

**Departament responsable del programa de doctorat:** Departament de Medicina

**Programa de doctorat:** Biopatologia en Medicina  
**Bienni** 1997-1999

**Títol de la tesi:**

ESTUDI DE LES MUTACIONS DELS EXONS 2 I 4 DEL GEN HFE EN PACIENTS  
AMB PORFÍRIA CUTÀNIA TARDA ESPORÀDICA

**Doctorant:** Agustí Toll Abelló

**Directora de la tesi:** Dra. Carme Herrero Mateu

A la meva dona Cristina i al meu fill Enric,  
per les hores no dedicades

# ÍNDEX

<b>ÍNDEX</b> .....	4
<b>AGRAÏMENTS</b> .....	9
<b><u>I- INTRODUCCIÓ</u></b> .....	11
<b>PORFÍRIA CUTÀNIA TARDA (PCT)</b> .....	12
1. INTRODUCCIÓ.....	12
2. CLASSIFICACIÓ DE LA PCT.....	13
2.1. PCT tipus I o esporàdica.....	13
2.2. PCT tipus II o hereditària. ....	13
2.3. PCT tipus III.....	13
3. CLÍNICA DE LA PORFÍRIA CUTÀNIA TARDA.....	15
4. FACTORS DE RISC.....	17
4.1. Sobrecàrrega fèrrica.. ....	17
4.2. Infeccions.....	20
4.2.1. Virus hepatitis C (VHC).....	20
4.2.2. Virus hepatitis B (VHB) .....	20
4.2.3. Virus de la Immunodeficiència humana (VIH) .....	21
4.3. Hexaclorobenzè.....	21
4.4. Estrògens.....	22
4.5. Alcohol.....	22
4.6. Polimorfismes de P-450.....	23
5. MALALTIA HEPÀTICA EN LA PCT.....	24
6. TRACTAMENT DE LA PCT.....	25
6.1. Flebotomies.....	25
6.2. Antipalúdics.....	25
6.3. IFN $\alpha$ / Ribavirina.....	26
6.4. Eritropoietina.....	27
6.5. Antioxidants.....	27

<b>HEMOCROMATOSI I GEN HFE</b> .....	28
1. DEFINICIÓ D'HEMOCROMATOSI.....	28
2. HLA I HEMOCROMATOSI.....	30
3. GEN HFE.....	31
3.1. Mutacions del gen HFE.....	33
3.1.1. Mutació C282Y.....	33
3.1.2. Mutació H63D.....	34
4. FISIOLOGIA DE L'ABSORCIÓ DE FERRO .....	36
5. MECANISME D'ACCIÓ DE LA PROTEÏNA HFE.....	37
6. MUTACIONS DEL GEN HFE I EVIDÈNCIA CLÍNICA/BIOQUÍMICA D'AUGMENT DE FERRO SISTÈMIC.....	41
6.1. Mutacions del gen HFE i paràmetres sèrics de sobrecàrrega de ferro.....	41
6.1.1. Genotipus C282Y/C282Y .....	41
6.1.2. Genotipus no homozigots.....	43
C282Y/C282Y.....	43
C282Y/H63D .....	43
H63D/H63D .....	43
C282Y/wt o H63D/wt.....	44
6.2. Mutacions del gen HFE i ferro hepàtic.....	44
7. EFECTE DE LES MUTACIONS DEL HFE SOBRE L'AUGMENT DEL FERRO HEPÀTIC ASSOCIAT AMB LA INFECCIÓ PER VHC.....	46
8. PATOGÈNESI DEL DANY TISSULAR I LA FIBROSI EN L'HEMOCROMATOSI.....	46
9. DETECCIÓ DE LES MUTACIONS DEL GEN HFE COM A CRIBATGE D'HEMOCROMATOSI.....	47
10. GEN HFE I ANTROPOLOGIA.....	48
11. ALTRES FACTORS ETIOLÒGICS POTENCIALS DE L'HEMOCROMATOSIS.....	49
11.1. Gen HFE:.....	49
11.1.1. Mutació S65C.....	49
11.2. Altres gens:.....	50
11.2.1. Mutacions del HFE2.....	50
11.2.2. Mutacions en la ferroportina.....	50
11.2.3. Mutacions del receptor de la transferrina 2.....	51
11.2.4. Mutacions de l'hepcidina.....	51

<b>PCT I HEMOCROMATOSI</b> .....	52
<b><u>II- HIPÒTESI</u></b> .....	60
<b><u>III- OBJECTIUS</u></b> .....	62
<b><u>IV- MATERIAL I MÈTODES</u></b> .....	64
<b>MATERIAL</b> .....	65
1. GRUP CASOS.....	65
1.1. Criteris d'inclusió.....	65
1.2. Criteris d'exclusió.....	65
1.3. Variables clíniques registrades.....	65
1.4. Paràmetres serològics.....	66
1.5. Estudi histopatològic en biòpsies hepàtiques.....	66
1.6. Paràmetres de sobrecàrrega fèrrica.....	66
2. GRUP CONTROL.....	66
2.1. Criteris d'inclusió.....	66
<b>MÈTODES</b> .....	67
1. DETERMINACIÓ DE PORFIRINES.....	67
2. SEROLOGIES VÍRIQUES.....	67
3. PARÀMETRES DE SOBRECÀRREGA FÈRRICA.....	67
4. ANÀLISI GENÈTIC DEL GEN HFE.....	68
4.1. Extracció i precipitació d'ADN.....	68
4.2. Amplificació per PCR dels exons 2 i 4.....	70
4.3. Digestió de l'ADN amb endonucleases de restricció mitjançant tècnica de <i>restriction fragment length polymorphism (RFLP)</i> :.....	72
Interpretació dels resultats.....	74
1- Mutació C282Y .....	74
2- Mutació H63D .....	76
4.4. Anàlisi estadístic.....	78

<b><u>V- RESULTATS</u></b> .....	79
<b>ESTUDI DESCRIPTIU:</b> .....	80
1. Gènere.....	80
2. Edat.....	80
3. Enolisme.....	80
4. Transaminases.....	81
5. Infecció crònica per VHC.....	81
6. Infecció crònica per VHB.....	81
7. Infecció crònica per VIH.....	82
8. Estudi histopatològic en biòpsies hepàtiques.....	82
<b>ANÀLISI DE LES MUTACIONS DEL GEN HFE</b> .....	83
1. PREVALENÇA DE LES MUTACIONS DEL GEN HFE.....	83
1.1. Freqüència al.lèlica de les mutacions del gen HFE.....	83
Freqüència al.lèlica de la mutació C282Y .....	83
Freqüència al.lèlica de la mutació H63D .....	84
1.2. Genotipus.....	84
1.2.1. Mutació C282Y .....	84
1.2.2. Mutació H63D .....	84
1.2.3. Dobles heterozigots (C282Y/H63D) .....	85
2. RELACIÓ ENTRE LA PRESÈNCIA DE MUTACIONS DEL GEN HFE I LA SOBRECÀRREGA FÈRRICA EN PACIENTS AMB PCT.....	86
2.1. Ferritina.....	86
2.2. Ferro hepàtic.....	88
2.2.1. Anàlisi semiquantitatiu del ferro hepàtic.....	88
2.2.2. Concentració de ferro hepàtic (pes en sec).....	88
2.2.3. Ferro hepàtic i mutacions del gen HFE.....	91
3. RELACIÓ ENTRE LA PREVALENÇA DE LES MUTACIONS DEL GEN HFE I LA INFECCIÓ PEL VHC.....	92
3.1. Estudi de la independència de les mutacions del gen HFE i la infecció per VHC.....	92

3.2. Anàlisi per grups.....	93
3.2.1. Grup control.....	95
3.2.2. Relació casos-controls.....	95
3.2.2.1. Mutació C282Y .....	95
Heterozigots simples C282Y .....	95
Dobles heterozigots C282Y/H63D.....	95
Heterozigots simples C282Y i dobles heterozigots C282Y/H63D .....	96
3.2.2.2. Mutació H63D .....	97
Heterozigosi simple.....	97
Homozigosi.....	98
Heterozigots simples H63D, homozigots H63D/H63D i dobles heterozigots H63D/C282Y .....	98
4. RELACIÓ ENTRE LA INGESTA D'ALCOHOL I EL GENOTIPUS HFE.....	100
5. ANÀLISI MULTIVARIAT.....	100
<b><u>VI- DISCUSIÓ</u></b>	
1. PREVALENÇA DE LES MUTACIONS DEL GEN HFE A LA POBLACIÓ GENERAL.....	103
2. PREVALENÇA DE LES MUTACIONS DEL GEN HFE EN PACIENTS AMB PCT.....	105
3. RELACIÓ MUTACIONS – VHC.....	109
4. RELACIÓ MUTACIONS – FERRO.....	111
5. IMPLICACIONS CLÍNiques DE L'ESTUDI DE LES MUTACIONS DEL GEN HFE EN PACIENTS AMB PCT ESPORÀDICA.....	115
<b><u>VII- CONCLUSIONS</u></b> .....	119
<b><u>VIII- ANNEXES</u></b> .....	123
1. TAULES.....	124
2. FIGURES.....	126
3. ARTICLE ACCEPTAT PER A PUBLICACIÓ.....	129
<b><u>IX- BIBLIOGRAFIA</u></b> .....	153



## **AGRAÏMENTS**

A la Dra. Carme Herrero Mateu, Cap de Servei de l'Hospital Clínic de Barcelona, per la seva inestimable ajuda, el seu continu estímul i els consells que m'ha ofert tant durant la meva formació com a dermatòleg com durant la realització d'aquesta tesi. Sempre ocuparà un espai preferent en el meu altar personal de professors mítics.

A la Dra. Guadalupe Ercilla, adjunta del Servei d'Immunologia de l'Hospital Clínic de Barcelona, pels seus consells i idees rebudes durant la realització d'aquest treball.

A la Dra. Raquel Celis, per la seva inestimable ajuda en l'aprenentatge de la metodologia d'aquest estudi.

A la Dra. M. Dolores Ozalla, per la seva ajuda en la realització de l'apartat experimental i els seus consells.

Al Dr. Miquel Bruguera, vull agrair-li la seva disponibilitat per a recollir les mostres hepàtiques i interpretar-ne els resultats.

Al Dr. Ramon M Pujol, Cap de Servei de Dermatologia de l'Hospital del Mar, per la seva continua motivació per a la realització d'aquesta tesi. Treballar amb ell és un privilegi impagable.

A en Joan Vila, estadístic de l'Institut Municipal d'Investigació Mèdica, IMIM, per la seva col·laboració en l'anàlisi i interpretació dels resultats estadístics.

A tots els companys del Servei de Dermatologia de l'Hospital del Mar, que representen un estímul continu i que han contribuït a que aquesta tesi sortís endavant.

## **I- INTRODUCCIÓ**

## **PORFÍRIA CUTÀNIA TARDA (PCT)**

### **1. INTRODUCCIÓ**

Les porfíries són un grup de malalties causades per deficiències, hereditàries o adquirides, dels enzims col·laboradors de la via de síntesi de l'hem. La porfíria cutània tarda (PCT) és el tipus més freqüent de porfíria amb una prevalença aproximada d'1 per 10.000 habitants. Aquesta malaltia està causada pel dèficit de l'enzim uroporfirinogendecarboxilasa (UROD), que participa en la decarboxilació de 4 dels 8 grups carboxil de l'uroporfirinogen III. Aquest dèficit pot produir-se per diversos motius. Mutacions en el gen de la UROD ocasionen alteracions en la síntesi de la proteïna enzimàtica, ocasionant una disminució de la seva activitat global. Ara bé, aquesta activitat també es pot veure afectada a nivell de la cèl·lula hepàtica, per bloqueig adquirit del seus centres actius per diversos factors (siderosi, alcohol, factors tòxics, etc.).<sup>1</sup> Secundàriament es produeix un cúmul d'uroporfirines i altres porfirines carboxilades, que difonen des del plasma a la dermis degut a que són hidrosolubles. A la dermis, aquestes substàncies s'exposen a radiacions de l'espectre ultraviolat i a la llum visible. L'energia lumínica tramesa per aquestes ones genera molècules de porfirina en estat "excitat". Quan es recupera l'estat basal s'allibera aquesta energia, que es transfereix a d'altres estructures del teixit circumdant, generant radicals lliures que causen el dany tisular.<sup>2</sup>

## **2. CLASSIFICACIÓ DE LA PCT**

La classificació de la PCT reflecteix tant l'origen com la localització del dèficit enzimàtic.

### **2.1. PCT tipus I:**

Un 75% dels pacients amb PCT tenen una forma no hereditària, esporàdica, que sol afectar a individus de mitjana edat. Aquests casos són deguts a una inhibició en l'activitat de la UROD limitada al fetge <sup>3-5</sup> sense que s'observi una reducció de la quantitat de l'enzim.

### **2.2. PCT tipus II:**

En un 20% dels casos de PCT l'activitat de la UROD està disminuïda en un 50% en tots els teixits. En aquests casos la reducció de l'activitat de la UROD és deguda a mutacions del gen que codifica aquest enzim, donant lloc a una reducció de la síntesi o a un descens en l'estabilitat de la proteïna.<sup>6</sup> Aquesta forma és d'herència autosòmica dominant i sol manifestar-se al voltant dels 20 anys però és de penetració baixa per la qual cosa són necessaris altres factors genètics o adquirits per a que es manifesti la malaltia. De fet, és necessària una reducció de més del 75% de l'activitat de la UROD a la cèl·lula hepàtica per a que es produeixin manifestacions clíniques de PCT.<sup>7</sup>

La identificació del gen de la UROD a nivell del cromosoma 1p34 ha permès detectar diverses mutacions d'aquest gen en famílies amb PCT tipus II.<sup>3,6,8,9</sup>

### **2.3. PCT tipus III:**

La PCT tipus III és una forma hereditària infreqüent de porfíria deguda a un dèficit de la UROD a nivell del fetge sense que s'observi ni una disminució quantitativa ni mutacions

d'aquest enzim. Per tant, és possible que sigui deguda a mutacions a altres locus<sup>5</sup> o bé a gens implicats en el metabolisme del ferro.

### 3. CLÍNICA DE LA PORFÍRIA CUTÀNIA TARDA

La clínica de la PCT reflecteix la reacció fototòxica que es produeix a la dermis superficial, de forma que les lesions apareixen quasi exclusivament a zones fotoexposades.<sup>10</sup> La principal manifestació clínica de la PCT és l'augment de la fragilitat de la pell al dors de les mans i avantbraços, a on mínims traumatismes produeixen erosions de marges nítids. Pràcticament tots els pacients presenten ampul·les de fins a 1 o més cms. Aquestes lesions evolucionen a crosta i posteriorment deixen cicatrius atròfiques, milium i sovint una hiper/hipopigmentació. Aquestes manifestacions de PCT empitjoren a l'estiu. Pot produir-se una hiperpigmentació semblant al melasma, no causada per ampul·les, a les galtes i al voltant dels ulls en un 50% dels pacients. També pot observar-se una hipertricosi en dos terços dels pacients que afecta la part superior de la cara i el front.

Una cinquena part dels pacients amb PCT, especialment aquells amb malaltia de llarga evolució i no tractada, desenvolupen canvis esclerodermiformes al cap i a la part superior del tronc. Al cuir pilós, aquests canvis, que són similars als de la morfea, poden ocasionar una alopecia cicatricial de localització frontoparietal i occipital.

A la histologia s'observen ampul·les subepidèrmiques, produint-se el clivatge al marge dèrmic, amb un discret infiltrat inflamatori.

El diagnòstic de PCT s'aconsegueix mitjançant l'estudi de la concentració urinària d'uroporfirina i porfirines hepta-, hexa- i pentacarboxíliques.<sup>11</sup> L'augment d'uroporfirina plasmàtica es detecta amb espectrofluorimetria, observant-se un pic de 619 nm. També pot detectar-se un augment d'isocoprofirines a la femta. El marcador bioquímic d'activitat de la malaltia i resposta al tractament és la determinació quantitativa de

l'excreció de porfirina urinària. Clàssicament s'ha determinat aquest paràmetre en orina de 24 hores però l'estudi en una sola mostra d'orina recent és un substitut adequat.<sup>12</sup>



## 4. FACTORS DE RISC

### 4.1. Sobrecàrrega fèrrica:

Els nivells de ferritina i de saturació de la transferrina habitualment estan augmentats en pacients amb PCT. Quasi tots els pacients presenten un augment del ferro hepàtic<sup>4,13-17</sup> i la seva depleció mitjançant les flebotomies és seguida habitualment per una remisió de la malaltia.<sup>18-23</sup> Tanmateix, la sobrecàrrega de ferro no acostuma a ser important i només arriba als valors baixos del rang de l'HH en el 10% dels pacients amb PCT. Quan existeixen altres factors de predisposició de PCT l'augment de ferro pot empitjorar la gravetat i disminuir l'edat d'aparició de la clínica. Per tant, la sobrecàrrega de ferro actua exacerbant la sobreproducció d'uroporfirina però no n'és la causa primària.

El ferro no inhibeix directament la UROD sinó que ho fa interactuant amb una subfamília dels citocroms P450 (Cy P4501A) per a formar espècies d'oxigen reactiu. Aquestes espècies tenen la capacitat d'oxidar l'uroporfirinogen, oxidació que facilita la formació d'uroporfirina i altres metabòlits no ben caracteritzats amb capacitat d'inhibir la UROD.<sup>4, 24-27</sup> El ferro també pot estar implicat en la inducció del gen de l'ALA-sintasa, afavorint doncs la formació de uroporfirinogen, precursor de la uroporfirina (**Figura 1**).

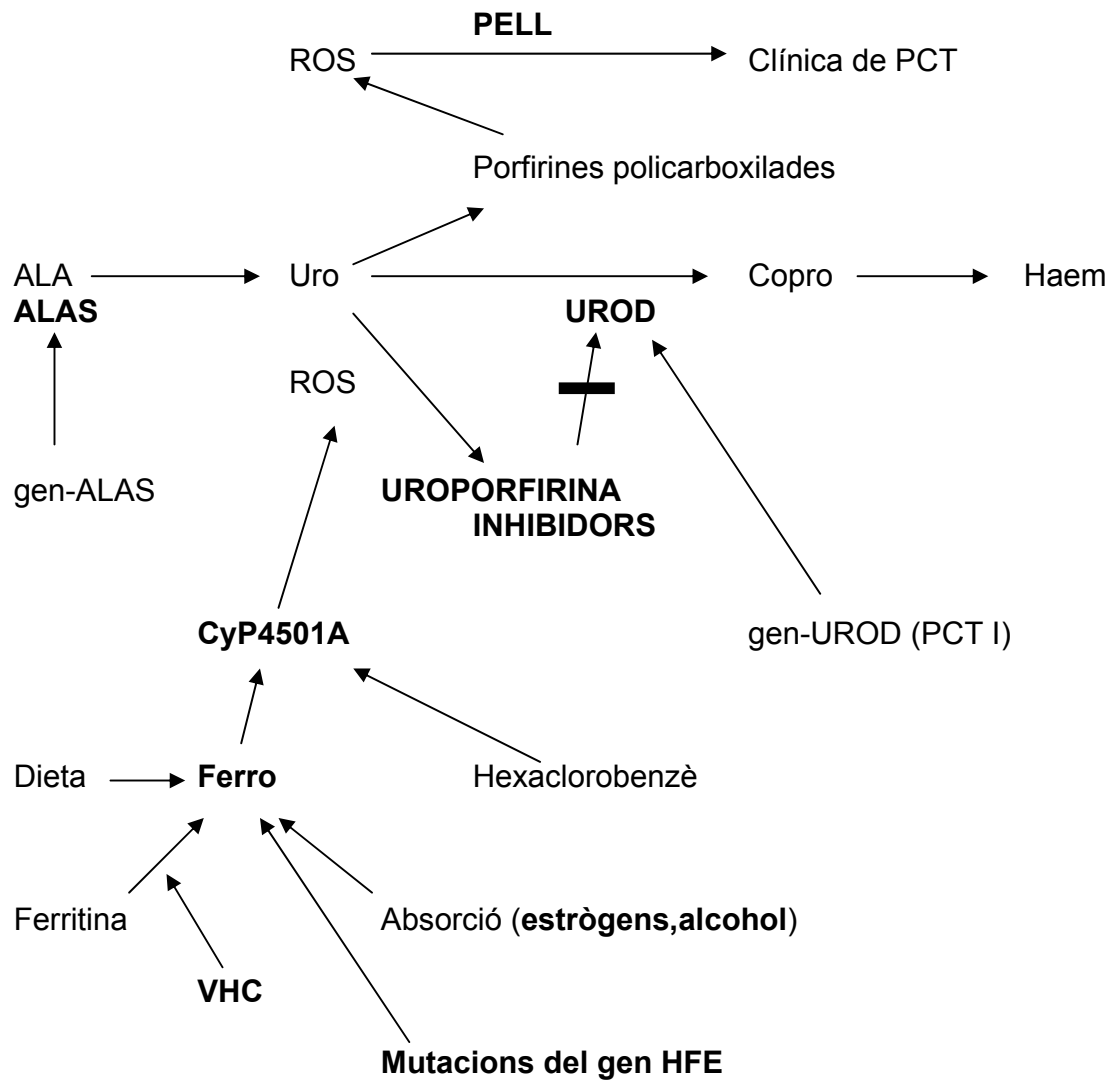
El ferro pot augmentar per diferents motius. La ingesta elevada crònica de ferro, encara que infreqüent al nostre medi, en pot ser una causa.

El ferro hepàtic sol augmentar lleugerament en pacients infectats amb el VHC,<sup>28-31</sup> infecció que afavoreix l'alliberament del ferro unit a la ferritina. Per altra banda, l'augment de ferro pot potenciar la replicació viral i les seves mutacions o bé inhibir la resposta immune humoral. La sobrecàrrega de ferro també es correlaciona amb una pitjor resposta

de l'hepatitis crònica per VHC al tractament amb IFN<sup>32-36</sup> Així doncs, el VHC augmentaria l'alliberació de ferro i aquest afavoriria la infecció pel virus.<sup>35</sup>

La ingesta d'alcohol pot acompanyar-se, fins en un terç dels casos, de sobrecàrrega de ferro hepàtic.<sup>37,38</sup> Tant l'alcohol com els estrògens afavoreixen l'absorció intestinal del ferro.

Figura 1. Patogènesi de la PCT



**ROS: espècies d'oxigen reactiu.**

**ALAS: ALA sintasa**

**Uro: Uroporfirinogen**

## 4.2. Infeccions:

### Virus Hepatitis C (VHC):

La prevalença de la infecció del VHC en pacients amb PCT és variable segons l'àrea geogràfica a estudi però acostuma a ser més elevada que la que es troba a la població general no porfírica. La prevalença del VHC a la població general a Catalunya és del 2.64%.<sup>39</sup> D'un 70 a un 90% dels pacients amb PCT d'Espanya, Itàlia i França pateixen aquesta infecció.<sup>40-44</sup> A EEUU la prevalença està al voltant del 50-75%.<sup>45,46</sup> Tanmateix, aquesta proporció disminueix al nord d'Europa, Austràlia i Nova Zelanda, situant-se per sota del 20%.<sup>47-50</sup>

Alguns autors han associat el genotip 1b del VHC amb un risc augmentat de patir PCT.<sup>43,51</sup> La variabilitat trobada en la prevalença del VHC en diferents poblacions de pacients amb PCT podria ser deguda a la variabilitat en els genotips d'aquest virus segons l'àrea geogràfica a estudi.

El VHC no sembla exercir un efecte inhibidor directe sobre la UROD.<sup>52</sup> Per alguns autors, la infecció crònica per VHC no augmentaria, per si sola, l'excreció de les porfirines observada en la PCT.<sup>53</sup> De forma similar a l'alcohol, i d'altres noxes que poden danyar el fetge, el VHC pot afavorir un estrès oxidatiu depenent del ferro, afavorint l'oxidació de l'uroporfirinogen a uroporfirina.

### Virus Hepatitis B:

El virus de l'hepatitis B s'ha associat amb la PCT però no pot excloure's que la freqüent coinfecció amb el VHC hagi sobrevalorat la seva rellevància.<sup>54</sup>

#### Virus de la Immunodeficiència Humana (VIH):

Encara que s'han descrit més de 60 casos de pacients amb PCT i infecció per VIH, aquesta associació és infreqüent.<sup>55-58</sup> La rellevància del VIH en la inducció de la PCT és també controvertida donat que aquesta infecció sovint s'acompanya d'una infecció pel VHC o d'altres factors de risc com l'alcoholisme.<sup>59</sup> Tanmateix, s'ha observat de forma aïllada la resolució de la clínica de PCT després de la introducció com a únic tractament d'antiretrovirals per al VIH.<sup>60</sup>

#### **4.3. Hexaclorobenzè:**

Al 1955 el Dr. Cihad Cam, un dermatòleg que treballava al Sud-est de Turquia va veure el seu primer pacient amb lesions ampul·loses i hipertricosi. Al final d'aquell any havia vist centenars de nens amb una clínica de porfíria cutània tarda severa. Als següents 5 anys milers de nens van patir aquesta malaltia fins que Cam va descobrir que aquests nens provenien de famílies agricultores pobres que s'havien alimentat directament de llavors de blat que havien de ser cultivades en lloc de consumides. Des de 1954 aquestes llavors havien estat pretractades amb hexaclorobenzè com a fungicida per a prevenir les plagues que anteriorment havien destruït les collites. Al 1960 es va aturar l'ús de l'hexaclorobenzè i l'epidèmia va remetre. Es va poder implicar aquesta substància i els seus metabòlits en la inhibició de la UROD.<sup>61,62</sup>

En estudis posteriors, realitzats en poblacions exposades a altes concentracions ambientals d'hexaclorobenzè, no s'ha pogut demostrar el potencial porfirinogen de l'hexaclorobenzè incorporat a l'organisme per inhalació.<sup>63-65</sup>

#### 4.4. Estrògens:

Els estrògens, tant en píndoles anticonceptives com en teràpies hormonals substitutives representen l'únic factor de risc en un 25% de les dones amb PCT i la seva suspensió pot induir la remissió de la malaltia sense que es requereixin altres conductes terapèutiques.<sup>10,66,67</sup>

L'efecte inductor dels estrògens sobre la PCT s'ha implicat inclús en el decliu dels etruscs. Aquest decliu pot haver estat degut a l'alta prevalença de la PCT cap a l'any 500 a.c. A aquesta època es va produir un descens de les temperatures que va afavorir l'aparició d'un fong, la *Fusaria*, amb capacitat per a produir una micotoxina amb efectes porfirinògens i estrogènics. A això s'hauria d'afegir la seva exposició al ferro, metall en la manufactura de la qual destacaven.<sup>68</sup>

#### 4.5. Alcohol:

El 36.9% de la població espanyola consumeix alcohol de forma habitual i el 0.87% en quantitats importants (més de 40 cc/setmana).<sup>258</sup> Espanya és el segon país on es consumeix més litres d'alcohol per càpita (17 lts), per darrera de França.

Del 30 al 90% dels pacients amb PCT consumeixen més de 40 grs d'alcohol al dia.<sup>66,69,70</sup>

L'alcohol pot afavorir l'absorció intestinal de ferro<sup>71</sup> així com el seu augment hepàtic i sistèmic.<sup>38</sup> És factible que l'etanol present a alcohols d'alta graduació així com components fenòlics presents al vi puguin induir els isoenzims del citocrom P450, afavorint un consum del grup heme.<sup>72</sup> Conseqüentment, augmentaria l'expressió de l'enzim limitant de la síntesis de l'heme, l'ALA-sintasa (ALAS), afavorint el cúmul de precursors d'una UROD inhibida o genèticament disminuïda.

#### **4.6. Polimorfismes de P-450:**

El citocrom p-450 juga un important paper en el metabolisme dels porfirinògens i per tant pot tenir rellevància en la inducció de porfíries hepàtiques. Un isoenzim del citocrom P-450, el P4501A2(CYP1A2), és essencial per a que es desenvolupi porfíria induïda per fàrmacs en ratolins,<sup>73</sup> encara que és insuficient per si sol, essent necessària la presència de ferro<sup>74,75</sup>. En humans, l'expressió de CYP1A2 és constitutiva i altament variable, podent estar afectada pel tabac, fàrmacs i d'altres factors.<sup>76</sup>No s'ha trobat un augment de l'expressió de CYP1A2 en fetges de pacients amb PCT.<sup>67</sup>

## 5. MALALTIA HEPÀTICA EN LA PCT

La PCT pot ser considerada com una malaltia del fetge amb efectes sobre la pell i l'afectació hepàtica té importants implicacions de maneig i tractament. En pràcticament tots els pacients la biòpsia hepàtica mostra un augment del ferro, esteatosi i cristalls de porfirina intracel·lulars. Al voltant del 50% dels pacients tenen canvis més severos que consisteixen en necrosi lobular o tractes portals fibròtics i inflamats. Pot detectar-se cirrosi en un 15% dels pacients. A l'efecte de les porfirines acumulades al fetge cal afegir sovint el de l'alcoholisme i el de la infecció crònica pel virus de la hepatitis C (VHC), que poden contribuir a l'hepatopatia que sol detectar-se en aquests pacients.<sup>67</sup>

Entre un 10 i un 15% dels pacients amb PCT desenvolupen un hepatocarcinoma una dècada després del diagnòstic de porfíria.<sup>77</sup> Actualment és conegut que el grau elevat d'inflamació hepàtica, l'hepatopatia d'evolució crònica i el desenvolupament d'hepatocarcinoma estan més relacionats amb la infecció vírica que amb l'alteració metabòlica pròpia de la PCT.<sup>78</sup>

La biòpsia hepàtica és recomanable quan es realitza el diagnòstic de PCT. Aquells pacients que han estat durant anys amb clínica i mancats de tractament així com aquells en els quals es detecti infecció viral avançada han de seguir controls periòdics ecogràfics i dels nivells d'alfafetoproteïna.



## **6. TRACTAMENT DE LA PCT**

La retirada de factors desencadenants de la porfíria és fonamental per aconseguir la remissió de la malaltia. En alguns casos s'ha comprovat la remissió completa només evitant la ingesta d'alcohol o d'estrògens.<sup>66</sup> En molts altres casos, però, és necessari instaurar un tractament efectiu, que està bàsicament dirigit a eliminar els dipòsits de ferro al fetge.

### **6.1. Flebotomies:**

Donada la rellevància de la sobrecàrrega de ferro en la PCT, la seva depleció constitueix una de les principals fites terapèutiques. La pràctica de sagnies de 500 ml cada 15 dies millora la clínica en pocs mesos. Aquest tractament s'atura quan s'observen nivells baixos d'hemoglobina, saturació de transferrina o ferritina. Tanmateix la ferritina pot augmentar quan hi ha inflamació hepàtica, no essent els seus nivells representatius de la càrrega fèrrica. Per altra banda, uns nivells baixos de ferritina sempre són indicatius d'un nivell baix de ferro corporal total.<sup>79</sup> Donat que l'augment de ferro hepàtic augmenta el dany hepàtic produït pel VHC, les sagnies són el tractament d'elecció en els pacients amb PCT i VHC. Per altra banda, el ferro també disminueix l'eficàcia de l'interferó, recomanant-se sagnies en cas de nivells elevats de ferro com a pas previ al tractament amb aquest fàrmac de pacients amb VHC.

### **6.2. Antipalúdics:**

La cloroquina també constitueix una bona eina terapèutica degut a que forma complexos hidrosolubles amb les porfirines i promou la seva excreció per via biliar i urinària.<sup>80</sup> Secundàriament a aquesta acció, a l'inici del tractament els nivells de porfirines en sang augmenten considerablement, acompanyant-se de cert grau de toxicitat de les estructures centrilobulars, com es reflecteix en l'augment transitori de les transaminases sèriques. La

dosi de cloroquina recomanable és de 125 mgs, 2 cops per setmana, aconseguint-se remissions clíniques en uns 4-6 mesos, període similar a l'observat amb les sagnies.<sup>81</sup>

La forma més eficaç i ràpida d'induir la remissió de la PCT consisteix en la combinació de flebotomies i l'administració de cloroquina a baixes dosis.<sup>82</sup>

### **6.3. Interferó $\alpha$ /Ribavirina:**

L'interferó  $\alpha$  de forma aïllada o en combinació amb la Ribavirina s'han mostrat eficaços en el tractament de l'hepatitis per VHC.<sup>83</sup>

Tanmateix, l'eficàcia de l'interferó  $\alpha$  i/o interferó en el tractament de pacients amb PCT i VHC és controvertida i només s'han descrit casos aïllats. Amb l'interferó la reducció de la càrrega viral del VHC pot no traduir-se en una reducció dels nivells de porfirines.<sup>84</sup> S'ha descrit l'aparició *de novo* de clínica de PCT després d'iniciar-se tractament amb interferó i ribavirina.<sup>85</sup> A més, s'observa una menor negativització del VHC en pacients amb PCT que reben IFN- $\alpha$  respecte als que no tenen aquesta malaltia metabòlica.<sup>86</sup>

Tanmateix, s'ha descrit en casos aïllats la normalització dels nivells de porfirines urinàries i de la clínica de PCT després de tractar la infecció crònica per VHC amb IFN- $\alpha$ .<sup>53,60,87-90</sup> Aquesta normalització de les porfirines pot produir-se encara que no es negativitzi la càrrega viral de VHC, postulant-se que l'acció de l'IFN- $\alpha$  és deguda a un efecte immunomodulador que amortigua la resposta inflamatòria hepàtica ocasionada pel VHC, resposta implicada en la inhibició de la UROD.<sup>87</sup>

**6.4. Eritropoietina:**

En pacients anèmics (com ara pacients amb insuficiència renal) el ferro pot ser neutralitzat amb l'administració d'eritropoietina humana recombinant. Aquest regulador de l'eritropoesi disminueix la quantitat de ferro lliure i actua mitjançant la seva incorporació al grup hem.<sup>91</sup>

**6.5. Antioxidants:**

Diversos estudis han demostrat que els pacients amb PCT tenen nivells disminuïts en sang d'antioxidants com les vitamines E i C, així com de carotenoides. En models animals amb PCT s'ha observat que l'àcid ascòrbic preveu el desenvolupament d'uroporfirinúria.<sup>92</sup> Per tant, és probable que en la patogènia de la PCT es produeixi un estrès oxidatiu per l'acció combinada del ferro i les porfirines, amb la producció d'inhibidors de la UROD i el consum d'antioxidants. També s'ha suggerit que aquesta reducció del potencial antioxidant seria responsable de l'augment de dany hepàtic, càncer hepàtic i disminució de la resposta immune, afavorint la infecció pel VHC i el VIH.<sup>93</sup> Encara que la vitamina E s'ha demostrat eficaç en alguns casos aïllats, es recomana en primer lloc la depleció del principal implicat en la creació de radicals, el ferro. Com a segona opció se li pot recomanar al pacient que augmenti la ingesta de fruites i vegetals.

