardial infarction in carriers of the hemochromatosis gene Cys282Tyr mutation: a prospective cohort study in men in Eastern Finland. *Circulation* 100: 1274-1279 (1999). PMID: 10491370
- Turnbull, A.J., Mitchison, H.C., Peaston, R.T., Lai, L.C., Bennett, M.K., Taylor, R., Bassendine, M.F. The prevalence of hereditary haemochromatosis in a diabetic population. *QJM* 90:271-5 (1997). PMID: 9307761
- Vallet, V.S., Casado, M., Henrion, A.A., Bucchini, D., Raymondjean, M., Kahn, A., Vaulont, S. Differential roles of upstream stimulatory factors 1 and 2 in the transcriptional response of liver genes to glucose. *J Biol Chem* 273: 20175-9 (1998). PMID: 9685363
- Van Thiel, D.H., Friedlander, L., Fagioli, S., Wright, H.I., Irish, W., Gavalier, J.S. Response to interferon a therapy is influenced by the iron content of the liver. *J Hepatol* 20: 410-415 (1994). PMID: 8014455
- Von Recklinghausen, F.D. Uber Haemochromatose. Heidelberg: Taggeblatt (62) Versammlung Dtsch Naturforsch Artze, 1889: 324-5.
- Vulpe, C.D., Kuo, Y-M., Murphy, T.L., Cowley, L., Askwith, C., Libina, N., Gitschier, J., Anderson, G.J. Hephaestin, a ceruloplasmin homologue implicated in intestinal iron transport, is defective in the sla mouse. *Nature Genet* 21: 195-199 (1999). PMID : 9988272

- Waheed, A., Parkkila, S., Saarnio, J., Fleming, R. E., Zhou, X.Y., Tomatsu, S., Britton, R.S., Bacon, B.R., Sly, W.S. Association of HFE protein with transferrin receptor in crypt enterocytes of human duodenum. *Proc Nat Acad Sci* 96: 1579-1584 (1999). PMID: 9990067
- Waheed, A., Parkkila, S., Zhou, X.Y., Tomatsu, S., Tsuchihashi, Z., Feder, J.N., Schatzman, R.C., Britton, R.S., Bacon, B.R., Sly, W.S. Hereditary hemochromatosis: effects of C282Y and H63D mutations on association with beta-2-microglobulin, intracellular processing, and cell surface expression of the HFE protein in COS-7 cells. *Proc Nat Acad Sci* 94: 12384-12389 (1997). PMID: 9356458
- Walker, A.P., Wallace, D.F., Partridge, J., Bomford, A.B., Dooley, J.S. Atypical haemochromatosis: phenotypic spectrum and beta2-microglobulin candidate gene analysis. *J Med Genet* 36: 537-41 (1999). PMID: 10424814
- Wallace, D.F., Dooley, J.S., Walker, A.P. A novel mutation of HFE explains the classical phenotype of genetic hemochromatosis in a C282Y heterozygote. *Gastroenterology* 116: 1409-12 (1999). PMID: 10348824
- Warnich, L., Kotze, M.J., Groenewald, I.M., Groenewald, J.Z., van Brakel, M.G., van Heerden, C.J., de Villiers, J.N., van de Ven, W.J., Schoenmakers, E.F., Taketani, S., Retief, A.E. Identification of three mutations and associated haplotypes in the protoporphyrinogen oxidase gene in South African families with variegate porphyria. *Hum Mol Genet* 5: 981-4 (1996). PMID: 8817334
- Wenz, H.M., Baumheuter, S., Ramachandra, S. and Worwood, M. A rapid automated SSCP multiplex capillary electrophoresis protocol that detects the two common mutations implicated in hereditary hemochromatosis (HH). *Hum Genet* 104, 29-35 (1999). PMID: 10071189
- West, A.P. Jr., Bennett, M.J., Sellers, V.M., Andrews, N.C., Enns, C.A., Bjorkman, P.J. Comparison of the interactions of transferrin receptor and transferrin receptor 2 with transferrin and the hereditary hemochromatosis protein HFE. *J Biol Chem* 275: 38135-8 (2000). PMID: 11027676
- Willis, G., Jennings, B.A., Goodman, E., Fellows, I.W., Wimperis, J.Z. A high prevalence of HLA-H 845A mutations in hemochromatosis patients and the normal population in eastern England. *Blood Cells Mol Dis* 23: 288-91 (1997). PMID: 9410472
- Willis, G., Wimperis, J. Z., Lonsdale, R., Fellows, I. W., Watson, M. A., Skipper, L. M., Jennings, B. A. Incidence of liver disease in people with HFE mutations. *Gut* 46: 401-404 (2000). PMID: 10673304
- Witte, D.L., Crosby, W.H., Edwards, C.Q., Fairbanks, V.F. and Mitros, F.A. Practice parameter for hereditary hemochromatosis. *Clin Chim Acta* 245: 139-200 (1996). PMID: 8867884
- Woolley, A.T., Sensabaugh, G.F, and Mathies, R.A. High-speed DNA genotyping using microfabricated capillary array electrophoresis chips. *Anal. Chem.* 69, 2181-2186, 1997. PMID: 9183181
- Worwood, M. and Drake, C. Serum ferritin, blood donation, iron stores and haemochromatosis. *Transfus Med* 3:21-8 (1993). PMID: 8038893
- Worwood, M., Jackson, H.A., Feeney, G.P., Edwards, C and Bowen, D.J. A single tube heteroduplex PCR for the common HFE genotypes. *Blood* 94: (S1), 405a (1999).
