L'emocromatosi: diagnostica di laboratorio

P. Doretto

Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera "S. Maria degli Angeli", Pordenone

Riassunto

L'emocromatosi è una sindrome clinica caratterizzata dall'accumulo tossico di ferro nel parenchima di organi vitali quali fegato, cuore e ghiandole endocrine causata dalla mutazione di geni che limitano l'ingresso del ferro nel sangue. La mutazione dei geni coinvolti, che codificano per proteine quali HFE, l'epcidina, il recettore 2 della transferrina, l'emojuvellina e la ferroportina, ha come effetto patogenetico comune la deficienza o la resistenza all'epcidina, denominatore patogenetico comune a tutte le forme di questa sindrome. L'emocromatosi è generalmente associata all'omozigosi del polimorfismo C282Y di HFE, comune nelle popolazioni Caucasiche; tuttavia solo una minoranza presenta l'espressione fenotipica completa della malattia, generalmente in concomitanza di fattori modificatori quali l'abuso alcolico. Il work-up diagnostico deve non solo identificare la malattia ma quantificare il sovraccarico di ferro, definire lo stadio della malattia e identificare i fattori di rischio per la progressione e le complicanze precoci. I cinque successivi step comprendono l'individuazione della popolazione target su cui eseguire l'indagine; l'esecuzione della saturazione della transferrina e della ferritina; se la saturazione della transferrina è >45%, l'esecuzione di tests genetici di primo livello per le mutazioni C282Y e H63D del gene HFR e, in caso di negatività, di secondo livello per la ricerca di mutazioni più rare; la quantificazione del sovraccarico del ferro con esami invasivi (biopsia epatica) o non invasivi (ferritina, RMN SQUID); la stadiazione delle manifestazioni fenotipiche.

Summary

The laboratory diagnosis of hemochromatosis

Hemochromatosis is a clinical syndrome characterized by the toxic accumulation of iron in parenchymal cells of vital organs such as liver, heart and endocrine glands caused by mutations that affect genes that limit the iron entry into blood. The mutation of genes that codified proteins such as HFE, hepcidin, transferrin receptor 2, the hemojuvellina and ferroportin, has the effect of common pathogenetic hepcidin deficiency or resistance, common pathogenetic denominator in all forms of this syndrome. Hemochromatosis is usually associated to homozygosis for C282Y polymorphism in HFE, common in Caucasian populations, but only a minority has the full phenotypic expression of the disease, usually in association with abuse alcohol or other modifying factors. The diagnostic work-up should not only identify the disease but to quantify the iron overload, define the stage of disease and identify risk factors for progression and early complications. The five successive steps include identification of the target population on which to run the investigation; evaluation for transferrin saturation and ferritin; if the transferrin saturation is >45%, perform genetic testing for C282Y and H63D mutations of HFE, in case of negativity, second-line genetic testing for rarer mutations; quantify iron overload by invasive (liver biopsy) or noninvasive assessments (ferritin, NMR SQUID); stages the phenotypic manifestations.

Key-words: hemochromatosis, HFE, hepcidin, iron overload.

Definizione di emocromatosi e classificazione

L'emocromatosi è da sempre considerata una patologia cronica e progressiva conseguente all'accumulo di una eccessiva quantità di ferro nel parenchima di vari organi bersaglio. Il termine emocromatosi fu introdotto per la prima volta dal patologo tedesco von Recklinghausen nel 1889 per indicare una sindrome caratterizzata da diabete mellito, cirrosi epatica e colorazione bronzina della cute già descritta per la prima volta nel 1865 dal medico francese Trousseau. Sulla base del rilievo di alcuni casi familiari, Sheldon nel 1935 ipotizzò l'ereditarietà dell'emocromatosi, confermata solo nel 1974 quando ne fu dimostrata la trasmissione autosomica recessiva. Due anni dopo, Simon e collaboratori, riscontrarono una stretta associazione tra

Ricevuto: 01-09-2010 Pubblicato on-line: 01-10-2010

Corrispondenza a: Dott. Paolo Doretto, Dipartimento di Medicina di Laboratorio, SOC di Patologia Clinica, Azienda Ospedaliera "S. Maria degli Angeli", Via Montereale n. 24, 33170 Pordenone. Tel. 0434-399321, fax 0434-399906, e-mail: paolo.doretto@aopn.fvg

emocromatosi e l'allele A3 del sistema maggiore di istocompatibilità (MHC) situato sul braccio corto del cromosoma 6. Finalmente Federer e collaboratori nel 1996 mapparono su tale cromosoma il gene responsabile della maggior parte dei casi di emocromatosi, denominato *HFE*[1]. Dal 2000 al 2004 si individuarono ulteriori 4 geni coinvolti in altrettante forme clinicamente distinguibili di emocromatosi. Sulla base dei geni coinvolti, il database dell'OMIM (Online Mandelian Inheritance in Man)[2] ha proposto la classificazione dell'emocromatosi ereditaria (EE) in 4 tipi:

- tipo 1 o emocromatosi HFE: mutazione del gene *HFE*, cromosoma 6, posizione 6p21.3, proteina alterata: *HFE*;
- tipo 2 o emocromatosi giovanile;
  tipo 2 A: mutazione del gene *HJV*, cromosoma 1q21, proteina alterata: emojuvelina (HJV);
  tipo 2 B: mutazione del gene *HAMP*, cromosoma 19q13.1, proteina alterata: epcidina;
- tipo 3 o emocromatosi TfR2: mutazione del gene *TfR2*, cromosoma 19q13.1, proteina alterata: recettore 2 della transferrina (TfR2);
- tipo 4 o emocromatosi FNR: mutazione del gene *FNR*, cromosoma 2q32, proteina alterata: ferroportina (FPN).

Tale classificazione è stata criticata perché non è né genotipica né fenotipica, ma piuttosto un misto delle due, non evidenzia i casi atipici caratterizzati da una combinazione di varianti geniche (ereditarietà digenica); non include tutte le forme di emocromatosi. Dalla scoperta del gene *HFE* i notevoli ulteriori progressi fatti nelle conoscenze dell'emocromatosi e del metabolismo del ferro hanno reso evidente come quella che un tempo era considerata un'entità unica sul piano clinico e genetico, in realtà sia una condizione geneticamente eterogenea, non sempre ereditata con modalità autosomica recessiva, con penetranza incompleta ed espressività clinica estremamente variabile.