## **HEMOCROMATOSI I GEN HFE**

### **1. DEFINICIÓ D'HEMOCROMATOSI**

L'hemocromatosi hereditària (HH) es caracteritza pel cúmul lent i progressiu de ferro, especialment al fetge, que pot donar lloc a una reducció de l'esperança de vida per cirrosi i/o fallida orgànica.

L'HH és probablement la malaltia genètica recessiva més freqüent a la població nordeuropea, afectant a un de cada 200-300 individus. La seva incidència és més elevada en poblacions d'origen celta com ara a Irlanda, Gales, Austràlia i a regions d'EUA amb població d'origen irlandès.

El diagnòstic d'HH ha de ser sospitat en qualsevol pacient amb hepatomegàlia, hiperpigmentació anormal, cardiomiopatia, diabetis, artritis o hipogonadisme de causa no determinada. L'HH és una malaltia progressiva que es manifesta de forma més freqüent en homes i que habitualment no és aparent fins a la tercera o sisena dècades de la vida. Les dones presenten menys manifestacions degut a la menstruació i els parts.

Clàssicament els criteris acceptats per al diagnòstic de l'HH han estat els següents: <sup>94</sup>

- 1- Tincions per ferro hepàtic graus 3 o 4.
- 2- Concentració de ferro hepàtic  $>80 \mu\text{M/g dw}$  (pes sec) o  $>1000 \mu\text{g}/100\text{mg}$  (pes sec)
- 3- Índex de ferro hepàtic  $> 1.9$
- 4- Cinc o més grams de ferro extrets per flebotomia

La sobrecàrrega de ferro també repercuteix en l'augment de la saturació de transferrina i la concentració de ferritina.

El tractament de l'hemocromatosi hereditària consisteix en la pràctica de sagnies, que inicialment es realitzaran una o dues vegades a la setmana. Posteriorment s'adapta el ritme de sagnies després de la monitorització de l'hemoglobina, l'hematocrit i la ferritina.<sup>95</sup> Es considera adequat assolir i mantenir nivells de ferritines de 50 mg/l o menors.

## 2. HLA I HEMOCROMATOSI

Al 1976 Simon va establir una forta associació entre l'HH i l'HLA-A (localitzat a 6p21.3), que va trobar en un 78% dels seus pacients.<sup>96</sup> Stevens i col van concloure que el gen de l'hemocromatosi havia de localitzar-se al cromosoma 6 proper al locus de l'HLA-A en desequilibri d'unió, amb una alta freqüència de l'HLA-A3.<sup>97</sup> Durant els anys següents diversos autors van anar acotant el locus de l'HH entre els locus HLA-A i l'HLA-B utilitzant tècniques d'associació al·lèlica.<sup>98-103</sup> L'absència de lesions estructurals utilitzant electroforesi en gel per a localitzar el locus de l'HH va permetre descartar grans delecions o reordenaments.<sup>104</sup> La identificació dels microsatèlits va permetre situar el gen de la HH entre el locus HLA-A i el marcador microsatèlit D6S105 al 1993.<sup>105,106</sup> Finalment, en un estudi en pacients amb hemocromatosi, Feder i col van identificar una regió de 250 kb telomèrica en 3 Mb al complex major d'histocompatibilitat (CMH) al cromosoma 6 mitjançant tècniques d'anàlisi de desequilibri d'unió i d'haplotipus complet.<sup>107</sup> A aquesta regió van identificar un gen relacionat amb el CMH tipus I (denominat pels autors HLA-H i actualment HFE) que contenia dues mutacions sense sentit. Una de les mutacions es va trobar en el 83% dels 178 pacients estudiats.

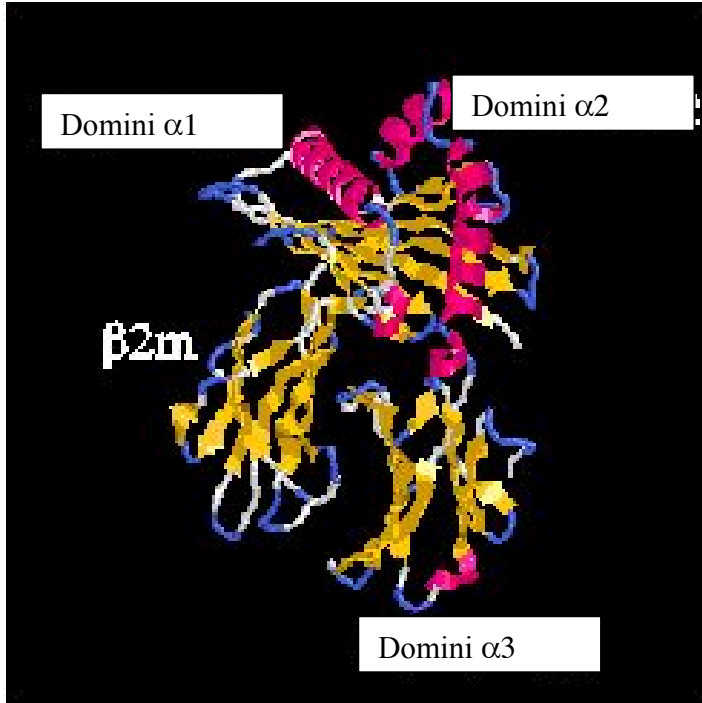
El fet de que es retardés una dècada la troballa del gen de la HH és degut a diversos motius. Per una banda, el gen es localitza en una àmplia zona de desequilibri d'unió amb uns marcadors al·lèlics que encara que allunyats entre si mostren nivells comparables de desequilibri d'unió amb el gen a estudi. A l'HH els mapes genètics i físics no són proporcionals. El gen HFE es troba 4.6 Mb distal al HLA-A però la distància genètica es troba només a 0.75 cM per la qual cosa durant 20 anys l'estreta unió entre el gen de l'HH i el HLA-A es va interpretar com una distància física petita.<sup>108</sup> La introducció de microsatèlits

com a marcadors va permetre endegar una recerca més precisa, encara que finalment el gen es trobava a 2 Mb del marcador preferit, D6S105.<sup>105</sup>

### 3. GEN HFE

El gen de la proteïna HFE (pHFE) conté 7 exons i codifica una proteïna de 343 aminoàcids. La mutació que es troba en més del 80% dels pacients amb hemocromatosi es localitza a l'exó 4, consistint en una substitució d'una sola base, G→A, en el nucleòtid 845 (G845A) –**Figura 2**-. Aquesta mutació es tradueix en una substitució d'una cisteïna per una tirosina a nivell de l'aminoàcid 282 (cys282Tyr-C282Y). La pHFE és similar a les molècules del CMH de classe I. Conté, a l'igual que aquestes, una seqüència senyal, una regió d'unió al pèptid (dominis  $\alpha 1$  i  $\alpha 2$ ), un domini tipus immunoglobulina ( $\alpha 3$ ), una regió transmembrana i una petita porció citoplasmàtica (**Figura 3**).<sup>107</sup> Una de les característiques estructurals més importants de les molècules del CMH conservada a la proteïna HFE consisteix en 4 cisteïnes que formen ponts dissulfur als dominis  $\alpha 2$  i  $\alpha 3$ . La correcta conformació del domini  $\alpha 3$  és rellevant per la unió no covalent amb la  $\beta 2$ -microglobulina ( $\beta 2M$ ) i la seva adequada presentació a la superfície cel·lular.<sup>109</sup> La mutació C282Y origina una alteració en una d'aquestes cisteïnes.

Figura 3. Estructura de la pHFE.





### 3.1. Mutacions del gen HFE:

#### Mutació C282Y:

Un cop descobert el gen del HH diversos estudis han confirmat que el 72-90% dels pacients amb aquesta malaltia són homozigots per la mutació C282Y.<sup>111-118</sup> La prevalença d'aquesta mutació a la població general és especialment elevada a la població anglosaxona, trobant-se en homozigosi en un 0.5% a la majoria d'estudis realitzats al Nord d'Europa.<sup>119,120</sup> La població amb major prevalença fou la irlandesa, detectant-se la mutació C282Y en un 14% dels cromosomes.<sup>121</sup> La mutació C282Y es troba en heterozigosi en un 7-10% dels individus d'origen nordeuropeu. La freqüència de la mutació C282Y, així com la gravetat de les manifestacions clíniques d'hemocromatosi, decreixen en totes direccions des de les regions del nord-oest d'Europa, regions habitades per poblacions d'origen celta.

A Espanya s'ha observat una prevalença d'homozigots per al C282Y del 83-87% i en doble heterozigosi amb la mutació H63D en un 5-6.5% dels pacients amb HH.<sup>122,123</sup> A la població general s'ha observat la mutació C282Y en homozigosi en un 0,2% i en heterozigosi en el 5.5% (dobles heterozigots 1.4%).<sup>122</sup>

A Itàlia es detecta una menor prevalença de les mutacions del gen HFE que al nord d'Europa en els pacients amb HH (64% d'homozigots per C282Y)<sup>114,124</sup> Aquesta prevalença augmenta de sud a nord d'Itàlia, en correlació amb l'augment del percentatge de població d'origen celta.<sup>125</sup> Les diferents prevalences de la mutació C282Y segons la població a estudi semblen confirmar l'origen celta de la mutació C282Y.<sup>126,127</sup>

Essent l'HH una malaltia metabòlica freqüent, amb una fase pressimptomàtica i amb un tractament disponible eficaç (sagnies), alguns autors han proposat la utilitat del cribatge sistemàtic de les seves mutacions en poblacions d'alt risc.<sup>45, 67,107,128-130</sup>

Aproximadament el 80% dels individus amb el genotipus homozigot per C282Y tenen un fenotipus de sobrecàrrega de ferro compatible amb HH.<sup>119-131</sup> A més, les mutacions del gen HFE, especialment la C282Y en homozigosi podria estar relacionada amb un risc augmentat de patir hepatocarcinoma, amb la qual cosa l'estudi i detecció d'aquesta mutació podria ser de gran interès per a la prevenció d'aquest tumor.<sup>132</sup>

Per altra banda, nombrosos estudis realitzats en població general han observat que la penetració clínica (si incloem com a tals les manifestacions clàssiques com la diabetis, la cardiomiopatia i la cirrosi) del genotipus més prevalent, el C282Y en homozigosi, és molt baixa, al voltant del 1-4%.<sup>120,133,134</sup>

Actualment no s'ha arribat a un consens sobre la conveniència de realitzar estudis poblacionals de cribatge de les mutacions del HFE.<sup>135-137</sup>

#### Mutació H63D:

La freqüència d'una segona mutació, situada a l'exó 2 està augmentada en els cromosomes que no contenen la mutació C282Y en pacients amb HH.<sup>107,112,115,138</sup> Aquesta mutació es troba en desequilibri d'unió amb la mutació C282Y. Consisteix en una transició C→G en el nucleòtid 187 (C187G) –**Figura 2**- que determina una substitució d'histidina per àcid aspàrtic en la posició 63 (His63Asp-H63D) en el domini  $\alpha 1$ .

La prevalença en població general de la mutació H63D és més elevada que la C282Y, essent del 15-20% en població nordeuropea. A Espanya aquesta prevalença en homozigosi és del 4.1% i en heterozigosi del 35.1%.<sup>122</sup>

Malgrat el comportament aparentment normal de la proteïna mutada H63D observat en models experimentals, alguns autors defensen la seva participació en la inducció d'HH,<sup>139,140</sup> especialment com a factor afavoridor de l'expressió fenotípica en situacions susceptibles de sobrecàrrega fèrrica com l'alcoholisme, trastorns metabòlics o heterozigositat C282Y.<sup>141-143</sup> També s'ha descrit l'augment de la saturació de transferrina i de ferro hepàtic en individus heterozigots per a aquesta mutació.<sup>144</sup>

Inicialment diversos autors atribuïren a aquesta mutació un paper menor en la inducció d'HH,<sup>111,113,145</sup> però actualment es considera que pot contribuir a aquesta malaltia quan es presenta en els següents genotipus: H63D/H63D en homozigosi i C282/H63D heterozigots compostos.<sup>146</sup>

A diferència de C282Y, la H63D per si sola no és una bona eina per al cribatge de possibles pacients amb HH donat que més del 98% dels portadors d'aquesta mutació no tenen el ferro augmentat.<sup>147</sup>

#### 4. FISIOLOGIA DE L'ABSORCIÓ DE FERRO

El ferro en estat fèrric ( $\text{Fe}^{3+}$ ) de la dieta és reduït a  $\text{Fe}^{2+}$  per acció del citocrom b duodenal (Dcytb)<sup>148</sup> i posteriorment absorbit per l'enteròcit mitjançant la proteïna transportadora de ferro (DMT-1) principalment per les cèl·lules velloses.<sup>149</sup> Posteriorment, el ferro travessa l'enteròcit i és exportat per la superfície basolateral per un altre transportador del ferro, la IREG/ferroportina/mtp-1 (actualment anomenada ferroportina). En aquest procés d'exportació el ferro es reoxida a  $\text{Fe}^{3+}$  mitjançant l'acció de la hephaestina intracel·lular,<sup>150</sup> i s'uneix a la transferrina a la circulació per a ser transportat per l'organisme.

Les concentracions de ferroportina i de DMT-1 expressades a l'enteròcit madur modulen l'absorció de ferro de la dieta. Durant la maduració de les cèl·lules de la cripta envers l'enteròcit absorbit l'expressió de DMT-1 i ferroportina dependrà principalment de la concentració de ferro dintre de la cèl·lula de la cripta. L'expressió de DMT-1 i ferroportina augmenta quan es redueix la concentració del ferro a la cripta.<sup>149</sup> Per tant, un descens del ferro a nivell de les cèl·lules de la cripta es tradueix en una inducció de la maduració de les cèl·lules velloses i en una major absorció de ferro a l'organisme establint-se un mecanisme d'amplificació del senyal.<sup>149,151,152</sup>

Els mecanismes pels quals les cèl·lules de la cripta detecten els nivells i requeriments de ferro de l'organisme no són ben compresos però probablement impliquen l'absorció de ferro unit a la transferrina de la circulació a través del receptor de la transferrina-1 (TfR-1). Aparentment, l'aportació de ferro de les cèl·lules de la cripta depèn únicament del provinent de la transferrina de la circulació. Quan s'injecta transferrina a animals d'experimentació augmenten els nivells de ferro de la cripta. En absència o disminució de

transferrina s'esdevé una manca de ferro a la cripta que donarà lloc a la inducció de tots els gens implicats en l'absorció de ferro per l'enteròcit madur. Aquests gens són principalment la DMT-1, la ferroportina, el TfR i l'HFE.

## 5. MECANISME D'ACCIÓ DE LA PROTEÏNA HFE

Parkkila i col. van sintetitzar un anticòs contra un pèptid C-terminal que va permetre immunolocalitzar la pHFE al tracte gastrointestinal.<sup>153</sup> Amb aquesta estratègia es va poder observar que la pHFE s'expressa a nivell intracel·lular i perinuclear a les cèl·lules de la cripta del budell prim. Aquesta distribució contrastava amb la trobada a altres localitzacions com l'esòfag o els leucòcits a on s'expressava a tota la membrana plasmàtica. Aquestes troballes recolzen la possible implicació de la pHFE en l'origen de l'hemocromatosi a l'expressar-se de forma especial a la zona d'absorció intestinal del ferro.

Inicialment els estudis funcionals en línies cel·lulars van atribuir un paper inhibidor de la pHFE sobre el TfR, disminuint la seva afinitat per la transferrina.<sup>154-156</sup> Seguint les troballes d'aquests experiments es va concloure que a l'hemocromatosi es perdia l'efecte inhibidor de la pHFE sobre el TfR afavorint-se l'absorció de ferro tissular, augment de ferro tissular que característicament és observat en aquesta malaltia. Tanmateix, posteriorment va poder observar-se que a l'hemocromatosi el ferro es troba disminuït a les criptes i a les cèl·lules de Kupffer reticulo-endotelials del fetge.

Partint de que les mutacions del gen HFE donen lloc a una disminució del ferro a nivell de les criptes s'han establert complexos models que hipotetitzen el mecanisme d'acció de la pHFE.<sup>149,157-159</sup>

Actualment existeixen tres teories que impliquen la pHFE en el mecanisme de regulació dels canvis en els nivells de ferro a nivell de la cripta.

### **1- La pHFE potencia l'acció del receptor de la transferrina (TfR):**

Feder va poder comprovar, en cèl·lules cultivades, que la pHFE nativa s'uneix a la  $\beta$ 2M, proteïna que a la vegada afavoreix el transport de la primera a la superfície cel·lular. La pHFE s'uneix al TfR i aquest a la transferrina a nivell de la superfície cel·lular<sup>155,160</sup> per a formar un complex quaternari dependent del pH.<sup>151,156</sup>

El complex HFE- $\beta$ 2M no afecta l'afinitat de la TfR1 per la transferrina o la capacitat d'absorció d'aquesta sinó que està implicat en la velocitat de reciclatge del TfR1. Així, el complex HFE- $\beta$ 2M actuaria com a inductor d'aquest recanvi, afavorint una major presència de TfR1 i en conseqüència un augment de la seva acció a la paret de les cèl·lules de la cripta.<sup>152</sup>

En l'hemocromatosi la mutació C282Y en homozigosi impedeix la unió de la pHFE a la  $\beta$ 2M,<sup>161,162</sup> afavorint-se la degradació de la primera.<sup>154-162</sup> Per altra banda, l'expressió a la superfície cel·lular de la proteïna nativa HFE i de la mutada per a H63D no està alterada.<sup>162,163</sup>

En resum, la mutació C282Y afavoriria la seva degradació, disminuint la seva unió amb el TfR1 i per tant disminuint l'acció d'aquesta. Per tant, l'absorció de ferro a les criptes disminuiria i això donaria el senyal que potenciarà la maduració de les cèl·lules velloses i la seva absorció de ferro de forma desmesurada.

## **2- La pHFE inhibeix l'acció de la ferroportina:**

Townsend i cols proposen un altre model.<sup>164</sup> Quan la saturació de transferrina a l'organisme és elevada la pHFE es dissocia del TfR1 i s'uneix a la ferroportina, inhibint-la. Aquesta inhibició reduiria l'exportació de ferro fora de les criptes, augmentant a les mateixes i donant la senyal de disminuir l'absorció a les vellositats. Per altra banda, quan disminueix la saturació de la transferrina a l'organisme, la pHFE es dissocia de la ferroportina i aquesta es torna activa, disminuint el ferro de les criptes i augmentant consegüentment l'absorció a les vellositats. Amb la mutació C282Y la ferroportina està contínuament estimulada, infraestimant els nivells de saturació de la transferrina i mantenint els enteròcits madurs en un programa d'absorció de ferro.

## **3- La proteïna HFE potencia l'acció de l'hepcidina:**

Les teories comentades pressuposen que la senyal que determina el grau de ferro que s'ha d'absorbir a nivell de les cèl·lules velloses es produeix inicialment a les cèl·lules de la cripta. Així ha estat degut a que habitualment l'absorció de ferro a nivell de les vellositats en resposta als nivells de ferro de l'organisme es produeix de forma diferida o tardana. Tanmateix, en ocasions aquesta resposta es produeix en hores (vg. quan es produeix una transfusió de reticulocits), temps que no permet que les cèl·lules de la cripta madurin a cèl·lules velloses. Segons Frazer i col. la senyal es produiria directament sobre les cèl·lules velloses i el decalatge entre les necessitats de ferro i la seva absorció seria degut al temps que necessita l'organisme en *reconèixer* les seves necessitats de ferro.<sup>165</sup> La

principal proteïna que segons aquest autor estaria implicada en la regulació de l'absorció de ferro seria l'hepcidina, l'expressió de la qual es correlaciona inversament amb l'absorció de ferro, tant en relació a estímuls ràpids com retardats. A més, aquesta regulació es produiria a nivell hepàtic, on s'expressen principalment no només l'hepcidina sinó la pHFE. La hipòtesi que plantegen és la següent<sup>165,166</sup>: La transferrina circulant i la pHFE competeixen pel mateix lloc d'unió al TfR1.<sup>167</sup> La pHFE lliure no unida al TfR1 estimularia la producció d'hepcidina, estímul que quedaria frenat quan la pHFE i el TfR1 s'uneixen. La transferrina (difèrrica) s'uneix amb més afinitat al TfR1 que la pHFE, per la qual cosa quan existeix un excés de transferrina la pHFE es troba lliure, s'estimula la producció d'hepcidina, proteïna que inhibeix l'absorció intestinal de ferro. Per altra banda, quan disminueixen els nivells de ferro circulants augmenta la proporció de transferrina monofèrrica en detriment de la difèrrica i augmenta l'expressió de TfR1. La transferrina monofèrrica té menys afinitat pel TfR1 i per tant la pHFE s'unirà amb major proporció amb aquest receptor, disminuint la síntesi d'hepcidina i estimulant-se l'absorció de ferro intestinal. En l'hemocromatosi, l'alteració de la pHFE donaria lloc a una disminució de la síntesi d'hepcidina i a un augment de l'absorció de ferro intestinal malgrat la TfR1 estigui saturada amb transferrina difèrrica. Frazer i cols. també postulen que el TfR2 unit a la transferrina difèrrica tindria una acció similar a la de la pHFE lliure, induint la síntesi d'hepcidina. El TfR1 té més afinitat per la transferrina que el TfR2 i en condicions de poc ferro circulant aquest s'unirà a TfR1, el TfR2 quedarà lliure i juntament amb la disminució de la pHFE lliure s'inhibirà la síntesi d'hepcidina, augmentant l'absorció de ferro intestinal. Pel contrari, en condicions d'elevat ferro circulant s'inhibirà l'expressió de TfR1 i el TfR2 unit a la transferrina augmentarà, la qual cosa, considerant l'augment de la pHFE lliure, estimularà la síntesi d'hepcidina i la inhibició de l'absorció intestinal de ferro. Aquest mecanisme de doble regulació que exerceix la transferrina sobre el TfR1/HFE i el TfR2 té les seves implicacions clíniques. Mutacions en els gens que codifiquen la síntesis de



TfR1, TfR2 i HFE donen lloc a manifestacions clíniques d'hemocromatosi. Tanmateix, en aquests casos, malgrat existeixi un augment exagerat de l'absorció de ferro, aquesta absorció pot ser regulada, en cert grau, per la quantitat de ferro circulant<sup>168,169</sup> i la clínica no sol aparèixer en edats precoces. Pel contrari, les mutacions de l'hepcidina donen lloc a una hemocromatosi juvenil.<sup>170</sup>

## **6. MUTACIONS DEL GEN HFE I EVIDÈNCIA CLÍNICA/BIOQUÍMICA D'AUGMENT DE FERRO SISTÈMIC**

Els paràmetres de ferro que més s'han utilitzat per a valorar la sobrecàrrega de ferro en pacients amb hemocromatosi i en estudis sobre el fenotipus associat a les mutacions del gen HFE han estat la saturació de la transferrina, la ferritina i la siderèmia. La quantificació del ferro hepàtic és considerada de forma infreqüent en els estudis sobre el fenotipus de les mutacions del gen HFE. Els treballs més recents semblen coincidir en que el millor paràmetre individual per a analitzar aquesta relació és la saturació de la transferrina.

### **6.1. Mutacions del gen HFE i paràmetres sèrics de sobrecàrrega de ferro:**

Els indicadors d'homeostasi del ferro, incloent-hi la saturació de la transferrina, la ferritina i la siderèmia, tenen el valor màxim en els C282Y homozigots, seguits dels C282Y/H63D heterozigots compostos, els H63/H63D homozigots, els C282Y heterozigots, els H63D heterozigots i en darrer lloc els tipus salvatges sense les mutacions.<sup>134,171</sup>

Genotipus C282Y/C282Y:

En pacients homozigots per C282Y amb sobrecàrrega de ferro, el grau d'expressió fenotípica és molt variable i depèn també de factors com l'edat, el gènere, factors ambientals, la dieta, l'alcohol o la pèrdua de sang.<sup>121</sup>

Els estudis realitzats en població general mostren una important variabilitat geogràfica en l'expressió fenotípica del genotipus C282Y. Així, en estudis realitzats a Gales i al Canadà s'observa una sobrecàrrega moderada de ferro en només el 20% dels individus homozigots C282Y.<sup>134,135</sup> Per altra banda, en estudis realitzats en població general a EUA i Austràlia s'ha observat que més del 80% dels individus amb homozigosi per C282Y presenten una saturació de la transferrina superior al 45%.<sup>119,131</sup>

En un estudi realitzat en 5370 donants de sang espanyols, Sánchez i cols. detecten que el 50% dels pacients homozigots per C282Y (4 pacients barons) presenten un augment significatiu de la saturació de la transferrina i de la ferritina.<sup>172</sup>

Genotipus no homozigots:

C282Y/C282Y:

La presència d'una sobrecàrrega de ferro (mesurada en nivells de saturació de la transferrina i de ferritina) en els individus que no són homozigots per la mutació C282Y és poc freqüent. Olynyk i cols. observen que aquesta freqüència es del 0.13% en un estudi realitzat en 3011 individus d'una població australiana.<sup>119</sup>

C282Y/H63D:

Encara que de forma lleu o moderada el genotipus C282Y/H63D heterozigot compost s'ha associat amb un augment significatiu dels paràmetres de sobrecàrrega de ferro en estudis en població general.<sup>173,174</sup>

A Espanya, Sánchez i cols. observen un augment de la saturació de la transferrina i de la ferritina en només el 1.35% (penetració) dels individus dobles heterozigots en població general.<sup>172</sup> Les manifestacions clíniques d'hemocromatosi en pacients amb aquest genotipus, especialment l'afectació hepàtica, són rares.<sup>121</sup>

H63D/H63D:

El genotipus H63D en homozigosi té també poca penetració,<sup>174</sup> encara que sembla que hi ha certa variabilitat geogràfica. Nombrosos autors han observat un augment significatiu de la saturació de la transferrina en els individus de la població general que són homozigots per H63D respecte als tipus salvatges.<sup>147,173,175,176</sup>

### C282Y/wt o H63D/wt:

En estudis poblacionals de les mutacions del gen HFE alguns autors observen un augment significatiu dels paràmetres de sobrecàrrega de ferro en individus heterozigots per la mutació C282Y o la H63D.<sup>141,143,147,173,175,176,178</sup>

## **6.2. Mutacions del gen HFE i ferro hepàtic:**

La quantificació del ferro hepàtic és un paràmetre que ha estat poc utilitzat per a esbrinar l'efecte de les mutacions del gen HFE. Òbviament, per motius ètics aquests estudis no es realitzen en pacients sans sinó en individus que presenten alguna malaltia hepàtica com ara infecció pel VHC, alteracions de la biologia hepàtica o sobrecàrrega de ferro. En pacients amb HH el genotipus que més ha estat relacionat amb un augment del ferro hepàtic és el C282Y/C282Y en homozigosi.<sup>179</sup>

En un estudi retrospectiu realitzat en 32 biòpsies hepàtiques, Nash i cols. observen que la mutació C282Y en homozigosi és l'únic genotipus que es correlaciona amb un augment del ferro hepàtic.<sup>180</sup>

En 103 biòpsies hepàtiques obtingudes de pacients amb diverses patologies, Brunt i cols. observen que la concentració de ferro hepàtic i l'índex de ferro hepàtic estan augmentats en els pacients homozigots per C282Y i de forma més moderada en la resta de genotipus.<sup>181</sup>

Moodie i cols. detecten un augment significatiu del ferro hepàtic (mesurat de forma semiquantitativa) en individus que havien estat remesos per alteracions hepàtiques, quan aquests presenten els genotipus C282Y en homozigosi o bé són dobles heterozigots C282Y/H63D.<sup>182</sup>

Lim i cols. observen un augment moderat del ferro hepàtic en pacients que estaven en estudi per presentar un augment de la saturació de la transferrina i/o de la ferritina i que a més eren heterozigots composts C282Y/H63D.<sup>183</sup>

## **7. EFECTE DE LES MUTACIONS DEL HFE SOBRE L'AUGMENT DEL FERRO HEPÀTIC ASSOCIAT AMB LA INFECCIÓ PER VHC**

Diversos autors han descrit una manca d'augment dels nivells de ferro hepàtic (per tinció de Pearl's i de forma quantitativa) en individus amb infecció per VHC.<sup>184,185</sup> Aquests autors tampoc observen diferències en els nivells de ferro hepàtic en funció de la presència de les mutacions del HFE.

Altres autors però sí observen un augment de la concentració del ferro hepàtic en pacients amb infecció per VHC i mutacions del gen HFE respecte als que no presenten aquestes mutacions.<sup>186</sup>

## **8. PATOGÈNESI DEL DANY TISSULAR I LA FIBROSI EN L'HEMOCROMATOSI**

Diversos autors han observat un augment de risc de cirrosi hepàtica<sup>187</sup> així com d'esteatosi no-alcohòlica<sup>188</sup> en pacients amb les mutacions del gen HFE.

El cúmul progressiu de ferro al fetge i d'altres òrgans pot donar lloc a un dany cel·lular i fibrosi. El mecanisme patogènic implicat sembla ser la peroxidació de lípids deguda a la creació d'espècies reactives d'oxigen.<sup>189,190</sup> Els fosfolípids de les membranes cel·lulars són els més susceptibles de ser danyats per l'oxidació, desencadenant la destrucció de la membrana, l'alliberació d'enzims hidrolítics en el citosol, l'exposició del DNA als enzims degradants i la pèrdua del potencial de membrana mitocondrial que pot portar a la mort cel·lular.

L'activació i proliferació de les cèl·lules estelades hepàtiques quan hi ha sobrecàrrega de ferro també estan implicades en la fibrosi hepàtica. Els productes de la peroxidació lipídica i el ferro estimulen directament la síntesi de colagen<sup>191</sup> i aquesta afavoreix la formació de fibrosi i cirrosi. El lílndar acostuma a ser de 400 µM/g de ferro hepàtic però aquest pot reduir-se per factors com la ingesta d'alcohol i les infeccions víriques.<sup>191</sup>

La mutació C282Y en heterozigosi afavoreix i potencia el dany hepàtic i la cirrosi produïda per la infecció crònica per VHC.<sup>186,192-194</sup> Aquesta mutació associada a ingesta d'alcohol o a la infecció crònica per VHC també s'ha relacionat amb un risc augmentat de patir hepatocarcinoma.<sup>144,195</sup> La mutació C282Y en homozigosi dona un risc relatiu de 20 de patir hepatocarcinoma<sup>132,196</sup> encara que aquesta associació encara és controvertida.<sup>197</sup>

## **9. DETECCIÓ DE LES MUTACIONS DEL GEN HFE COM A CRIBATGE D'HEMOCROMATOSI**

Avui en dia es consideren indicatius d'hemocromatosis els homozigots per C282Y ,els dobles heterozigots C282Y/H63D i els homozigots H63D. L'estudi de les mutacions del gen HFE està indicat en els següents casos:

1- Individus amb evidència de sobrecàrrega de ferro: augment de la saturació de la transferrina (més del 45%), de la ferritina o del ferro hepàtic, especialment si es demostra una hepatopatia associada.

2- Tots els familiars de primer grau dels pacients amb hemocromatosis. Als familiars als qui es detecti homozigosi se'ls hi haurà de determinar l'índex de saturació de la transferrina.

Com s'ha exposat, el benefici de realitzar un cribatge de les mutacions del gen HFE de forma generalitzada a la població general és controvertit.

## 10. GEN HFE I ANTROPOLOGIA

La prevalença de la mutació C282Y és més elevada en la població d'origen celta.

