



Universitat Autònoma de Barcelona

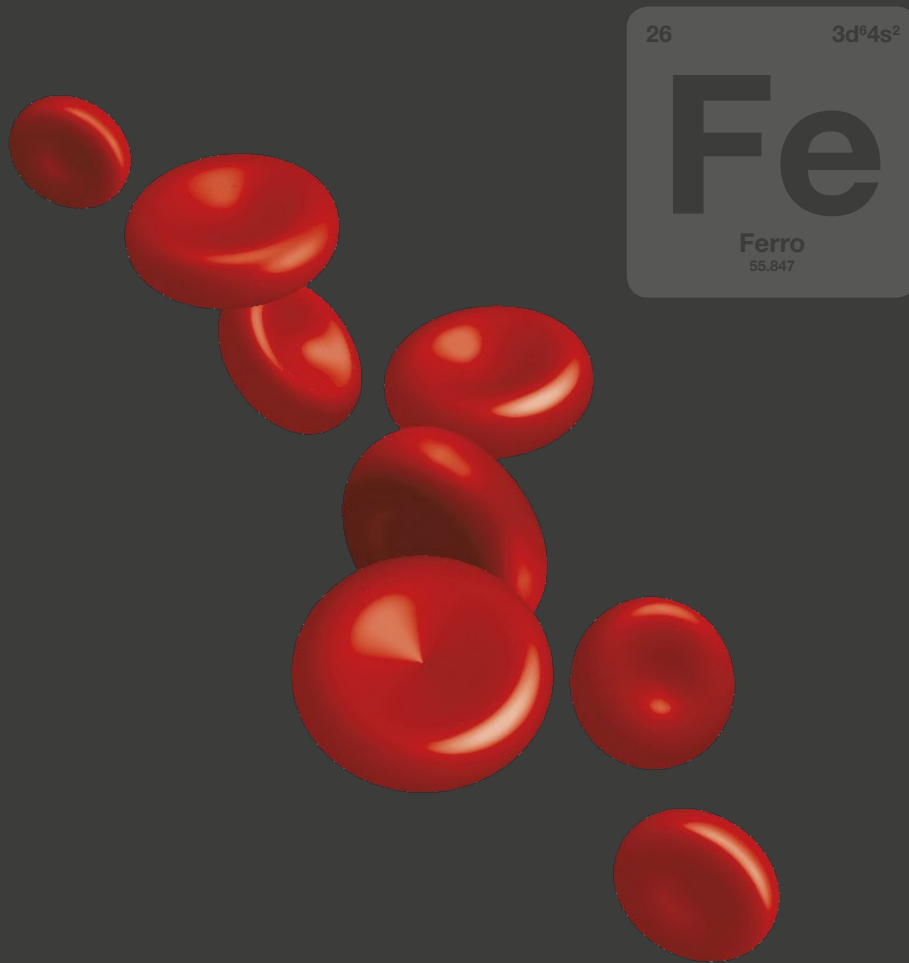
**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  [http://cat.creativecommons.org/?page\\_id=184](http://cat.creativecommons.org/?page_id=184)

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

# La sobrecàrrega bioquímica de ferro en l'atenció primària. Prevalença i relació amb l'hemocromatosis hereditària i amb l'obesitat

Núria Freixenet Guitart



Programa de Doctorat en Medicina  
Departament de Medicina  
Facultat de Medicina  
Universitat Autònoma de Barcelona

**UAB**  
Universitat Autònoma  
de Barcelona

Bellaterra, 2018

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

FACULTAT DE MEDICINA

DEPARTAMENT DE MEDICINA



Programa de Doctorat en Medicina

**La sobrecàrrega bioquímica de ferro en l'atenció primària.  
Prevalença i relació amb l'hemocromatosi hereditària i amb l'obesitat.**

Tesi doctoral presentada per

**Núria Freixenet Guitart**

per obtenir el grau de Doctora

Treball realitzat sota la direcció  
del **Dr. José Miguel González Clemente** i de la **Dra. Carme Vilardell Vila**  
i sota la tutoria del **Dr. Rafael Simó Canonge**

Bellaterra, 2018



“No tot és desar somnis pels calaixos  
rodejats d’enemics o bé d’objectes  
que subtilment i astuta ens empresonen.