E' tempo di una revisione della definizione storica di emocromatosi su base fisiopatologica. In quest'ottica l'emocromatosi viene oggi considerata una sindrome ben definita di sovraccarico cronico di ferro di origine genetica che ha come comune meccanismo patogenetico l'eccessivo, rispetto alle richieste dell'eritrone, ingresso di ferro nel sangue con aumento nella saturazione della transferrina sierica (Tf), deputata al trasporto di ferro alle cellule. La conseguenza è l'accumulo di ferro nelle cellule parenchimali di vari organi e sviluppo di cirrosi, diabete, ipogonadismo, cardiomiopatia, artropatia e pigmentazione cutanea, senza alterazione dell'attività eritropoietica.

Ruolo patogenetico centrale è la ridotta sintesi o "resistenza" all'epcidina, l'ormone che regola l'ingresso del ferro nel sangue, conseguenza o di mutazioni del gene *HAMP* o di mutazioni che impediscono l'interazione dell'epcidina con la *FPN*, proteina che regola il rilascio di ferro dalle cellule o di mutazione dei geni che regolano la sintesi dell'epcidina, quali *HFE, TfR2* e *HJV*[3]. Questo ha portato a rivedere anche la classificazione delle condizioni da sovraccarico di ferro con distinzione tra forme primitive e secondarie. Le prime sono caratterizzate da un difetto geneticamente determinato nel sistema di regolazione del metabolismo del ferro; comprendono l'emocromatosi ereditaria nelle sue varie espressioni genetiche e cliniche ed altre rare forme ereditarie da mutazione dei geni della ceruloplasmina, della Tf, del DMT1, della ferritina H, la porfiria cutanea tarda, l'atassia di Friedreich. Le forme secondarie (emocromatosi secondarie o emosiderosi), generalmente acquisite, sono legate ad una aumentata introduzione parenterale (trasfusioni protratte) od orale (eccesso dietetico di ferro, terapia marziale impropria) od aumentato assorbimento intestinale di ferro (epatopatie croniche, sindrome dismetabolica, anemie con eritropoiesi inefficace o incrementata eritropoiesi, emodialisi) o difetti nella ricircolazione del ferro (anemie da malattia cronica)[3]. Per altri autori invece la differenza tra emocromatosi ed emosiderosi è anatomo-clinica: caratterizzata la prima dall'accumulo di ferro nelle cellule parenchimali con associati fenomeni di flogosi e fibrosi e conseguente insufficienza funzionale degli organi interessati, la seconda dalla deposizione di ferro, sia diffusa che focale, prevalentemente a livello macrofagico, spesso di entità inferiore, non associata ad infiammazione o fibrosi e quindi senza alterazioni della struttura e funzione parenchimale.

Patogenesi

Per comprendere la patogenesi dell'eccessivo accumulo di ferro nell'organismo che caratterizza l'emocromatosi è necessario fare riferimento ai meccanismi di controllo dell'omeostasi del ferro che agiscono sia a livello sistemico che cellulare e coinvolgono diversi tipi di cellule, proteine e segnali. I meccanismi sistemici sono rappresentati dai depositi di ferro, dall'attività eritropoietica, dall'ipossia e dall'epcidina. La regolazione intracellulare avviene a livello post-trascrizionale tramite le proteine regolatorie del ferro (IRP) sensibili al pool labile citoplasmatico del ferro che riflette i contenuti di ferro della cellula. Le IRP si legano agli iron responsive elements (IRE) presenti negli RNAm di diverse proteine coinvolte nel metabolismo del ferro, modulandone l'attività. In condizioni fisiologiche il controllo avviene a livello dell'assorbimento duodenale. Il ferro nel lume intestinale viene trasportato negli enterociti dalla proteina divalent metal transporter 1 (DMT1) dopo riduzione per azione di un aspecifica reduttasi di membrana (D-Cytib). Negli enterociti il ferro o viene utilizzato o immagazzinato come ferritina (Ft) e perso con la esfoliazione o rilasciato nel circolo ematico attraverso la membrana basolaterale tramite la FPN. Una ferrossidasi di membrana, l'efestina, ossida il ferro che in tal modo può legarsi alla Tf ed essere trasportato nelle sedi di utilizzo (principalmente l'eritrone) o di deposito (fegato). La maggior parte del ferro utilizzato per l'eritropoiesi deriva invece dai macrofagi, che lo riciclano dall'eritrocateresi e lo rilasciano al plasma tramite la FPN. Questo ferro, come quello rilasciato dagli epatociti, prima di legarsi alla Tf viene ossidato da una ferrossidasi circolante, la ceruloplasmina. L'acquisizione nelle cellule del ferro transferrinico avviene tramite il legame con il TfR1, a cui si lega HFE, modulandone l'affinità per la Tf. Un secondo recettore per la transferrina (TfR2) è presente sugli epatociti; ha minor affinità per la Tf, ma non è regolato dai livelli di ferro. Il ferro legato al TfR1 o TfR2 viene endocitato nelle cellule e, dopo riduzione, rilasciato dall'endosoma al citoplasma tramite DMT1, mentre la Tf e il TfR vengono riciclati sulla superficie cellulare[4].

Il principale regolatore sistemico dell'assorbimento inte-

stinale del ferro e del rilascio dai macrofagi è l'epcidina. Prodotta dal fegato, si lega alla FPN internalizzandola e degradandola. In tal modo viene bloccato il rilascio di ferro dai macrofagi e dagli enterociti, con conseguente riduzione del ferro circolante legato alla Tf. La sintesi dell'epcidina è stimolata dal sovraccarico di ferro e dall'infiammazione (tramite LPS e IL-6), mentre è ridotta nel deficit di ferro, nell'ipossia e nell'iperplasia eritroide. L'epcidina ha un ruolo centrale nell'omeostasi del ferro, collettore finale dei segnali dei "sensori" dei depositi di ferro, dell'eritropoiesi e dell'ipossia. Il sistema di regolazione dell'epcidina mediato dai livelli plasmatici di ferro coinvolge diverse proteine tra cui la citochina BMP6 che, legandosi al recettore specifico (BMPR) e al co-recettore HJV, tramite il sistema STAT attiva il gene *HAMP*; nella stessa via sono coinvolti HFE e TfR2, forse con la formazione di un sensore complesso del ferro sensibile alla Tf diferrica. Normalmente HFE compete con la Tf satura di ferro per il legame con TfR1; in situazioni di aumentata saturazione della Tf , HFE si stacca da TfR1 e può legarsi a TfR2, stimolando in tal modo la sintesi dell'epcidina. Vari sono gli inibitori del sistema tra cui la neogenina e la matriptase-2, serin proteasi codificata dal gene *TMPRSS*, che cliva il co-recettore HJV da BMPR. L'ipossia agisce indipendentemente dai depositi di ferro tramite il fattore inducibile l'ipossia (HIF), regolato negativamente dal ferro e dall'ossigeno. Il sensore dell'eritropoiesi vede la partecipazione di tre proteine: l'eritropoietina e due nuove proteine prodotte dagli eritroblasti (GDF15 e TWSG1); questi fattori eritroidi regolano positivamente l'assorbimento intestinale e la mobilizzazione del ferro dai depositi e sopprimono l'espressione dell'epcidina indipendentemente dai depositi di ferro[5]