Les mutacions en el gen HFE poden haver representat un èxit evolutiu en situacions de baixa ingesta de ferro a la dieta. Aquestes mutacions podrien representar també un avantatge evolutiu en grups de població amb tendència a patir anèmia per parasitosis intestinals, malària o embarassos múltiples. A nivell placentari, l'augment de l'absorció de ferro pot haver-se traduït en una menor mortalitat i morbiditat perinatal.<sup>153,198,199</sup>

Les mutacions del gen HFE poden representar un altre avantatge evolutiu, en especial la C282Y. Podria especular-se, a l'igual que s'ha proposat per la proteïna transmembrana reguladora de la fibrosi quística,<sup>200</sup> que la pHFE és un receptor d'un agent infecciós. Les seves mutacions dificultarien l'entrada a nivell intestinal d'aquests agents.

La mutació H63D pot haver aparegut en més d'una ocasió en diferents àrees geogràfiques<sup>201,202</sup> i és més antiga que la mutació C282Y.<sup>203</sup> Cullen va establir l'ancestral cromosòmic del gen HFE en poblacions no caucàsiques d'aborígens australians i xinesos mitjançant estudis amb haplotipatge HLA. Observà que la mutació C282Y que detectava en aquestes poblacions s'associava sovint amb HLAs més freqüents entre els Europeus conclouent que aquesta mutació va ser importada pels anglosaxons. Pel contrari, la mutació H63D es trobava també associada amb HLAs freqüents entre els aborígens i infreqüents entre els europeus per la qual cosa es pot sospitar que aquesta mutació



aparegué de forma aïllada abans de la immigració d'origen europeu. Per a Cullen i Rochette l'aparició i permanència d'aquesta mutació de forma aïllada a diferents àrees geogràfiques podria traduir un avantatge evolutiu. A més, la mutació H63D s'ha associat amb el HLA-A29 i amb un major recompte de limfocits CD8+<sup>204</sup>. Per tant, les mutacions del gen HFE poden tenir implicacions en la immunitat i en una millor adaptació evolutiva enfront d'infeccions virals.

Per a d'altres autors, el fet de que l'HH sigui molt poc prevalent a Àsia i de que la mutació més prevalent a aquestes àrees sigui la H63D indicaria que aquesta mutació és poc rellevant en l'etiopatogènia de l'hemocromatosi.<sup>128</sup>

## **11. ALTRES FACTORS ETIOLÒGICS POTENCIALS DE L'HEMOCROMATOSI**

La variabilitat fenotípica observada en pacients amb les mutacions descrites al gen HFE indica que poden existir altres factors genètics (com ara gens modificadors) o ambientals que determinen aquestes diferències. També recolzaria aquesta teoria el fet que s'observin pacients amb criteris d'hemocromatosi sense les mutacions del gen HFE.<sup>114,117,179,205</sup>

### **11.1. Gen HFE:**

#### Mutació S65C:

S'ha descrit una tercera mutació en el gen HFE deguda a una substitució A→T a la posició 193 de l'exó 2, que dóna lloc a una substitució d'una serina al codó 65 per una cisteïna (S65C). El paper com a factor etiològic de l'hemocromatosi que exerceix la

mutació S65C és controvertit. Alguns autors han observat una prevalença augmentada d'aquesta mutació en pacients amb hemocromatosi, amb una freqüència al·lèlica del 1.6-2%.<sup>138,143,206</sup> També s'ha observat un augment de la prevalença d'aquesta mutació en cromosomes de risc (sense les mutacions C282Y o H63D)<sup>207</sup> així com en heterozigosi amb la mutació C282Y<sup>208</sup> en pacients amb fenotipus d'hemocromatosi .

Per Mura i cols. la mutació S65C s'associaria amb una forma poc severa d'hemocromatosi.<sup>138</sup> Així com alguns autors no han trobat cap associació entre aquesta mutació i la sobrecàrrega de ferro,<sup>209</sup> d'altres sí han observat un augment de la saturació de la transferrina en aquests pacients.<sup>143</sup>

## **11.2. Altres gens:**

### Mutacions del HFE2:

Els pacients amb hemocromatosi juvenil presenten manifestacions clíniques d'hemocromatosi hereditària abans dels 30 anys i moren a edats temperanes per insuficiència cardíaca si no són diagnosticats.<sup>210,211</sup> És una malaltia autossòmica recessiva de la qual se n'ha mapejat el gen recentment, localitzant-se al cromosoma 1 i denominant-se HFE2.<sup>212</sup> La proteïna que transcriu s'ha denominat hemojuvelina i aparentment modula, potenciant-la, l'expressió de l'hepcidina.

### Mutacions en la ferroportina:

S'ha descrit una forma d'hemocromatosi associada a una mutació puntual en el gen de la ferroportina, donant lloc a un canvi de N a H a la posició 144 de la proteïna.<sup>213</sup> La malaltia s'hereta de forma autossòmica dominant. Njajou i col. suggereixen que la mutació activa la ferroportina. Townsend i cols. hipotetitzen que aquesta mutació podria donar lloc a una

alteració en la unió ferroportina-HFE, obviant-se doncs la inhibició de la primera i estimulant-se l'absorció de l'enteròcit.<sup>164</sup>

#### Mutacions del receptor de la transferrina 2:

El receptor de la transferrina 2 (TfR2) és una proteïna localitzada a nivell de les criptes que té un 48% d'homologia amb el TfR1 en la porció extracel·lular de la proteïna i presenta afinitat per la transferrina però no per la pHFE.<sup>214</sup> S'ha descrit una forma d'hemocromatosi deguda a mutacions en aquest receptor (TfR2).<sup>215</sup>

#### Mutacions de l'hepcidina:

L'hepcidina és un petit pèptid que s'expressa al fetge amb activitat antimicrobiana i es creu que té una acció reguladora de l'homeostasi del ferro.<sup>216,217</sup> Aquesta proteïna aparentment limita l'absorció de ferro intestinal i la seva manca d'expressió s'ha associat amb sobrecàrrega de ferro. Alguns autors han hipotetitzat que la ferroportina és inhibida per l'hepcidina<sup>164</sup> i aquesta podria ser potenciada per la pHFE.<sup>218</sup> Per tant, es podria preveure que les mutacions de la pHFE disminuirien l'expressió de l'hepcidina, disminuint la inhibició sobre la ferroportina i potenciant-se l'exportació de ferro de la cripta.

En estudis experimentals amb ratolins knockout s'ha observat que l'expressió clínica de l'hemocromatosi deguda a mutacions del gen HFE es potencia quan manca l'activitat de l'hepcidina.<sup>219</sup> També s'ha observat l'aparició d'una malaltia similar a l'hemocromatosi hereditària en ratolins amb manca d'expressió d'hepcidina.<sup>220</sup>

Posteriorment s'han descrit mutacions en el gen de l'hepcidina (HAMP) localitzat a 19q13 que donen lloc a l'aparició d'una forma d'hemocromatosi que comparteix les característiques clíniques de l'hemocromatosi juvenil.<sup>170,221</sup>

## **PCT I HEMOCROMATOSI**

No tot individu de la població general exposat als factors descrits com a desencadenants de la PCT tipus I desenvoluparà aquesta malaltia. Per tant, malgrat sigui denominada PCT esporàdica o adquirida, ja al 1963 Waldenstrom va postular la possibilitat de que alguns factors genètics podien predisposar a aquesta malaltia.<sup>222</sup>

Existeix una semblança entre la siderosi hepàtica en pacients amb HH i PCT i alguns pacients presenten ambdues malalties de forma simultània.<sup>223,224</sup> Tant el procés de recerca com la troballa del gen implicat en l'HH s'ha reflectit en l'estudi de la PCT. De forma successiva i paral·lela als avenços aconseguits en l'estudi de l'HH s'han anat assolint troballes en biologia molecular en la PCT.

Al 1985 Kushner observa que el 51% dels seus pacients amb PCT esporàdica presenten l'HLA-A3.<sup>225</sup> Posteriorment, diversos autors confirmen la relació entre HLA-A3, PCT i sobrecàrrega de ferro.<sup>224,226</sup>

Al 1997, l'any després de que es descobreixi el gen implicat en l'HH, Roberts i col mostren una prevalença significativament augmentada de la mutació C282Y en pacients afectes de PCT (**Taula 1**).<sup>227</sup> Aquests autors analitzen les mutacions C282Y i H63D en 41 pacients del Regne Unit amb PCT esporàdica i observen una prevalença significativament augmentada de la mutació C282Y, tant en heterozigosi (26.8%) com en homozigosi (17%) respecte als controls (9.9% i 0.9% respectivament). No mostren una relació entre la mutació H63D i la PCT, ni en heterozigosi (29.2%) ni en homozigosi (2.4%). No s'analitza la prevalença de la infecció per VHC en aquest estudi.

Santos i cols. observen, en un estudi realitzat a Holanda, que el 47% dels al·lels de pacients amb PCT tenen la mutació C282Y i el 23% la mutació H63D, en contrast amb el 9% i el 4% del grup control.<sup>228</sup>

Posteriorment, en un estudi realitzat a Milà, al nord d'Itàlia, Sampietro i cols. no observen un augment significatiu de la mutació C282Y (2.9% en pacients amb PCT respecte a un 1.5% en controls) entre els 68 barons amb PCT esporàdica que són analitzats.<sup>229</sup> No observen pacients homozigots per la mutació C282Y. Pel contrari, observen una sobreexpressió significativa de la mutació H63D. Observen la mutació H63D en el 50% dels pacients amb PCT, en forma heterozigota (42.6%) o homozigota (7.3%), en contrast amb el 24% del grup control (22.6% d'heterozigots i 1.5% d'homozigots). Tanmateix, no observen una correlació entre la mutació H63D i una sobrecàrrega fèrrica (mesuren el ferro hepàtic de forma quantitativa en 21 pacients). En l'estudi de Sampietro s'inclouen controls amb infecció pel VHC i no s'observen diferències en les mutacions del HFE quan es comparen amb controls no infectats. No observen tampoc una correlació entre les mutacions del gen HFE i la infecció pel VHC en els pacients amb PCT. No s'analitzen les diferències en les prevalences de les mutacions del HFE segons l'estatus del VHC entre els pacients amb PCT i els controls i no reflecteixen una xifra de la prevalença de la infecció pel VHC en el grup de pacients amb PCT.

D'Amato i cols. descriuen una sobreexpressió de la mutació C282Y (sumant heterozigots i homozigots) i no de la H63D entre 50 pacients amb PCT d'Itàlia central i sud.<sup>230</sup> Tanmateix, no observen una correlació entre la mutació C282Y i la sobrecàrrega de ferro, mesurada en nivells de ferritina i siderèmia. No s'analitza la prevalença de la infecció pel VHC.

En una població australiana de 27 pacients amb PCT, Stuart i cols. observen un augment significatiu de la mutació C282Y (44.4%) en relació amb els controls (12%; p 0.001).<sup>49</sup> No observen un augment significatiu dels valors de saturació de la transferrina ni de la ferritina en els pacients amb la mutació C282Y respecte als tipus salvatges. Tampoc objectiven una relació entre la mutació H63D i la PCT. El 25.9% dels pacients d'aquest estudi són VHC positius i cal destacar que cap d'aquests presentava la mutació C282Y.

Christiansen i cols. observen una sobreexpressió de les mutacions C282Y i H63D en homozigosi en 42 pacients danesos amb PCT esporàdica.<sup>231</sup> Aquests autors no analitzen la prevalença de la infecció pel VHC entre els seus pacients.

En l'estudi d'Enríquez de Salamanca i cols. realitzat amb 69 pacients amb PCT esporàdica en una població espanyola, s'observa un augment significatiu de la mutació H63D en homozigosi entre els pacients amb PCT.<sup>232</sup> La mutació C282Y no es correlaciona amb la PCT. No es fa cap anàlisi en relació a la infecció pel VHC ni a la sobrecàrrega de ferro.

No s'observa una relació entre les mutacions del HFE i la PCT (esporàdica i familiar) en pacients de Bulgària.<sup>233</sup> No s'analitzen altres factors de risc com la infecció pel VHC.

En el treball de Bulaj i col., realitzat a EUA amb 108 pacients afectes de PCT, s'observa una relació entre la mutació C282Y i aquesta malaltia.<sup>67</sup> Observen que un 19% dels pacients són homozigots per C282Y (controls 0%) i un 7% són dobles heterozigots (controls 0%). Aquests genotips estan sobreexpressats doncs entre els pacients amb PCT. Per altra banda, no s'observa un sobreexpressió dels altres genotips, incloent la mutació C282Y en heterozigosi. Bulaj també correlaciona la mutació C282Y en homozigosi amb la

sobrecàrrega de ferro, mesurada amb els següents paràmetres: concentració de ferritina, saturació de transferrina i concentració de ferro hepàtic. La concentració de ferro mesurada mitjançant espectrofotometria d'absorció atòmica va ser estudiada en 31 biòpsies. El 59% dels pacients d'aquest estudi presentaven infecció pel VHC.

En un estudi brasileny es detecta una sobreexpressió de la mutació C282Y entre 23 pacients amb PCT, que també presenten una alta prevalença d'infecció pel VHC (65.2%).<sup>234</sup> La prevalença de la mutació C282Y és del 17.4%, significativament augmentada respecte als controls (4%; p 0.02).

A Alemanya, Tannapfel i cols. observen un augment significatiu d'ambdues mutacions en 190 pacients amb PCT esporàdica.<sup>235</sup> El 39% dels pacients presentaven la mutació C282Y i el 45% la mutació H63D, respecte al 3% i el 10% dels controls. Aquests autors destaquen que la relació que observen entre la mutació H63D i la PCT entre els seus pacients, no observada en d'altres estudis similars, podria ser deguda a la baixa prevalença de la infecció pel VHC entre els pacients amb PCT a Alemanya, xifrada en un 8-15%, significativament inferior a l'observada en d'altres països. Tannapfel observa una tendència dels pacients homozigots per C282Y, heterozigots per H63D i dobles heterozigots envers un augment dels nivells de ferritina i saturació de la transferrina sense arribar a la significació estadística.

Dereure i cols. analitzen les mutacions en 36 pacients amb PCT esporàdica o familiar (32 i 4 pacients respectivament) del Sud de França i observen una sobreexpressió de la mutació C282Y en heterozigosi (19% dels pacients) i de la mutació H63D en homozigosi (14%).<sup>236</sup> No observen un augment ni de la ferritina ni de la saturació de la transferrina

entre els pacients amb PCT amb les mutacions del gen HFE. El 56% d'aquests pacients francesos presenten infecció pel VHC.

Skowron i cols. descriuen la presència de mutacions del gen HFE en 56 pacients del centre de França (no recullen un grup control).<sup>237</sup> Observen que el 30.2% presenten la mutació C282Y en heterozigosi (cap en homozigosi). El 46.3% presentava la mutació H63D en heterozigosi i el 7.1% en homozigosi. Destaquen l'augment significatiu de la saturació de la transferrina en els pacients dobles heterozigots C282Y/H63D i una tendència que no arriba a la significació estadística en els homozigots per H63D. El 25% presentaven la infecció pel VHC.

Lamoril i cols. analitzen les mutacions del HFE en 65 pacients amb PCT esporàdica de la zona central de França i observen un augment significatiu de la mutació C282Y, en heterozigosi (11.4%) i en homozigosi (5.7%).<sup>238</sup> No observen una sobreexpressió de la mutació H63D ni de la S65C entre els pacients amb PCT. El 28% dels pacients amb PCT esporàdica presentaven una infecció pel VHC.

En el treball d' Egger i cols. es fa èmfasi en la multiplicitat de factors de risc en la PCT, incloent les mutacions del HFE.<sup>239</sup> No es fa un anàlisi detallat de les prevalences d'aquestes mutacions en els 34 pacients amb PCT estudiats però sí es refereix que un 29% presentaven la mutació C282Y en alguna de les còpies i un 47% la mutació H63D. El 74% dels pacients presentaven infecció pel VHC. Cal destacar que s'estratifiquen els pacients segons la presència d'infecció per VHC i que s'observa una tendència, encara que no significativa, envers un major nombre de mutacions del HFE, en general, entre els pacients sense infecció pel VHC.



En un estudi realitzat per Malina i cols. a la República Txeca amb 71 pacients s'observa una sobreexpressió de la mutació C282Y entre els pacients amb PCT.<sup>240</sup> Malgrat que la prevalença de la infecció pel VHC entre els pacients amb PCT txecs és del 22%, en el seu estudi Malina no observa cap pacient amb la mutació C282Y que a més presenti aquesta infecció hepàtica. Aquests autors hipotetitzen que la rellevància de les mutacions del HFE, i en particular la mutació C282Y, pot variar geogràficament en funció de la prevalença de la infecció pel VHC.

En un estudi sud-africà, Hift i cols. troben una significativa variabilitat en la prevalença de les mutacions del HFE en pacients amb PCT segons l'origen ètnic.<sup>241</sup> Observen que les mutacions C282Y i H63D són prevalents en la població d'origen europeu malgrat només troben que la mutació H63D està augmentada en els individus amb PCT en aquest grup. La mutació H63D també està augmentada en el grup d'origen asiàtic (en controls i PCT, sense diferències significatives) i no troben cap mutació en el grup d'origen africà.

En l'estudi realitzat per Chiavérini i cols. en població de pacients amb PCT del Sud de França, s'observa una sobreexpressió de la mutació C282Y.<sup>242</sup> El 18.2% dels pacients presenten la mutació C282Y en heterozigosi, significativament augmentada respecte als controls (1.7%). No observen homozigots C282Y entre els pacients amb PCT. El 57.6% dels seus pacients presenten la infecció per VHC. Quan analitzen les mutacions del gen HFE només en els pacients i controls amb infecció pel VHC no observen una sobreexpressió de la mutació C282Y. Destaca la manca d'aquest anàlisi entre els pacients no infectats. No observen una associació entre els paràmetres de sobrecàrrega de ferro (mesurats en siderèmia, ferritina i saturació de la transferrina) i les mutacions del HFE.

Stölzel i cols. realitzen un estudi de les mutacions del HFE en 62 pacients amb PCT a Leipzig, Alemanya.<sup>243</sup> Observen un augment significatiu de la prevalença de la mutació C282Y i la H63D en heterozigosi, així com dels dobles heterozigots, entre els pacients amb PCT. Els tres pacients homozigots per C282Y presenten nivells significativament elevats de ferritina i saturació de la transferrina i no milloren ni clínica ni bioquímicament (nivells elevats de porfirines urinàries) després de ser tractats amb antipal.lúdics. Els paràmetres de sobrecàrrega de ferro només milloren després d'instaurar-se flebotomies. Els pacients heterozigots per les mutacions del HFE presenten una millora dels paràmetres clínics i en els nivells de porfirines i enzims hepàtics després de rebre antipal.lúdics. Tanmateix, no milloren els paràmetres de sobrecàrrega de ferro amb aquest tractament.

En un estudi hongarès recent amb 50 pacients amb PCT, Nagy i cols. observen una sobreexpressió només de la mutació C282Y i no de la H63D.<sup>244</sup> El 16% dels pacients presentaven la mutació C282Y en heterozigosi o homozigosi respecte al 3.8% dels controls. No observen un augment significatiu de la saturació de la transferrina en els pacients amb mutacions del gen HFE. El 44% dels total de pacients presentaven la infecció pel VHC.

En resum, els treballs publicats descriuen 4 situacions:

**1- Augment significatiu aïllat de la mutació C282Y:** un nombre significatiu d'estudis, la majoria realitzats en poblacions anglosaxones de Gran Bretanya i EUA, observen un augment aïllat de la mutació C282Y en els pacients amb PCT.<sup>46,49,67,227,230,234,238,240,244,245</sup>

**2- Augment significatiu aïllat de la mutació H63D:** Només en 2 estudis de l'àrea mediterrània, el de Sampietro a Itàlia i el d'Enríquez de Salamanca a Espanya, s'observa un increment aïllat de la mutació H63D entre els pacients amb PCT.<sup>229</sup>

**3- Augment significatiu de les dues mutacions:** resultats descrits en estudis realitzats a Alemanya, França i Dinamarca.<sup>231,235,236,242,243,246,247</sup>

**4- Cap augment significatiu de les 2 mutacions estudiades:** En 3 grups de població (Japó, Bulgària i africans de Sudàfrica) no s'ha observat cap correlació entre les mutacions del gen HFE i la PCT.<sup>233,241,248</sup>

En general, la mutació C282Y és menys prevalent en els pacients amb PCT a l'àrea mediterrània que en els grups de població anglosaxons. Aquestes diferències serien paral·leles a les observades en l'hemocromatosi. Així, tots els pacients amb HH de Queensland, el 92% dels de Regne Unit i el 83% dels d'EUA són homozigots per la mutació C282Y, mentre que aquesta prevalença disminueix al 71% a França i al 61% a Itàlia.<sup>249</sup> Aquesta tendència s'observa també en la població general.

## **II- HIPÒTESI**

## HIPÒTESI

La PCT és una malaltia desencadenada per la interacció de múltiples factors que inclouen l'herència, l'alcohol, el VHC, els estrògens i alguns agents tòxics, entre d'altres encara en estudi. La sobrecàrrega fèrrica, de forma primària o secundària a d'altres factors de risc (com la infecció pel VHC), és un factor desencadenant de la PCT. En aquest context, considerem la hipòtesi de que la sobrecàrrega fèrrica observada en alguns pacients amb PCT pot estar associada amb les mutacions descrites en el gen de l'hemocromatosi (C282Y i H63D). Per tant, caldria esperar un augment de la prevalença d'aquestes mutacions en els individus amb PCT, així com una associació entre la presència d'aquestes mutacions i la sobrecàrrega de ferro. Si així es demostra, les mutacions C282Y i H63D del gen HFE haurien de ser considerades com a factors de risc de PCT. La freqüència d'aquestes mutacions i de la infecció pel VHC en estudis realitzats en altres països és variable. Per tant, seria interessant conèixer també la interrelació entre la freqüència d'aquestes mutacions i els altres factors de risc, especialment el VHC, en el desencadenament de la malaltia en el nostre àmbit geogràfic.

### **III- OBJECTIUS**

## **OBJECTIUS**

1. Establir les prevalences de les mutacions C282Y i H63D del gen HFE en pacients amb PCT esporàdica en el nostre ambient.
2. Determinar la relació entre les mutacions del gen HFE en pacients amb PCT esporàdica i la sobrecàrrega de ferro hepàtic.
3. Establir la relació entre la prevalença d'aquestes mutacions i la infecció pel VHC.

## **IV- MATERIAL I MÈTODES**



## **MATERIAL**

### **1. GRUP CASOS**

#### **Criteris d'inclusió:**

S'ha inclòs de forma retrospectiva en l'estudi 99 pacients amb PCT esporàdica, diagnosticada per criteris clínics i bioquímics a la Unitat de Porfíries de l'Hospital Clínic i Provincial de Barcelona en els últims 10 anys. Tots els pacients havien presentat un quadre de fotosensibilitat cutània amb aparició d'ampolles, fragilitat cutània, quists de milium i hipertricosi malar.

Els criteris de diagnòstic bioquímic de PCT són: 1) increment de la uro i la heptacarboxilporfirina en orina 2) presència d'isocoprofirina en femta.

#### **Criteris d'exclusió:**

S'han exclòs els pacients amb història familiar de PCT.

#### **Variables clíniques enregistrades:**

S'han enregistrat els següents paràmetres clínics dels pacients del grup casos:

- Gènere.
- Edat d'inici de la malaltia.
- Ingesta d'alcohol: s'ha subdividit en dos grups: Ingesta als últims 5 anys de més de 80 gr/dia o menys de 80 gr/dia.
- Exposició laboral a hexaclorobenzè
- Presa d'anticonceptius orals
- Nivells de transaminases

**Paràmetres serològics:**

Serologia virus hepatitis C

Serologia virus hepatitis B

Serologia virus immunodeficiència humana.

**Estudi histopatològic en biòpsies hepàtiques:**

S'ha determinat el grau d'inflamació hepàtica en 63 pacients als que s'havia practicat prèviament una biòpsia hepàtica.

**Paràmetres de sobrecàrrega fèrrica:**

S'ha pogut mesurar el ferro hepàtic en 41 dels 63 pacients als que s'havia practicat prèviament una biòpsia hepàtica.

S'han determinat els nivells de ferritina en 71 pacients amb PCT.

S'ha realitzat un anàlisi semiquantitatiu (+, ++, +++) del ferro hepàtic mitjançant la tinció de Pearls en un total de 55 pacients.

Tots els paràmetres de sobrecàrrega fèrrica s'han determinat abans de que els pacients rebessin cap tractament per a la PCT.

**2. GRUP CONTROL****Criteris d'inclusió:**

Es van seleccionar mostres de 126 individus d'un pool del laboratori d'Immunologia de l'Hospital Clínic. 76 d'aquests individus són subjectes sans (grup A) i 50 pacients tenen infecció crònica pel VHC (grup B).

## **MÈTODES**

### **1. DETERMINACIÓ DE PORFIRINES**

L'estudi de les porfirines s'ha realitzat al laboratori de porfíries del Servei de Dermatologia de l'Hospital Clínic de Barcelona. S'ha practicat anàlisi quantitatiu de les porfirines totals en orina mitjançant espectrofluorimetria.<sup>251</sup> El valor normal de referència de les porfirines totals en orina de 24 hs en el nostre laboratori és el següent: < 300 µg/24 hs.

Els perfils de les porfirines urinàries i fecals s'han analitzat mitjançant cromatografia líquida a alta pressió (HPLC).

### **2. SEROLOGIES VÍRIQUES**

Les serologies per a VHB,VHC i VIH han estat estudiades al laboratori de bioquímica de l'Hospital Clínic mitjançant el test de Abbott Laboratories, North Chicago, IL.

### **3. PARÀMETRES DE SOBRECÀRREGA FÈRRICA**

La concentració de ferro hepàtic s'ha determinat mitjançant espectrofotometria d'absorció atòmica. Els resultats s'expressen en µg/100mg de teixit hepàtic (pes en sec). El rang normal és de 17-140 µg/100mg en teixit sec.

La ferritina (en ng/l; valors normals: 20-300 en barons; 15-200 en dones) ha estat mesurada per mètodes estandaritzats.

#### **4. ANÀLISI GENÈTIC DEL GEN HFE:**

En tots els individus dels grups casos i controls s'ha realitzat l'estudi de les mutacions dels exons 2 i 4 del gen HFE.

Les mutacions en el gen HFE han estat estudiades mitjançant l'amplificació dels exons 2 i 4, la posterior digestió amb enzims de restricció (*Mbo I* i *Rsa I* respectivament) i finalment visualització amb gel d'acrilamida (PAGE 15%). Els passos seguits han estat els següents:

- 1- Extracció del ADN a partir de sang total i precipitació de l'ADN.
- 2- Amplificació dels exons 2 i 4.
- 3- Digestió de l'ADN amb endonucleases de restricció mitjançant tècnica de *restriction fragment length polymorphism* (RFLP).

##### **4.1. Extracció i precipitació d'ADN:**

S'ha realitzat extracció d'ADN de mostres congelades de sang total utilitzant el QIAamp Blood Kit (Qiagen, Santa Clarita, CA)

##### Mètode de precipitació de l'ADN:

- 1- Afegir etanol al 100% (2,5 vegades del volum inicial d'ADN) i acetat sòdic 3M (1/10 del volum inicial d'ADN)

- 2- Deixar a  $-20^{\circ}\text{C}$  tota la nit
- 3- Centrifugar 15' a  $4^{\circ}\text{C}$  (13000 rpm)
- 4- Retirar el sobrenadant
- 5- Afegir 500  $\mu\text{l}$  d'etanol al 70% i centrifugar 15' a  $4^{\circ}\text{C}$  (13000 rpm)
- 6- Secar al menys 2 hores
- 7- Diluir en  $\text{H}_2\text{O}$  fins a 50  $\mu\text{l}$
- 8- Es mesura la concentració d'ADN amb l'espectrofotòmetre, que mesura l'absorbència (A260). La concentració ( $[ ]$ ) es calcula segons la següent fórmula:  
 $[ ] = A_{260} \times \text{dilució} \times 50$

## 4.2. Amplificació per PCR dels exons 2 i 4:

### Material:

- 1-10 x tampó (MgCl<sub>2</sub>) x 5 µl
- 2- dNTPs (10mM) x 2 µl
- 3- Primer sense 10 µM x 1µl  
Primer Antisense 10 µM x 1µl
- 4- ADN 200 ng x X µl
- 5- Aigua destilada fins a 49,5 µl
- 6- Taq x 0,5 µ
- 7- Termociclador Applied Biosystem

### Mètodes:

Els cebadors emprats per a l'amplificació dels exons 2 i 4 del gen HFE, que inclouen la mutació H63D i la C282Y respectivament, han estat els següents:

#### *Amplificació de l'exó 4:*

Sense:

5' TGCCTCCTTTGGTGAAGGTGACAC 3'

Antisense:

5' CAGATCCTCATCTCACTGCC 3'

Amb aquest cebadors s'obté un fragment de l'exó 4, que inclou el locus de la mutació C282Y, de 366 parells de bases.

*Exó 2:*

Sense:

5' TGTTGCTCTGTCTCCAGGTT 3'

Antisense:

5' ACCCTTGCTGTGGTTGTGAT 3'.

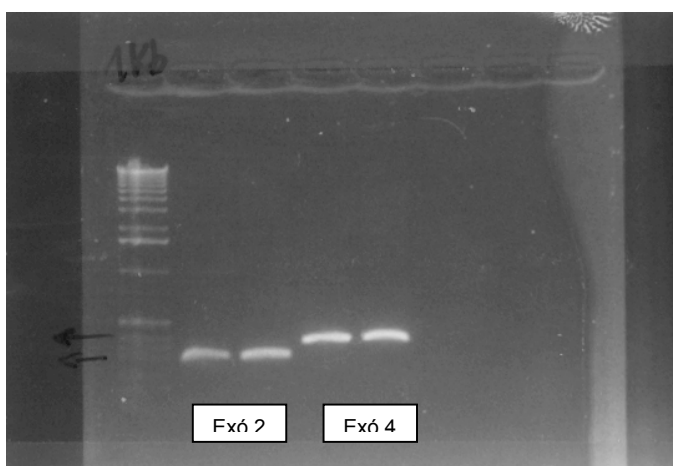
Amb aquest cebadors s'obté un fragment de l'exó 2, que inclou el locus de la mutació H63D, de 283 parells de bases.

Les condicions per a córrer la PCR han estat les següents (Termociclador Applied Biosystem; programa COR1):

10' 96° (20" 96° 45" 65° 3' 72°) x 5, (20" 96° 50" 60° 3' 72°) x 20, (20" 96° 1" 55° 3' 72°) x 9, 10' 72°.

Es comprova la presència dels exons 2 i 4 mitjançant electroforesi en gel d'acrilamida al 15% (PAGE 15%) amb una alicuota de 5 µl d'ADN (**Figura 4**). El control de pes molecular utilitzat és el  $\phi$ x174.

**Figura 4:**



#### **4.3. Digestió de l'ADN amb endonucleases de restricció mitjançant tècnica de *restriction fragment length polymorphism* (RFLP):**

Donat que es coneixia la localització de les mutacions C282Y i H63D s'ha utilitzat la tècnica de RFLP que permet digerir un locus determinat mitjançant la utilització d'uns enzims de restricció que donen lloc a fragments d'ADN d'un tamany concret.

S'ha realitzat una digestió per endonucleases de restricció mitjançant *Rsa I* per a l'exó 4 del gen HFE i *Mbo I* per a l'exó 2 del mateix gen. Els fragments resultants han estat separats mitjançant electroforesi en un gel d'acrilamida al 15% i visualitzats amb tinció de bromur d'etidi.

##### Material:

- 1- Mostra d'ADN diluïda en aigua
- 2- Tampó (buffer) 10 x d'endonucleases de restricció
- 3- Endonucleassa de restricció (*Rsa I* o *Mbo I*)
- 4- 10x loading buffer

##### Mètodes:

- 1- En un tub de centrifuga s'afegeix:
  - X µl d'ADN (2 µg d'ADN en H<sub>2</sub>O).
  - 2 µl de buffer 10x.
  - 0,5 µl d'enzim de restricció
  - Fins a 20 µl d'H<sub>2</sub>O.

S'incuba 1 hora a 37°C.



3- S'atura la reacció afegint 5  $\mu$ l de loading buffer 10x.

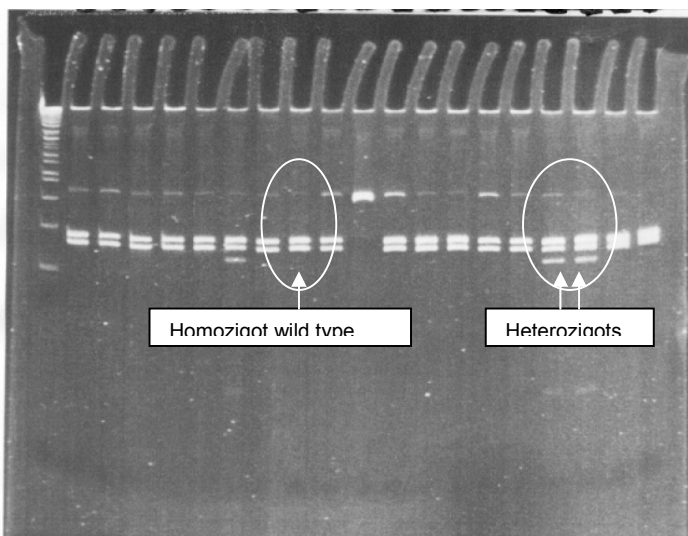
4- Es realitza electroforesi en un gel d'agarosa al 2% i es visualitzen amb tinció de bromur d'etidi.