Perquè viure és combatre la peresa  
de cada instant i restablir la fonda  
dimensió de tota cosa dita,  
podem amb cada gest guanyar nous àmbits  
i amb cada mot acréixer l’esperança.

Serem allò que vulguem ser.

Pels vidres  
del ponent encrespat, la llum esclata.”

Miquel Martí i Pol



A la Montserrat i al Ramon, els meus pares.

Al Bernat, el meu fill.





# ÍNDEX

---



## ÍNDEX

1. AGRAÏMENTS.	13
2. ABREVIACIONS.	19
3. THESIS SUMMARY.	25
4. RESUM DE LA TESI.	31
5. INTRODUCCIÓ.	37
5.1. Homeòstasi del ferro.	39
5.1.1. Contingut de ferro en l'ésser humà.	40
5.1.2. Recanvi de ferro.	41
5.1.3. Teixits, cèl·lules i fluxos.	43
5.1.4. Importació del ferro.	45
5.1.5. Importació de l'hemo.	46
5.1.6. Ferritina i magatzem citoplasmàtic.	46
5.1.7. Exportadors del ferro.	47
5.1.8. Exportadors de l'hemo.	47
5.1.9. Transportadors de ferro extracel·lular.	49
5.1.10. Control hormonal de l'homeòstasi del ferro per l'hepcidina i el seu receptor ferroportina.	49
5.1.11. Mecanisme d'acció de l'hepcidina.	51
5.1.12. Mecanisme d'homeòstasi del ferro independent de l'hepcidina.	52
5.1.13. Regulació de l'hepcidina pel ferro.	53
5.1.14. Sensors i vies que regulen l'hepcidina.	54
5.1.15. Regulació de l'hepcidina per l'eritropoiesi.	56
5.1.16. Hecpidina, inflamació, dany hepàtic i defensa de l'hoste.	57
5.2. Sobrecàrrega fèrrica i anèmia: desordres genètics en el sistema hepcidina-ferroportina.	59
5.3. Hemocromatosi hereditària.	63
5.3.1. Antecedents històrics de l'hemocromatosi hereditària.	63
5.3.2. Genètica de l'hemocromatosi hereditària.	65
5.3.3. Clínica d'hemocromatosi hereditària i dels estats de sobrecàrrega fèrrica.	69
5.3.3.a. Estadis de l'hemocromatosi hereditària.	73

5.3.4. Diagnòstic d'hemocromatosi hereditària.	74
5.3.4.a. Bioquímica.	74
5.3.4.b. Gen <i>HFE</i> .	74
5.3.4.c. Biòpsia hepàtica.	75
5.3.4.d. Ressonància magnètica nuclear.	76
5.3.5. Cribratge de l'hemocromatosi hereditària.	77
5.4. Trastorns del ferro, síndrome metabòlica i inflamació de baix grau.	79
5.4.1. Síndrome metabòlica.	79
5.4.2. Obesitat i sobrecàrrega fèrrica hepàtica associada a resistència a insulina i a sobrecàrrega fèrrica dismetabòlica.	80
5.4.3. Obesitat i deficiència de ferro.	83
5.4.4. Resposta dels paràmetres del ferro a la pèrdua de pes.	85
5.4.5. Metaflamació i lipotoxicitat, resistència a la insulina i sobrecàrrega fèrrica.	86
5.4.6. Esteatosi hepàtica no alcohòlica i sobrecàrrega fèrrica.	88
5.4.7. Resistència a la insulina, diabetis i sobrecàrrega fèrrica.	91
5.5. Tractament de l'hemocromatosi i dels estats de sobrecàrrega fèrrica.	94
6. HIPÒTESIS.	99
7. OBJECTIUS.	103
8. MÈTODES.	107
8.1. Estudi 1.	109
8.1.1. Disseny.	109
8.1.2. Subjectes. Programa de detecció de sobrecàrrega bioquímica de ferro i d'hemocromatosi hereditària.	109
8.1.3. Avaluacions de la tercera etapa del programa de detecció de subjectes amb sobrecàrrega bioquímica de ferro i hemocromatosi hereditària.	110
8.1.3.a. Anamnesi.	110
8.1.3.b. Exploració física i mesures antropomètriques.	111
8.1.3.c. Tercera extracció de sang: determinacions analítiques.	111
8.1.3.d. Estudi molecular del gen <i>HFE</i> .	112
8.1.3.e. Ecografia hepàtica.	113