Nell'emocromatosi il precoce aumento della saturazione della Tf (TS), espressione della progressiva espansione del pool circolante di ferro, è attribuito all'aumentato assorbimento intestinale di ferro, pari a 3-4 mg/die, contro i normali 1-2 mg, non correlato alle esigenze dell'organismo. Il ferro in eccesso si deposita a livello delle cellule epatiche, ma anche nel cuore, sinovie, ghiandole endocrine. Col tempo i depositi intracellulari ed extracellulari si saturano e il ferro libero in eccesso, con la formazione di radicali idrossilici, determina un danno ossidativo dei componenti cellulari (lipidi, proteine, DNA). Questo porta in tempi variabili a seconda della mutazione genetica a un danno d'organo progressivo che può manifestarsi come disfunzione epatica, diabete, ipogonadismo, impotenza, cardiomiopatia, artriti, iperpigmentazione cutanea o sintomi aspecifici come astenia e facile affaticabilità. La base patogenetica comune a tutte le forme di emocromatosi, responsabile dell'aumentato assorbimento di ferro a livello duodenale, è la deficienza o la "resistenza" all'epcidina. Bassi livelli di epcidina sono stati documentati nell'emocromatosi HFE, HJV, TfR2 e HAMP associate. Tutti questi geni up-regolano in modo indipendente ma complementare la sintesi epatica dell'epcidina e quindi appropriati livelli plasmatici di ferro. In presenza di mutazione e perdita di funzione di HFE o TfR2, aumenta l'ingresso di ferro nel sangue, ma HJV è sufficiente per sintetizzare ancora dell'epcidina; pertanto il sovraccarico di ferro procederà lentamente. Nel caso di mutazione di HJV il sovraccarico è più severo e più rapido ad instaurarsi, simile a quello dovuto alla mutazione del gene *HAMP* e il fenotipo sarà quello dell'emocromatosi giovanile. Un simile fenotipo si ha pure con genotipi compositi HFE/TfR2. Nella mutazione di *FPN*, con modifica del sito di legame con l'epcidina, si genera un "resistenza" all'epcidina, con normali o aumentati livelli della stessa[3].

Genotipo e fenotipo

Emocromatosi tipo 1 o emocromatosi ereditaria classica o emocromatosi HFE

E' la forma più comune di EE, dovuta a mutazione di gene *HFE*. Le più frequenti mutazioni sono la C282Y e la H63D, più rara la S65C, molto rare e spesso "private" più di altre 20 mutazioni puntiformi[6,7]. La C282Y, dovuta alla sostituzione di una cisteina con una tirosina in posizione 282, è una mutazione con perdita di funzione e comporta l'incapacità di HFE di legarsi alla $\alpha_2$microglobulina, mancato trasporto sulla superficie cellulare e rapida degradazione. La frequenza allelica media di C282Y basata su numerosi studi di screening di popolazione è del 6%, mentre la prevalenza dell'omozigosi nella popolazione caucasica è da 1:200 a 1:300; la frequenza della mutazione è notevolmente inferiore nel sud rispetto nord Europa (dal 12.5% in Irlanda allo 0% nel sud Europa) ed è molto ridotta tra gli ispanici e i neri americani, praticamente assente in Africa, Asia, Polinesia e tra gli aborigeni australiani[8,9]. Anche in Italia è presente un gradiente decrescente da nord a sud: l'omozigosi C282Y è presente in circa il 65% dei pazienti con diagnosi certa di EE, mentre nel centro-sud nel 40% e ancor meno nelle isole, rara o assente in Sardegna. Questo è coerente con la probabile origine della mutazione in un antenato celtico o vichingo 2000 anni fa; tale mutazione non avendo effetti a livello riproduttivo e conferendo alcuni vantaggi (resistenza a diete carenti di ferro e a certi patogeni) si è poi diffusa seguendo la migrazione di questa etnia. L'elevata frequenza in certe popolazioni fa ritenere C282Y una variante polimorfica piuttosto che una mutazione genica. La prevalenza dell'omozigosi C282Y in pazienti con emocromatosi clinicamente riconosciuta originari del nord Europa è dell'80,6%[8]. L'omozigosi è anche più frequente rispetto alla popolazione sana in pazienti con diabete, condrocalcinosi, porfiria cutanea tarda ed epatopatia cronica, ancor più se la TS è aumentata e in presenza di epatocarcinoma[8]. La seconda mutazione in ordine di frequenza è H63D, dovuta alla sostituzione dell'istidina con acido aspartico in posizione 63. Ha una maggiore frequenza nella popolazione generale (14%) e meno variazioni geografiche ed è considerata a bassa o nulla penetranza[3]. La doppia (compound) eterozigosi C282Y/H63D ha una frequenza del 5.3% nei pazienti con EE[8], tuttavia è quasi altrettanto frequente nei controlli normali. Anche l'omozigosi H63D è altrettanto frequente nei pazienti e nei controlli. Solamente una piccola minoranza di tali persone (1-2%, ancor meno nell'omozigosi) sviluppa un fenotipo emocromatosico, di solito moderato, e generalmente associato a fattori concomitanti acquisiti (alcool, epatopatie virali)[6,10]. Delle altre rare forme, la mutazione S65D, in cui la cisteina sostituisce la serina in posizione 65, ha un frequenza allelica nella popolazione generale dell0 0.5% (più alta in Gran Bretagna e Francia) e un significato clinico

ancora controverso, sia in eterozigosi che compound con altre mutazioni[6]. Gli eterozigoti C282Y e H63D normalmente non presentano un sovraccarico marziale se non raramente in presenza di altri fattori di rischio di sovraccarico. Sono state riportate anche rare mutazioni private che possono presentarsi con un fenotipo severo in omozigosi o eterozigosi compound con C282Y.