Interpretació dels resultats:

1- *Mutació C282Y:*

Patrons d'electroforesi obtinguts corresponents als diferents patrons de restricció (**Figura 5**):

**Figura 5**



**Mostra 1:** Homozigot wild type (salvatge). El wild type conté una diana de restricció. Per tant s'obtenen dues bandes d'electroforesi, de 195 i 171 pb. La mutació no és present en cap dels dos al·lels. No presenten per tant cap nova diana de restricció per *Rsa*.

**Mostra 2:** Homozigot per la mutació. Els dos al·lels presenten la mutació. La nova diana de restricció per l'enzim *Rsa* I és present en les dues còpies d'ADN. S'obtenen tres bandes d'electroforesi de 195, 142 i 29 nucleòtids.

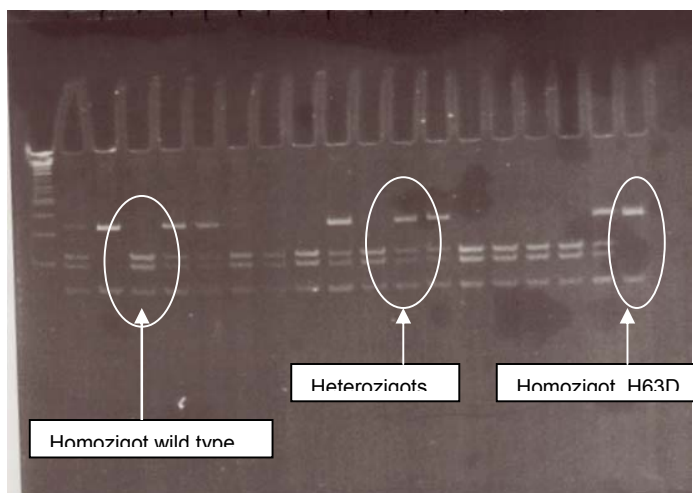
**Mostra 3:** Heterozigot per la mutació. La mutació és present en una de les dues còpies d'ADN, apareixent una nova diana de restricció. Observarem la suma de bandes de la

mostra 1 i 2, per tant, hauran d'aparèixer 4 bandes: 195, 171, 142 i 29 nt (aquesta última no s'observa en PAGE al 15%).

## 2- Mutació H63D:

Poden obtenir-se els següents 3 patrons (**Figura 6**):

**Figura 6**



**Mostra 1:** Homozigot wt (salvatge). S'obtenen 3 bandes d'electroforesi de 124, 99 i 60 pb. La mostra no presenta la mutació i per tant no s'elimina la diana de restricció per l'enzim *Mbo I*.

**Mostra 2:** Homozigot per la mutació. La mutació H63D és present en les dues còpies d'ADN. Les bandes d'electroforesi corresponen als fragments de restricció de 223 i 60 nt.

**Mostra 3:** Heterozigot per la mutació. Presenta 4 bandes d'electroforesi de 223, 124, 99 i 60 pb. Una còpia d'ADN presenta la mutació i per tant l'eliminació d'una diana de

restricció. L'altra còpia d'ADN no presenta la mutació i es conserva la diana per l'enzim de restricció.

**Anàlisi estadístic:**

La significació estadística de les diferències entre freqüències ha estat establerta mitjançant la prova de  $X^2$  (chi-quadrat) de Pearson. La relació entre la ingesta d'alcohol i les mutacions del gen HFE també ha estat estudiada amb aquest paràmetre estadístic.

El ferro ha estat analitzat mitjançant la prova no paramètrica de Mann-Whitney per a comparar mitjanes.

## **V- RESULTATS**

## ESTUDI DESCRIPTIU

### Gènere:

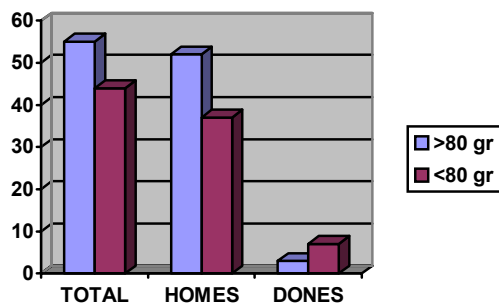
El 89.9% dels pacients (89/99) són barons i el 10.1% dones (10/99).

### Edat:

La mitjana d'edat en el moment del diagnòstic de PCT és de 57.9 anys (58 en homes; 57.8 en dones).

### Enolisme:

El 55.6% dels pacients (55/99) tenen una història d'enolisme de més de 80 grs/dia en els últims 5 anys, enfront el 44.4% (44/99), amb història de menys de 80 grs/dia. L'enolisme és més prevalent entre els barons (52/89; 58,4%) que entre les dones (3/10; 30%)



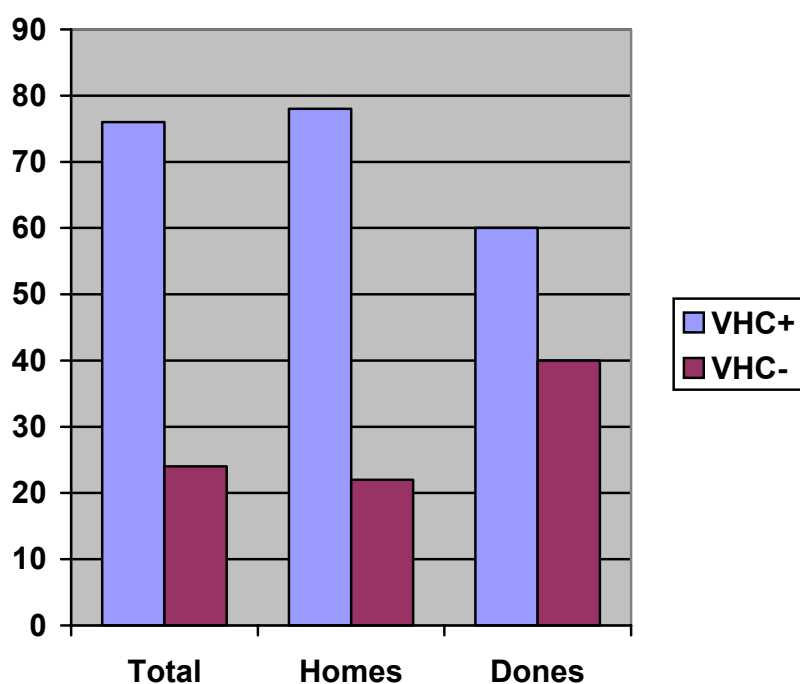


**Transaminases:**

Les mitges pels valors de GOT, GPT i GGT han estat de 45.5, 62.3 i 78.8 respectivament en els pacients amb PCT.

**Infecció crònica per VHC:**

75 pacients (75.7%) presenten infecció crònica pel VHC. La prevalença d'aquesta infecció és més alta entre els pacients barons (69/89; 77,5%) que entre les dones (6/10;60%)

**Infecció per VHB:**

Cap dels pacients presenta infecció crònica activa pel VHB encara que 6 presenten marcadors serològics d'aquest virus (Anticossos anti-HBc positius).

**Infecció per VIH:**

Només s'ha observat un pacient amb infecció pel VIH. Aquest pacient presentava infecció crònica per VHC concomitantment.

**Estudi histopatològic en biòpsies hepàtiques:**

El resultat de l'estudi s'han classificat en tres grups, segons el diagnòstic histopatològic. En el primer grup s'inclouen aquelles biòpsies que mostraven mínimes alteracions sense inflamació (siderosi, necrosi de cèl·lules hepàtiques aïllades), en el segon grup s'inclouen les biòpsies amb criteris de diagnòstic d'hepatitis crònica i en el tercer aquelles en les que el grau de fibrosi i distorsió de l'arquitectura hepàtica permet el diagnòstic de cirrosi.

	<b>n</b>
Canvis mínims	3
Hepatitis crònica	57
Cirrosi hepàtica	3

## ANÀLISI DE LES MUTACIONS DEL GEN HFE

### 1. PREVALENCIA DE LES MUTACIONS DEL GEN HFE:

S'ha trobat alguna de les mutacions del gen HFE (C282Y y/o H63D) en 62 dels 99 pacients amb PCT (62,6%) (**Taula 2**). La freqüència de les mutacions és lleugerament superior a la del grup control (45,2%). Destaca la important presència d'aquestes mutacions en el grup control, representatiu de la població general.

**TAULA 2. Freqüència de mutacions (C282Y, H63D) en PCT i grup control**

	PCT	CONTROLS	p
<b>Individus sense mutacions (Tipus salvatges)</b>	37/99 (37,3%)	69/126 ( 54,76%)	
<b>Individus amb mutacions</b>	62/99 (62,6%)	57/126 (45,2%)	<b>0.009</b>

### Freqüència al·lèlica de les mutacions del gen HFE:

Les freqüències al·lèliques de les mutacions C282Y i H63D en pacients amb PCT en relació als controls es descriuen seguidament i es mostren a la **Taula 3**.

#### Freqüència al·lèlica de la mutació C282Y :

La mutació C282Y es troba augmentada en els cromosomes dels pacients amb PCT (8%) respecte als del grup control (3.2%) (**p<0.02**).

Freqüència al·lèlica de la mutació H63D:

Aquesta mutació es detecta en un 31.8% dels cromosomes dels pacients amb PCT i en un 22.6% dels controls (**p 0.119**).

**TAULA 3. Freqüència al·lèlica de les mutacions HFE en pacients amb PCT i en controls**

AL.LELS	PCT (n=99)	CONTROLS (n=126)	p
<b>C282Y</b>	16/198 (8%)	7/252 (3,2%)	<b>.02</b>
<b>H63D</b>	63/198 (31,8%)	57/252 (22,6%)	.119

**Genotipus:**

La distribució dels diferents genotipus HFE en pacients amb PCT i en controls es descriu seguidament i es mostra a la **Taula 4**.

Mutació C282Y :

La freqüència de la mutació C282Y en heterozigosi simple en individus afectes de PCT és del 9.09%, augmentada respecte als controls (3.96%; **p 0.034**). No s'ha detectat cap homozigot per aquesta mutació entre el pacients amb PCT esporàdica.

Mutació H63D:

Aquesta mutació es detecta en heterozigosi simple en un 36.3% dels pacients amb PCT i en un 34.9% dels controls, diferència no significativa (p: **0.1635**). Es detecta un 10.1% d'homozigots entre els pacients amb PCT respecte al 3.96% dels controls, diferència significativa (**p 0.018**).

Dobles heterozigots (C282Y/H63D):

El 7% dels pacients amb PCT i el 2.4% dels controls són dobles heterozigots, diferència significativa (**p 0.028**).

**TAULA 4. Freqüència dels genotips HFE en pacients amb PCT i controls**

GENOTIPUS	PCT	CONTROLS	p
<b>Tipus salvatges (C282/H63)</b>	37/99 (37.3%)	69/126 (54.76%)	
<b>C282/C282Y</b>	9/99 (9.09%)	5/126 (3.96%)	p 0.0336
<b>C282Y/C282Y</b>	0	0	
<b>H63/H63D</b>	36/99 (36.3%)	44/126 (34.9%)	p 0.162
<b>H63D/H63D</b>	10/99 (10.1%)	5/126 (3.96%)	p 0.0182
<b>C282Y/H63D</b>	7/99 (7.07%)	3/126 (2.38%)	p 0.028

En resum, els genotips que inclouen la mutació C282Y en heterozigosi, la H63D en homozigosi i els dobles heterozigots C282Y/H63D estan augmentats en els pacients amb PCT respecte al grup control.

## 2. RELACIÓ ENTRE LA PRESENCIA DE MUTACIONS DEL GEN HFE I LA SOBRECÀRREGA FÈRRICA EN ELS PACIENTS AMB PCT

Com a paràmetre dels dipòsits de ferro del organisme s'ha estudiat la concentració de ferritina sèrica. Els dipòsits de ferro al fetge s'han estimat de manera semiquantitativa amb la tinció de Pearls a les mostres histopatològiques de teixit hepàtic i de manera quantitativa amb la determinació de la concentració de ferro hepàtic en els cilindres de teixit hepàtic obtingut per punció - biòpsia. Aquests paràmetres no han estat estudiats en el grup control. Es comparen els diferents paràmetres dels dipòsits de ferro en relació a la presència o absència de mutacions del gen HFE.

### 2.1. Ferritina

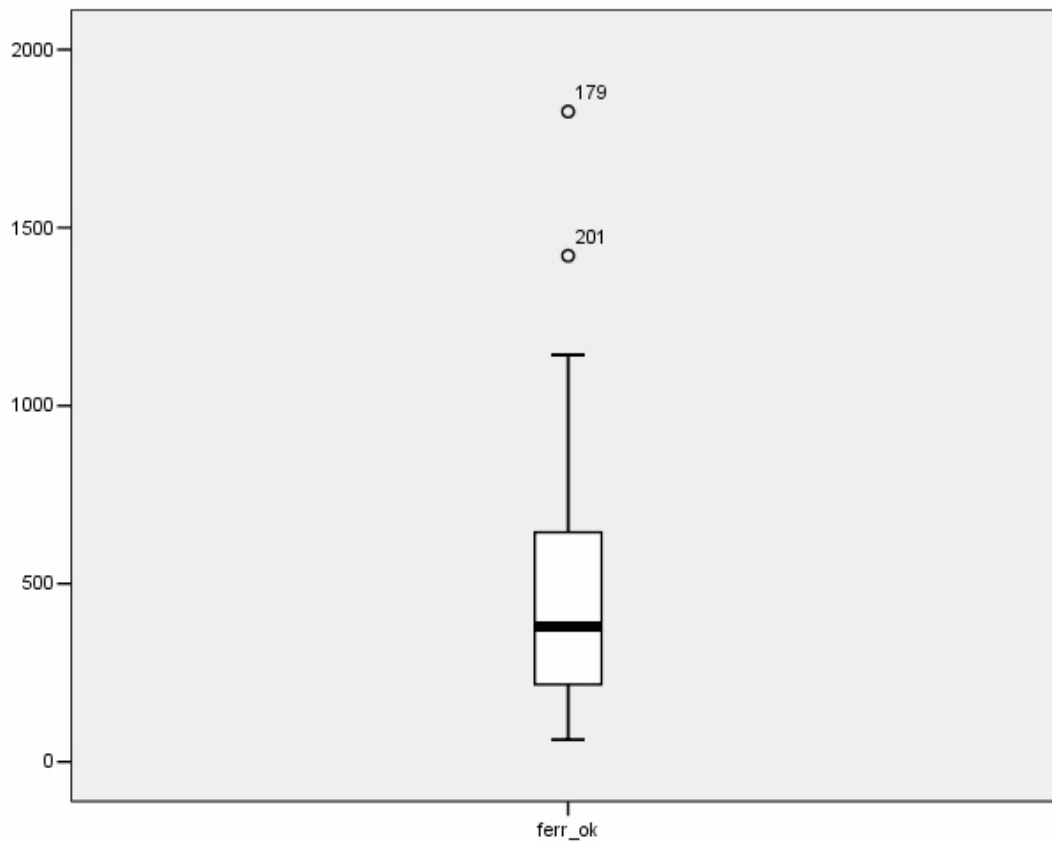
La mitjana de les ferritines en el conjunt dels pacients amb PCT (n=71) és de 280 ng/L; Ferritina P50 [p25-p75]:280 [210-650] (**Figura 7**)

En els pacients amb la mutació C282Y en heterozigosi la concentració de ferritina es troba augmentada respecte a la normalitat (N=4; mitjana 702). Aquesta concentració també es troba augmentada en els pacients heterozigots simples per C282Y respecte als tipus salvatges (N=28; mitjana 336; **p 0.054**).

Es detecta un augment de la ferritina per sobre dels valors de la normalitat entre els pacients homozigots per H63D (N=6; mitjana 625), i dobles heterozigots (N=6; mitjana 537; p 0.2). En canvi, els heterozigots simples per H63D (N=27; mitjana 320; p 0.47) presenten nivells propers al rang alt de normalitat de la ferritina. Quan es comparen amb les ferritines del grup tipus salvatge (N=28; mitjana 336) cap de les mitjanes de ferritina dels diferents genotipus que inclouen la mutació H63D han estat significativament

elevades. Tanmateix, s'ha de destacar que el nombre d'individus de les mostres han estat escassos.

**Figura 7**

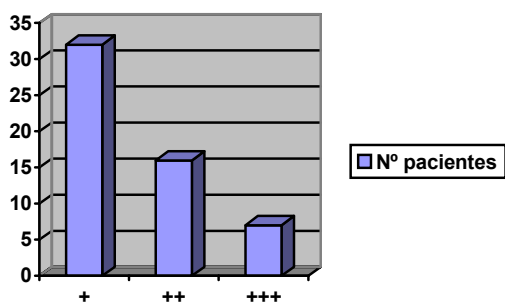


No s'han observat diferències en els valors de ferritina entre el grup d'infectats per VHC (mitjana 427,9; n=54) i els no infectats (mitjana 553.4; n=17) (p 0.17)

## 2.2. Ferro hepàtic

### Anàlisi semiquantitatiu del ferro hepàtic:

L'estudi anatomopatològic de les biòpsies hepàtiques amb tinció de Pearls en 55 de les 63 biòpsies hepàtiques ha permès obtenir els següents resultats: L'anàlisi qualitatiu es va estimar en 1+(+) en trenta-dos pacients, 2+(++) en 16 pacients i 3+(+++) en 7. El màxim dipòsit (+++) s'ha observat en el 12,7%. S'han observat dipòsits moderats/elevats en el 41,8% dels pacients als que se'ls va obtenir una tinció de Pearls de la biòpsia hepàtica.



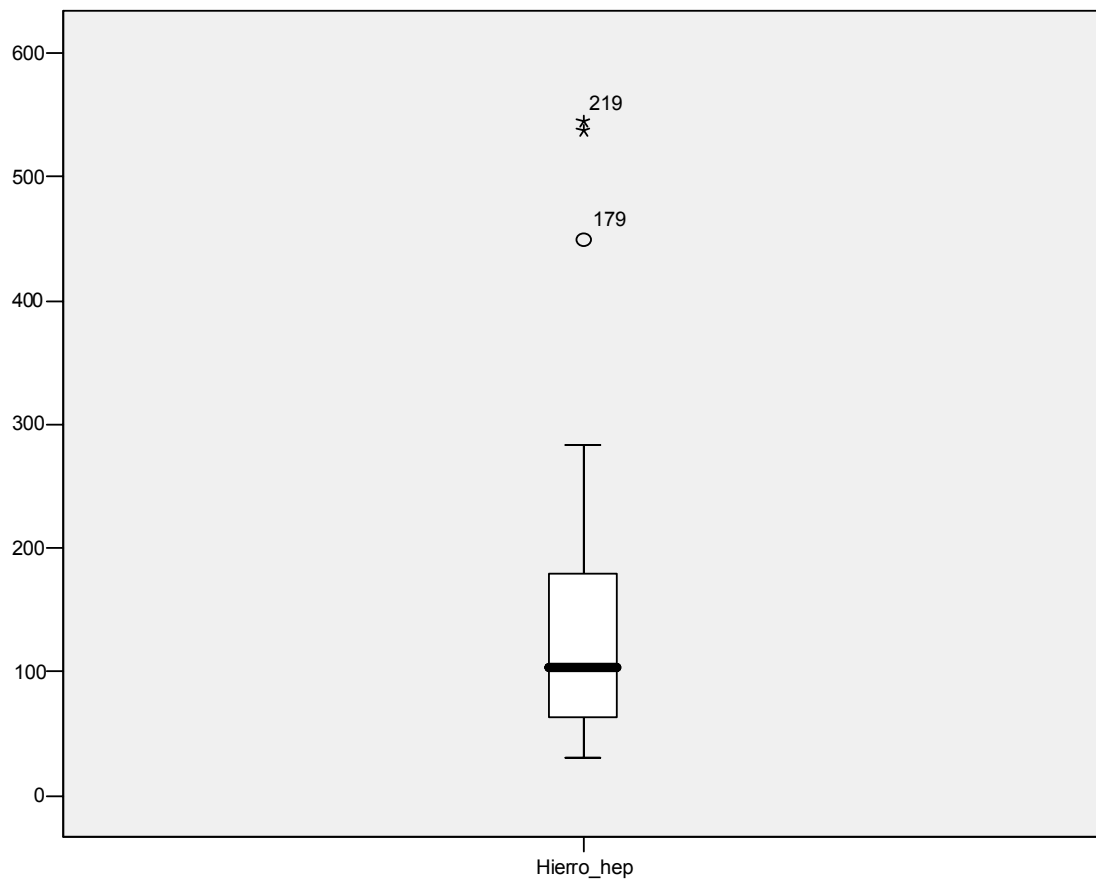
### Concentració de ferro hepàtic (pes en sec):

La concentració de ferro hepàtic s'ha pogut determinar en 41 dels 63 pacients en els que s'havia realitzat biòpsia hepàtica.

La mitjana del ferro hepàtic en el total de pacients amb PCT és de 103,8  $\mu\text{g}/100\text{mg}$ ; P50 [P25-P75]: 103,8 [63,5-195,5] (**Figura 8**).

### **Figura 8:**





Quinze de 41 pacients (36.5%) presenten valors de ferro hepàtic per sobre de la normalitat (valors normals:17-140  $\mu\text{g}/100\text{mg}$ ).

No s'ha observat correlació entre els nivells de ferro hepàtic i els nivells de ferritina (Coeficient de correlació 0.150; Significació 0.406).

No s'han observat diferències significatives en els valors de ferro hepàtic (pes sec) dels pacients amb PCT amb infecció pel VHC (mitjana 141.5; n=32) i aquells sense la infecció (mitjana 167.7; n=9) (p 0.59).

### Ferro hepàtic i mutacions del gen HFE

S'ha observat una tendència envers l'augment del ferro hepàtic (pes en sec) en els pacients amb el genotipus C282Y heterozigot simple (N=5; mitjana 243 µg/100mg) respecte als tipus salvatge (N=14; mitjana 95.7 µg/100mg; p 0.21). Malgrat el baix nombre de pacients que presentaven el genotipus C282Y heterozigot simple, s'observa que la mitjana dels valors de ferro hepàtic en aquest grup de pacients ha estat de més del doble que la mitjana dels pacients sense cap mutació.

No s'ha observat un augment significatiu del ferro hepàtic entre els pacients heterozigots per la mutació H63D (N=15; mitjana 97.8 µg/100mg; p 0.47), homozigots per H63D (N=5; mitjana 69,4 µg/100mg; p 0.50) ni heterozigots dobles (N=2; mitjana 229,4 µg/100mg; p 0.2), respecte als tipus salvatge (N=14; mitjana 95.7 µg/100mg). No obstant això, és de destacar que els heterozigots dobles, amb la mutació C282Y, presenten una mitjana destacadament superior al grup dels tipus salvatge i de portadors de la mutació H63D, que no sobrepassen els 100µg/100mg en cap cas.

Quan es comparen els nivells de ferro hepàtic (pes en sec) de tots els pacients amb la mutació C282Y (incloent aquells heterozigots i els dobles heterozigots amb la mutació H63D) (n=7; mitjana 243) amb els dels pacients sense aquesta mutació (n=34; mitjana 84.7) s'observa un augment significatiu en el primer grup (**p 0.019**).

Per tant, es considera que hi ha una relació entre l'increment del dipòsit de ferro al fetge i la presència de la mutació C282Y.

### 3. RELACIÓ ENTRE LA PREVALENCIA DE LES MUTACIONS DEL GEN HFE I LA INFECCIÓ PEL VHC

#### 3.1. Estudi de la independència de les mutacions del gen HFE i la infecció per VHC:

Les freqüències dels diversos genotipus pel gen HFE són similars en els individus sense infecció pel VHC i en aquells amb infecció (s'inclouen casos i controls en ambdós grups) –p 0.599-. Això indica que la presència d'infecció pel VHC no s'associa amb una major o menor prevalença d'alguna de les mutacions del HFE. Es pot concloure doncs que VHC i mutacions del HFE són factors independents.

*Prevalença de les mutacions del gen HFE segons la presència/absència d'infecció per VHC*

		vhc		Total	
			Negatiu	Positiu	
<b>Gen</b>	<b>Tipus salvatge</b>	Recompte	51	55	106
		% de gen	48,1%	51,9%	100,0%
	<b>Hetero simple C282Y</b>	Recompte	6	8	14
		% de gen	42,9%	57,1%	100,0%
	<b>Hetero simple H63D</b>	Recompte	34	46	80
		% de gen	42,5%	57,5%	100,0%
	<b>doble hetero C282Y/H63D</b>	Recompte	5	5	10
		% de gen	50,0%	50,0%	100,0%
	<b>Homozigot H63D</b>	Recompte	4	11	15
		% de gen	26,7%	73,3%	100,0%
<b>Total</b>	<b>Recompte</b>	100	125	225	
	<b>% de gen</b>	44,4%	55,6%	100,0%	

p 0.599

### **3.2. Anàlisi per grups:**

A la **Taula 5** es mostren les freqüències dels diferents genotipus HFE segons la presència d'infecció per VHC, tant en el grup de pacients amb PCT com en el grup control. Es comparen aquestes freqüències entre els diferents grups.

## TAULA 5.

**Freqüència dels genotipus HFE en pacients amb PCT i controls en relació a la infecció per VHC.**

GENOTIPUS	PCT		Controls	
	HCV- (n=24)	HCV+ (n=75)	VHC - (n=76)	VHC + (n=50)
C282/H63	11/24 (45.8%)	26/75(34.6%)	40/76 (52.6%)	29/50(58%)
C282Y	4/24 (16.6%) <sup>a,b</sup>	5/75 (6.6%) <sup>c</sup>	2/76 (2.6%) <sup>d</sup>	3/50 (6%)
C282Y/C282Y	0	0	0	0
H63D	5/24 (20.8%) <sup>e,f</sup>	31/75 (41.3%) <sup>g</sup>	29/76(38.1%) <sup>h</sup>	15/50(30%)
H63D/H63D	2/24 (8.3%) <sup>i,j</sup>	8/75 (10.6%) <sup>k</sup>	2/76 (2.6%) <sup>l</sup>	3/50 (6%)
C282Y/H63D	2/24 (8.3 %) <sup>m,n</sup>	5/75 (6.6%) <sup>ñ</sup>	3/76 (3.9%) <sup>o</sup>	0/50

**a:  $p=0.0116$ ; compara el grup PCT/VHC- amb el grup control VHC -**

**b:  $p=0.138$ ; compara el grup PCT/VHC- amb el grup PCT/VHC+.**

**c:  $p=0.88$ ; compara grup PCT/VHC+ amb grup control VHC +.**

**d:  $p=0.34$ ; compara ambdós grups controls**

**e:  $p=0.118$ ; compara grup PCT/VHC- amb grup control VHC -.**

**f:  $p=0.069$ ; compara grup PCT/VHC- amb grup PCT/VHC+.**

**g:  $p=0.198$ ; compara grup PCT/VHC+ amb control VHC +.**

**h:  $p=0.35$  ;compara ambdós grups controls**

**i:  $p=0.21$ ; compara grup PCT/VHC- amb control VHC-.**

**j:  $p=0.74$ ; compara grup PCT/VHC- amb grup PCT/VHC+.**

**k:  $p=0.36$ ; compara grup PCT/VHC+ amb control VHC+.**

**l:  $p=0.34$ ; compara ambdós grups controls**

**m:  $p=0.39$ ; compara grup PCT/VHC- amb control VHC-**

**n:  $p=0.78$ ; compara grup PCT/VHC- amb grup PCT/VHC+.**

**ñ:  $p=0.062$ ; compara grup PCT/VHC+ amb control VHC+.**

**o:  $p=0.155$ ; compara ambdós grups controls**

### 3.2.1. Grup Control

No existeixen diferències significatives en les prevalències de les mutacions del HFE entre el grup control amb infecció pel VHC i el grup control sense la infecció. Aquesta observació és vàlida quan s'analitzen aïlladament els diferents genotipus: heterozigots simples C282Y (p 0.34), heterozigots simples H63D (p 0.35), homozigots H63D (p 0.34) i dobles heterozigots (p 0.155).

### 3.2.2. Relació casos-controls

#### **3.2.2.1. Mutació C282Y:**

##### Heterozigots simples C282Y:

S'observa un augment de la freqüència de la mutació C282Y en heterozigosi entre els pacients amb PCT que no tenen infecció per VHC respecte als pacients amb PCT infectats (16.6% i 6.6% respectivament) encara que no es demostra significació estadística (p 0.138).

Quan es compara la prevalença de la mutació C282Y en pacients amb PCT no infectats pel VHC (16.6%%) amb la del grup A -controls no infectats- (2.6%) s'observa un augment significatiu en el primer grup (**p 0.0116**).

Pel contrari, no s'han observat diferències significatives quan es compara el grup de pacients amb PCT infectats (6.6%) amb el grup B de controls infectats (6%).

##### Dobles heterozigots C282Y/H63D:

No existeixen diferències en la prevalença de dobles heterozigots respecte als controls en funció de la presència o absència d'infecció pel VHC.

Heterozigots simples C282Y i dobles heterozigots C282Y/H63D:

El 25% dels pacients amb PCT (6/24) sense la infecció pel VHC presenten la mutació C282Y en la forma heterozigota simple o doble heterozigota C282Y/H63D (**Taula 6**). Aquest percentatge es troba significativament augmentat respecte al grup control sense la infecció amb els mateixos genotipus (6,5%; 5/76) –**p 0.012**–.

Pel contrari, no existeixen diferències entre el grup de pacients amb PCT infectats (13,4%; 10/75) i el grup control d'individus infectats (6%; 3/50) –p 0,188– (**Taula 7**).

**Taula 6.**

***Prevalences de la mutació C282Y (Heterozigots simples o dobles heterozigots) en pacients amb PCT no infectats pel VHC i en controls no infectats***

	<b>PCT no infectats</b>	<b>Controls no infectats</b>
<b>C282Y/H63 ó C282Y/H63D</b>	6 (25%)	5 (6.5%)
<b>C282</b>	18 (75%)	71 (93.5%)
	24 (100%)	76 (100%)

**P 0.012**



**Taula 7.**

**Prevalences de la mutació C282Y (Heterozigots simples o dobles heterozigots) en pacients amb PCT infectats pel VHC i en controls infectats**

	<b>PCT infectats</b>	<b>Controls infectats</b>
<b>C282Y/H63 o C282Y/H63D</b>	10 (13.4%)	3 (6%)
<b>C282</b>	65 (86.7%)	47 (94%)
	75 (100%)	50 (100%)

p 0,188

### **3.2.2.2. Mutació H63D:**

#### Heterozigosi simple:

La mutació H63D en heterozigosi és més freqüent en pacients amb PCT amb infecció per VHC (41.3%) que en pacients amb PCT VHC negatius (20.8%) sense arribar a tenir significació estadística (p 0.069).

No hi ha diferències en les prevalences de la mutació H63D en pacients amb la infecció pel VHC (41.3%) respecte al grup control B (amb infecció) (30%; p 0.198) ni entre els pacients amb PCT sense VHC (20.8%) i el grup control A (sense infecció) (38.1%;p 0.118).

Es manté doncs una manca d'associació entre la PCT i la mutació H63D quan es desglossa segons la presència d'infecció a l'igual que el que s'havia observat prèviament quan no consideràvem aquesta infecció (**Taula 4**).

Homozigosi:

La prevalença de la mutació H63D en homozigosi és similar en el grup de pacients amb PCT infectats per VHC i en el dels pacients no infectats (10.6% i 8.3% respectivament) (p 0.74).

Encara que s'observa una major prevalença de la mutació H63D en homozigosi en pacients amb PCT infectats pel VHC (10.6%) respecte als controls infectats (6%), aquesta no té significació estadística (p 0.36).

No s'observa un augment de la prevalença de la mutació H63D en homozigosi en els pacients amb PCT sense infecció per VHC (8.3%) respecte al grup control A, sense infecció (2.6%) (p 0.21).

Heterozigots simples H63D, homozigots H63D/H63D i dobles heterozigots H63D/C282Y:

Quan es considera el conjunt de pacients que tenen la mutació H63D en qualsevol dels genotipus possibles (heterozigot simple, doble heterozigot i homozigots) s'observa que la prevalença d'aquesta mutació està augmentada en els pacients amb PCT amb infecció pel VHC (58.7%) respecte al grup control amb la infecció (36%; **p 0.01**) -**Taula 8**-. Pel contrari, no s'observa un augment de la prevalença d'aquesta mutació en els pacients amb PCT sense la infecció (37.5%) respecte al grup control sense la infecció (44.7%; p 0.07) -**Taula 9**-.

Taula 8.

**Prevalences de la mutació H63D (Heterozigots simples, dobles heterozigots i homozigots) en pacients amb PCT infectats pel VHC i en controls infectats**

	PCT infectats	Controls infectats
H63D/C282, H63D/C282Y o H63D/H63D	44 (58,6%)	18 (36%)
H63	31 (41,3%)	32(64%)
	75 (100%)	50 (100%)

p 0,01

Taula 9.

**Prevalences de la mutació H63D (Heterozigots simples, dobles heterozigots i homozigots) en pacients amb PCT no infectats pel VHC i en controls no infectats**

	PCT no infectats	Controls no infectats
H63D/C282, H63D/C282Y o H63D/H63D	9 (37,5%)	34 (44,7%)
H63	15 (62,5%)	42 (55,3%)
	24 (100%)	76 (100%)

p 0,07

Com a resum d'aquestes comparacions, es demostra una tendència a l'augment de freqüència de la mutació C282Y en pacients amb PCT sense infecció per VHC. Aquesta freqüència es estadísticament significativa quan es compara el grup de pacients amb PCT VHC negatius amb el grup control sense infecció. Es a dir, en absència d'infecció pel VHC, la mutació C282Y és més freqüent en la PCT que en els controls. (p 0,0116).