8.1.4. Seguiment anual durant 4 anys més de les persones amb hemocromatosi hereditària.	113
8.1.5. Consideracions ètiques i legals.	113
8.1.6. Anàlisi estadística.	113
8.2. Estudi 2.	114
8.2.1. Disseny.	114
8.2.2. Selecció de subjectes. Criteris d'inclusió i d'exclusió.	114
8.2.3. Avaluació dels subjectes.	115
8.2.4. Consideracions ètiques i legals.	116
8.2.5. Anàlisi estadística.	116
8. RESULTATS.	119
10. DISCUSSIÓ.	137
10.1. Estudi 1.	139
10.1.1. La prevalença de la sobrecàrrega bioquímica de ferro.	139
10.1.2. La prevalença de l'hemocromatosi hereditària.	143
10.1.3. Manifestacions clíniques de les persones amb hemocromatosi hereditària.	145
10.1.4. Cost econòmic del programa.	149
10.1.5. Manifestacions clíniques de les persones amb sobrecarrega bioquímica de ferro.	149
10.2. Estudi 2.	151
10.2.1 Obesitat, obesitat central i dèficit tissular de ferro.	151
11. CONCLUSIONS.	157
12. LÍNIES DE FUTUR.	161
13. BIBLIOGRAFIA.	165
14. ANNEXES.	207
14.1. Annex 1.	209
14.2. Annex 2.	213
14.3. Annex 3.	219



# 1. AGRAÏMENTS

---





## 1. AGRAÏMENTS

Al Dr. José Miguel González Clemente, endocrinòleg del Servei d'Endocrinologia i Nutrició de l'Hospital de Sabadell, Corporació Sanitària i Universitària Parc Taulí (Universitat Autònoma de Barcelona), director d'aquest projecte, per haver confiat en mi per dur-lo a terme, per introduir-me en el món de la recerca i transmetre'm el seu esperit crític, per totes les vivències compartides i, sobretot, per haver demostrat tanta valentia i capacitat de superació personal.

A la Dra. Carme Vilardell, endocrinòloga de la Unitat de Diabetis, Endocrinologia i Nutrició de l'Hospital Sant Joan de Déu de Manresa. Althaia. Xarxa Assistencial Universitària de Manresa, Professora Associada de la Universitat Internacional de Catalunya, directora d'aquest projecte, per la seva immensa bondat i paciència, pel seu mestratge i els seus savis consells que han fet possible que aquest projecte es concretés, per la seva valuosa amistat durant tants anys.

Al Dr. Rafael Simó, Professor Titular de Medicina-Endocrinologia, Departament de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona, cap de la Unitat de Recerca en Diabetis i Metabolisme de l'Institut de Recerca de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron (VHIR), pel seu generós recolzament en la tutoria d'aquesta tesi.

A la Dra. Montserrat Baiget cap del Servei de Genètica de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (Universitat Autònoma de Barcelona) en el moment d'iniciar aquest projecte i al Dr. Jordi Félez, el més sincer agraïment.