La storia naturale della malattia è caratterizzata da una iniziale alterazione dei parametri biochimici, dapprima la TS e poi la Ft sierica a cui segue la comparsa di segni e sintomi da sovraccarico di ferro in vari organi. L'esordio clinico è variabile, anche se generalmente inizia nella IV- V decade. La compromissione epatica è quella iniziale e prevalente, dal lieve aumento della transaminasi con o senza epatomegalia fino alla cirrosi e all'epatocarcinoma; seguono i segni di disfunzione delle ghiandole endocrine (diabete, ipotiroidismo, impotenza, ipogonadismo ipogonadotropo), del cuore (aritmie, insufficienza cardiaca), delle articolazioni (artropatia cronica in particolare delle articolazioni metacarpofalangee) e l'iperpigmentazione cutanea. Tuttavia la maggior frequenza con cui si eseguono gli esami di laboratorio di controllo e l'utilizzo dei test genetici ha permesso diagnosi più precoci e precise, modificando radicalmente la presentazione clinica della malattia. La triade classica di presentazione (colorito bronzino della cute, cirrosi non spiegabile e diabete) raramente si vede oggi. I sintomi d'esordio sono spesso subdoli e non specifici e comprendono l'astenia, l'affaticabilità e i dolori articolari associati o meno ad epatomegalia[6]. Le donne sono colpite meno frequentemente degli uomini, per le maggiori perdite di ferro con le mestruazioni e le gravidanze, e tendono a sviluppare i sintomi in età più avanzata. Trattandosi di una malattia autosomica recessiva, lo stato omozigote C282Y dovrebbe portare all'espressione fenotipica della malattia; in realtà non è possibile stabilire se, e con quale gravità, questo si verificherà. La malattia di per sé è rara, comuni sono invece il genotipo e le modificazioni biochimiche associate[11]. La penetranza dell'omozigosi C282Y, ovvero la probabilità che il genotipo si renda clinicamente evidente, varia a seconda delle casistiche in base ai criteri di inclusione utilizzati per la definizione stessa di penetranza (biochimica e clinica). Una recente metanalisi ha concluso che solo dal 38% al 50% degli omozigoti C282Y sviluppa un sovraccarico di ferro e solo dal 10% al 30% sviluppa una morbidità associata all'emocromatosi[12]. La penetranza è più alta nei maschi che nelle femmine (28% vs 1%). Per quanto riguarda la penetranza biochimica, dati di metanalisi evidenziano aumentati valori di ferritina (>200 μg/L nelle femmine e >300 μg/L nei maschi) nel 26% delle femmine e nel 32% dei maschi, mentre la penetranza dell'eccesso di ferro epatico (>25 μmoli/g) è del 19% nelle femmine e del 42% nei maschi[8]. L'EE classica mostra poi un'ampia variabilità in termini di gravità delle manifestazioni fenotipiche: dalla semplice alterazione dei parametri biochimici del ferro, che peraltro in alcuni omozigoti C282Y possono anche mancare, fino a quadri di severa compromissione multi organo. Questa variabilità fenotipica è fortemente influenzata da vari fattori o modulatori, individuali (età, sesso), genetici (combinazione di mutazioni HFE con quelle in altri geni quali *HAMP* o *HJV*, polimorfismi in altri geni che regolano il metabolismo del ferro) ed ambientali (stress ossidativi, epatite virale, abuso etilico, dieta, mestruazioni, donazioni di sangue.). Questo a dimostrazione che l'omozigosi C282Y va considerata solo un fattore predisponente all'emocromatosi[3,4,13].

Emocromatosi tipo 2 o emocromatosi giovanile

L'emocromatosi giovanile comprende due forme clinicamente simili ma geneticamente distinte: il sottotipo A, più frequente, con mutazione del gene *HJV* e il sottotipo B con mutazione del gene *HAMP*. Le mutazioni interessano sia popolazioni caucasiche che non caucasiche e sono trasmesse con carattere autosomico recessivo. L'esordio è più precoce per entrambi i sessi, generalmente attorno ai 20 anni, talora in età infantile. Il quadro clinico è più severo rispetto all'EE-HFE perchè la completa soppressione della produzione dell'epcidina determina un maggiore assorbimento intestinale di ferro e un suo più rapido accumulo tissutale. Le manifestazioni cliniche più rilevanti sono l'ipogonadismo (con amenorrea nelle femmine ed impotenza nei maschi) e la cardiopatia (cardiomiopatia dilatativa e scompenso cardiaco) che è la principale causa di morte. Più tardivo è lo sviluppo della cirrosi epatica. I pazienti presentano livelli di TS e Ft sierica molto elevati[13,14].

Emocromatosi tipo 3 o emocromatosi TfR2-correlata

E' molto rara, poco più di 20 casi riportati in letteratura, con interessamento prevalente per la popolazione italiana. La mutazione interessa il gene *TfR2* che codifica per il TfR2, localizzato preferenzialmente sulla superficie degli epatociti e degli eritroblasti. Il quadro clinico è simile a quello dell'EE-HFE ma l'esordio tende ad essere più precoce (30-40anni) e l'evoluzione più rapida. La gravità del quadro clinico è intermedia tra l'EE classica e la forma giovanile. Molti pazienti alla diagnosi presentano già una malattia con sintomi d'organo (epatopatia, cardiomiopatia, diabete)[3,14].

Emocromatosi tipo 4 o sovraccarico di ferro FPN-correlato

E' l'unica forma di EE ad ereditarietà autosomica dominante, dovuta a mutazione del gene *SLC40A1* che codifica per la FPN ed è anche la più frequente forma di EE non HFE. Il primo caso è stato riportato nelle isole Salomon, mentre successivamente sono state riportate mutazione del gene *FPN* in varie parti del mondo, per lo più private. A seconda del tipo di mutazione si possono avere due fenotipi clinici molto diversi. Il primo tipo (4a), o malattia FPN, è caratterizzato da una perdita di funzione in quanto la FPN mutata è trattenuta all'interno delle cellule. Il mancato rilascio del ferro provoca il suo accumulo nei macrofagi, le cellule maggiormente interessate al ciclo del ferro derivato dall'eritrocateresi. Di conseguenza si ha ridotto assorbimento intestinale di ferro, livelli sierici elevati di Ft, ma normali o bassi livelli di TS, eritropoiesi ferro carente e sviluppo di una lieve anemia e/o di una ridotta tolleranza ai salassi. Il ferro si accumula nelle cellule reticoloendoteliali, principalmente del fegato e ci può essere lieve splenomegalia; col tempo il sovraccarico di ferro si estende agli epatociti e la TS aumenta. La bassa tossicità dell'accumulo del ferro nei macrofagi rende ragione delle poco frequenti complicanze cliniche da sovraccarico di ferro. A differenza delle altre forme di EE, i livelli urinari

di epcidina sono molto aumentati. Il secondo tipo (4b) è caratterizzato da una mutazione con guadagno di funzione: la proteina mutata non è in grado di legare l'epcidina ("resistenza" all'epcidina) e un maggior numero di molecole di FPN è dispiegato a livello della membrana basolaterale. Ciò provoca un rilascio aumentato di ferro in circolo da parte degli epatociti e dei macrofagi, aumentato assorbimento intestinale di ferro, aumento della TS e deposizione del ferro negli epatociti e in altri tessuti. Il mancato controllo della FPN da parte della epcidina mima il fenotipo dell'EE-HFE, con quadri di severità variabile a seconda della residua sensibilità all'epcidina della FPN mutata. Anche la flebotomia è meglio tollerata, visti gli aumentati livelli di ferro circolante[13].