Pel contrari, la mutació H63D té tendència a ser més freqüent en pacients amb PCT i infecció vírica.

#### 4. RELACIÓ ENTRE LA INGESTA D'ALCOHOL I EL GENOTIPUS HFE

No s'han observat diferències en les prevalències de cap de les dues mutacions del gen HFE en relació a la ingesta d'alcohol major o menor de 80 grs/dia (p 0.7), podent-se considerar doncs aquests dos com a factors independents.

		enol			
			< 80 gr	>= 80 gr	Total
<b>gen</b>	<b>Tipus salvatge</b>	Recompte	14	23	37
		% de gen	37,8%	62,2%	100,0%
	<b>Hetero simple 4</b>	Recompte	4	5	9
		% de gen	44,4%	55,6%	100,0%
	<b>Hetero simple 2</b>	Recompte	15	21	36
		% de gen	41,7%	58,3%	100,0%
	<b>doble hetero</b>	Recompte	4	3	7
		% de gen	57,1%	42,9%	100,0%
	<b>Homo2</b>	Recompte	6	4	10
		% de gen	60,0%	40,0%	100,0%
<b>Total</b>	<b>Recompte</b>	43	56	99	
	<b>% de gen</b>	43,4%	56,6%	100,0%	

p 0.7

#### 5. ANÀLISI MULTIVARIAT

S'ha realitzat un anàlisi multivariat en el que s'ha analitzat la relació entre la infecció pel VHC i les mutacions C282Y i la H63D respecte a la PCT. No s'ha inclòs la sobrecàrrega de ferro ni l'enolisme donat que per a realitzar aquest anàlisi s'han d' incloure els resultats del grup control.

L'anàlisi multivariat ha mostrat una associació significativa entre la malaltia PCT i la infecció pel VHC; Odds ratio:4.75 (I.C. 95%:2.65-8.5)-**p<0.05**-.

S'ha observat també una tendència envers una associació entre la mutació C282Y i la PCT encara que no arriba a la significació estadística ( $p > 0.08$ ). La manca d'una associació significativa observada en l'anàlisi multivariat pot ser deguda a la baixa potència de la mutació C282Y com a factor etiopatogènic de PCT junt amb un nombre insuficient d'individus inclosos a l'estudi.

Per altra banda; no s'ha observat una relació entre la mutació H63D i la PCT.

## **VI- DISCUSIÓ**

El principal objectiu del present treball ha estat determinar la prevalença de les mutacions del gen HFE en pacients espanyols amb PCT esporàdica. L'existència d'una sobrecàrrega de ferro en els pacients amb PCT<sup>4,13-17</sup> i la troballa concomitant de PCT i HH en alguns casos ja havien suggerit la relació entre aquestes dues malalties.<sup>223,224</sup> La descripció recent del gen HFE i les mutacions associades amb l'HH han permès endegar una sèrie de treballs dirigits a establir la relació entre aquestes mutacions i l'aparició de PCT.

## **1. PREVALENÇA DE LES MUTACIONS DEL GEN HFE A LA POBLACIÓ GENERAL**

La prevalença de la mutació C282Y a la població general s'observa en heterozigosi en un 7-10% dels individus i en homozigosi en un 0.5-1% dels mateixos en la majoria d'estudis nordeuropeus.<sup>119,120,227</sup> A Itàlia s'han descrit prevalences menors d'aquesta mutació en els grups controls, sobre el 1.5% en heterozigosi i el 0% en homozigosi.<sup>114,229</sup> A Espanya s'ha observat la mutació C282Y en heterozigosi en el 4-5.5% (dobles heterozigots 0-1.4%) i en homozigosi en un 0-0,2%, valors similars als estudis anglosaxons.<sup>112,232</sup> En el present treball hem observat la mutació C282Y en heterozigosi en el 6,34% (dobles heterozigots 2,38%) dels controls. Cap dels individus d'aquest grup era homozigot per la mutació C282Y.

La prevalença en població general de la mutació H63D és marcadament més elevada que la C282Y. Aquesta prevalença es troba propera al 25% en heterozigosi i al 3-5% en homozigosi en població general nordeuropea.<sup>227,252</sup> A Itàlia s'ha descrit una prevalença de

la mutació H63D del 22% en heterozigosi i del 1.5% en homozigosi.<sup>229</sup> A Espanya aquesta prevalença en heterozigosi és del 28-35% i en homozigosi al voltant del 4%.<sup>112,232</sup> En el present estudi la prevalença observada en el grup control ha estat del 37,2% en heterozigosi (2.38% dobles heterozigots) i del 3.96% en homozigosi.

#### Prevalença de les mutacions HFE en població general

Mutació	Nord d'Europa <small>227,252</small>	Itàlia <sup>229</sup>	Espanya <sup>112,232</sup>	Present estudi
<b>C282Y</b>				
Heterozigots	7-10 %	1,5 %	4.5-5 %	6,44 %
Homozigots	0,5 %	0		0
<b>H63D</b>				
Heterozigots	25 %	22 %	28-35 %	37,2 %
Homocigots	3-5 %	1,5 %	4 %	3,96 %

En resum, la prevalença de la mutació C282Y en població general a Espanya és similar a l'obtinguda en estudis anglosaxons. Cal destacar que a Itàlia aquesta prevalença és sensiblement menor.<sup>229</sup> Pel contrari, la prevalença de la mutació H63D en població general és lleugerament superior en els treballs realitzats a Espanya, incloent-hi el present estudi, respecte als obtinguts en poblacions anglosaxones i a Itàlia.



## 2. PREVALENCIA DEL LES MUTACIONES DEL GEN HFE EN PACIENTS AMB PCT

Nombrosos treballs que han adreçat l'estudi de les mutacions del gen HFE destaquen l'augment de la seva prevalença en pacients amb PCT.<sup>46,49,67,227,230,231,234-236,240,242-244,246,247</sup>

Tanmateix, el valor d'aquesta prevalença en pacients amb PCT oscil·la de forma significativa segons l'àrea geogràfica estudiada.

La majoria d'estudis anglosaxons descriuen un augment significatiu de la mutació C282Y en pacients amb PCT amb prevalences que oscil·len entre el 33 i el 44% (heterozigots més homozigots) -**Taula 1**-.<sup>227,49,46,67,235,243</sup>

Fora de l'àmbit anglosaxó, en estudis amb poblacions d'origen ètnic més proper al nostre (França, Argentina, Brasil), les prevalences de la mutació C282Y en heterozigosi oscil·len entre el 11.4% i el 19%.<sup>230,234,236,238,242</sup> Amb resultats similars als darrers, a Espanya s'ha descrit la mutació C282Y en heterozigosi en el 13% dels pacients amb PCT esporàdica, sense que s'observés un augment significatiu respecte als controls.<sup>232</sup>

En el present estudi s'observa un augment significatiu de la mutació C282Y en heterozigosi (16%), tant simple (9%) com composta amb H63D (7%), en els pacients amb PCT esporàdica. Els pacients inclosos en l'estudi, d'origen espanyol, presentaven la mutació C282Y amb una freqüència 2,3 vegades superior a la població general.

De forma paral·lela a la menor prevalença de la mutació C282Y en heterozigosi que hem observat respecte a la descrita en nombrosos estudis previs, destaca l'absència de pacients homozigots pel C282Y entre els nostres pacients. La prevalença d'homozigots és

del 15-20% en alguns estudis, però cal destacar que són també treballs realitzats en poblacions anglosaxones.<sup>46,49,67,227,231,235</sup>

A diferència del que prèviament havien descrit Roberts i cols., Sampietro observà a l'any 1998 una relació entre la mutació H63D i la PCT, així com una manca d'associació amb la mutació C282Y, en pacients amb PCT del Nord d'Itàlia.<sup>229</sup> Autors alemanys i australians han observat que la prevalença de les mutacions H63D (en heterozigosi) i C282Y (en heterozigosi i homozigosi) estan augmentades en pacients amb PCT.<sup>235,243,247</sup> Tannapfel i cols. atribueixen l'augment significatiu de la mutació H63D entre els pacients porfírics a la baixa prevalença de la infecció per VHC (15%) entre els mateixos.<sup>235</sup> La baixa prevalença de la infecció per VHC en la població de pacients amb PCT augmentaria la importància d'altres factors de risc com les mutacions del HFE. Hift i cols, en un estudi sudafricà, han descrit l'associació aïllada entre la mutació H63D en heterozigosi i la PCT.<sup>241</sup> De forma similar al descrit per Tannapfel, l'índex d'infecció per VHC entre els pacients amb PCT a Sudàfrica és significativament baix (9.4%).<sup>241</sup> Aparentment aquests resultats podrien semblar contradictoris amb els nostres, donat que hem observat un aparent sinergisme entre la mutació H63D i la infecció per VHC com a inductors de PCT. Tanmateix, Tannapfel i Hift no avaluen directament la relació entre les mutacions del HFE i la infecció pel VHC. S'especula una dissociació entre la mutació H63D i la infecció pel VHC sense que s'analitzi individualment la presència concomitant d'aquests factors de risc.

En el present estudi no s'observa un augment significatiu de la mutació H63D en heterozigosi entre els pacients amb PCT. Tanmateix, sí s'observa un augment significatiu de la mutació H63D en homozigosi (10.1%). El genotipus H63D en homozigosi ha estat relacionat amb la PCT en nombrosos estudis, amb prevalences que oscil·len entre el 3.4% i el 22%.<sup>231,232,236,242,246</sup>

La troballa entre els nostres pacients d'un augment significatiu dels homozigots per H63D i dels dobles heterozigots suggereix que no només la mutació de l'exó 4 (C282Y) té rellevància en la inducció de PCT. Així doncs, encara que inicialment diversos autors atribuïren a la mutació H63D un paper menor en la inducció d'HH,<sup>111,113,145</sup> aquesta mutació podria també afavorir el desenvolupament de porfíria, especialment en homozigosi i en els dobles heterozigots C282Y/H63D.<sup>146</sup>

Malgrat que el comportament de la proteïna mutada H63D observat en models experimentals és aparentment normal, alguns autors defensen la seva participació en la inducció d'HH,<sup>139,140</sup> especialment com a factor afavoridor de l'expressió fenotípica en situacions susceptibles de sobrecàrrega fèrrica com l'alcoholisme, trastorns metabòlics o heterozigositat C282Y.<sup>140-143</sup> També s'ha descrit l'augment de la saturació de transferrina i de ferro hepàtic en individus heterozigots per a aquesta mutació.<sup>144</sup>

En conclusió, el nostre treball atorga un paper rellevant a la mutació C282Y en la inducció de PCT. L'associació entre mutació C282Y i PCT concorda amb allò observat per nombrosos autors anglosaxons. Per tant, i de forma similar al que s'ha descrit en l'hemocromatosi al nostre entorn,<sup>122,123</sup> la mutació C282Y jugaria un paper més important que la H63D en la inducció de PCT. Això contrasta amb el descrit en algunes poblacions teòricament més properes genèticament a la nostra.<sup>229</sup> En aquest sentit, s'ha de destacar que la freqüència al·lèlica de la mutació C282Y en població general a Espanya (3%)<sup>122</sup> també és més similar a la dels anglosaxons (2,8-3,2%)<sup>107,116</sup> que a la descrita en estudis italians (1%).<sup>114</sup>

És a dir, en relació a les mutacions del gen HFE, la població espanyola es genèticament més propera a la població anglosaxona que a la italiana. Tanmateix, malgrat que en el

present estudi hem observat una associació entre la mutació C282Y i la PCT, la prevalença d'aquesta associació entre nosaltres és sensiblement inferior a la descrita en poblacions nordeuropees. Les diferències geogràfiques observades en els valors d'aquestes prevalences en individus amb PCT poden ser degudes a diferents factors.

### 3. RELACIÓ MUTACIONS-VHC

A diferència de l'hemocromatosi, la PCT és una malaltia plurietiològica i la prevalença dels seus factors inductors com l'alcoholisme o la infecció pel VHC és variable segons l'àrea geogràfica a estudi. Al nostre entorn s'observen prevalences altes d'infecció per VHC, tant en la població general<sup>39</sup> com en pacients amb PCT,<sup>41</sup> que coincideixen amb prevalences relativament baixes de les mutacions del gen HFE. Les prevalences dels diferents genotipus que hem trobat associats a la PCT, els heterozigots per C282Y, els homozigots H63D i els dobles heterozigots C282Y/H63D, d'un 16.2%, 10.1% i 7% respectivament, són sensiblement inferiors a la prevalença de la infecció pel VHC en els pacients amb PCT del nostre entorn (75%). Aquesta tendència és l'oposada a la que es descriu en països del Nord d'Europa, en els que la prevalença de la mutació del gen HFE en pacients amb PCT és més elevada i la de la infecció pel VHC més reduïda que al nostre medi. En resum, s'observa una tendència oposada en la freqüència de la infecció per VHC i la presència de mutacions del HFE en pacients amb PTC.

La rellevant influència que exerceix la infecció pel VHC en la inducció de PCT en el nostre entorn dificulta l'estudi de la influència d'altres desencadenants menys rellevants de porfíria, obligant a augmentar el nombre d'individus dels grups estudiats. Els resultats de l'anàlisi multivariat del present estudi indiquen que el VHC està significativament associat amb la PCT. Mitjançant aquest anàlisi s'observa també una tendència envers l'augment de la mutació C282Y entre els pacients amb PCT, sense arribar però a la significació estadística, probablement perquè el nombre de la mostra es insuficient per demostrar aquesta possible associació. Per altra banda, quan descartem els individus infectats pel virus, el percentatge de pacients heterozigots simples per la mutació C282Y augmenta del 9.09% al 16.6%. De forma similar, el percentatge que s'obté quan s'agrupa el conjunt de

pacients amb la mutació C282Y (heterozigots simples i dobles heterozigots) sense infecció per VHC, assoleix el 24.9%. Aquesta xifra és propera a la que observen els autors d'àrees geogràfiques on les prevalences d'infecció pel VHC són molt baixes (**Taula 1**).<sup>235,241</sup> En resum, el 25% dels pacients amb PCT sense infecció pel VHC que han estat inclosos en aquest estudi tenen la mutació C282Y, xifra significativament augmentada respecte a l'observada en pacients amb PCT amb la infecció (13.2%) i en controls sans (6.5%). Aquests resultats suggereixen que la mutació C282Y juga un paper rellevant com a desencadenant de PCT, especialment en el grup de pacients no infectats pel VHC.

Per altra banda, de forma oposada a allò observat amb la mutació C282Y, la mutació H63D és més prevalent entre els pacients amb PCT infectats pel VHC que entre els controls infectats. Quan s'analitzen els pacients sense la infecció, la mutació H63D no està augmentada en els pacients amb PCT respecte als controls. Cal suposar doncs que la mutació H63D i la infecció pel VHC interactuen i/o tenen un paper sinèrgic en la inducció de PCT. Així com la mutació C282Y es mostra com un factor suficient i independent del VHC en la inducció de PCT, la mutació H63D requereix l'associació amb aquesta infecció o d'altres coinductors.<sup>229</sup>

Egger i cols. observen que ambdues mutacions C282Y i H63D són més freqüents en el grup de pacients amb PCT sense infecció, sense arribar però a tenir significació estadística.<sup>239</sup> Per altra banda, altres autors que han adreçat la relació entre les mutacions del HFE i la infecció pel VHC no observen diferències significatives en les prevalences de les mutacions del HFE segons l'estatus d'aquesta infecció.<sup>46,242</sup>

#### 4. RELACIÓ MUTACIONS-FERRO

L'HH i la PCT tenen en comú la presència d'una sobrecàrrega de ferro, més accentuada en la primera. Així com les manifestacions de l'HH solen aparèixer a partir de la tercera dècada de la vida, la PCT esporàdica també sol presentar-se de forma tardana. Aquesta coincidència en l'edat d'aparició de les manifestacions clíniques en l'HH i la PCT podria ser deguda a la necessitat d'acumular una determinada concentració de ferro per a que es manifestin els símptomes. En l'hemocromatosi la sobrecàrrega de ferro es relaciona directament amb les mutacions en el gen HFE en pràcticament el 100% dels casos.

L'observació d'un augment en la prevalença de les mutacions del gen HFE en pacients amb PCT suggereix que aquestes mutacions poden ser les responsables de l'augment de ferro en determinats casos, i aquest increment un dels desencadenants de la malaltia. Tanmateix, altres reconeguts factors desencadenants de PCT, com la infecció per VHC i l'alcoholisme freqüentment estan associats també amb un increment del ferro hepàtic. En el present treball hem observat evidències directes i indirectes que impliquen les mutacions del gen HFE en l'augment de ferro en pacients amb PCT.

En primer lloc, no hem observat en el present estudi una associació entre la ingesta d'alcohol o la infecció per VHC i l'augment del ferro en pacients amb PCT. Malgrat que la infecció per VHC, per si sola, s'ha associat amb un increment sèric del ferro,<sup>28-30,186</sup> nombrosos autors també destaquen la manca d'un augment significatiu del ferro hepàtic en pacients infectats.<sup>184-186</sup>

Per altra banda hem observat que la mutació C282Y s'associa amb un augment del ferro, mesurat amb els paràmetres ferritina i ferro hepàtic. No hem observat una associació entre la mutació H63D i la sobrecàrrega de ferro.

La quantificació de Fe al fetge és el paràmetre més fidedigne per a establir els dipòsits en aquest òrgan. L'ús habitual d'aquesta tècnica està limitat per la necessitat de fer una biòpsia hepàtica, motiu pel qual habitualment es valoren rutinàriament paràmetres sèrics com ara la saturació de la transferrina i la ferritina.

La ferritina sèrica reflecteix habitualment de forma exacta els dipòsits tissulars de ferro, però hi ha situacions, com ara la inflamació aguda del fetge i algunes neoplàsies o limfomes, en les quals la ferritina alliberada pels teixits afectats pot falsejar els resultats de les reserves fèrriques reals de l'organisme.<sup>145</sup>

S'han realitzat nombrosos estudis poblacionals, amb milers d'individus, amb la finalitat d'establir el fenotipus de sobrecàrrega fèrrica associat als diferents genotipus de les dues principals mutacions del gen HFE. El genotipus més freqüentment associat amb un augment dels paràmetres de sobrecàrrega de ferro sèrics és el C282Y/C282Y en homozigosi.<sup>119,131,172</sup> Tanmateix, la sobrecàrrega en aquest genotipus és moderada i només en un percentatge molt reduït d'individus s'associa amb clínica d'hemocromatosi.<sup>120,133,134</sup> La resta de genotipus que inclouen la mutació C282Y i/o la H63D s'han associat amb una tendència menor envers la sobrecàrrega de ferro en pacients amb PCT.<sup>119,141,143,147,172-178</sup>

Nombrosos estudis en l'hemocromatosi han adreçat la relació entre els nivells de ferro hepàtic i la presència de mutacions del gen HFE. La mutació C282Y en homozigosi,



freqüent en pacients amb HH és la que dóna lloc a un major augment del ferro hepàtic.<sup>179-</sup>

<sup>182</sup> Excloent els homozigots C282Y/C282Y, el genotipus que més àmpliament s'ha associat amb la sobrecàrrega de ferro hepàtic en pacients amb hemocromatosi ha estat el C282Y/H63D doble heterozigot.<sup>182,183,252</sup>

Els estudis publicats sobre les mutacions del gen HFE en pacients amb PCT que tenen també en consideració els paràmetres fèrrics com la siderèmia, la saturació de la transferrina o la ferritina no han descrit un augment significatiu dels mateixos entre els pacients heterozigots simples per cap de les dues principals mutacions del gen HFE.<sup>229,230,234-236,242-244,249</sup> Tanmateix, alguns treballs sí han descrit un augment significatiu de la saturació de la transferrina i de la ferritina en aquells pacients amb la mutació C282Y en homozigosi, de forma similar al que s'observa en pacients amb hemocromatosi.<sup>67,243</sup> També s'ha descrit un augment significatiu de la saturació de la transferrina entre els pacients dobles heterozigots C282Y/H63D.<sup>237</sup>

El conjunt dels nostres pacients amb PCT presentaven un augment dels nivells de ferritina respecte als valors normals de referència. S'observa també que el genotipus C282Y heterozigot simple s'associa amb uns nivells més elevats de ferritina que els tipus salvatges. Aquesta associació no s'observa quan s'analitza la mutació H63D.

Dos treballs realitzats amb pacients amb PCT avaluen de forma quantitativa els nivells de ferro hepàtic i els correlacionen amb les mutacions del HFE de forma similar al present estudi. Ambdós treballs recullen un nombre reduït de biòpsies i obtenen resultats oposats. Sampietro no observa un augment del ferro hepàtic associat a les mutacions del HFE<sup>229</sup> i Bulaj sí descriu un augment significatiu però només en aquells pacients homozigots per C282Y.<sup>67</sup>

En el present treball es va realitzar una biòpsia hepàtica pel diagnòstic i avaluació de l'hepatopatia en 63 pacients amb PCT. Aquest material ha estat estudiat posteriorment per a mesurar els dipòsits de Fe hepàtic (de forma semiquantitativa en 55 pacients i quantitativa en 41 pacients) i comparar-los amb la presència de mutacions del gen HFE.

Hem observat un augment del ferro hepàtic quan considerem el conjunt de pacients amb la mutació C282Y (heterozigots simples o dobles heterozigots), respecte als pacients sense la mateixa. Hem observat també una tendència, malgrat no ser significativa, envers l'augment de ferro hepàtic en els heterozigots C282Y simples (considerats aïlladament) respecte als tipus salvatges.

L'observació en el present estudi d'un augment significatiu del genotipus C282Y en heterozigosi entre els pacients amb PCT, així com dels nivells de ferritina i de ferro hepàtic en aquest genotipus suggereix que aquesta mutació en heterozigosi exerceix una influència en la inducció de PCT mitjançant l'elevació del ferro sistèmic i hepàtic. Es pot hipotetitzar que la mutació C282Y en heterozigosi dona lloc a una alteració del metabolisme del ferro que causa un cúmul d'espècies tòxiques de ferro amb capacitat per promoure la inactivació de la URO-D, l'acumulació dels metabòlits que són substrat d'aquest enzim i, secundàriament, la inducció de les manifestacions clíniques de la PCT. En una malaltia metabòlica plurietiològica com és la PCT, uns nivells no excessivament elevats de ferro podrien ser suficients per a induir, de forma concomitant amb d'altres factors de risc que actuarien per altres mecanismes, les manifestacions clíniques d'aquesta malaltia.

## **5. IMPLICACIONS CLÍNiques DE L'ESTUDI DE LES MUTACIONS DEL GEN HFE EN PACIENTS AMB PCT ESPORÀDICA**

La prevalença de la PCT (1/10.000 habitants) és molt inferior a la de l'hemocromatosi (1/300 habitants) i la rellevància de les mutacions del gen HFE com a inductores és menor en la primera. A més, la PCT dona lloc a una clínica cutània força característica que acostuma a alertar sobre la malaltia, a diferència de l'hemocromatosi, que pot ocasionar greus alteracions sistèmiques abans no donen simptomatologia clínica. Per tant, a diferència de l'interès que pot tenir per detectar pacients amb HH en la població general, no es planteja la utilitat del cribatge de les mutacions del gen HFE amb la intenció de detectar pacients amb PCT.<sup>253</sup>

Tanmateix, l'estudi de les mutacions del gen HFE en pacients amb PCT té un marcat interès clínic per nombrosos motius:

- 1- L'existència de possibles patrons de resposta terapèutica segons el genotipus del gen HFE.***
- 2- Possible existència d'un risc de cirrosi i hepatocarcinoma augmentat en pacients amb PCT i mutacions del gen HFE.***
- 3- Permet discriminar els pacients amb PCT i HH concomitant.***

### **1- Resposta terapèutica segons genotipus HFE:**

Donat que les mutacions del gen HFE afavoreixen l'aparició de PCT mitjançant la inducció d'un increment de ferro pot hipotetitzar-se que la presència d'aquestes mutacions poden modificar o condicionar la resposta terapèutica de la PCT als dos tractaments clàssics habitualment utilitzats: els antipal·lúdics i les sagnies. Així, la detecció d'aquestes

mutacions pot convertir-se en una eina de gran utilitat per al dermatòleg amb la finalitat d'establir el tractament més adequat. Encara que els estudis al respecte són encara limitats, la presència de mutacions del gen HFE sembla associar-se amb una menor resposta a la cloroquina i una major resposta a les sagnies.

Stolzel i cols. avaluen la resposta clínica, bioquímica i dels paràmetres de ferro dels pacients amb PCT que reben tractament amb cloroquina en relació amb la presència de mutacions del gen HFE.<sup>243</sup> Destaca l'absència de millora dels paràmetres de sobrecàrrega de ferro després d'aquest tractament en els pacients amb les mutacions del gen del HFE, tant en heterozigosi com en homozigosi. En definitiva, aquests autors recomanen les flebotomies com a tractament d'elecció en els pacients amb mutacions del gen HFE.

Un àrea d'investigació que s'haurà d'adreçar en el futur consisteix en l'estudi de la influència que poden exercir les mutacions del HFE en la resposta al tractament de la infecció per VHC amb interferó i ribavirina en pacients afectes de PCT. Malgrat que encara no s'ha resolt de forma definitiva si el tractament de la infecció pel VHC és d'utilitat en el control dels pacients amb PCT en general, probablement caldrà considerar aquells pacients que a més presentin les mutacions del HFE com a candidats especialment tributaris de rebre aquest tractament.

## **2- Prevenció de cirrosi i hepatocarcinoma en pacients amb PCT i mutacions del gen HFE:**

L'augment de la freqüència d'hepatocarcinoma a la PCT s'havia relacionat inicialment amb la pròpia alteració metabòlica de les porfirines. Després de que s'observés una elevada prevalença d'hepatopatia crònica per VHC en aquests pacients es va suggerir que el risc de neoplàsia podria ésser degut a la presència d'aquesta infecció. Tanmateix,

cal destacar que en una altra porfíria no relacionada amb aquesta infecció vírica, la Porfíria Aguda Intermitent, també s'ha demostrat un augment en la incidència d'hepatocarcinoma. Per tant, al paper de la infecció pel VHC en la possible inducció d'un hepatocarcinoma s'hauria d'afegir el de la malaltia porfírica per se, així com el de l'increment dels dipòsits de ferro.

A això cal afegir que les mutacions del gen HFE s'han relacionat amb un major risc de patir hepatopatia cirròtica<sup>187,192,193</sup> i hepatocarcinoma, probablement mitjançant la inducció d'un augment del ferro. Aquesta tendència és especialment elevada quan aquestes mutacions s'associen amb d'altres factors inductors de cirrosi hepàtica com l'enolisme i la infecció pel VHC.<sup>192,194,254</sup> L'estudi d'aquestes mutacions de forma rutinària en els pacients amb PCT pot tenir doncs gran interès amb la finalitat d'establir poblacions de risc i monitoritzar amb proves complementàries adequades i amb una determinada periodicitat aquesta subpoblació de pacients.

Els algoritmes de seguiment més adequats per al despistatge d'hepatocarcinoma segons el genotipatge del HFE hauran de ser objecte d'estudi en el futur, tant en pacients amb PCT com en pacients amb hemocromatosi, malaltia que ha estat objecte d'un major estudi que la PCT i en la que encara no s'ha arribat a un consens.<sup>255,256</sup>

Actualment es recomana realitzar una ecografia (amb una sensibilitat en la detecció d'hepatocarcinomes del 80-90%) i sol·licitar l'alfa-fetoproteïna en sèrum un cop a l'any en pacients amb PCT.<sup>7</sup> És previsible que aquells pacients amb PCT que també siguin portadors de la infecció pel VHC, així com d'alguna de les mutacions del gen HH, hagin de ser avaluats amb intervals més curts. Aquesta avaluació periòdica hauria d'incloure no

només les exploracions complementàries esmentades sinó també l'estricta control del metabolisme de les porfirines i el consell i tractament sobre l'abús d'alcohol.

### **3- Detecció de pacients amb PCT i HH:**

La incidència d'hemocromatosi entre els pacients amb PCT és més elevada que a la població general. Les manifestacions clíniques d'HH són tardanes i quan apareixen poden traduir una afectació sistèmica greu i irreversible. En individus amb la presència concomitant d'HH i PCT, les manifestacions cutànies de PCT sovint són els primers signes que permeten endegar el diagnòstic d'ambdues malalties. L'estudi rutinari de les mutacions del gen HFE, disponible en nombrosos laboratoris, permetrà detectar amb facilitat els individus amb PCT que són homozigots per C282Y.

Entre les proves complementàries que han tingut un paper rellevant en l'estudi dels pacients amb sobrecàrrega de ferro cal destacar el paper de la biòpsia hepàtica. Durant molt temps aquesta eina ha permès, gràcies a la detecció d'una sèrie de patrons histològics i a la mesura del ferro hepàtic, establir el diagnòstic d'HH. Amb l'estudi de les mutacions del gen HFE, que actualment es pot realitzar d'una forma pràcticament rutinària, els criteris per a indicar una biòpsia hepàtica es modifiquen. Aquells pacients joves amb sobrecàrrega sèrica de ferro, sense alteracions bioquímiques dels paràmetres hepàtics i amb genotipus del gen HFE suggestius d'HH, probablement no siguin tributaris d'una biòpsia hepàtica, donat que el diagnòstic ja s'ha obtingut per altres mètodes. La biòpsia hepàtica tindria sentit en pacients d'edat avançada amb aquests mateixos criteris bioquímics amb la finalitat d'identificar si s'ha desenvolupat una fibrosi hepàtica o una cirrosi, o bé, per confirmar la presència d'un hepatocarcinoma. Per altra banda, malgrat es trobin mutacions del gen HFE, la biòpsia hepàtica no està indicada quan el ferro sèric és normal, donat que la penetració d'aquestes mutacions és baixa.

## **VII- CONCLUSIONS**

## **PREVALENCES DE LES MUTACIONS DEL GEN HFE EN PACIENTS AMB PCT ESPORÀDICA**

- S'han trobat mutacions del gen de l'HH (la C282Y o la H63D) en el 62,6% dels pacients amb PCT estudiats, amb un freqüència significativament superior a la freqüència d'aquestes mutacions en la població general, del 45,2%.

- Existeixen diferències entre les freqüències de les mutacions del gen del HFE que hem observat en la nostra població de pacients amb PCT i les descrites en porfírics d'altres àrees geogràfiques. La freqüència de les mutacions del gen HFE en la nostra població és inferior a la descrita en països anglosaxons i superior a l'observada en població italiana.

- La freqüència al·lèlica de la mutació C282Y està augmentada en els pacients amb PCT esporàdica respecte a la població general. La mutació C282Y en heterozigosi és més prevalent entre els pacients amb PCT esporàdica que en la població general (2,3 vegades superior). La freqüència dels dobles heterozigots C282Y/H63D també està augmentada en els pacients amb PCT esporàdica.

- La freqüència al·lèlica de la mutació H63D no està augmentada en els pacients amb PCT esporàdica. La mutació H63D en homozigosi, que no en heterozigosi, és més prevalent entre els pacients amb PCT esporàdica que en els controls.



## **MUTACIONS DEL GEN HFE I INFECCIÓ PEL VHC**

- La freqüència de la mutació C282Y és més elevada entre els pacients amb PCT sense infecció per VHC que entre els controls sense la infecció. Pel contrari, la freqüència de la mutació C282Y no és més elevada entre els pacients que sí tenen la infecció pel VHC que entre els controls infectats. Per tant, la mutació C282Y és un factor inductor de PCT que pot actuar de forma independent de la infecció pel VHC.

- La freqüència de la mutació H63D en els pacients amb PCT infectats per VHC és superior a la dels controls infectats. Per tant, la mutació H63D pot exercir un paper inductor de PCT de forma sinèrgica amb la infecció pel VHC.

## **MUTACIONS DEL GEN HFE I SOBRECÀRREGA DE FERRO**

- La concentració de ferro hepàtic i els nivells de ferritina estan augmentats entre els pacients amb la mutació C282Y respecte als tipus salvatges. Pel contrari, els nivells de ferro hepàtic i de ferritina no estan significativament augmentats entre els pacients amb PCT amb la mutació H63D.

## **IMPLICACIONS CLÍNiques**

Les mutacions del gen HFE estan relacionades amb la sobrecàrrega de ferro i per tant en el possible desenvolupament d'hepatopatia crònica i de carcinoma hepatocel·lular. D'altra

banda, el tractament amb flebotomies pot ser l'idoni en els pacients amb sobrecàrrega de ferro. Per tant, l'anàlisi de les mutacions del gen HFE s'ha d'incloure de forma sistemàtica en els protocols d'estudi dels pacients amb PCT.