Al Dr. Albert Altés, cap de Servei d'Hematologia de l'Hospital Sant Joan de Déu de Manresa. Althaia. Xarxa Assistencial Universitària de Manresa, pel seu entusiasme contagiós que em va engrescar a llençar-me a aquesta aventura. Amalgama d'enginy i de coneixement sense el qual això no hauria estat possible.

A la Dra. Gemma Llauradó, endocrinòloga del Servei Endocrinologia i Nutrició de l'Hospital del Mar, Consorci MAR Parc de Salut de Barcelona, que malgrat no

ser-ho, de fet ha estat també directora del projecte i un suport fonamental des de l'inici. La seva generositat i constància en l'orientació i la revisió del treball, així com en la recerca bibliogràfica i en l'anàlisi de les dades ha contribuït a fer possible la realització d'aquesta tesi.

A la Dra. Bàrbara Segura, neuropsicòloga de la Unitat de Psicologia Mèdica, Departament de Medicina, Facultat de Medicina de l'Hospital Clínic Barcelona, Institut de Neurociència (Universitat Autònoma de Barcelona), per la seva gran amistat, els seus consells i els seus ànims, que han estat imprescindibles per superar les adversitats del camí. Aquest projecte s'ha nodrit de la seva expertesa i de les seves ensenyances.

A la Dra. Annabel Valledor Fernández, Professora Agregada d'Immunologia-Programa Serra Hunter. Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia (Universitat de Barcelona), Col·laboradora de la *División de Coordinación. Evaluación y Seguimiento Científico y Técnico* àrea de *Biomedicina* de l'*Agencia Estatal de Investigación*, pel seu bon criteri i rigor científic, per la seva generositat, proximitat i infinita paciència en la revisió d'aquest treball. Ha estat una guia completament indispensable.

Al Dr. José Antonio Ruiz Postigo, Suki pels amics, cap del Programa de Control de la Leishmaniasi, Departament de Malalties Tropicals Desateses, a la seu de l'Organització Mundial de la Salut (OMS) a Ginebra, per la seva gran amistat i per transmetre'm confiança i serenor des de qualsevol racó del món. És també gràcies a ell que aquesta tesi arriba a bon port.

Al Dr. Joan Vendrell, cap de la Secció d'Endocrinologia i Nutrició de l'Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII per facilitar el processament de les mostres.

A la direcció de l'Equip d'Atenció Primària de Corbera de Llobregat (Servei d'Atenció Primària Baix Llobregat Centre. Direcció d'Atenció Primària Costa de Ponent. Gerència Territorial Metropolitana Sud. Institut Català de la Salut), per confiar en mi i donar-me l'oportunitat de finalitzar el meu projecte.

Al Servei d'Atenció Primària Baix Llobregat Centre i a la Direcció d'Atenció Primària Costa de Ponent. Gerència Territorial Metropolitana Sud. Institut Català de la Salut, per facilitar l'adaptació de l'horari que ha permès concloure aquest treball.

Als meus antics companys del Centre d'Atenció Primària de Sant Just Desvern (Servei d'Atenció Primària Baix Llobregat Centre. Direcció d'Atenció Primària Costa de Ponent. Gerència Territorial Metropolitana Sud. Institut Català de la Salut), del Centre d'Atenció Primària Canaletes de Cerdanyola del Vallès (Servei d'Atenció Primària Vallès Occidental. Direcció d'Atenció Primària Metropolitana Nord. Gerència territorial Metropolitana Nord. Institut Català de la Salut), del Centre de Salut de la Vall d'Uixó (Departament de Salut de La Plana. Castelló. Conselleria de Sanitat Universal i de Salut Pública. Generalitat Valenciana), de la Secció de Medicina Digestiva i de la Secció d'Hematologia de l'Hospital Universitari de La Plana (Departament de Salut de La Plana. Vila-real. Castelló. Conselleria de Sanitat Universal i de Salut Pública. Generalitat Valenciana), per tots els coneixements transmesos i per la seva implicació tan decisiva perquè aquest treball comencés a caminar.