Diagnosi

Come molte altre malattie genetiche l'EE può avere delle conseguenze letali, ma a differenza di quasi tutte le malattie genetiche, è fin d'ora curabile con salassi periodici che possono ripristinare una normale aspettativa di vita nei pazienti. L'obiettivo è dunque una diagnosi precoce per prevenire i danni e le disfunzioni viscerali dovute alla tossicità del ferro sui tessuti, instaurare un adeguato trattamento per promuovere una rapida, sicura ed efficace rimozione del ferro e ridurre al minimo la progressione e le complicanze della malattia e la mortalità. Oggi questo è possibile con la combinazione di test molecolari e biochimici che permettono una più precisa e precoce indentificazione della malattia. Vista l'elevata frequenza dell'EE-HFE, la diagnosi andrà indirizzata alla ricerca dell'omozigosi C282Y in un paziente con sovraccarico di ferro circolatorio e parenchimale con o senza sintomi clinici. Un adeguato work-up diagnostico deve inoltre valutare l'entità del sovraccarico marziale, identificare lo stadio della malattia e dei fattori di rischio per la progressione (fibrosi, cirrosi, alterazioni metaboliche) e identificare precocemente le complicanze (epatocarcinoma). Possiamo prevedere 5 steps successivi[15].

Individuazione della popolazione target

Pazienti sintomatici. L'EE va sospettata in pazienti con malattia cronica di fegato sintomatica ad eziologia ignota, o dovuta ad una causa ritenuta probabile, comunque associata ad alterazione dei parametri sierici del ferro; diabete tipo 2 specie se associato ad epatomegalia, incremento degli enzimi epatici, malattia cardiaca atipica o comparsa precoce di disfunzione sessuale; insorgenza precoce di artropatia atipica, malattia cardiaca, impotenza; astenia cronica marcata senza apparente causa, specie se associata alle manifestazioni cliniche sopradescritte. Si tratta di manifestazioni cliniche aspecifiche, che possono riconoscere cause ben più comuni, ma di cui va tenuta in mente la possibile natura emocromatosica[16].

Pazienti asintomatici. I pazienti asintomatici su cui puntare l'attenzione sono i parenti di primo grado di un probando omozigote per EE, e gli individui ai quali sia stata occasionalmente riscontrata un'alterazione dei parametri sierici del ferro o un incremento non spiegato degli enzimi epatici o un occasionale riscontro di un'epatomegalia asintomatica[16].

Popolazione generale. Lo screening di popolazione per l'EE è teoricamente molto allettante. Prima dell'era genetica erano stati condotti vari studi che avevano rilevato l'efficacia dei test di screening biochimici, consentendo di individuare omozigoti non noti con una frequenza vicina a quella attesa. Altri studi avevano evidenziato un rapporto costo beneficio a favore delle indagini di screening, confrontando i costi per lo screening di un omozigote asintomatico con quelli della presa in carico delle complicanze della malattia. Oltre al basso costo e alla facile disponibilità, i test biochimici sono sufficientemente sensibili e specifici[16]. Negli studi di popolazione la prevalenza di elevati valori della Ft sierica e TS varia, a seconda dei cut-off utilizzati, dal 4 al 41% e dal 1.2 al 7% rispettivamente. Il valore predittivo positivo di un elevato valore della Ft nell'individuare l'omozigosi C282Y varia dal 1.6 al 17.6% mentre per elevati valori della TS dal 4.3 al 21.7%. I limiti di tali test è che non sono test definitivi, selezionano un gran numero di soggetti che richiedono ulteriori controlli e forniscono informazioni non sempre certe sulla progressione della malattia. L'introduzione dei test di screening basati sullo studio genotipico ha permesso di fornire una stima genotipica attendibile della popolazione, selezionare un numero ridotto di soggetti "positivi allo screening", identificare la predisposizione a sviluppare la malattia e individuare i pazienti asintomatici su cui intervenire livello preventivo. Tuttavia ha anche evidenziato come la penetranza della malattia fosse molto più bassa di quanto si pensasse e che molti pazienti omozigoti non solo non hanno ancora i sintomi della malattia, ma non li svilupperanno mai. Inoltre nessun test biochimico o genetico è in grado di prevedere quali pazienti andranno in progressione. Nella valutazione del rapporto tra benefici (terapia precoce e sopravvivenza prolungata) e costi (elevati) vanno aggiunte le ripercussioni negative di ordine psicologico (insicurezza e ansietà), sociale (discriminazioni lavorative) e legale (assicurazioni) conseguenti all'identificazione, in un determinato paziente, di un genotipo associato ad una malattia che potrebbe non sviluppare mai. La raccomandazione è quindi di non eseguire test di screening genetico nella popolazione generale[8]. Invece lo screening biochimico, seguito dal test di conferma genetico dove indicato, può essere utilizzato oltre che nei gruppi ad alta prevalenza di mutazione, anche in tutti i pazienti che afferiscono ai medici di medicina generale[6].

Test biochimici

Saturazione della transferrina. Il parametro biochimico più precocemente alterato e più specifico per valutare l'iperassorbimento dei ferro alimentare è la TS. Essendo espressione del pool circolante di ferro, può essere già satura per sovraccarichi marziali ancora modesti. Pertanto non può essere usata per dare informazioni quantitative circa il sovraccarico di ferro dell'organismo.