## **VIII- ANNEXES**

## TAULES

**Taula 1. PREVALENÇA DE LES MUTACIONS C282Y, H63D i S65C EN PACIENTS AMB PCT ESPORÀDICA SEGONS ÀREA GEOGRÀFICA**

País	n	C282Y(en al menys 1 còpia)%	C282Y (homozigots)%	H63D (en al menys 1 còpia)%	H63D (en homozigosi)%	S65C	Prevalença VHC (%)	Referències
GB	41	44	17	32 (NS)	3 (NS)	-	?	Roberts <sup>13</sup>
Austràlia	27	44	20	44 (NS)	7 (NS)	-	25.9	Stuart <sup>16</sup>
USA	26	42	15	31(NS)	8 (NS)	-	56	Bonkovsky <sup>15</sup>
USA	87	41	19	22 (NS)	7 (NS)	-	59	Bulaj <sup>67</sup>
Nord Itàlia	68	3 (NS)	0 (NS)	49	7	-	?	Sampietro <sup>19</sup>
Sud Itàlia	50	14	2 (NS)	26 (NS)	2 (NS)	-	?	D'Amato <sup>230</sup>
França	36	19	0 (NS)	33 (NS)	14		56	Dereure <sup>236</sup>
França	56	30.2 (NC)	0	53.4	7.1		25	Skowron <sup>237</sup>
França	65	17.1	5.7	47.1 (NS)	7.7 (NS)	4.8 (NS)	28	Lamoril <sup>238</sup>
França	33	18.2	0	54.5 (NS)	3.4		57.6	Chiaverini <sup>31</sup>
Argentina	9	11	0	44 (NS)	22	-		Mendez <sup>246</sup>
Bulgària	48	2.1 (NS)	0	20.8 (NS)	0	-	?	Ivanova <sup>233</sup>
Dinamarca	42	35.7	14.3	28.4(?)	7	-	?	Christiansen <sup>231</sup>
Japó	20	0 (NS)	0 (NS)	5 (NS)	0 (NS)	-	?	Furuyama <sup>248</sup>
Alemanya	190	39	12	45	2		15	Tannapfel <sup>235</sup>
Alemanya	62	33	5 (NS)	42	0 (NS)		?	Stölzel <sup>243</sup>

<b>Espanya</b>								
-Esporàdica	69	17.3 (NS)	4.3 (NS)	50.6 (NS)	14.5		?	Enrriquez de
-Familiar	19	15.7 (NS)	0	31.5 (NS)	0 (NS)			Salamanca <sup>232</sup>
<b>Espanya</b>								
-Esporàdica	45	16 (NC)	D	41	11	D	77	Cruz-Rojo <sup>257</sup>
-Familiar	12	12	D	67	0	D		
<b>Sudàfrica</b>	34	26.4 (NS)	8.8 (NS)	38.2	0		9.4	Hift <sup>241</sup>
<b>Brasil</b>	23	17.4	0	30.4 (NS)	4.3 (NS)	-	65.2	Martinelli <sup>234</sup>
<b>Rep. Txeca</b>	71	21.2	4.3 (NS)				22	Malina <sup>240</sup>
<b>Austràlia</b>	13	46	15	25	0		25	McCrossin <sup>247</sup>
<b>Hongria</b>	50	16	6	36 (NS)	2 (NS)		44	Nagy <sup>244</sup>
<b>Suècia</b>	84	36	14	30.7	1.7		29	Rossmann <sup>245</sup>
<b>Catalunya (Espanya)</b>	<b>99</b>	<b>16.2</b>	<b>0</b>	<b>53.5 (NS)</b>	<b>10.1 (NS)</b>	<b>2.5</b>	<b>75.7</b>	<b>Estudi actual</b>

NS: no significatiu; SC: Sense controls; D: Valor no descrit

## FIGURES

## Figura 2: SEQÜÈNCIA DEL GEN HFE:

### ORIGIN

1 ggggacactg gatcacctag tgttcacaa gcaggtacct tctgctgtag gagagagaga  
 61 actaaagttc tgaagacct gttgctttc accaggaagt tttactgggc atctctgag  
 121 cctaggcaat agctgtaggg tgacttctgg agccatcccc gtttccccgc cccccaaaag  
 181 aagcggagat ttaacgggga cgtgcgccca gagctgggga aatgggcccg cgagccaggc  
 241 cggcgcttct cctctgatg ctttgcaga ccgcggtcct gcagggggcg tgctgcgtt  
 301 cacactctct gactacctc ttcattgggtg cctcagagca ggacctgggt ctttcttgt  
 361 ttgaagcttt gggctactg gatgaccagc tgttctgtt ctatgatc gagagtgcg  
 421 gtgtggagcc ccgaactcca tgggtttcca gtagaattc aagccagatg tgctgcagc  
 481 tgatcagag tctgaaaggg tgggatcaca tgttactgt tgacttctgg actattatgg  
 541 aaaacacaa ccacagcaag gagtcccaca cctgcaggt catctgggc tgtgaaatgc  
 601 aagaagacaa cagtaccgag ggctactgga agtacgggta tgatgggcag gaccacctg  
 661 aattctgcc tgacactc gattggagag cagcagaacc caggcctgg cccaccaagc  
 721 tggagtggga aaggcacaag attcgggcca ggcagaacag ggctacctg gagagggact  
 781 gccctgcaca gctgcagcag ttgctggagc tggggagagg tgtttggac caacaagtgc  
 841 ctctttgtg gaaggtgaca catcatgtga cctctcagt gaccactta cgggtcggg  
 901 ccttgaacta ctacccccag aacatcacca tgaagtggct gaaggataag cagccaatgg  
 961 atgccaagga gttcgaacct aaagacgtat tgcccaatgg gtaggggacc taccagggt  
 1021 ggataacctt ggctgtacc cctggggaag agcagagata tacgtgcccag gtggagcacc  
 1081 caggcctgga tcagcccctc atgtgatct gggagccctc accgtctggc accctagtca  
 1141 ttggagtcat cagtggaatt gctgttttg tctcatctt gttcattgga atttgttca  
 1201 taatattaag gaagaggcag ggttcaagag gagccatggg gactacgctc ttactgaac  
 1261 gtgagtgaca cgcagcctgc agactcactg tgggaaggag acaaaactag agactcaaag  
 1321 agggagtgca tttatgagct ctcatgttt caggagagag ttgaacctaa acatagaaat  
 1381 tgcctgacga actcctgat tttagcctc tctgtcatt tctcaaaaa gatttccca  
 1441 tttaggttc tgagtctctg catgccggtg atccctagct gtgacctc ccttggact  
 1501 gtctctcatg aacctcaagc tgactctaga ggcttcttc atttctccg tcacctcaga  
 1561 gacatacacc tatgtcatt catttctat ttttgaaga ggactcctta aatttggggg  
 1621 acttacatga ttcattttaa catctgagaa aagctttaa ccttgggacg tggctagtca  
 1681 taaccttacc agattttac acatgtatct atgcatttc tggacctgt caactttcc  
 1741 tttgaatcct ctctctgtgt taccagtaa ctcatctgc accaagcctt ggggattctt  
 1801 ccacttgatt gtgatgtgag tgcacagct atgaaggctg tgcactgcac gaatggaaga  
 1861 ggcacctg cagaaaaag catcatggct atctgtgggt agtatgatgg gtgttttag  
 1921 caggtaggag gcaaatatct tgaaggggt tgtgaagagg tgttttct aattggcatg  
 1981 aaggtgcat acagattgc aaagttaat ggtgcctca tttgggatgc tactctagta  
 2041 tccagacct gaagaatcac aataatttc tactgggtct ctcttcttgc tgataatgaa  
 2101 aattatgata aggatgataa aagcacttac tctgttccg actctctga gcactactt  
 2161 acatgcatta ctgcctgac ttctacaat aattctatga gataggctact attatccca  
 2221 tttctttt aaatgaaga agtgaagtag gccgggacg gtggctcgcg cctgtgttc  
 2281 cagggtgctg agattgcagg tgtgagccac cctgcccagc cgtcaaaaga gtcttaatat  
 2341 atatatccag atggcatgtg ttactttat gttactacat gcactggct gcataaatgt  
 2401 ggtacaacca ttctgtctg aagggcagg gctcaggat accatataca gctcagaagt  
 2461 ttctctta ggcattaaat ttagcaaag atatctcact tcttcttca aacctttc

2521 ttttttgtg gtagaaaag ttatgtagaa aaaagtaa atgatttacg ctattgtag  
2581 aaaagctata aaatgaatac aattaaagct gttattaat tagccagtga aaaactatta  
2641 acaactgtc tattacctgt tagtattatt gttgcattaa aaatgcatat actttaataa  
2701 atgtacattg tattgtaaaa aaaaaaa

Peus de figura:

**atg** = Inici de l'exó 1 del gen HFE

**c** = Nucleòtid (Citosina) mutat per una Guanina en la mutació H63D

**g** = Nucleòtid (Guanina) mutat per una Adenosina en la mutació C282Y



**ARTICLE ACCEPTAT PER PUBLICACIÓ:**

L'article amb el títol "THE PREVALENCE OF HFE C282Y GENE MUTATION IS INCREASED IN SPANISH PATIENTS WITH PORPHYRIA CUTANEA TARDA WITHOUT HEPATITIS C VIRUS INFECTION" Agustí Toll, Raquel Celis, Maria Dolores Ozalla, Miquel Bruguer, Carmen Herrero, M Guadalupe Ercilla, ha estat acceptat per publicació en la revista Journal of European Academy of Dermatology. A continuació s'adjunta l'article i la carta d'acceptació per a la seva publicació.

**THE PREVALENCE OF HFE C282Y GENE MUTATION IS INCREASED IN SPANISH PATIENTS WITH PORPHYRIA CUTANEA TARDA WITHOUT HEPATITIS C VIRUS INFECTION**

Agustí Toll,MD<sup>1,2</sup>, Raquel Celis,MD<sup>3</sup>, Maria Dolores Ozalla,MD<sup>1</sup>, Miquel Bruguera,MD<sup>4</sup>, Carmen Herrero,MD<sup>1</sup>, M Guadalupe Ercilla,MD<sup>3</sup>.

1 – Department of Dermatology. Hospital Clínic. University of Barcelona. August Pi-Sunyer Biomedical Research Institute. Barcelona. Spain

2 - Department of Dermatology. Hospital del Mar. IMAS. Barcelona. Spain

3 – Department of Immunology. Institut Clínic d'Infeccions i Immunologia (ICII). Hospital Clínic. August Pi-Sunyer Biomedical Research Institute. Barcelona. Spain

4 – Liver Unit. Institut Clínic de Malalties Digestives (ICMD). Hospital Clínic. University of Barcelona. August Pi-Sunyer Biomedical Research Institute. Barcelona. Spain

**Keywords:** Porphyria Cutanea Tarda, HFE, C282Y, H63D, HCV, Iron overload

**Correspondence:**

Dr Agustí Toll

Department of Dermatology

Hospital del Mar.

Pg/Maritim 25-29

08003-Barcelona.

Spain.

Ph:34932483380

Fax:34932483328

E-mail: 30632ata@comb.es

**ABSTRACT**

**Objectives:** To investigate the role of C282Y and H63D mutations, and Hepatitis C virus (HCV) infection in the pathogenesis of Porphyria Cutanea Tarda (PCT).

**Design:** Prospective case-control study.

**Setting:** A large clinical and research institute for the study and treatment of cutaneous diseases in Barcelona, Spain.

**Patients:** Ninety-nine consecutive patients with PCT and one hundred and twenty six control patients (76 healthy subjects and 50 patients chronically infected with HCV), were recruited.

**Main outcome measures:** The frequency of the C282Y and H63D mutations in patients with PCT vs controls and the relationship of these mutations with HCV infection, and iron status, as judged by serum iron, liver iron and ferritin levels.

**Results:** C282Y mutation was significantly increased in PCT patients. This mutation was more frequent among non HCV-infected patients. Increased ferritin levels and hepatic iron overload were also observed in PCT patients with heterozygous C282Y state. H63D mutation was only significantly increased among PCT patients with chronic hepatitis C infection. No significant iron overload was observed in patients with H63D mutation.

**Conclusions:** This study confirms the high frequency of C282Y mutation in patients with PCT and its relationship with iron overload. The C282Y mutation has a relevant role in Spanish patients with PCT non-associated with HCV chronic infection. On the other hand, the prevalence of the H63D mutation seems not to be increased in patients with PCT. The possibility of an association between HCV infection and H63D mutation in inducing PCT can be hypothesized.

## INTRODUCTION

Porphyria cutanea tarda (PCT), a disease presenting with vesiculo-bullous eruption on photo-exposed areas of the skin, is caused by a congenital or acquired reduction in the activity of the enzyme uroporphyrinogen decarboxylase (URO-D).<sup>1,2</sup> In familial PCT, a marked reduction of the enzyme activity is detected, caused by mutations of the URO-D gene. This form of porphyria is inherited as an autosomal dominant trait and affects approximately between 20 to 25% of patients.<sup>3</sup> In sporadic PCT, the most common form of porphyria, a reduction of URO-D is demonstrated exclusively in hepatocytes, through inactivation of the normal enzyme.<sup>1</sup> PCT is associated with liver-cell damage. Various factors such as alcohol, oestrogens, and hepatitis C virus infection<sup>4</sup> may precipitate the disease.

In most patients with sporadic PCT liver iron deposits (hepatic siderosis) are present.<sup>5,6</sup> The clinical manifestations of the disease may be precipitated by liver iron overload and phlebotomy (an indirect treatment that leads to iron withdrawal) is the treatment of choice for PCT patients.<sup>7,8,9,10</sup> The cause of hepatic iron overload in sporadic PCT is unknown.

The possibility that genetically predisposed individuals have more susceptibility for sporadic PCT has been hypothesized.<sup>11</sup> The observation of a possible association with HLA locus A antigens and PCT led to a systematic search for a susceptibility gene telomeric to the HLA complex. The HFE gene (previously named HLA-H) that encodes an HLA class I-like molecule as a gene candidate for hemochromatosis was identified by Feder et al<sup>12</sup> in 1996. Several mutations of the HFE gene have been identified: In approximately 85% of chromosomes (83% of patients) from patients with hemochromatosis, a point mutation in the HFE gene which replaces a cysteine amino acid

at position 282 by a tyrosine (C282Y) is detected. A second mutation which replaces histidine 63 by aspartic acid (H63D), over-represented in hemochromatosis, was also identified. However, this last mutation seems to be fairly common in the general population; and, by itself is not associated with iron overload.

The identification of mutations on the HFE gene in hemochromatosis, has allowed the study of the role of these mutations in PCT patients. An increased frequency of the C282Y mutation in PCT patients was initially detected <sup>13</sup>, and additional studies confirmed these results.<sup>14-18</sup> More recently, the association between the H63D mutation and PCT was also described.<sup>19,20</sup>

The present study is aimed to determine the prevalence of HFE mutations in PCT patients in Spain, to analyse the role of these mutations in the degree of iron overload and to assess the relationship between HFE mutations and HCV infection as triggering factors of sporadic PCT.

## PATIENTS AND METHODS

### Patients

The study was carried out on 99 consecutive Spanish patients with sporadic PCT (89 males, the mean age of 58, ranging from 31-81 years, and 10 females, with the mean age of 59, ranging from 37-77). The diagnosis of PCT was based on characteristic clinical and laboratory features. All patients had skin lesions suggestive of PCT such as blistering or skin fragility on the dorsum of the hands. A marked increase of uro- and heptacarboxy-porphyrins in urine and presence of isocoproporphyrin in faeces was also found in all patients. None of the patients had a clinical picture or a family history of hemochromatosis or PCT. No history of environmental exposure to hepatotoxic or porphyrogenic chemicals or toxins was recorded. Five women had a history of oestrogen therapy.

Serum ferritin levels were determined before treatment in all patients. For measurement of hepatic iron concentration, a needle liver biopsy was carried out in 41 patients. In all patients, serologic markers for hepatitis B virus (HBV) and hepatitis C virus (HCV) infection were determined. Alcohol abuse was defined by present or past alcohol intake higher than 80 g/day for more than 5 years.

A control group of 126 subjects was selected. 76 healthy subjects (group A) and 50 patients chronically infected with HCV (group B) were randomly selected from the pool of subjects available in the laboratory. None of the controls had a history of PCT or hemochromatosis.



All case and control subjects gave their informed and written consent according to a protocol reviewed and approved by the local Ethics Committee. (Helsinki Convention)

## Methods

Mutation analysis of the HFE gene was performed on DNA extracted from frozen stored samples of whole blood using the QIAamp Blood Kit (Qiagen, Santa Clarita, CA) and amplified by PCR, which was followed by restriction endonuclease digestion. For both the C282Y and the H63D mutations, known homozygous normal, heterozygous, and homozygous abnormal controls were run simultaneously with each batch of PCT patients. The primers used for the touch down PCR were as follows: to amplify exon 4, 5' TGCCTCCTTTGGTGAAGGTGACAC 3' and 5' CAGATCCTCATCTCACTGCC 3'; for exon 2, 5' TGTTGCTCTGTCTCCAGGTT 3' and 5' ACCCTTGCTGTGGTTGTGAT 3'. The restriction enzymes used were RsaI for exon 4 and MboI for exon 2, and the resulting fragments were separated by electrophoresis in an acrylamide gel (PAGE) and visualized by ethidium bromide staining.

The conditions for running the PCR were: 10' 96° (20" 96° 45" 65° 3' 72°) x 5, (20" 96° 50" 60° 3' 72°) x 20, (20" 96° 1" 55° 3' 72°) x 9, 10' 72°.

Standard biochemical tests and porphyrin analysis were performed in the hospital laboratories. Quantitative assessment of urinary total porphyrin was made by spectrofluorimetry,<sup>21</sup> urinary and faecal porphyrin profiles which were analysed by high pressure liquid chromatography (HPLC).<sup>22</sup> Hepatitis B virus infection was investigated by hepatitis B surface antigen and by the antibody to hepatitis B core antigen (Abbott

Laboratories, North Chicago, IL). Detection of HCV RNA was performed by PCR as previously described.<sup>23</sup>

Liver iron concentration was measured by atomic absorption spectrophotometry.<sup>24</sup> The results were expressed as  $\mu\text{g}/100\text{mg}$  of liver tissue (dry weight), the normal values were lower than  $50 \mu\text{g}/100\text{mg}$ . Serum iron ( $\mu\text{g}/\text{dl}$ ; normal range 50-150) and ferritin ( $\text{ng}/\text{l}$ ; normal range 20-300 in males and 15-200 in females) were measured by standard methods.

### **Statistical analysis**

The significance of the differences between frequencies for patients and controls was determined by the  $\chi^2$  test (with Yates' correction). When iron levels were analyzed the non-parametric Mann-Whitney test was used to compare median values.

## RESULTS

### Mutational analysis of HFE

The frequency of HFE mutations and genotypes of patients and controls is shown in Table 1. The C282Y mutation was present in 8% of chromosomes in patients with porphyria cutanea and in 3.2% of controls ( $p < 0.02$ ). When the distribution of the mutation was considered in individuals, the frequency in PCT patients (16.2%) was significantly increased in comparison with the control group (6.3%;  $p < 0.03$ ). None of the subjects included in the study was homozygous for the C282Y mutation.

The H63D mutation was found in 31.8% of chromosomes from patients with PCT, which was not significantly increased over controls (22.6%;  $p: 0.119$ ). This missense mutation was present in heterozygosity in 43.4% of PCT patients in comparison with 37.3 % in controls, differences that do not reach statistical significance ( $p: 0.218$ ). Homozygosity was present in 10.1% of PCT compared with 4% in controls ( $p: 0.067$ ). When all patients with the H63D mutation, either in its heterozygous or homozygous form, were compared to controls (53.5% vs 41.3%), no significant difference was observed ( $p: 0.089$ ).

The presence of at least one of the HFE mutations was observed more frequently in PCT patients than in controls (62.6% vs 45.2%;  $p < 0,01$ ). Seven patients with PCT (7%) and three subjects among controls (2.4%) were compound heterozygotes for C282Y and H63D mutations ( $p: 0.17$ ).

No correlation between HFE mutations and alcohol intake was found (data not shown),

### **HFE mutations in PCT patients according to the hepatitis C virus infection status**

Seventy-five patients (75 %) with PCT were HCV-positive. None was actively infected by Hepatitis B virus (HBV) but six had markers of infection in serum (positive anti-HBc antibodies).

The heterozygous C282Y change was twice as frequent in HCV negative than in HCV positive PCT patients (25% and 13.3% respectively) but without reaching statistical significance ( $p:0.177$ ) (Table 2). However, when the frequency of this mutation in non-infected PCT patients was compared with the control group A (healthy subjects), a statistical difference was observed (25% vs 6%;  $p:0.012$ ). On the contrary, in HCV positive patients the frequency of C282Y mutation did not differ from the HCV positive control group B (13% vs 6%;  $p: 0.188$ ).

The heterozygous H63D mutation was more frequent in HCV positive patients (48%) than either in HCV negative patients (29%;  $p : 0.166$ ) nor in HCV positive control group (30%;  $p:0.068$ ) without reaching statistical significance. Similarly, no differences were observed in the frequency of homozygous H63D mutation regarding HCV infection.

On one hand, when patients with heterozygous and homozygous H63D mutation were gathered in the same group, this mutation was more prevalent among HCV positive PCT patients when compared to HCV positive controls (58% vs 36 %;  $p: 0.02$ ) (Table 2). On the other hand, as observed when HCV was not considered (Table 1), no statistical difference was observed when HCV negative PCT patients were compared to HCV negative controls (37% vs 45%;  $p : 0.69$ ).

**Correlation of the iron phenotype with the HFE genotype**

The hepatic iron concentration and ferritin levels were highest in PCT patients who were heterozygous for the C282Y mutation (Table 3). Serum iron levels were increased in all PCT patients but no statistical significance could be established according to the HFE genotype. Similarly, no statistically significant increase in serum iron, ferritin and hepatic iron was observed when the H63D mutation was present.

## DISCUSSION

The identification of the HFE gene and the association of some mutated forms to iron overload in hemochromatosis, has prompted the study of the presence of these mutations in other disorders in which there is an increase of iron deposits. Several studies suggested that HFE mutations described in hemochromatosis could also be related with iron overload observed in sporadic PCT, and in some way could contribute to the trigger of the clinical onset of the disease.

Overall, mutant HFE alleles were detected in 63% of the PCT patients we genotyped (Table 1), being on the same order than previously reported<sup>4</sup> and significantly higher than that found in the control group (45%).

Our study shows that the C282Y mutation prevalence is significantly increased in sporadic PCT Spanish patients. On the other hand, H63D mutation prevalence was not significantly increased in these patients. The heterozygous C282Y mutation has been found to be the most relevant HFE mutation in PCT patients from North Europe and America<sup>13-18</sup> but reports from the Mediterranean area argue that the H63D is the strongest associated mutation.<sup>19, 20</sup> Similarly, the homozygosity for the C282Y mutation has been associated with an earlier onset of skin lesions in both familial and sporadic PCT.<sup>25</sup>

The C282Y mutation is the most common defect associated with hereditary hemochromatosis in Spain.<sup>26</sup> This result also differs from those reported by Italian investigators who found a lower frequency for the C282Y among hemochromatosis patients.<sup>27</sup> The differences found between Spanish and Italian studies among PCT and hemochromatosis patients may be due to the Spanish Celtic genetic background<sup>28</sup>.

Hepatitis C virus infection is a prevalent cause of liver disease in PCT patients<sup>22,29,30</sup> and an important triggering factor of this cutaneous disease in predisposed individuals in the Mediterranean area. As HCV infection is frequent in Spanish PCT patients, we examined a control group of patients with HCV chronic active hepatitis, to rule out a direct association between the C282Y mutation and HCV infection. The prevalence of HFE mutations in the control group with HCV hepatitis was almost identical to that observed in controls without the infection, suggesting that the increased prevalence of C282Y is directly associated with PCT. The prevalence of C282Y was higher when PCT patients were not infected by HCV. Therefore, the C282Y mutation might play a relevant role as a triggering factor of PCT, particularly when no HCV infection is detected.

Conversely, when PCT patients are chronically infected by HCV, the prevalence of the H63D mutation is increased. To our knowledge, this association has not been previously described although a similar trend without reaching statistical significance has been reported<sup>31</sup>. It is interesting to speculate that HCV infection and H63D mutation synergize to flare up clinical PCT.

Dry iron weight on liver biopsies and serum iron were significantly increased when C282Y mutation was present. Similar results have been observed by other authors.<sup>4</sup> However, in our series, the presence of H63D did not seem to correlate with the iron status of PCT patients, as judged by serum iron, liver iron and ferritin levels.<sup>15,16,19</sup> HFE associates with  $\beta_2$ -microglobulin and facilitates the uptake of transferrin bound iron by duodenal crypt cells.<sup>32-35</sup> HFE mutations that impair this function contribute to an abnormal iron absorption. Duodenal crypt cells, poor in iron, will induce cells differentiating into mature villous cells to absorb an excess of iron. On the other hand, several authors have found that the H63D

mutant protein behaves similarly to the wild-type protein.<sup>36,37</sup> In the same way, the role of H63D in hemochromatosis has not been clearly shown in several clinical studies.<sup>32,38</sup>

Therefore, several lines of evidence indicate that the H63D mutation could cause a subtler abnormality of iron metabolism than C282Y. H63D mutation may interact with other host molecules such as the transferrin receptor 2<sup>39</sup> or may also interfere with HCV metabolism inducing a reversible urogenecarboxylase inactivation.

HFE mutations, HCV infection, oestrogen treatment and/or alcohol intake was found in the majority of our patients. However, in a remaining 6% of them no clear exposure to triggering factors could be found. Similarly, HFE mutations and other triggering factors of PCT may be found in many individuals without overt PCT, thus suggesting that other genetic or environmental factors may be involved.

In conclusion, this study shows that the prevalence of the C282Y mutation is increased in sporadic PCT Spanish patients. We found this increase to be more pronounced in non HCV infected PCT patients. A correlation of this mutation with hepatic iron overload was also observed. Conversely, the prevalence of the H63D mutation is only increased in HCV infected PCT patients. This finding suggests that the H63D mutation needs to be associated with other factors to trigger PCT, possibly due to its inability to increase the iron status by itself.



**REFERENCES**

- 1.- Elder GH. Decreased activity of hepatic uroporphyrinogen decarboxylase in sporadic porphyria cutanea tarda. *N Engl J Med* 1970;299:274-278.
- 2.- Garey JR, Franklin KF, Brown DA, Harison LM, Metcalf KM, Kushner JP. Analysis of uroporphyrinogen decarboxylase complementary DNAs in sporadic porphyria cutanea tarda. *Gastroenterology* 1993; 105:165-169.
- 3.- De Verneuil H, Aitken G, Nordmann Y. Familial and sporadic porphyria cutanea tarda: two different diseases. *Hum Genet* 1978;44:145-151.
- 4.- Bulaj Z, Phillips JD, Ajioka RS, et al. Hemochromatosis genes and other factors contributing to the pathogenesis of porphyria cutanea tarda. *Blood* 2000; 95: 1565-1571.
- 5.- Berlin SO, Brante G. Iron metabolisms in porphyria and hemochromatosis. *Lancet* 1962; 2: 729.
- 6.- Lundvall O, Weinfeld A, Lundin P. Iron storage in porphyria cutanea tarda. *Acta Med Scand.* 1970; 188: 37-53
- 7.- Epstein JH, Redeker AG: Porphyria cutanea tarda. A study of the effect of phlebotomy. *N Engl J Med* 1986; 279: 1301-1304
- 8.- Enriquez de Salamanca R, Rico R, Pena ML, Romero F, Olmos A, Jimenez J. Patterns of porphyrin excretion in Porphyria cutanea tarda under venesection treatment. *Int J Biochem* 1980; 12: 862-8;
- 9.- Lundvall O. The effect of phlebotomy therapy in porphyria cutanea tarda. *Acta Med Scand* 1971; 189: 33-49.
- 10.- Rocchi E, Gilbertini P, Cassanelli M, et al. Liver iron overload and desferrioxamine treatment of Porphyria cutanea tarda. *Dermatologica* 1991; 182: 27-31.

- 11.- Edwards CQ, Griffen LM, Goldgar DE, Skolnick MH, Kushner JP. HLA-A linked haemochromatosis alleles in sporadic porphyria cutanea tarda. *Gastroenterology* 1989; 97: 972-981
- 12.- Feder J.N, 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
- 13.- Roberts AG, Whatley SD, Morgan RR, Worwood M, Elder GH. Increased frequency of the hemochromatosis Cys282Tyr mutation in sporadic porphyria cutanea tarda. *Lancet* 1997; 349: 321-323.
- 14- Santos M, Clevers HC, Marks JJM. Mutations of the hereditary hemochromatosis candidate gene HLA-H in porphyria cutanea tarda. *N Engl J Med* 1997; 336: 1327-1328
- 15.- Bonkowsky HL, Poh-Fitzpatrick M, Pimstone N, et al. Porphyria cutanea tarda, hepatitis C, and HFE gene mutations in North America. *Hepatology* 1998; 27: 1661-9
- 16.- Stuart KA, Busfield F, Jazwinska EC, et al. The C282Y mutation in the hemochromatosis gene (HFE) and hepatitis C virus infection are independent cofactors for porphyria cutanea tarda in Australian patients. *J Hepatol* 1998; 28: 404-409.
- 17.- Bulaj Z, Phillips JD, Ajioka RS, et al. Hemochromatosis genes and other factors contributing to the pathogenesis of porphyria cutanea tarda. *Blood* 2000; 95: 1565-1571.
- 18.- Martinelli ALC, Zago MA. Porphyria cutanea tarda in brazilian patients: association with hemochromatosis C282Y mutation and hepatitis C virus infection. *Am J Gastroenterol* 2000;95(12):3516-3521

- 19.- Sampietro M, Piperno A, Lupica L, et al. High Prevalence of the His63Asp HFE Mutation in Italian Patients With Porphyria Cutanea Tarda. *Hepatology* 1998;27:181-184
- 20.- Enriquez de Salamanca R, Morales P, Castro MJ, Rojo R, González M, Arnaiz-Villena A. The most frequent HFE allele linked to Porphyria Cutanea tarda in Mediterraneans is His63Asp. *Hepatology* 1999; 30:819-820
- 21.- Blake D, Poulos V, Rossi R. Diagnosis of porphyria-recommended methods for peripheral laboratories. *The Clinical Biochemist Reviews*. 1992; 13: s1-s24.
- 22.- Rossi E, Curnow DH. HPLC of small molecules- A practical approach,. In: Lim CK, editor. *The practical Approach Series*. Oxford: IRL Press, 1986. p. 261-303.
- 23.- Herrero C, Vicente A, Bruguera M, Ercilla MG, Barrera JM, Vidal J et al. Is hepatitis C virus infection a trigger or porphyria cutanea tarda? *Lancet* 1993; 128: 121-123.
- 24.- Summers KM, Halliday JW, Powell LW. Identification of homozygous hemochromatosis subjects by measurement of hepatic iron index. *Hepatology* 1990; 12: 20-25.
- 25.- Brady JJ, Jackson HA, Roberts AG, et al. Co-inheritance of mutations in the uroporphyrinogen decarboxylase and hemochromatosis genes accelerates the onset of porphyria cutanea tarda. *J Invest Dermatol* 2000;115:868-874.
- 26.- Sánchez M, Bruguera M, Bosch J, Rodés J, Ballesta F, Oliva R. Prevalence of the Cys282Tyr and His63Asp HFE gene mutations in Spanish patients with hereditary hemochromatosis and in controls. *J Hepatol* 1998; 29: 725-728;
- 27.- Carella M, D'Ambrosio L, Totaro A, et al. Mutation analysis of the HLA-H gene in Italian hemochromatosis patients. *Am J Hum Genet* 1997;60:828-32.

- 28.- 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. 2237-2269.
- 29.- Lacour JP, Bodokh I, Castanet J, Ortonne JP. Porphyria cutanea tarda and antibodies to hepatitis C virus. *Br J Dermatol* 1993; 128: 121-123.
- 30.- Fargion S, Piperno A, Cappellini MD, et al. Hepatitis C virus and Porphyria cutanea tarda: evidence of a strong association. *Hepatology* 1992; 16: 1322-1326.
- 31.- Chiaverini C, Halimi G, Ouzan D, Halfon P, Ortonne JP, Lacour JP. Porphyria cutanea tarda, C282Y, H63D and S65C gene mutations and hepatitis C infection: a study from southern France. *Dermatology* 2003;206:212-216.
- 32.- Jazwinska EC, Cullen LM, Busfield F, et al. Hemochromatosis and HLA-H. *Nat Genet* 1996; 14: 249-251.
- 33.- Feder JN, Penny DM, Irrinki A, et al. The hemochromatosis gene product complexes with the transferrin receptor and lowers its affinity for ligand binding. *Proc Natl Acad Sci* 1998; 95: 1472-1477.
- 34.- Waheed A, Parkila S, Saarnio J, et al. Association of HFE protein with transferrin receptor in crypt enterocytes of human duodenum. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 1579-1584.
- 35.- Waheed A, Grubb JH, Zhou XY, et al. Regulation of transferrin-mediated iron uptake by HFE, the protein defective in hereditary hemochromatosis. *Proc Natl Acad Sci* 2002; 99 (5):3117-3122.
- 36.- Waheed A, Parkkila S, Zhou XY, et al. *Proc Natl Acad Sci*. Hereditary hemochromatosis: effects of C282Y and H63D mutations on association with beta2-microglobulin, intracellular processing, and cell surface expression of the HFE protein in COS-7 cells. 1997 Nov11;94(23):12384-12389

- 37.- Roy C, Carlson E, Anderson E, et al. Interaction of the ectodomain of HFE with the transferrin receptor are critical for iron homeostasis in cells. *FEBS Lett* 2000;484:271-274.
- 38.- Jouanolle, A. M; Gandon, G; Jezequel, P, et al: Haemochromatosis and HLA-H. (Letter) *Nature Genet.* 14: 251-252, 1996.
- 39.- Camaschella C, Roetto A, Cali A, et al. The gene TFR2 is mutated in a new type of haemochromatosis mapping to 7q22. *Nature Genetics* 2000; 25: 14-15.