Als meus antics companys del Servei d'Endocrinologia i Nutrició de l'Hospital de Sabadell, Corporació Sanitària i Universitària Parc Taulí, per la seva estima i el seu suport durant aquells anys. Un reconeixement especial a la Sra. Teresa Pujol per la seva ajuda tècnica.

A l'Equip d'Atenció Primària de Corbera de Llobregat (Servei d'Atenció Primària Baix Llobregat Centre. Direcció d'Atenció Primària Costa de Ponent. Gerència Territorial Metropolitana Sud. Institut Català de la Salut). Als equips de les residències geriàtriques Creu Nova i Reche de Corbera de Llobregat. A l'equip de Cirurgia Plàstica, Estètica i Reparadora de la Unitat de Remodelació Corporal de l'Hospital Universitari Quirónsalud-Dexeus. A tots ells, agrair la seva empena en l'últim tram d'aquest recorregut.

A l'Stephen Kelly per la seva amable dedicació i per la revisió de l'anglès dels articles que són el nucli d'aquesta tesi.

## 1. Agraïments

A la Laia Suades per la seva valuosa implicació en l'atenta revisió lingüística d'aquest treball.

A la generositat de tots els pacients i voluntaris que han participat en aquest projecte, sense els quals no hagués estat possible dur-lo a terme.

I especialment, a tota la meva família, a totes les meves amigues, amics i a cada un dels meus companys incondicionals de viatge. El vostre suport i escalf han estat absolutament essencials poder arribar fins aquí.

## **2. ABREVIACIONES**

---



## 2. ABREVIACIONS

Les abreviacions corresponents a noms de gens i de proteïnes s'han determinat segons les guies del comitè de nomenclatura de gens de l'organització HUGO (*Human Genome Organization*) (<http://www.genenames.org/>). Segons aquestes guies, els símbols dels gens estan escrits en cursiva i els símbols de les proteïnes sense cursiva.

AASLD	<i>American Association for the Study of the Liver</i>
AACE	<i>American Association of Clinical Endocrinologists</i>
AHA	<i>American Heart Association</i>
AGL	àcids grassos lliures
A-FABP	<i>adipocyte fatty acid binding protein</i>
ALT	alanina-aminotransferasa
Anti-VHC	anticossos del virus de l'hepatitis C
AST	aspartat-aminotransferasa
BMP	<i>bone morphogenetic protein</i>
CAP	Centre d'Atenció Primària
cHDL	colesterol de lipoproteïnes d'alta densitat
cLDL	colesterol de lipoproteïnes de baixa densitat
CREBH	<i>cyclic AMP response element-binding protein H</i>
DCYTB	citocrom B duodenal
DIOS	<i>dysmetabolic iron overload</i>
DM	diabetis mellitus
DMT1	<i>divalent metal transporter 1</i>
EASL	<i>European Association for the Study of the Liver</i>
EGIR	<i>European Group for Study of Insulin Resistance</i>
EGF	factors de creixement epidèrmics
EHNA	esteatosi hepàtica no alcohòlica
EPO	eritropoietina
ERFE	eritroferrona
ESC	<i>European Society of Cardiology</i>
ESH	<i>European Society of Hypertension</i>
FLVCR1	<i>feline leukemia virus, tyne C, receptor 1</i>
FPN	ferroportina
GBA	glucèmia basal alterada
GGT	gammaglutamiltranspeptidasa
HAMP	<i>hepcidin antimicrobial peptide</i>
HBcAg	antigen del nucli del virus de l'hepatitis B
HBsAg	antigen de superfície del virus de l'hepatitis B
HCP1	<i>heme carrier protein 1</i>
HFE	hemocromatosi humana
<i>HFE2</i>	gen que codifica per a l'hemojuvelina
HGF	factor de creixement dels hepatòcits