La TS rappresenta la percentuale dei siti di Tf legati dal ferro rispetto a quelli totali se le molecole della Tf fossero tutte sature; il che corrisponde al rapporto della sideremia (Fe) con la capacità totale legante il ferro (TIBC). Tuttavia nella maggior parte dei laboratori la TIBC non è direttamente misurata, né dedotta dalla capacità legante il ferro non satura (UIBC), per cui la TS viene calcolata dalla Tf e dalla Fe dopo correzione per una costante [((Fe/Tf)x1.41)x100] considerando che 1 mg di Tf trasporta al massimo 1.41 μg di ferro. La facilità di esecuzione, il basso

costo e la sensibilità la rendono particolarmente adatta come test di screening. E' il miglior test per individuare gli omozigoti C282Y. E' influenzata dalle stesse variazioni della Fe (variazioni diurne, infiammazione) che ne possono limitare l'utilità clinica. Può essere falsamente elevata in situazioni non di sovraccarico di ferro come le epatopatie, per incremento della Fe (per la necrosi epatocellulare acuta) o diminuzione della Tf (per l'insufficienza epatica), e l'assunzione di vitamina C, supplementi dietetici contenenti ferro, farmaci a base di ferro, preparati a base di estrogeni, estroprogestinici. Può essere falsamente ridotta, invece, nelle infiammazioni, nel deficit di acido ascorbico, nelle neoplasie, nel freddo. Valori normali sono compresi tra il 16% e il 45%. Un valore di TS superiore al 45% è generalmente indicativo di sovraccarico marziale a livello ematico, deve far sospettare una EE e richiede la determinazione della Ft sierica[8]. Con tale soglia la sensibilità nell'individuare gli omozigoti C282Y varia a seconda degli studi dal 73% al 100%, ma con una bassa specificità, anche del 44%[16,17] venendo individuati anche altri gruppi con sovraccarico secondario di ferro (epatiti alcoliche, steatoepatiti, epatiti HCV+). Con una soglia del 50% nelle femmine e del 60% nei maschi la sensibilità è del 92% e la specificità del 93%[16]. Un valore normale di TS in assenza di infiammazione esclude la diagnosi di EE. Il prelievo di sangue va eseguito a digiuno per evitare le variazioni circadiane e postprandiali e il dato va confermato con un successivo prelievo. I valori di TS non eseguiti a digiuno possono lo stesso essere usati per lo screening di sovraccarico di ferro: se >60% sono indicativi di sovraccarico di ferro, tra 45% e 60% sono considerati bordeline e richiedono la ripetizione del test. Altri studi non hanno confermato né la superiorità del test a digiuno rispetto al non digiuno né differenze tra UIBC e la Tf per il calcolo della TS[17].

Ferritina. La Ft sierica aumenta più tardivamente rispetto alla TS. La concentrazione sierica della Ft correla direttamente con i depositi di ferro: misure dopo ripetuti salassi hanno dimostrato che 1 μg/L di Ft corrisponde a 8-10 mg di ferro di deposito. Pertanto è il metodo indiretto più usato per valutare il sovraccarico di ferro tissutale: valori normali (<300 μg/L nei maschi e <200 μg/L nelle femmine) di fatto escludono un sovraccarico di ferro tissutale e quindi la diagnosi di EE HFE; valori fino a 500 μg/L indicano un sovraccarico lieve, valori tra 500 e 1000 μg/L un sovraccarico medio e valori <1000 μg/L un sovraccarico severo. Il progressivo aumento dei valori nei pazienti con EE indica una progressione della malattia. Un valore di FS >1000 μg/L ha inoltre un significato predittivo sulla possibile esistenza di danno epatico e si accompagna ad alto rischio di cirrosi. Il principale limite di questo test è la bassa specificità; essendo un marker neoplastico e proteina della fase acuta, aumenta in numerose condizioni comprendenti stati infiammatori acuti e cronici, neoplasie, disordini metabolici, tra cui diabete, alcolismo ed epatopatie, nonché trasfusioni, terapia orale con ferro, ipertiroidismo, contraccettivi orali. In assenza di tali condizioni un aumento della Ft in un paziente con C282Y omozigote è espressione di sovraccarico di ferro[3]. La Ft risulta invece falsamente ridotta nell'ipotiroidismo e nel deficit di vitamina C, situazione frequente nei sovraccarichi di ferro per la rapida ossidazione ferro dipendente della vitamina C. Inoltre la correlazione tra Ft e ferro di deposito tende ad aumentare nelle situazioni in cui il sovraccarico è prevalentemente trasfusionale ed è influenzata dalla terapia ferrochelante[18].

Epcidina. La determinazione sierica o urinaria dell'epcidina potrebbe avere un ruolo nello screening dell'EE, riducendo i costi e il carico di lavoro per le procedure di sequenziazione genica. In pazienti con una forma clinica e biochimica non HFE correlate, potrebbe differenziare tra i tre tipi di EE non HFE o le loro combinazioni (valori molto bassi nel tipo 2, bassi nel tipo 3 ed aumentati nel tipo 4 con perdita di funzione, nei limiti normali ma troppo bassi per sovraccarico di ferro nel tipo 4 con guadagno di funzione), determinare la prognosi e ottimizzare la terapia scegliendo tra nessun trattamento, la flebotomia, la terapia chelante o il trattamento con agonisti o antagonisti dell'epcidina. Il rapporto tra epcidina urinaria e la Ft, basso per esempio nel tipo 3, potrebbe essere un indice utile per valutare l'inadeguata risposta dell'epcidina al sovraccarico di ferro. Un basso rapporto si trova anche nelle sindromi secondarie da sovraccarico di ferro caratterizzate da una eritropoiesi inefficace, quali le talassemie, e anche anemie emolitiche quali la sferocitosi e la falcemia. Difficoltà tecniche hanno finora impedito la diffusione dei metodi di determinazione. Lo sviluppo di metodi immunochimici basato sulla produzione di anticorpi antiepcidina è reso difficile dalle piccole dimensioni dell'epcidina (25 aminoacidi) con conseguente conservazione della sequenza tra le specie animali e quindi ridotta disponibilità di antigeni. Il test ELISA su siero misura la proepcidina (68 aminoacidi) e rimane controverso se questa rifletta la quantità di epcidina bioattiva. La concentrazione urinaria misurata con metodo immunoblot o con gas-massa correla significativamente con i livelli intraepatici di RNAm dell'epcidina[13].