**TABLE 1. Frequency of HFE genotypes in PCT patients and controls**

	PCT (n=99)	Controls (n=126)	pc
<b>ALLELES</b>			
C282Y	6/198 (8%)	7/252 (3,2%)	.02
H63D	63/198 (31,8%)	57/252 (22,6%)	.119
<b>GENOTYPES</b>			
C282/C282	83/99 (83,8%)	118/126(93,6%)	.0316
C282/C282Y	16/99 (16,2%)	8/126 (6,3%)	
H63/H63	46/99 (46,5%)	74/126 (58,7%)	.218
H63/H63D	43/99 (43,4%)	47/126 (37,3%)	
H63D/H63D	10/99 (10,1%)	5/126 (4%)	
H63/H63D or H63D/H63D	53/99 (53,5%)	52/126 (41,3%)	
C282Y/H63D	7/99 (7%)	3/126 (2,4%)	.17
C282Y or H63D	62/99(62,6%)	57/126 (45,2%)	.013

P corrected for continuity

**TABLE 2. Frequency of HFE genotypes in PCT patients and controls in regard to the VHC infection status**

	PCT		Controls	
	HCV- Group B (n=24) n=50)	HCV+ (n=75)	Group A (n=76)	
GENOTYPES				
C282/C282	18/24 (75%)	65/75 (87%)	71/76(93%)	47/50(94%)
C282/C282Y	6/24 (25%) <sup>a,b</sup>	10/75 (13%) <sup>c</sup>	5/76 (6%) <sup>d</sup>	3/50 (6%)
H63/H63	15/24 (62.5%)	31/75 (41%)	42/76 (55%)	32/50(64%)
H63/H63D	7/24 (29%) <sup>e,f</sup>	36/75 (48%) <sup>g</sup>	32/76 (42%)	15/50(30%)
H63D/H63D	2/24 ( 8%) <sup>h,i</sup>	8/75 (11%) <sup>j</sup>	2/76 (3%)	3/50 (6%)
H63/H63D o H63D/H63D	9/24 (37%) <sup>k,l</sup>	44/75 (58%) <sup>m</sup>	34/76 (45%)	18/50(36%)

**Group A:** controls without VHC

**Group B:** controls with VHC chronic infection

**a :** p=0.012 ; compares group PCT/VHC- with group A.

**b :** p=0.177; compares group PCT/VHC- with group PCT/VHC+.

**c :** p=0.188; compares group PCT/VHC+ with group B.

**d :** p=0.896; compares both control groups (A and B).

**e :** p=0.371; compares group PCT/VHC- with group A.

**f :** p=0.166; compares group PCT/VHC- with group PCT/VHC+.

**g:** p=0.068; compares group PCT/VHC+ with group B.

**h:** p=0.52; compares group PCT/VHC- with group A.

**i:** p=0.74; compares group PCT/VHC- with group PCT/VHC+.

**j:** p=0.56; compares group PCT/VHC+ with group B.

**k:** p=0.69; compares group PCT/VHC- with group A.

**l:** p=0.115; compares group PCT/VHC- with group PCT/VHC+.

**m:** p=0.02; compares group PCT/VHC+ with group B.

**TABLE 3. Iron phenotype in PCT patients**

	<b>C282/C282</b>	<b>C282/C282Y</b>	<b>p Value</b>
<b>Liver iron (µg/100mg)</b>	84.7 (34)	242 (7)	0.019
<b>Serum iron (µg/dl)</b>	128 (78)	150 (12)	0.072
<b>Ferritin (ng/ml)</b>	353 (61)	648 (10)	0.032
	<b>H63/H63</b>	<b>H63/H63D</b>	<b>P Value</b>
<b>Liver iron (µg/100mg)</b>	116.2 (19)	106.3 (17)	0.346
<b>Serum iron (µg/dl)</b>	108 (42)	134 (40)	0.697
<b>Ferritin (ng/ml)</b>	367 (32)	356 (33)	0.798
	<b>H63/H63</b>	<b>H63D/H63D</b>	<b>P Value</b>
<b>Liver iron (µg/100mg)</b>	116.2 (19)	69.4 (5)	0.406
<b>Serum iron (µg/dl)</b>	108 (42)	135 (8)	0.233
<b>Ferritin (ng/ml)</b>	367 (32)	625 (6)	0.136

Values are the medians. Normal liver iron levels are <50µg/100mg dry weight. Normal serum iron values are 50-150 µg/dl and normal ferritin values are 20-300 ng/l. Values in brackets represent the number of patients.



## **IX- BIBLIOGRAFIA**

**BIBLIOGRAFIA:**

1. Elder GH, Urquhart AJ, De Salamanca RE, Muñoz JJ, Bonkovsky HL. Immunoreactive uroporphyrinogen decarboxylase in the liver in porphyria cutanea tarda. *Lancet* 1985; 2:229-33.
2. Anderson KE, Sassa S, Bishop DF, Desnick RJ. Disorders of heme biosynthesis: X-linked sideroblastic anemias and the porphyrias. En: *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*. CR Scriver, AL Beaudet, WS Sly, D Valle, B Childs, B Vogelstein (eds). New York, Mc Graw-Hill, 2001. Capítol 124, pàgs.2991-3062.
3. De Verneuil H, Nordmann Y, Phung N, Grandchamp B, Aitken G, Grelier M, Noire J. Familial and sporadic porphyria cutanea tarda: two different diseases. *Hum Genet* 1978; 44:145-51.
4. Elder GH. Decreased activity of hepatic uroporphyrinogen decarboxylase in sporadic porphyria cutanea tarda. *N Engl J Med* 1970; 299:274-78.
5. Garey JR, Franklin KF, Brown DA, Harison LM, Metcalf KM, Kushner JP. Analysis of uroporphyrinogen decarboxylase complementary DNAs in sporadic porphyria cutanea tarda. *Gastroenterology* 1993; 105:165-9.
6. Roberts AG, Elder GH, De Salamanca RE, Herrero C, Lecha M, Mascaró JM. A mutation (G281E) of the human uroporphyrinogen decarboxylase gene causes both hepatoerythropoietic porphyria and overt familial porphyria cutanea tarda: biochemical and genetic studies on Spanish patients. *J Invest Dermatol.* 1995;104:500-2.
7. Thunell S, Harper P. Porphyrins, porphyrin metabolism, porphyrias. III. Diagnosis, care and monitoring in porphyria cutanea tarda-suggestions for a handling programme. *Scand J Clin Lab Invest* 2000;60:561-80.
8. Mendez M, Rossetti MV, De Siervi A, del Carmen Batlle AM, Parera V. Mutations in familial porphyria cutanea tarda: two novel and two previously described for hepatoerythropoietic porphyria. *Hum Mutat.* 2000;16:269-70.
9. McManus JF, Begley CG, Sassa S, Ratnaike S. Three new mutations in the uroporphyrinogen decarboxylase gene in familial porphyria cutanea tarda. *Mutation in brief no. 237. Online. Hum Mutat.* 1999;13:412.
10. Grossman ME, Bickers DR, Poh-Fitzpatrick MB, Deleo VA, Harber LC. Porphyria cutanea tarda. Clinical features and laboratory findings in 40 patients. *Am J Med.* 1979;67:277-86.

11. Elder GH. Porphyria cutanea tarda. *Semin Liver Dis* 1998; 18:67-75.
12. Boynton SB, Roth KS. Rapid and accurate random urinary porphyrin quantitation. *Clin Chim Acta* 1994; 226:1-11.
13. Bruguera M. Liver involvement in porphyria. *Semin Dermatol* 1986;5:178-85.
14. Berlin SO, Brante G. Iron metabolisms in porphyria and hemochromatosis. *Lancet* 1962; 2: 729.
15. Lundvall O, Weinfeld A, Lundin P. Iron storage in porphyria cutanea tarda. *Acta Med Scand.* 1970; 188: 37-53.
16. Turnbull A, Baker H, Vernon-Roberts B:Iron metabolism in porphyria cutanea tarda and in erythropoietic protoporphyria. *QJM* 1973;42:341-355.
17. Pimstone N: Porphyria cutanea tarda. *Semin Liver Dis* 1982;2:132-42.
18. Lundvall O. The effect of phlebotomy therapy in porphyria cutanea tarda. *Acta Med Scand* 1971; 189: 33-49.
19. Ippen H. Treatment of porphyria cutanea tarda by phlebotomy. *Semin Hematol* 1977;14: 253-9.
20. Epstein JH, Redeker AG. Porphyria cutanea tarda. A study of the effect of phlebotomy. *N Engl J Med* 1986; 279: 1301-1304.
21. Enriquez de Salamanca R, Rico, Pena ML, Olmos A, Molina C, Ladero JM. Patterns of porphyrin excretion in Porphyria cutanea tarda under venesection treatment. *Int J Biochem* 1980; 12: 862-8.
22. Di Bisceglie AM, Axiotis CA, Hoofnagle JH, Bacon BR Measurements of iron status in patients with chronic hepatitis. *Gastroenterology* 1992; 102:2108-13.
23. Arber N, Konikoff FM, Moshkowitz M, Baratz M, Hallak A, Santo M, Halpern Z, Weiss H, Gilat T Increased serum iron and iron saturation without liver iron accumulation distinguish chronic hepatitis C from other chronic liver diseases. *Dig Dis Sci* 1994; 39:2656-9.
24. Feldman ES, Bacon BR, Hepatic mitochondrial oxidative metabolism and lipid peroxidation in experimental hexachlorobenzene induced porphyria with dietary carbonyl iron overload. *Hepatology* 1989;9:686-92.
25. Bonkovsky HL. Mechanism of iron potentiation of hepatic uroporphyrin: studies in cultured chick embryo liver cells. *Hepatology* 1989; 10:354-64.
26. Francis JE, Smith AG: Oxidation of uroporphyrinogens by hydroxyl radicals. Evidence for nonporphyrin products as potential inhibitors of uroporphyrinogen decarboxylase. *FEBS Lett* 1988; 233:311-314.

27. De Matteis F: Drug induced abnormalities of liver heme biosynthesis. En: Hepatotoxicology. RG Meeks, SD Harrison, RJ Bull (eds). Boca Raton, Florida, CRC Press. pàgs 437-479. 1991
28. Farinati F, Cardin R, De Maria N, Della Libera G, Marafin C, Lecis E, Burra P, Floreani A, Cecchetto A, Naccarato R. Iron storage, lipid peroxidation and glutathione turnover in chronic anti-HCV positive hepatitis. *J Hepatol* 1995; 22:449-56.
29. Piperno A, D'Alba R, Fargion S, Roffi L, Sampietro M, Parma S, Arosio V, Fare M, Fiorelli G. Liver iron concentration in chronic viral hepatitis: a study of 98 patients. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1995;7:1203-8.
30. Riggio O, Montagnese F, Fiore P, Folino S, Giambartolomei S, Gandin C, Merli M, Quinti I, Violante N, Caroli S, Senofonte O, Capocaccia L. Iron overload in patients with chronic viral hepatitis: how common is it? *Am J Gastroenterol* 1997;92:1298-1301.
31. Giannini E, Mastracci L, Botta F, Romagnoli P, Fasoli A, Risso D, Faravelli F, Ceppa P, Lantieri PB, Icardi GC, Testa R. Liver iron accumulation in chronic hepatitis C patients without HFE mutations: relationships with histological damage, viral load and genotype and alpha-glutathione S-transferase levels. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2001;13:1355-61.
32. Van Thiel DH, Friedlander L, Fagiuoli S, Wright HI, Irish W, Gavaler JS. Response to interferon alpha therapy is influenced by the iron content of the liver. *J Hepatol* 1994;20:410-5.
33. 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 alpha-interferon therapy, and effects of iron depletion in chronic hepatitis C. *Liver* 1996;16:248-54.
34. Fargion S, Fracanzani AL, 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 alpha therapy in chronic hepatitis C. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1997; 9:497-503.
35. Bonkovsky HL, Banner BF, Rothman AL. Iron and chronic viral hepatitis. *Hepatology* 1997; 25: 759-768.
36. Kaserer K, Fiedler R, Steindl P, Muller CH, Wrba F, Ferenci P. Liver biopsy is a useful predictor of response to interferon therapy in chronic hepatitis C. *Histopathology* 1998;32:454-61.

37. Fletcher LM, Halliday JW, Powell LW. Interrelationships of alcohol and iron in liver disease with particular reference to the iron-binding proteins, ferritin and transferrin. *J Gastroenterol Hepatol* 1999; 14:202-14.
38. Valerio LG Jr, Parks T, Petersen DR. Alcohol mediates increases in hepatic and serum nonheme iron stores in a rat model for alcohol-induced liver injury. *Alcohol Clin Exp Res* 1996;20:1352-61.
39. Sola R, Cruz De Castro E, Hombrados M, Planas R, Coll S, Jordi R, Sunyer J, Covas MI, Marrugat J. Prevalence of hepatitis B and hepatitis C viruses in different counties of Catalonia, Spain: cross-sectional study. *Med Clin (Barc)*. 2002 Jun;119:90-5.
40. Fargion S, Piperno A, Cappellini MD, Sampietro M, Fracanzani AL, Romano R, Caldarelli R, Marcelli R, Vecchi L, Fiorelli G. Hepatitis C virus and Porphyria cutanea tarda: evidence of a strong association. *Hepatology* 1992; 16:1322-1326.
41. Herrero C, Vicente A, Bruguera M, Ercilla MG, Barrera JM, Vidal J, Teres J, Mascaro JM, Rodes J. Is hepatitis C virus infection a trigger or porphyria cutanea tarda? *Lancet* 1993; 128: 121-123.
42. Lacour JP, Bodokh I, Castanet J, Bekri S, Ortonne JP. Porphyria cutanea tarda and antibodies to hepatitis C virus. *British Journal of Dermatology* 1993;128:121-3.
43. Sampietro M, Fracanzani AL, Corbetta N, Amato M, Mattioli M, Molteni V, Fiorelli G, Fargion S. High prevalence of hepatitis C virus type 1b in Italian patients with Porphyria cutanea tarda. *Ital J Gastroenterol Hepatol* 1997;29:543-7.
44. Lamoril J, Andant C, Bogard C, Puy H, Gouya L, Pawlotsky JM, Da Silva V, Soule JC, Deybach JC, Nordmann Y. Epidemiology of hepatitis C and G in sporadic and familial porphyria cutanea tarda. *Hepatology* 1998;27:848-52.
45. Bulaj ZJ, Ajioka RS, Phillips JD, LaSalle BA, Jorde LB, Griffen LM, Edwards CQ, Kushner JP. Disease-related conditions in relatives of patients with hemochromatosis. *New Eng J Med* 2000; 343: 1529-1535.
46. Bonkovsky HL, Poh-Fitzpatrick M, Pimstone N, Obando J, Di Bisceglie A, Tattre C, Tortorelli K, LeClair P, Mercurio MG, Lambrecht RW. Porphyria cutanea tarda, hepatitis C, and HFE gene mutations in North America. *Hepatology* 1998; 27: 1661-9.
47. Stolzel U, Kostler E, Koszka C, Stoffler-Meilicke M, Schuppan D, Somasundaram R, Doss MO, Habermehl KO, Riecken EO. Low prevalence of hepatitis C virus infection in porphyria cutanea tarda in Germany. *Hepatology*. 1995;21:1500-3.

48. Murphy A, Dooley S, Hillary IB, Murphy GM. HCV infection in porphyria cutanea tarda. *Lancet*. 1993;12;341(8859):1534-5.
49. Stuart KA, Busfield F, Jazwinska EC. The C282Y mutation in the hemochromatosis gene (HFE) and hepatitis C virus infection are independent cofactors for porphyria cutanea tarda in Australian patients. *J Hepatol* 1998; 28:404-9.
50. Malina L, Stransky J, Zdarsky E. Geographical differences in prevalence of hepatitis C virus infection in PCT (porphyria cutanea tarda). *Br J Dermatol* 1997;136:291-2 .
51. Rivanera D, Lilli D, Griso D, Macri A, Mancini C. Hepatitis C virus in patients with porphyria cutanea tarda: relationship to HCV-genotypes. *New Microbiol* 1998;21:329-34.
52. Moran MJ, Fontanellas A, Brudieux E, Hombrados I, de Ledinghen V, Couzigou P, de Verneuil H, De Salamanca RE. Hepatic uroporphyrinogen decarboxylase activity in porphyria cutanea tarda patients: the influence of virus C infection. *Hepatology* 1998;27:584-9.
53. Gibson PR, Grant J, Cronin V, Blake D, Ratnaike S. Effect of hepatobiliary disease, chronic hepatitis C and hepatitis B virus infections and interferon-alfa on porphyrin profiles in plasma, urine and faeces. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15:192-201.
54. Rocchi E, Gibertini P, Cassanelli M, Pietrangelo A, Jensen J, Ventura E. Hepatitis B virus infection in porphyria cutanea tarda. *Liver* 1986; 6:153-7.
55. Wissel PS, Sordillo P, Anderson KE, Sassa S, Savillo RL, Kappas A. Porphyria cutanea tarda associated with the acquired immune deficiency syndrome. *Am J Hematol*. 1987;25:107-13.
56. Cohen PR, Suarez SM, DeLeo VA. Porphyria cutanea tarda in human immunodeficiency virus-infected patients. *JAMA* 1990; 264:1315-6.
57. Nomura N, Zolla-Pazner S, Simberkoff M, Kim M, Sassa S, Lim HW. Abnormal serum porphyrin levels in patients with the acquired immunodeficiency syndrome with or without hepatitis C virus infection. *Arch Dermatol* 1996;132:906-10.
58. O'Connor WJ, Murphy GM, Darby C, Fogarty J, Mulcahy F, O'Moore R, Barnes L. Porphyrin abnormalities in acquired immunodeficiency syndrome. *Arch Dermatol* 1996;132:1443-7.
59. Drobacheff C, Derancourt C, Van Landuyt H, Devred D, de Wazieres B, Cribier B, Rey D, Lang JM, Grosieux C, Kalis B, Laurent R. Porphyria cutanea tarda

- associated with human immunodeficiency virus infection. *Eur J Dermatol*. 1998; 8:492-6.
60. Rich JD, Mylonakis E, Nossa R, Chapnick RM. Highly active antiretroviral therapy leading to resolution of porphyria cutanea tarda in a patient with AIDS and hepatitis C. *Dig Dis Sci* 1999;44:1034-7.
  61. Ochner RK, Schmid R. Acquired porphyria in man and rat due to hexachlorobenzene intoxication. *Nature* 1961;189:499.
  62. Cripps, Gocmen A, Peters HA. Porphyria turcica. Twenty years after hexachlorobenzene intoxication. *Arch Dermatol* 1980;116 :46-50.
  63. Herrero C, Ozalla D, Sala M, Otero R, Santiago-Silva M, Lecha M, To-Figueras J, Deulofeu R, Mascaro JM, Grimalt J, Sunyer J. Urinary porphyrin excretion in a human population highly exposed to hexachlorobenzene. *Arch Dermatol*. 1999;135:400-4.
  64. To-Figueras J, Barrot C, Sala M, Otero R, Silva M, Ozalla MD, Herrero C, Corbella J, Grimalt J, Sunyer J. Excretion of hexachlorobenzene and metabolites in feces in a highly exposed human population. *Environ Health Perspect*. 2000 Jul;108:595-8.
  65. Ozalla D, Herrero C, Ribas-Fito N, To-Figueras J, Toll A, Sala M, Grimalt J, Basagana X, Lecha M, Sunyer J. Evaluation of urinary porphyrin excretion in neonates born to mothers exposed to airborne hexachlorobenzene. *Environ Health Perspect*. 2002;110:205-9.
  66. Haberman HF, Rosenberg L, Menon LA. Porphyria cutanea tarda: comparison of cases precipitated by alcohol and estrogens. *Can Med Assoc J* 1975;1113:633-55.
  67. Bulaj Z, Phillips JD, Ajioka RS, Franklin MR, Griffen LM, Guinee DJ, Edwrads CQ, Kushner JP. Hemochromatosis genes and other factors contributing to the pathogenesis of porphyria cutanea tarda. *Blood* 2000; 95: 1565-1571.
  68. Schoental R. Mycotoxins, porphyrias and the decline of the Etruscans. *J Appl Toxicol* 1991;11:453-4.
  69. Brunsting LA, Mason HL, Aldrich RA. Adult form of chronic porphyria with cutaneous manifestations. *JAMA* 1951; 146:1207-1212.
  70. Elder GH. Alcohol intake and porphyria cutanea tarda. *Clin Dermatol* 1999; 17:431-6.
  71. Chapman RW, Morgan MY, Laulicht M, Hoffbrand AV, Sherlock S. Hepatic iron stores and markers of iron overload in alcoholics and patients with hemochromatosis. *Dig Dis Sci* 1982; 27:909-16.

72. Thunell S, Floderus Y, Henrichson A, Moore M, Meissner P, Sinclair J. Alcoholic beverages in acute porphyria. *J Stud Alcohol* 1992;53:272-6.
73. Sinclair PR, Gorman N, Dalton T, Walton HS, Bement WJ, Sinclair JF, Smith AG, Nebert DW. Uroporphyrin produced in mice by iron and 5-aminolaevulinic acid does not occur in Cyp1a2(-/-) null mutant mice. *Biochem J* 1998;15;330:149-53.
74. Gorman N, Ross KL, Walton HS, Bement WJ, Szakacs JG, Gerhard GS, Dalton TP, Nebert DW, Eisenstein RS, Sinclair JF, Sinclair PR. Uroporphyrin in mice: thresholds for hepatic CYP1A2 and iron. *Hepatology*. 2002;35:912-21.
75. Franklin MR, Phillips JD, Kushner JP. Cytochrome P450 induction, uroporphyrinogen decarboxylase depression, porphyrin accumulation and excretion, and gender influence in a 3-week rat model of porphyria cutanea tarda. *Toxicol Appl Pharmacol* 1997;147:289-99.
76. Chung I, Bresnick E. Identification of positive and negative regulatory elements of the human cytochrome P450A2 (CYP1A2) gene. *Arch Biochem Biophys* 1997;15;338:220-6.
77. Salata H, Cortes JM, Enriquez de Salamanca R, Oliva H, Castro A, Kusak E, Carreno V, Hernandez Guio C. Porphyria cutanea tarda and hepatocellular carcinoma. Frequency of occurrence and related factors. *J Hepatol* 1985;1:477-87.
78. Herrero C, Vicente A, Bruguera M, Ercilla MG, Barrera JM, Vidal J, Teres J, Mascaro JM, Rodes J. Is hepatitis C virus infection a trigger or porphyria cutanea tarda? *Lancet* 1993; 128: 121-123.
79. Lipschitz DA, Cook JD, Finch CA. A clinical evaluation of serum ferritin as an index of iron stores. *N Engl J Med* 1974;290:1213-6.
80. Scholnick PL, Epstein J, Marver HS. The molecular basis of the action of chloroquine in porphyria cutanea tarda. *J Invest Dermatol* 1973;61:226-32.
81. Cainelli T, Di Padova C, Marchesi L, Gori G, Rovagnati P, Podenzani SA, Bessone E, Cantoni L. Hydroxychloroquine versus phlebotomy in the treatment of porphyria cutanea tarda. 1983; 108:593-600.
82. Seubert S, Seubert A, Stella AM, Guzman H, Batlle A. Ergebnisse bei der Behandlung der Porphyria cutanea tarda mit Aderlass und Resorcin. *Z. Hautkr* 1990;65:223-5.
83. Brok J, Gluud LL, Gluud C. Effects of adding ribavirin to interferon to treat chronic hepatitis C infection: a systematic review and meta-analysis of randomized trials. *Arch Intern Med*. 2005; 24;165:2206-12.



84. Furuta M, Kaito M, Gabazza E, Fujita N, Ishida S, Tamaki S, Ikeda R, Wakisawa S, Hayashi H, Watanabe S, Adachi Y. Ineffective interferon treatment of chronic hepatitis C-associated porphyria cutanea tarda, but with a transient decrease in HCV RNA levels. *J Gastroenterol* 2000;35:60-2.
85. Jessner W, Der-Petrossian M, Christiansen I, Maier H, Steindl-Munda P, Gangl A, Ferenci P. Porphyria cutanea tarda during interferon/ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Hepatology* 2002 Nov;36(5):1301-2.
86. Fernandez I, Castellano G, de Salamanca RE, Colina F, Gomez de la Camara A, Moran MJ, Munoz R, Solis-Herruzo JA. Porphyria cutanea tarda as a predictor of poor response to interferon alfa therapy in chronic hepatitis C. *Scand J Gastroenterol.* 2003; 38:314-9.
87. Sheikh MY, Wright RA, Burruss J. Dramatic resolution of skin lesions associated with porphyria cutanea tarda after interferon-alpha therapy in a case of chronic hepatitis C. *Dig Dis Sci* 1998;43:529-33.
88. Okano J, Horie Y, Kawasaki H, Kondo M. Interferon treatment of porphyria cutanea tarda associated with chronic hepatitis type C. *Hepatogastroenterology* 1997;44:525-8.
89. Fernandez I, Castellano G, De Salamanca RE, Domingo MJ, Colina F, Fuertes A, Canga F. Efficacy and safety of interferon therapy in patients with porphyria cutanea tarda (PCT) and chronic hepatitis C (abstract). *J Hepatol* 1998; 28:190.
90. Takikawa H, Yamazaki R, Shoji S, Miyake K, Yamanaka M. Normalization of urinary porphyrin level and disappearance of skin lesions after successful interferon therapy in a case of chronic hepatitis C complicated with porphyria cutanea tarda. *J Hepatol* 1995;22:249-50.
91. Sarkell B, Patterson JW. Treatment of porphyria cutanea tarda of end-stage renal disease with erythropoietin. *J Am Acad Dermatol* 1993;29:499-500.
92. Sinclair PR, Gorman N, Walton HS, Bement WJ, Jacobs JM, Sinclair JF. Ascorbic acid inhibition of cytochrome P450-catalyzed uroporphyrin accumulation. *Arch Biochem Biophys* 1993;304:464-70.
93. Rocchi E, Stella AM, Cassanelli M, Borghi A, Nardella N, Seium Y, Casalgrandi G. Liposoluble vitamins and naturally occurring carotenoids in porphyria cutanea tarda. *Eur J Clin Invest* 1995;25:510-4.

94. Bassett ML, Halliday JW, Powell LW. Value of hepatic iron measurements in early hemochromatosis and determination of the critical iron level associated with fibrosis. *Hepatology* 1986; 6:24-29.
95. Burke W, Thomson E, Khoury MJ. Hereditary hemochromatosis: gene discovery and its implications for population based screening. *JAMA* 1998; 280:172-8.
96. Simon M, Bourel M, Fauchet R, Genetet B. Association of HLA-A3 and HLA-B14 antigens with idiopathic haemochromatosis. *Gut* 1976;17:332-4.
97. Stevens FM, Walters JM, Watt DW, McCarthy CF. Inheritance of idiopathic haemochromatosis. (Letter) *Lancet*1977; I: 1107.
98. Cartwright GE, Skolnick M, Amos DB, Edwards CQ, Kravitz K, Johnson A. Inheritance of hemochromatosis: linkage to HLA. *Trans Assoc Am Phys* 1978; 91: 273-281.
99. Edwards CQ, Griffen LM, Dadone MM, Skolnick MH, Kushner JP. The locus for hereditary hemochromatosis maps between HLA-A and HLA-B. (Abstract) *Cytogenet. Cell Genet* 1985; 40: 620.
100. Edwards CQ, Griffen LM, Dadone MM, Skolnick MH, Kushner J P. Mapping the locus for hereditary hemochromatosis: localization between HLA-B and HLA-A. *Am J Hum Genet* 1986; 38: 805-811.
101. David V, Paul P, Simon M, Le Gall JY, Fauchet R, Gicquel I, Dugast I, Le Mignon L, Yaouanq J, Cohen D, Bourel M. DNA polymorphism related to the idiopathic hemochromatosis gene: evidence in a recombinant family. *Hum Genet* 1986; 74: 113-120.
102. David V, Paul P, Yaouanq J, Blayau M, Fauchet R, Cohen D, Le Gall JY, Simon M. Molecular genetic approach to the hemochromatosis gene. (Abstract) *Cytogenet. Cell Genet* 1987; 46: 604.
103. Lucotte G, Coulondre C. Association between a 10 kb PvuII restriction fragment of genomic DNA with the hemochromatosis gene. *Exp. Clin. Immunogenet.* 1986; 3: 219-223.
104. Lord DK, Dunham I, Campbell RD, Bomford A, Strachan T, Cox TM. Molecular analysis of the human MHC class I region in hereditary haemochromatosis. A study by pulsed-field gel electrophoresis. *Hum Genet.*1990 Oct;85:531-6.
105. Jazwinska EC, Lee SC, Webb SI, Halliday JW, Powell LW. Localization of the hemochromatosis gene close to D6S105. *Am J Hum Genet* 1993;53:347-52.

106. Calandro LM, Baer DM, Sensabaugh GF. Characterization of a recombinant that locates the hereditary hemochromatosis gene telomeric to HLA-F. *Hum Genet* 1995; 96: 339-342.
107. Feder JN, Gnirke A, Thomas W, Tsuchihashi Z, Ruddy DA, Basava A, Dormishian F, Domingo R Jr, Ellis MC, Fullan A, Hinton LM, Jones NL, Kimmel BE, Kronmal GS, Lauer P, Lee VK, Loeb DB, Mapa FA, McClelland E, Meyer NC, Mintier GA, Moeller N, Moore T, Morikang E, Prass CE, Quintana L, Starnes SM, Schatzman RC, Brunke KJ, Drayna DT, Risch NJ, Bacon BR, Wolff R. A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary hemochromatosis. *Nat Genet* 1996; 13:399-408.
108. Lonjou C, Collins A, Ajioka R, Jorde L, Kushner JP, Morton NE. Allelic association under map error and recombinational heterogeneity: A tale of two sites. *Proc. Natl Acad* 1998; 95:11366-70.
109. Bjorkman PJ, Parham P. Structure, function, and diversity of class I major histocompatibility complex molecules. *Annu Rev Biochem* 1990; 59:253-88.
110. Jazwinska EC, Cullen LM, Busfield F, Pyper WR, Webb SI, Powell LW, Morris CP, Walsh TP. Haemochromatosis and HLA-H. (Letter) *Nature Genet* 1996;14: 249-251.
111. Jouanolle AM, Gandon G, Jezequel P, Blayau M, Campion ML, Yaouanq J, Mosser J, Fergelot P, Chauvel B, Bouric P, Carn G, Andrieux N, Gicquel I, Le Gall JY, David V. Haemochromatosis and HLA-H. *Nat Genet* 1996;14:251-2.
112. Beutler E, Gelbart T, West C, Lee P, Adams M, Blackstone R, Pockros P, Kosty M, Venditti CP, Phatak PD, Seese NK, Chorney KA, Ten Elshof AE, Gerhard GS, Chorney M. Mutation analysis in hereditary hemochromatosis. *Blood Cells Mol Dis* 1996; 22:187-94.
113. Worwood M, Shearman JK, Wallace DF, Dooley JS, Merryweather-Clarke AT, Pointon JJ, Rosenberg WMC. A simple genetic test identifies 90% of UK patients with haemochromatosis. The UK Haemochromatosis Consortium. *Gut* 1997 Dec;41:841-4.
114. Carella M, D'Ambrosio L, Totaro A, Grifa A, Valentino MA, 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* 1997; 60: 828-832.
115. Barton JC, Shih WW, Sawada-Hirai R, Acton RT, Harmon L, Rivers C, Rothenberg BE. 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* 1997; 23:135-45.
116. Jouanolle 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.
  117. Borot N, Roth M, Malfroy L, Demangel C, Vinel JP, Pascal JP, Coppin H. Mutations in the MHC class I-like candidate gene for hemochromatosis in French patients. *Immunogenetics* 1997;45:320-4.
  118. Datz C, Lalloz MR, Vogel W, Graziadei I, Hackl F, Vautier G, Layton DM, 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* 1997; 27:773-9.
  119. Olynyk JK, Cullen DJ, Aquilia S, Rossi E, Summerville L, Powell LW. A population-based study of the clinical expression of the hemochromatosis gene. *New Eng J Med* 1999; 341: 718-724.
  120. Beutler E, Felitti VJ, Koziol JA, Ho NJ, Gelbart T. Penetrance of 845G-A (C282Y) HFE hereditary haemochromatosis mutation in the USA. *Lancet* 2002; 359: 211-218.
  121. Bomford A. Genetics of haemochromatosis. *The Lancet* 2002;360:1673-80.
  122. Sanchez M, Bruguera M, Bosch J, Rodes J, Ballesta F, Oliva R. Prevalence of the Cys282Tyr and His63Asp HFE gene mutations in Spanish patients with hereditary hemochromatosis and in controls. *J Hepatol* 1998 Nov;29:725-8.
  123. Pardo A, Quintero E, Barrios Y, Bruguera M, Rodrigo L, Vila C, Acero D, Guarner C, Pascual S, Lopez L, Moreno R, Fabrega E, Andrade R, Pelaez G, Santos J, Buti M, Torres M; Grupo de Hemocromatosis Hereditaria de la AEEH. [Genotype and phenotypic expression of hereditary hemochromatosis in Spain] *Gastroenterol Hepatol*. 2004;27:437-43.
  124. 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* 1998;28:1105-9.
  125. Mariani R, Salvioni A, Corengia C, Erba N, Lanzafame C, De Micheli V, Baldini V, Arosio C, Fossati L, Trombini P, Oberkanins C, Piperno A. Prevalence of HFE

- mutations in upper Northern Italy: study of 1132 unrelated blood donors. *Dig Liver Dis.* 2003;35: 479-81.
126. Jazwinska EC, Pyper WR, Burt MJ, Francis JL, Goldwurm S, Webb SI, Lee SC, Halliday JW, Powell LW. Haplotype analysis in Australian hemochromatosis patients: evidence for a predominant ancestral haplotype exclusively associated with hemochromatosis. *Am J Hum Genet* 1995. 56: 428-433.
  127. Beckman LE, Saha N, Spitsyn V, Van Landeghem G, Beckman L. Ethnic differences in the HFE codon 282 (Cys/Tyr) polymorphism. *Hum Hered* 1997; 47: 263-267.
  128. Merryweather-Clarke AT, Pointon JJ, Shearman JD, Robson KJH. Global prevalence of putative haemochromatosis mutations. *J Med Genet* 1997;34:275-8.
  129. Rhodes DA, Raha-Chowdhury R, Cox TM, Trowsdale J. Homozygosity for the predominant Cys282Tyr mutation and absence of disease expression in hereditary haemochromatosis. *J. Med. Genet.* 1997; 34: 761-764.
  130. Press RD, Flora K, Gross C, Rabkin JM, Corless CL. Hepatic iron overload: direct HFE (HLA-H) mutation analysis vs quantitative iron assays for the diagnosis of hereditary hemochromatosis. *Am J Clin Pathol* 1998;109:577-84.
  131. Phatak PD, Ryan DH, Cappuccio J, Oakes D, Braggins C, Provenzano K, Eberly S, Sham RL. Prevalence and penetrance of HFE mutations in 4865 unselected primary care patients. *Blood Cells Mol Dis.* 2002;29:41-7.
  132. Haddow JE, Palomaki GE, McClain M, Craig W. Hereditary haemochromatosis and hepatocellular carcinoma in males: a strategy for estimating the potential for primary prevention. *J Med Screen.* 2003;10: 11-3.
  133. Asberg A, Hveem K, Thorstensen K, Ellekjer E, Kannelonning K, Fjosne U, Halvorsen TB, Smethurst HB, Sagen E, Bjerve KS. Screening for hemochromatosis: high prevalence and low morbidity in an unselected population of 65,238 persons. *Scand J Gastroenterol.* 2001; 36:1108-15.
  134. Jackson HA, Carter K, Darke C, Guttridge MG, Ravine D, Hutton RD, Napier JA, Worwood M. HFE mutations, iron deficiency and overload in 10,500 blood donors. *Br J Haematol.* 2001;114:474-84.
  135. Adams PC, Kertesz AE, McLaren CE, Barr R, Bamford A, 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* 2000 May;31(5):1160-4.