## 2. Abreviacions

HH	hemocromatosi hereditària
HIF	factor induït per hipòxia
HJV	Hemojuvelina
HOMA-IR	<i>Homeostatic Model Assessment Insulin Resistance</i>
HOMA-%B	estimació percentual de la funció cel·lular beta en estat basal en l' <i>Homeostatic Model Assessment</i>
HOMA-%S	estimació percentual de la sensibilitat a la insulina en l' <i>Homeostatic Model Assessment</i>
HOX1	hemo oxigenasa 1
HRG1	<i>heme responsive gene 1</i>
IDF	<i>International Diabetes Federation</i>
IFN $\gamma$	interferó gamma
IgM	immunoglobulina M
IL	interleucina
IMC	índex de massa corporal
<i>IREG1</i>	<i>iron-regulated gene 1</i>
<i>IRE</i>	element de resposta al ferro
IR-HIO	<i>insulin resistance-hepatic iron overload</i>
IRP	proteïnes reguladores de ferro
IST	índex de saturació de la transferrina
LEAP	<i>liver expressed antimicrobial protein</i>
LSH	lipasa sensible a hormones
MCP1	proteïna quimioattractant dels monòcits 1
MTP1	<i>metal transporter protein 1</i>
NADPH	nicotinamida adenina dinucleòtid fosfat, forma reduïda
NAFLD	<i>non-alcoholic fatty liver disease</i>
NCEP ATP III	<i>Adult Treatment Panel III of the National Cholesterol Education Program</i>
NHLBI	<i>National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement</i>
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
NRAMP1	<i>natural resistance associated macrophage protein 1</i>
OMS	Organització Mundial de la Salut
PCR	proteïna C reactiva
PCRhs	proteïna C reactiva d'alta sensibilitat
RBP4	proteïna d'unió a retinol 4
RM	ressonància magnètica nuclear
RNA <sub>m</sub>	RNA missatger
ROS	espècies reactives d'oxigen
SCL40A1	<i>solute carrier family 40 member 1</i>
SMAD	<i>mothers against decapentaplegic homolog</i>
STAT3	<i>signal transducer and activator of transcription 3</i>
sTFR	receptor soluble de la transferrina
TA	tensió arterial
TAD	tensió arterial diastòlica
TAS	tensió arterial sistòlica



TFR	receptor de la transferrina
TG	triglicèrids
TGF $\beta$	factor de creixement transformant beta
TMPRSS6	proteasa matriptase-2
TNF $\alpha$	factor de necrosi tumoral-alfa
VCM	volum corpuscular mig
VLDL	lipoproteïnes de molt baixa densitat



### **3. THESIS SUMMARY**

---



### 3. THESIS SUMMARY

The detection of biochemical iron overload in primary care is frequently a chance finding that goes unnoticed as there is no procedure for systematically studying its possible etiology. In general, there is a lack of knowledge on how to manage iron overload at this care level. In cases where overload persists, patients are typically referred to hematology for study with no exploration of potential underlying causes.

There are various disorders due to biochemical iron overload, some acquired and others of genetic origin, which may result from the alteration of numerous genes and thus give rise to distinct clinical phenotypes.

Elevated iron level is a parameter indicative of biochemical overload in routine analysis. It can appear as a consequence of hereditary hemochromatosis (HH), although it is more frequently related to obesity or diabetes mellitus (DM) 2, which form part of metabolic syndrome. As such, we cannot overlook its association with other situations including chronic alcohol consumption, inflammatory processes, infections, liver diseases, neoplasms, non-regenerative anemias, the most frequent being (inflammatory anemia, anemia due to chronic kidney disease, aplastic anemia, myelodysplastic syndromes and congenital dyserythropoietic anemias) and regenerative anemias (basically non-immune hemolytic and congenital hemolytic), anemias with hyperferritinaemia, compensated dyserythropoiesis without anemia, post-transfusion hemochromatosis or other less frequent alterations such hyperferritinaemia-cataract syndrome, aceruloplasminemia, or atransferrinemia or hypotransferrinemia.