Test genetici

In presenza di valori di TS e FS aumentati va eseguita l'analisi di mutazione dei geni associati all'emocromatosi per avere la conferma diagnostica[8]. Il primo livello prevede la ricerca della mutazione C282Y e H63D ed eventualmente di S65C, un'ulteriore mutazione che si riscontra in un numero significativo di casi. La strategia iniziale può inizialmente essere rivolta alla sola ricerca di C282Y, visto l'elevata frequenza dell'omozigosi nei pazienti con EE. Gli eventuali eterozigoti verrebbero poi sottoposti al test per H63D con l'obiettivo di identificare gli eterozigoti compound, evitando così di identificare (ed esporre a possibili discriminazioni) gli eterozigoti H63D. L'estensione della ricerca già da subito al maggior numero di mutazioni possibili può essere giustificata dal fatto che in Italia a differenza delle altre popolazioni nord europee l'omozigosi C282Y è presente solamente nel 65% dei casi di EE e vi possono essere più frequentemente casi di EE con eterozigosi compound. Il riscontro di positività in omozigosi C282Y o della eterozigosi compound C282Y/H63D definisce la diagnosi di EE HFE. La mutazione S65C isolata o in eterozigosi compound ha significato ancora controverso, mentre l'omozigosi H63D non è da sola causa genetica sufficiente di sovraccarico di ferro e in tal caso vanno ricercate altre cause possibili di iperferritinemia. L'even-

tualità di procedere a ulteriori indagini genetiche in caso di negatività del test o di discrepanza tra l'esito ottenuto e la gravità del fenotipo, necessita della valutazione costo/beneficio e della probabilità di ottenere un esito positivo. L'estensione delle indagini ad altri geni dell'EE *(HJV, HAMP, TfR2, FRN)* potrebbe essere considerato in pazienti con sovraccarico di ferro dimostrato con metodi diretti (biopsia epatica, RMN) e dopo aver escluso altre cause ematologiche ed epatiche di sovraccarico[8].

I metodi utilizzati sono la Real Time PCR, rapida, affidabile e specifica ma in grado di rilevare solo 2 o 3 mutazioni coinvolte. Esiste anche un test che permette di identificare le più comuni mutazioni dei geni *HFE*, *TfR2* e *FPN* 4a (18 mutazioni complessive) basato sull'amplificazione delle regioni suscettibili di mutazione mediante PCR e sulla caratterizzazione degli amplificati mediante ibridizzazione inversa con sonde oligonucleotidiche specifiche per le mutazioni.

Quantificazione del sovraccarico di ferro

La valutazione del sovraccarico di ferro dell'organismo è uno dei criteri diagnosti di EE, ma è anche importante per la stadiazione e la prognosi della malattia. I depositi di ferro possono essere valutati con metodi diretti o indiretti. Quelli diretti comprendono la biopsia epatica e metodi non invasi quali la suscettibilità biomagnetica epatica misurata mediante una speciale apparecchiatura detta SQUID (Superconducting Quantum Interference Device) e la risonanza magnetica nucleare (RMN). I metodi indiretti comprendono la Ft, la TS, la flebotomia quantitativa e la stima del ferro trasfuso[19].

Ferritina. Il basso costo, l'ampia diffusione del metodo e la buona standardizzazione rendono la Ft, oltre che parametro diagnostico, essenziale nel monitoraggio dei depositi di ferro. In assenza dei ben noti fattori confondenti, la Ft correla con l'entità dei depositi cellulari di ferro, in particolare dei depositi del sistema reticolo endoteliale. Tale rapporto è strettamente dipendente dalle cause di sovraccarico, essendo più alto nelle situazioni di sovraccarico trasfusionale. Una volta stabilito per il singolo paziente il rapporto tra la Ft e la concentrazione epatica di ferro (LIC), la Ft può essere utilmente utilizzata per il monitoraggio del sovraccarico nel breve-medio periodo (1-3 anni)[19].

Biopsia epatica. Prima dell'introduzione dei test genetici la biopsia epatica era considerata il gold standard per la diagnosi di EE non solo per la valutazione quantitativa della LIC (valori normali <30 mmol/g tessuto secco) e dell'indice epatico di ferro (HIL) o ferro rapportato all'età calcolato secondo la formula: LIC mmol/g/età in anni (valori normali <1.9), ma anche per la valutazione qualitativa del danno epatico e per la valutazione dell'evoluzione della fibrosi in cirrosi. Esiste stretta correlazione tra LIC e depositi di ferro totali corporei misurati con flebotomie ripetute ed esiste una relazione diretta tra danno epatico e quantità di ferro: si ritiene che la fibrosi sia presente quando la LIC è >400 mmol/g tessuto e l'HIL è >1.9 ed è presente un distribuzione parenchimale del ferro con gradiente da periportale a centrale. Un accumulo di ferro a livello parenchimale e non mesenchimale è tuttavia possibile anche nelle anemie da eritropoiesi inefficace. Oggi la biopsia epatica viene eseguita a scopo diagnostico nel sospetto di una EE geneticamente non ben definita, o in casi di iperferritinemia in presenza di fattori confondenti, e a scopo prognostico in omozigoti C282Y con dati clinici e biochimici alterati (Ft >1000 μg/L, transaminasi aumentate, epatomegalia, età >40 anni) per valutare il grado di coinvolgimento epatico (fibrosi o cirrosi)[8]. La valutazione della fibrosi può essere in alternativa fatta con l'elastografia transitoria tramite uno strumento, l'elastomero, che misura l'elastanza del fegato o mediante dei test bioumorali (fibro-test, apri-test, forns-index) che permetterebbero di predire in maniera affidabile la presenza di fibrosi[8].

Flebotomia quantitativa. Il metodo più accurato per misurare i depositi di ferro è determinare la quantità di ferro corporeo che può essere mobilizzato con ripetute flebotomie fino ad esaurire l'apporto di ferro all'eritrone. Questo rappresenta una parte importante nella valutazione del paziente con EE perché l'estensione del danno tissutale e la sopravvivenza dipendono dalla quantità di ferro accumulata[19].

Suscettibilità biomagnetica. Lo SQUID è uno strumento che misura la suscettibilità magnetica negli organi e tessuti superficiali sfruttando le proprietà paramagnetiche del ferro. Permette la quantificazione indiretta dei depositi di ferro utilizzando la forte risposta del complesso paramagnetico ferritina/emosiderina all'interno del campo magnetico. Tale effetto è misurato direttamente dalla SQUID sulla base di una calibrazione fisica. La valutazione della LIC con la SQUID correla linearmente con la LIC valutata con biopsia epatica e può essere ripetuta frequentemente. Tuttavia è una metodica non validata per pazienti con EE, può sottostimare i livelli di ferro, ha costi elevati, disponibilità molto limitata e richiede personale altamente specializzato e dedicato[20].

Risonanza magnetica nucleare. E' una metodica potenzialmente ampiamente disponibile che permette una valutazione complessiva del contenuto di ferro nel fegato. L'effetto del ferro sui protoni in risonanza, misura indiretta della LIC, è misurato sulla base del confronto con la determinazione chimico-fisica del ferro in biopsie tissutali. La metodica risulta particolarmente sensibile se si utilizzano strumentazioni da 1.5 Tesla e tecniche di misura con echo di gradiente (GRE). Esiste un'eccellente correlazione tra il segnale della RMN e la HIL nel range tra 50 e 350 mmol/g tessuto. La RMN è anche utile nell'identificare un distribuzione irregolare del ferro nel fegato, differenziare tra sovraccarico parenchimale e mesenchimale e individuare piccole lesioni neoplastiche ferro-prive[8,20].