136. Njajou OT, Alizadeh BZ, van Duijn CM. Is genetic screening for hemochromatosis worthwhile? *Eur J Epidemiol.* 2004;19:101-8.
137. Galhenage SP, Viiala CH, Olynyk JK. Screening for hemochromatosis: patients with liver disease, families, and populations. *Curr Gastroenterol Rep* 2004; 6:44-51.
138. Mura C, Raguenes O, Ferec C. HFE mutations analysis in 711 hemochromatosis probands: evidence for S65C implication in mild form of hemochromatosis. *Blood* 1999; 93: 2502-5.
139. Beutler E. genetic irony beyond haemochromatosis: clinical effects on HLA-H mutations. *Lancet* 1997; 349: 296-7.
140. Risch N. Haemochromatosis, HFE and genetic complexity. (Letter) *Nature Genet.* 1997. 17: 375-376.
141. Bulaj ZJ, Griffen LM, Jorde LB, Edwards CQ, Kushner JP. Clinical and biochemical abnormalities in people heterozygous for hemochromatosis. *N Engl J Med* 1996;12;335:1799-805.
142. Moirand R, Jouanolle AM, Brissot P, Le Gall JY, David V, Deugnier Y. Phenotypic expression of HFE mutations: a French study of 1110 unrelated iron-overloaded patients and relatives. *Gastroenterology* 1999;11:372-7.
143. Beutler E, Felitti V, Gelbart T, Ho N. The effect of HFE genotypes on measurements of iron overload in patients attending a health appraisal clinic. *Ann Intern Med* 2000; 133:329-37.
144. Fargion S, Stazi MA, Fracanzani AL, Mattioli M, Sampietro M, Tavazzi D, Bertelli C, Patriarca V, Mariani C, Fiorelli G. Mutations in the HFE gene and their interaction with exogenous risk factors in hepatocellular carcinoma. *Blood Cells Mol Dis* 2001; 27:505-11.
145. Aguilar-Martinez P, Bismuth M, Picot MC, Thelcide C, Pageaux G-P, Blanc F, Blanc P, Schved J-F, Larrey D. Variable phenotypic presentation of iron overload in H63D homozygotes: are genetic modifiers the cause? *Gut* 2001; 48: 836-842.
146. Barosi G, Salvaneschi L, Grasso M, Martinetti M, Marchetti M, Bodini U, Reggiani A, D'Agostino F, Nalli G, Degiuli A, De Silvestri A, Arbustini E. High prevalence of a screening-detected, HFE-unrelated, mild idiopathic iron overload in Northern Italy. *Haematologica.* 2002; 87:472-8.
147. Gochee PA, Powell LW, Cullen DJ, Du Sart D, Rossi E, Olynyk JK. A population-based study of the biochemical and clinical expression of the H63D

- hemochromatosis mutation. *Gastroenterology*. 2002;122:646-51. Erratum in: *Gastroenterology* 2002;122:1191.
148. McKie AT, Barrow D, Latunde-Dada GO, Rolfs A, Sager G, Mudaly E, Mudaly M, Richardson C, Barlow D, Bomford A, Peters TJ, Raja KB, Shirali S, Hediger MA, Farzaneh F, Simpson RJ. An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron. *Science* 2001; 291:1755-9.
  149. Fleming RE, Migas MC, Zhou XY, Jiang J, Britton RS, Brunt EM, Tomatsu S, Waheed A, Bacon BR, Sly WS. Mechanism of increased iron absorption in murine model of hereditary hemochromatosis: increased duodenal expression of the iron transporter DMT1. *Proc Nat Acad Sci* 1999; 96: 3143-3148.
  150. Vulpe CD, Kuo Y, Murphy TL, Cowley L, Askwith C, Libina N, Gitschier J, Anderson GH. Hephaestin, a ceruloplasmin homologue implicated in intestinal iron transport, is defective in the sla mouse. *Nat Genet* 1999;21:195-99.
  151. Waheed A, Parkkila S, Saarnio J, Fleming RE, Zhou XY, Tomatsu, Britton RS, Bacon BR, Sly WS. Association of HFE protein with transferrin receptor in crypt enterocytes of human duodenum. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 1579-84.
  152. Waheed A, Grubb JH, Yan Zhou X, Tomatsu S, Fleming R, Costaldi M, Britton R, Bacon B, Sly W. Regulation of transferrin-mediated iron uptake by HFE, the protein defective in hereditary hemochromatosis. *PNAS* 2002;99:3117-22.
  153. Parkkila S, Waheed A, Britton RS, Feder JN, Tsuchihashi Z, Schatzman RC, Bacon BR, Sly WS. Immunohistochemistry of HLA-H, the protein defective in patients with hereditary hemochromatosis, reveals unique pattern of expression in gastrointestinal tract. *Proc Nat Acad Sci* 1997; 94: 2534-2539.
  154. Feder JN, Penny DM, Irrinki A, Lee VK, Lebron JA, Watson N, Tsuchihashi Z, Sigal E, Bjorkman PJ, Schatzman RC. The hemochromatosis gene product complexes with the transferrin receptor and lowers its affinity for ligand binding. *Proc Natl Acad Sci* 1998; 95: 1472-77.
  155. Lebron JA, Bennett MJ, Vaughn DE, Chirino AJ, Snow PM, Mintier GA, Feder JN, Bjorkman PJ. Crystal structure of the hemochromatosis protein HFE and characterization of its interaction with transferrin receptor. *Cell* 1998; 93: 111-123.
  156. Lebron JA, West AP, Bjorkman PJ. *J Mol Biol* 1999;289:1109-18.
  157. Pietrangelo A, Rocchi E, Casalgrandi G, Rigo G, Ferrari A, Perini M, Ventura E, Cairo G. *Gastroenterology* 1992;102:802-809.
  158. Zoller H, Pietrangelo A, Vogel W, Weiss G. *Lancet* 1999;353:2120-23.

159. Zoller H, Koch RO, Theurl I, Obrist P, Pietrangelo A, Montosi G, Haile DJ, Vogel W, Weiss G. *Gastroenterology* 2001;120:1412-19.
160. Bennett MJ, Lebron JA, Bjorkman PJ. Crystal structure of the hereditary haemochromatosis protein HFE complexed with transferrin receptor. *Nature* 2000 Jan 6; 403(6765):46-53.
161. Feder JN, Tsuchihashi Z, Irrinki A, Lee VK, Mapa FA, Morikang E, Prass CE, Starnes SM, Wolff RK, Parkkila S, Sly WS, Schatzman RC. The hemochromatosis founder mutation in HLA-H disrupts beta2-microglobulin interaction and cell surface expression. *J Biol Chem* 1997; 272:14025-14028.
162. Waheed A, Parkkila S, Zhou XY, Tomatsu S, Tsuchihashi Z, Feder JN, Schatzman RC, Britton RS, Bacon BR, Sly WS. Hereditary hemochromatosis: effects of C282Y and H63D mutations on association with beta2-microglobulin, intracellular processing, and cell surface expression of the HFE protein in COS-7 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997 Nov 11;94(23):12384-9.
163. Roy C, Carlson E, Anderson E, Basava A, Starnes S, Feder J, Enns C. Interaction of the ectodomain of HFE with the transferrin receptor are critical for iron homeostasis in cells. *FEBS Lett* 2000;484:271-4.
164. Townsend A, Drakesmith H. Role of HFE in iron metabolism, hereditary haemochromatosis, anaemia of chronic disease, and secondary iron overload. *Lancet* 2002. 359: 786-790.
165. Frazer DM, Anderson GJ. The orchestration of body iron intake: how and where do enterocytes receive their cues? *Blood cells, molecules, and diseases* 2003; 30:288-97.
166. Steele TM, Frazer DM, Anderson GJ. Systemic regulation of intestinal iron absorption. *IUBMB Life*. 2005;57:499-503.
167. West AP, Giannetti AM, Herr AB, Bennett MJ, Nangiana JS, Pierce JR, Weiner LP, Snow PM, Bjorkman PJ. Mutational analysis of the transferrin receptor reveals overlapping HFE and transferrin binding sites. *J Mol Biol* 2001;313:385-7.
168. McLaren GD, Nathanson MH, Jacobs A, Trevett D, Thomson W. Regulation of intestinal iron absorption and mucosal iron kinetics in hereditary hemochromatosis. *J Lab Clin Med* 1991;117:390-401.
169. Ajioka RS, Levy JE, Andrews NC, Kushner JP. Regulation of iron absorption in Hfe mutant mice. *Blood* 2002;100:1465-9.



170. Roetto A, Papanikolaou G, Politou M, Alberti F, Girelli D, Christakis J, Loukopoulos D, Camaschella C. Mutant antimicrobial peptide hepcidin is associated with severe juvenile hemochromatosis. *Nat Genet* 2003 Jan; 33(1): 21-2.
171. Waalen J, Felitti V, Gelbart T, Ho NJ, Beutler E. Penetrance of hemochromatosis. *Blood Cells Mol Dis* 2002; 29:418-32.
172. Sanchez M, Villa M, Ingelmo M, Sanz C, Bruguera M, Ascaso C, Oliva R. Population screening for hemochromatosis: a study in 5370 Spanish blood donors. *J Hepatol* 2003; 38:745-50.
173. Njajou OT, Houwing-Duistermaat JJ, Osborne RH, Vaessen N, Vergeer J, Heeringa J, Pols HA, Hofman A, van Duijn CM. A population-based study of the effect of the HFE C282Y and H63D mutations on iron metabolism. *Eur J Hum Genet* 2003;11:225-31.
174. De Gobbi M, D'Antico S, Castagno F, Testa D, Merlini R, Bondi A, Camaschella C. Screening selected blood donors with biochemical iron overload for hemochromatosis: a regional experience. *Haematologica* 2004; 89:1161-7.
175. 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* 2001; 34:523-8.
176. Andersen RV, Tybjaerg-Hansen A, Appleyard M, Birgens H, Nordestgaard BG. Hemochromatosis mutations in the general population: iron overload progression rate. *Blood* 2004 Apr 15;103:2914-9.
177. Burt MJ, George PM, Upton JD, Collett JA, Frampton CMA, Chapman TM, Walmsley TA, Chapman BA. The significance of haemochromatosis gene mutations in the general population: implications for screening. *Gut* 1998; 43: 830-836.
178. Raddatz D, Legler T, Lynen R, Addicks N, Ramadori G. HFE genotype and parameters of iron metabolism in German first-time blood donors - evidence for an increased transferrin saturation in C282Y heterozygotes. *Z Gastroenterol* 2003;41:1069-76.
179. Sham RL, Ou CY, Cappuccio J, Braggins C, Dunnigan K, Phatak PD. Correlation between genotype and phenotype in hereditary hemochromatosis: analysis of 61 cases. *Blood Cells Mol Dis* 1997;23:314-20.

180. Nash S, Marconi S, Sikorska K, Naeem R, Nash G. Role of liver biopsy in the diagnosis of hepatic iron overload in the era of genetic testing. *Am J Clin Pathol* 2002; 118:73-81.
181. Brunt EM, Olynyk JK, Britton RS, Janney CG, Di Bisceglie AM, Bacon BR. Histological evaluation of iron in liver biopsies: relationship to HFE mutations. *Am J Gastroenterol* 2000; 95:1788-93.
182. Moodie SJ, Ang L, Stenner JM, Finlayson C, Khotari A, Levin GE, Maxwell JD. Testing for haemochromatosis in a liver clinic population: relationship between ethnic origin, HFE gene mutations, liver histology and serum iron markers. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002;14:223-9.
183. Lim EM, Rossi E, De Boer WB, Reed WD, Jeffrey GP. Hepatic iron loading in patients with compound heterozygous HFE mutations. *Liver Int* 2004;24:631-6.
184. Kazemi-Shirazi L, Datz C, Maier-Dobersberger T, Kaserer K, Hackl F, Polli C, Steindl PE, Penner E, Ferenci P. The relation of iron status and hemochromatosis gene mutations in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 1999;116:127-34.
185. Thorburn D, Curry G, Spooner R, Spence E, Oien K, Halls D, Fox R, McCrudden EA, MacSween RN, Mills PR. The role of iron and haemochromatosis gene mutations in the progression of liver disease in chronic hepatitis C. *Gut* 2002; 50:248-52.
186. Tung BY, Emond MJ, Bronner MP, Raaka SD, Cotler SJ, Kowdley KV. Hepatitis C, iron status, and disease severity: relationship with HFE mutations. *Gastroenterology* 2003;124:318-26.
187. George DK, Goldwurm S, MacDonald GA, Cowley LL, Walker NI, Ward PJ, Jazwinska EC, Powell LW. Increased hepatic iron concentration in nonalcoholic steatohepatitis is associated with increased fibrosis. *Gastroenterology* 1998 Feb;114:311-8.
188. Valenti L, Dongiovanni P, Fracanzani AL, Santorelli G, Fatta E, Bertelli C, Taioli E, Fiorelli G, Fargion S. Increased susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease in heterozygotes for the mutation responsible for hereditary hemochromatosis. *Dig Liver Dis* 2003 Mar; 35:172-8.
189. Britton RS, Bacon BR, Recknagel RO. Lipid peroxidation and associated hepatic organelle dysfunction in iron overload. *Chem Phys Lipids* 1987; 45:207-39.

190. Young IS, Trouton TG, Torney JJ, McMaster D, Callendar ME, Trimble ER. Genetic hemochromatosis and Wilson's disease. role for oxidant stress? *Free Rad Biol Med* 1994;16:393-7.
191. Houglum K, Ramm GA, Crawford DH, Witztum JL, Powell LW, Chojkier M. Excess iron induces hepatic transforming growth factor beta1 in genetic hemochromatosis: role of oxidative stress. *Hepatology* 1997; 27:605-10.
192. Smith BC, Gorve J, Guzail MA, Day CP, Daly AK, Burt AD, Bassendine MF. Heterozygosity for hereditary hemochromatosis is associated with more fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology* 1998 Jun; 27:1695-9.
193. 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* 1998 May; 114:996-1002.
194. Gehrke SG, Stremmel W, Mathes I, Riedel HD, Bents K, Kallinowski B. Hemochromatosis and transferrin receptor gene polymorphisms in chronic hepatitis C: impact on iron status, liver injury and HCV genotype. *J Mol Med* 2003; 81:780-7.
195. Hellerbrand C, Poppl A, Hartmann A, Scholmerich J, Lock G. HFE C282Y heterozygosity in hepatocellular carcinoma: evidence for an increased prevalence. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2003; 1:279-84.
196. Cauza E, Peck-Radosavljevic M, Ulrich-Pur H, Datz C, Gschwantler M, Schoniger-Hekele M, Hackl F, Polli C, Rasoul-Rockenschaub S, Muller C, Wrba F, Gangl A, Ferenci P. Mutations of the HFE gene in patients with hepatocellular carcinoma. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 442-7.
197. Boige V, Castera L, de Roux N, Ganne-Carrie N, Ducot B, Pelletier G, Beaugrand M, Buffet C. Lack of association between HFE gene mutations and hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis. *Gut* 2003; 52: 1178-81.
198. Ritter B, Safwenberg J, Olsson KS. HLA as a marker of the hemochromatosis gene in Sweden. *Hum Genet* 1984; 68: 62-66.
199. Pozzato G, Zorat F, Nascimben F, Gregorutti M, Comar C, Baracetti S, Vatta S, Bevilacqua E, Begnano A, Crovella S, Amoroso A. Haemochromatosis gene mutations in a clustered Italian population: evidence of high prevalence in people of Celtic ancestry. *Europ J Hum Genet* 2001; 9: 445-451.

200. Pier GB, Grout M, Zaidi T, Meluleni G, Mueschenborn SS, Banting G, Ratcliff R, Evans MJ, Colledge WH. Salmonella typhi uses CFTR to enter intestinal epithelial cells. *Nature* 1998 7; 393(6680):79-82.
201. Cullen LM, Summerville L, Glassick TV, Crawford DHG, Powell LW, Jazwinska EC. Neonatal screening for the haemochromatosis defect. *Blood* 1997; 90:4236-7.
202. Rochette J, Pointon JJ, Fisher CA, Perera G, Arambepola M, Kodikara Arichchi DS, De Silva S, Vandwalle JL, Monti JP, Old JM, Merryweather-Clarke AT, Weatherall DJ, Robson KJH. Multicentric origin of hemochromatosis gene (HFE) mutations. *Am J Hum Genet* 1999; 64: 1056-1062.
203. Porto G, De Sousa M. Variation of hemochromatosis prevalence and genotype in national groups. En: Barton JC, Edwards CQ (eds) *Hemochromatosis: genetics, pathophysiology, diagnosis and treatment*. Cambridge University Press, Cambridge 2000. pp 51-62.
204. Cardoso CS, Alves H, Mascarenhas M, Goncalves R, Oliveira P, Rodrigues P, Cruz E, de Sousa M, Porto G. Co-selection of the H63D mutation and the HLA-A29 allele: a new paradigm of linkage disequilibrium? *Immunogenetics* 2002; 53: 1002-8.
205. Crawford DH, Powell LW, Leggett BA, Francis JS, Fletcher LM, Webb SI, Halliday JW, Jazwinska EC. Evidence that the ancestral haplotype in Australian hemochromatosis patients may be associated with a common mutation in the gene. *Am J Hum Genet* 1995; 57:362-367.
206. Beutler E, Felitti VJ, Ho NJ, Gelbart T. Commentary on HFE S65C variant is not associated with increased transferrin saturation in voluntary blood donors by Naveen Arya, Subrata Chakrabarti, Robert A. Hegele, Paul C. Adams. *Blood Cells Mol Dis* 1999; 25:358-60.
207. Trombini P, Mauri V, Salvioni A, Corengia C, Arosio C, Piperno A. S65c frequency in Italian patients with hemochromatosis, porphyria cutanea tarda and chronic viral hepatitis with iron overload. *Haematologica* 2001; 86:316-7.
208. Asberg A, Thorstensen K, Hveem K, Bjerve KS. Hereditary hemochromatosis: the clinical significance of the S65C mutation. *Genet Test* 2002; 6: 59-62.
209. Arya N, Chakrabarti S, Hegele RA, Adams PC. HFE S65C variant is not associated with increased transferrin saturation in voluntary blood donors. *Blood Cells Mol Dis* 1999; 25:354-7.

210. Lamon JM, Marynick SP, Roseblatt R, Donnelly S. Idiopathic hemochromatosis in a young female. A case study and review of the syndrome in young people. *Gastroenterology* 1979; 76:178-83.
211. 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* 1997; 5:371-5.
212. Papanikolaou G, Samuels ME, Ludwig EH, MacDonald ML, Franchini PL, Dube MP, Andres L, MacFarlane J, Sakellaropoulos N, Politou M, Nemeth E, Thompson J, Risler JK, Zaborowska C, Babakaiff R, Radomski CC, Pape TD, Davidas O, Christakis J, Brissot P, Lockitch G, Ganz T, Hayden MR, Goldberg YP. Mutations in HFE2 cause iron overload in chromosome 1q-linked juvenile hemochromatosis. *Nat Genet* 2004; 36: 77-82.
213. Njajou OT, Vaessen N, Joosse M. A mutation in SLC11A3 is associated with autosomal dominant hemochromatosis. *Nat Genet* 2001;28:213-4.
214. West AP Jr, Bennett MJ, Sellers VM, Andrews NC, Enns CA, Bjorkman PJ. Comparison of the interactions of transferrin receptor and transferrin receptor 2 with transferrin and the hereditary hemochromatosis protein HFE. *J Biol Chem* 2000; 275:38135-8.
215. 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. *Nat Genet* 2000 May; 25:14-5.
216. Hunter HN, Fulton DB, Ganz T, Vogel HJ. The solution structure of human hepcidin, a peptide hormone with antimicrobial activity that is involved in iron uptake and hereditary hemochromatosis. *J Biol Chem* 2002; 277:37597-603.
217. Nicolas G, Bennoun M, Porteu A, Mativet S, Beaumont C, Grandchamp B. Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver hepcidin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99:4596-601.
218. Bridle KR, Frazer DM, Wilkins SJ, Dixon JL, Purdie DM, Crawford DH, Subramaniam VN, Powell LW, Anderson GJ, Ramm GA. Disrupted hepcidin regulation in HFE-associated haemochromatosis and the liver as a regulator of body iron homeostasis. *Lancet* 2003; 361:669-73.
219. Nicolas G, Andrews NC, Kahn A, Vaulont S. Hepcidin, a candidate modifier of the hemochromatosis phenotype in mice. *Blood* 2004;103:2841-3.

220. 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 USA* 2001; 98:8780-85.
221. Roetto A, Daraio F, Porporato P, Caruso R, Cox TM, Cazzola M, Gasparini P, Piperno A, Camaschella C. Screening hepcidin for mutations in juvenile hemochromatosis: identification of a new mutation (C70r). *Blood* 2003; 15; 103:2407-9.
222. Waldenstrom J, Haeger-Aronsen B. Different patterns of human porphyria. *Br Med J* 1963; 5352:272-6.
223. Petrozzi C, Nixon RK. Hemochromatosis and porphyria cutanea tarda. *Henry Ford Hosp Med J* 1965;13:285-8.
224. Fargion S, Fracanzani AL, Romano R, Cappellini MD, Fare M, Mattioli M, Piperno A, Ronchi G, Fiorelli G. Genetic hemochromatosis in Italian patients with porphyria cutanea tarda: possible explanation for iron overload. *J Hepatol* 1996 May; 24(5):564-9.
225. Kushner JP, Edwards CQ, Dadone MM, Skolnick MH. Heterozygosity for HLA-linked hemochromatosis as a likely cause of the hepatic siderosis associated with sporadic porphyria cutanea tarda. *Gastroenterology* 1985 May; 88:1232-8.
226. Adams PC, Powell LW. Porphyria cutanea tarda and HLA-linked hemochromatosis-all in the family? *Gastroenterology* 1987 Jun; 92:2033-5.
227. Roberts AG, Whatley SD, Morgan RR, Worwood M, Elder GH. Increased frequency of the haemochromatosis Cys282Tyr mutation in sporadic porphyria cutanea tarda. *Lancet* 1997; 349:321-323.
228. Santos M, Clevers HC, Marks JJM. Mutations of the hereditary hemochromatosis candidate gene HLA-H in porphyria cutanea tarda. *N Engl J Med* 1997; 336: 1327-1328.
229. Sampietro M, Piperno A, Lupica L, Arosio C, Vergani A, Corbetta N, Malosio I, Mattioli M, Francanzani AL, Cappellini MD, Fiorelli G, Fargion S. High Prevalence of the His63Asp HFE Mutation in Italian Patients With Porphyria Cutanea Tarda. *Hepatology* 1998; 27:181-184.
230. D'Amato M, Macri A, Griso D, Biolcati G, Ameglio F. Are His63Asp or Cys282Tyr HFE mutations associated with porphyria cutanea tarda? Data of patients from central and southern Italy. *J Invest Dermatol* 1998; 111:1241-2.

231. Christiansen L, Bygum A, Thomsen K, Brandrup F, Horder M, Petersen NE. Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the hemochromatosis (HFE) gene: impact of HFE gene mutations on the manifestation of porphyria cutanea tarda. *Clin Chem* 1999; 45:2025-6.
232. Enriquez de Salamanca R, Morales P, Castro MJ, Rojo R, González M, Arnaiz-Villena A. The most frequent HFE allele linked to Porphyria Cutanea tarda in Mediterraneans is H63Asp. *Hepatology* 1999; 30:819-20.
233. 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. *Hepatology* 1999; 30:1531-2.
234. Martinelli AL, Zago MA, Roselino AM, Filho AB, Villanova MG, Secaf M, Tavella MH, Ramalho LN, Zucoloto S, Franco RF. Porphyria cutanea tarda in Brazilian patients: association with hemochromatosis C282Y mutation and hepatitis C virus infection. *Am J Gastroenterol* 2000; 95:3516-21.
235. Tannapfel A, Stolzel U, Kostler E, Melz S, Richter M, Keim V, Schuppan D, Wittekind C. C282Y and H63D mutation of the hemochromatosis gene in German porphyria cutanea tarda patients. *Virchows Arch* 2001; 439:1-5.
236. Dereure O, Aguilar-Martinez P, Bessis D, Perney P, Vallat C, Guillot B, Blanc F, Guilhou JJ. HFE mutations and transferrin receptor polymorphism analysis in porphyria cutanea tarda: a prospective study of 36 cases from southern France. *Br J Dermatol* 2001; 144:533-9.
237. Skowron F, Berard F, Grezard P, Wolf F, Morel Y, Perrot H. [Role of the hemochromatosis gene in porphyria cutanea tarda. Prospective study of 56 cases] *Ann Dermatol Venereol* 2001;128:600-4.
238. Lamoril J, Andant C, Gouya L, Malonova E, Grandchamp B, Martasek P, Deybach JC, Puy H. Hemochromatosis (HFE) and transferrin receptor-1 (TFRC1) genes in sporadic porphyria cutanea tarda (sPCT). *Cell Mol Biol* 2002;48:33-41.
239. Egger NG, Goeger DE, Payne DA, Miskovsky EP, Weinman SA, Anderson KE. Porphyria cutanea tarda: multiplicity of risk factors including HFE mutations, hepatitis C, and inherited uroporphyrinogen decarboxylase deficiency. *Dig Dis Sci* 2002; 47:419-26.
240. Malina L, Zdarsky E, Stransky J, Dandova S, Michalikova H. Are hepatitis C infection and C282Y mutation in hemochromatosis gene independent factors for Porphyria cutanea tarda? *Dermatology* 2002; 205:76-7.

241. Hift RJ, Corrigan AV, Hancock V, Kannemeyer J, Kirsch RE, Meissner PN. Porphyrinuria cutanea tarda: the etiological importance of mutations in the HFE gene and viral infection is population-dependent. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2002 Dec; 48:853-9.
242. Chiavérini C, Halimi G, Ouzan D, Halfon P, Ortonne JP, Lacour JP. Porphyrinuria cutanea tarda, C282Y, H63D and S65C gene mutations and hepatitis C infection: a study from Southern France. *Dermatology* 2003; 206:212-6.
243. Stölzel U, Kostler E, Schuppan D, Richter M, Wollina U, Doss M, Wittekind C, Tannapfel A. Hemochromatosis (HFE) gene mutations and response to chloroquine in porphyria cutanea tarda. *Arch Dermatol* 2003; 139: 309-313.
244. Nagy Z, Kószó F, Pár A, Horkay I, Horány M, Karádi O, Rumi Jr., Morvay M, Varga V, Dobozy A, Mózsik G. Hemochromatosis (HFE) gene mutations and hepatitis C virus infection as risk factors for porphyria cutanea tarda in Hungarian patients. *Liver Int* 2004; 24:16-20.
245. Rossmann-Ringdahl I, Olsson R. Porphyrinuria cutanea tarda in a Swedish population: risk factors and complications. *Acta Derm Venereol* 2005; 85(4):337-41.
246. Mendez M, Sorkin L, Rossetti MV, Astrin KH, Del Baltel AM, Parera VE, Aizencang G, Desnick RJ. Familial porphyria cutanea tarda: characterization of seven novel uroporphyrinogen decarboxylase mutations and frequency of common hemochromatosis alleles. *Am J Hum Genet* 1998; 63:1373-5.
247. McCrossini. Porphyrinuria cutanea tarda in south-east New South Wales. *Australas J Dermatol* 2002; 43:285-8.
248. Furuyama K, Kondo M, Hirata K, Fujita II, Sassa S, Extremely rare association of HFE mutations with PCT in Japanese patients (Letter). *Hepatology* 1999; 30:1532-3.
249. Elder GH, Worwood M. Mutations in the hemochromatosis gene, porphyria cutanea tarda and iron overload. *Hepatology* 1998; 27:289-91.
250. Blake D, Poulos V, Rossi R. Diagnosis of porphyria-recommended methods for peripheral laboratories. *The Clinical Biochemis Reviews* 1992; 13: S1-S24.
251. Mehrany K, Drage LA, Brandhagen DJ, Pittelkow MR. Association of porphyria cutanea tarda with hereditary hemochromatosis. *J Am Acad Dermatol.* 2004; 51:205-11.



252. Schoniger-Hekele M, Muller C, Polli C, Wrba F, Penner E, Ferenci P. Liver pathology in compound heterozygous patients for hemochromatosis mutations. *Liver* 2002; 22:295-301.
253. McLaren CE, Barton JC, Adams PC, Harris EL, Acton RT, Press N, Reboussin DM, McLaren GD, Sholinsky P, Walker AP, Gordeuk VR, Leindecker-Foster C, Dawkins FW, Eckfeldt JH, Mellen BG, Speechley M, Thomson E; Hemochromatosis and Iron Overload Study Research Investigators. Hemochromatosis and Iron Overload Screening (HEIRS) study design for an evaluation of 100,000 primary care-based adults. *Am J Med Sci* 2003; 325:53-62.
254. Lauret E, Rodriguez M, Gonzalez S, Linares A, Lopez-Vazquez A, Martinez-Borra J, Rodrigo L, Lopez-Larrea C. HFE gene mutations in alcoholic and virus-related cirrhotic patients with hepatocellular carcinoma. *Am J Gastroenterol* 2002; 97:1016-21.
255. Racchi O, Mangerini R, Rapezzi D, Gaetani GF, Nobile MT, Picciotto A, Ferraris AM. Mutations of the HFE gene and the risk of hepatocellular carcinoma. *Blood Cells Mol Dis* 1999; 25:350-3.
256. Hezode C, Cazeneuve C, Coue O, Roudot-Thoraval F, Lonjon I, Bastie A, Duvoux C, Pawlotsky JM, Zafrani ES, 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* 1999; 31:979-84.
257. Cruz-Rojo J, Fontanellas A, Moran-Jimenez MJ, Navarro-Ordonez S, Garcia-Bravo M, Mendez M, Munoz-Rivero MC, de Salamanca RE. Precipitating / aggravating factors of porphyria cutanea tarda in Spanish patients. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2002; 48:845-52.
258. Instituto Nacional de Estadística (INE). Módulo de Salud 1999. Distribución de la población por edad, sexo y situación actual en relación al consumo de alcohol.