This thesis focuses on the detection and study of biochemical iron overload in primary care in our Mediterranean area. Initially, the relationship between biochemical iron overload and HH was studied in this region; prevalence and the frequency of distinct genetic mutations of the human hemochromatosis gene

(*HFE*) related to this pathology. Subsequently, taking into account the potential relationship between biochemical iron overload and both low-grade inflammation and insulin resistance, the project was extended to assess the relationship between biochemical iron overload and pathologies as common as obesity, DM and the components that constitute metabolic syndrome. The primary care patient is always borne in mind as the reference point. The interest generated by this issue has led to the publication in prestigious journals of the different articles included in this thesis.

The thesis, presentation of which has been accepted as a compendium of published articles, thoroughly reviews the current situation of iron metabolism disorders and contributes new material in the form of three papers: a scientific letter, an original article, and an original brief report. The brief report has been included as an annex in accordance with the recommendations of the academic committee for the doctoral program in Medicine dated 16<sup>th</sup> March, 2017. The first two papers that make up the doctoral thesis are an in-depth study of the disorders that cause biochemical iron overload and focus on hereditary hemochromatosis linked to the human hemochromatosis gene (*HFE*) due to its potential severity and to obesity due to its elevated prevalence, with the primary care patient as the study population.

The first paper analyzes the prevalence of biochemical iron overload and hereditary hemochromatosis in a sample of the population that attends two primary care centers in our area. Analysis of this type of sample is new with respect to previous studies on the prevalence of iron overload states carried out in randomly selected populations or in previously identified people, mainly from blood donors. Thus, it is an unprecedented assessment in our area. In addition, the paper reports on the study of biochemical iron overload in relation to associated pathologies in this context such as non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), metabolic syndrome and DM. The cost of a screening program for biochemical overload states in primary care is also evaluated.

The second paper closely examines the relationship between iron stores and obesity. It focuses on the study of a group of obese Caucasian men from a

Mediterranean region with hyperferritinaemia and without HH or other more common causes of biochemical iron overload and concludes that they have an increase in serum concentrations of the transferrin soluble receptor (sTFR). The main interest of the study was to detect, in obese men with hyperferritinaemia, a functional iron deficit along with the presence of elevated serum concentrations of sTFR, and to demonstrate that this deficit is especially associated with abdominal obesity.

The third published paper, which can be found in the annex, studies a sample of Caucasian men from our Mediterranean region with hyperferritinaemia and non-insulin-dependent DM2 or without DM2. The paper concludes that both groups do not have greater biochemical iron overload (measured through ferritin in serum, the transferrin saturation index (TSI) and sTFR). The group with DM2 showed lower pancreatic beta cell function (*Homeostatic Model Assessment  $\beta$ -cell function* (HOMA-%B)) although there were no differences between the two groups (DM2 and non-DM2) with respect to insulin sensitivity (*Homeostatic Model Assessment insulin sensitivity* (HOMA-%S)), inflammation (C-reactive protein) or other metabolic syndrome components. In conclusion, this study casts doubt on the possible pathogenic role of biochemical iron overload in DM2 in men with hyperferritinaemia.

With regard to future lines of research, one aims to assess the role of hepcidin as a possible link between low-grade inflammation and iron metabolism in the context of the pathogenesis of metabolic syndrome, given that it is a key molecule in iron metabolism related to various inflammatory cytokines such as interleukin (IL)-6 and tumor necrosis factor-alpha (TNF $\alpha$ ). The final objective would be to find new therapeutic targets to treat or prevent metabolic syndrome. On the other hand, we are assessing the possibility of evaluating iron overload states in prediabetes, monitoring ferritin and sTFR levels, taking into account the contribution of iron from diet and including quantification of tissue deposit with nuclear magnetic resonance (NMR) of the liver. Finally, another line of interest would be the analysis, through randomized, controlled clinical trials, of the potential benefits of periodic iron depletion in people with DM2 or prediabetes and biochemical iron overload.