Stadiazione delle manifestazioni fenotipiche

Questo è importante per definire le misure più appropriate sia per il trattamento che per il follow-up.

Algoritmo diagnostico

In pazienti sintomatici o asintomatici con segni o sintomi suggestivi di EE il primo step diagnostico è il controllo della TS e della Ft.

TS e Ft elevate: in un paziente di razza caucasica con sintomatologia correlabile alla EE, è indicata l'esecuzione del test genetico per HFE. Se il paziente risulta omozigote C282Y, la diagnosi di EE HFE è confermata e il paziente può essere avviato alla flebotomia; se la Ft è >1000μg/L,

l'età è >40 anni, con o senza epatomegalia ed aumento delle transaminasi, è consigliata la biopsia epatica. In presenza di un altro genotipo (eterozigosi, compound, omozigosi, wild-type) vanno per prima esclusi fattori di comorbidità (epatopatia cronica, disordini metabolici, virus, alcool), quasi sempre responsabili degli aumenti di TS e Ft in soggetti non caucasici dove è rara l'EE HFE. Se tali fattori non sono presenti e persiste l'anomalia biochimica, deve essere confermato il sovraccarico marziale, preferibilmente con la biopsia epatica, prima di considerare la possibilità di forme di EE non-HFE. Se è presente un sovraccarico epatico parenchimale, tipico della EE, una volta escluse malattie ematologiche da sovraccarico di ferro con eritropoiesi inefficace con simile quadro istologico, o una cirrosi in stadio avanzato, in pazienti wild-type o eterozigoti C282Y e H63D andranno ricercate le mutazioni in altri geni quali *TfR2* o *FPN* o rare mutazioni *HFE*. In pazienti sintomatici omozigoti H63D o eterozigoti compound C282Y/H63D l'espressione fenotipica è legata a comorbidità solitamente non riconosciute. In assenza di queste, tali pazienti possono presentare alterazione dei marcatori sierici del ferro e un modesto sovraccarico periportale di ferro che può essere revertito dalla flebotomia.

TS elevata e Ft normale: sia in soggetti Caucasici che non Caucasici con segni e/o sintomi di EE, la diagnosi di EE è esclusa perché la sintomatologia in questi pazienti è conseguenza del sovraccarico di ferro tissutale, che è rispecchiato dall'aumento della Ft.

TS normale e Ft elevata: vanno escluse le cause più comuni di iperferritinemia (flogosi, infiammazioni, alcool, neoplasie, disordini metabolici). Se queste condizioni sono state escluse o se l'iperferritinemia persiste dopo il trattamento delle condizioni che possono averla determinata, si dovrebbe valutare la LIC con metodi diretti (RMN o biopsia epatica). Se si documenta un sovraccarico di ferro, vanno prese in considerazione malattie da sovraccarico di ferro non HFE correlate, quali la malattia FPN tipo 4a (con perdita di funzione), la aceruloplasminemia ereditaria e l'iperferritinemia metabolica. Se la LIC è normale vanno considerate altre situazioni di iperferritinemia senza sovraccarico di ferro, come la sindrome iperferritinemia-cataratta.

Bibliografia

1. Feder JN, Gnirke A, Thomas W, Tsuchihashi Z, Ruddy DA, Basava A, et al. A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. Nat Genet 1996; 13:399-408.
2. Online Mandelian Inheritance in Man, OMIM, Baltimora; McKusick-Nathans Institutefor Genetic Medicine. Disponibile su: URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/ (data di consultazione: 30.8.2010).
3. Pietrangelo A. Hereditary hemochromatosis: pathogenesis, diagnosis, and treatment. Gastroenterology 2010; 139:393-408.
4. Camaschella C, Strati P. Recent advances in iron metabolism and related disorders. Intern Emerg Med 2010; 5:393-400.
5. Zhang AS, Enns CA. Molecular mechanisms of normal iron homeostasis. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2009; 207-214.
6. Pietrangelo A. Hereditary hemochromatosis - a new look at an old disease. N Engl J Med 2004; 350:2383-97.
7. Alexander J, Kowdley KV. HFE-associated hereditary hemochromatosis. Gen Med 2009; 11:307-13.
8. European Association for the study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines for HFE Hemochromatosis. J Hepatol 2010; 53:3-22.
9. Merryweather-Clarke AT, Pointon JJ, Shearmann JD, Robson KJ. Global prevalence of putative haemochromatosis mutations. J Med Genet 1997; 34:275-8.
10. Gurrin LC, Bertalli NA, Dalton GW, Osborne NJ, Constantine CC, McLaren CE, et al. HFE C282Y/H63D compound heterozygotes are at low risk of hemochromatosis-related morbidity. Hepatology 2009; 50:94-101.
11. Beutler E. Iron storage disease: facts fiction and progress. Blood Cell Mol Dis 2007; 39:140-7.
12. Whitlock EP, Garlitz BA, Harris EL, Beil TL, Smith PR. Screening for hereditary hemochromatosis: a systematic review for the U.S. Preventive Services Task Force. Ann Intern Med 2006; 145:209-23.
13. Swinkels DW, Janssen MC, Bergmans J, Marx JJ. Hereditary hemochromatosis: genetic complexity and new diagnostic approaches. Clin Chem 2006; 52:950-68.
14. Wallace DF, Subramanian VN. Non-HFE haemochromatosis. World J Gastroenterol 2007; 21:4690-8.
15. Brissot P, de Bels F. Current approaches to the management of hemochromatosis. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2006; 36:41.
16. Tavill AS. Diagnosis and management of hemochromatosis. Hepatology 2001; 33:1321-8.
17. McLaren CE, Barton JC, Adams PC, Harris EL, Acton RT, Press N, et al. Hemochromatosis and iron overload screening (HEIRS) study design for an evaluation of 100,00 primary care-based adults. Am J Med Sci 2003; 325:53-62.
18. Porter JB. Practical management of iron overload. Br J Haematol 2001; 115:239-52.
19. Fischer R, Harmatz PR. Non-invasive assessment of tissue iron overload. Hemathology Am Soc Hematol Educ Program 2009; 215-21.
20. Jensen PD. Evaluation of iron overload. Br J Haematol 2004; 124:697-711.