- Worwood, M., Shearman, J.D., Wallace, D.F., Dooley, LS., Merryweather-Clarke, A.T., Pointon, LI, Rosenberg, W.M.C., Bowen, D1, Burnett, A.K., Jackson, H.A., Lawless, S., Raha-Chowdhury, R., Partridge, L, Williams, R., Bomford, A., Walker, A.P., and Robson, KJH. A simple genetic test identifies 90% of UK patients with haemochromatosis. *Gut* 41: 841-844 (1997). PMID: 9462220
- Wurapa, R.K., Gordeuk, V. ., Brittenham, G.M., Khiyami, A., Schechter, G.P., Edwards, C.Q. Primary iron overload in African Americans. *Am J Med* 101: 9-18 (1996). PMID: 8686721
- Yaouang, J., Perichon, M., Chorney, M., Pontarotti, P., Le Treut, A., El Kahloun, A., Mauvieux, V., Blayau, M., Jouanolle, A.M., Chauvel, B., Moirand, R., Nouel, O., Le Gall, J.Y., Feingold, J., David, V. Anonymous marker loci within 400 kb of HLA-A generate haplotypes in linkage disequilibrium with the hemochromatosis gene (HFE). *Am J Hum Genet* 54: 252-263 (1994). PMID: 8304342
- Younossi, Z.M., Gramlich, T., Bacon, B.R., Matteoni, C.A., Boparai, N., O'Neill, R., McCullough, A.J. Hepatic iron and nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 30: 847-850 (1999).
- Yu J, Yu ZK, Wessling-Resnick M. Expression of SFT (stimulator of Fe transport) is enhanced by iron chelation in HeLa cells and by hemochromatosis in the liver. *J Biol Chem* 1998a,273:34675-34678. PMID: 9856986
- Yu, J. and Wessling-Resnick, M. Structural and functional analysis of SFT, a stimulator of Fe transport. *J Biol Chem* 273: 21380-21385, (1998b). PMID: 9694900
- Zdarsky, E., Horak, J., Stritesky, J., Heirler, F. Hemochromatosis. Determination of the C282Y mutation frequency in the population of the Czech Republic and sensitivity of hemochromatosis detection using Guthrie cards. *Cas Lek Cesk* 138: 497-9 (1999). PMID: 10566227
- Zhou, X.Y., Tomatsu, S., Fleming, R.E., Parkkila, S., Waheed, A., Jiang, J., Fei, Y., Brunt, E.M., Ruddy, D.A., Prass, C.E., Schatzman, R.C., O'Neill, R., Britton, R.S., Bacon, B.R., Sly, W.S. HFE gene knockout produces mouse model of hereditary hemochromatosis. *Proc Nat Acad Sci* 95: 2492-2497, 1998. PMID: 9482913.
- Zoller, H., Koch, R.O., Theurl, I., Obrist, P., Pietrangelo, A., Montosi, G., Haile, D.J., Vogel, W., Weiss, G. Expression of the duodenal iron transporters divalent-metal transporter 1 and ferroportin 1 in iron deficiency and iron overload. *Gastroenterology* 120: 1412-9 (2001). PMID: 11313311
- Zoller, H., Pietrangelo, A., Vogel, W., Weiss, G. Duodenal metal transporter (DMT-1, NRAMP-2) expression in patients with hereditary hemochromatosis. *Lancet* 353: 2120-2123 (1999). PMID: 10382697