## **4. RESUM DE LA TESI**

---



## 4. RESUM DE LA TESI

La detecció de la sobrecàrrega bioquímica de ferro des de l'atenció primària és sovint una troballa marginal perquè no hi ha la dinàmica d'estudiar de manera sistemàtica la seva possible etiologia. En general hi ha un desconeixement del maneig que cal donar a les situacions de sobrecàrrega fèrrica en aquest nivell assistencial. En els casos en què persisteix la sobrecàrrega, solen derivar-se els pacients a hematologia per a estudi sense aprofundir en les causes potencials.

Existeixen diversos trastorns per sobrecàrrega bioquímica de ferro, alguns adquirits i altres de causa genètica que poden ser deguts a l'alteració de diversos gens i així donar lloc a fenotips clínics diferents.

La ferritina elevada és el paràmetre indicatiu de sobrecàrrega bioquímica de ferro en les analítiques de control habitual. Pot aparèixer com a conseqüència d'una hemocromatosi hereditària (HH), tot i que, més freqüentment, s'associa a patologies tan prevalents com l'obesitat o la diabetis mellitus (DM) 2, que formen part de la síndrome metabòlica. Tanmateix, no podem obviar la seva relació amb altres situacions com el consum excessiu d'alcohol, les malalties hepàtiques, els processos inflamatoris, les infeccions, les neoplàsies, les anèmies aregeneratives com a més freqüents (l'anèmia inflamatòria, l'anèmia per malaltia renal crònica, l'anèmia aplàsica, les síndromes mielodisplàsiques i les anèmies diseritropoiètiques congènites) i les anèmies regeneratives (fonamentalment les hemolítiques no immunitàries i d'origen congènit), les diseritropoiesis compensades i sense anèmia, l'hemocromatosi postransfusional, o altres causes molt menys freqüents com la hiperferritinèmia amb cataractes, l'aceruloplasminèmia, o l'atransferrinèmia o hipotransferrinèmia.

Aquesta tesi centra l'estudi i la detecció de la sobrecàrrega bioquímica de ferro des de l'atenció primària en la nostra àrea mediterrània. Inicialment es va estudiar la relació de la sobrecàrrega bioquímica de ferro amb l'HH en aquesta zona, la seva prevalença i la freqüència de les diferents mutacions del gen de

l'hemocromatosi humana (*HFE*) relacionat amb aquesta patologia. Posteriorment, tenint en compte la potencial relació de la sobrecàrrega bioquímica de ferro amb la inflamació de baix grau i amb la resistència a la insulina, es va estendre el projecte a la valoració de la relació de la sobrecàrrega bioquímica de ferro amb patologies tan comunes com l'obesitat, la DM i els altres components que conformen la síndrome metabòlica, sempre tenint com a punt de mira el pacient de la consulta de l'atenció primària. Fruit d'aquest interès se n'han derivat les diferents publicacions que la constitueixen.

La tesi, la presentació de la qual ha estat acceptada com a compendi de publicacions, revisa exhaustivament la situació actual dels trastorns del metabolisme del ferro i aporta novetats en forma de tres articles: una carta científica, un original, i un original breu. Aquest darrer s'ha inclòs com a annex d'acord amb les indicacions fetes per la comissió acadèmica del programa de doctorat en Medicina amb data 16 de març de 2017. Les dues primeres publicacions, que conformen la tesi doctoral, aprofundeixen en l'estudi dels trastorns que provoquen una sobrecàrrega bioquímica de ferro i centren l'interès en l'hemocromatosi hereditària lligada al gen de l'hemocromatosi humana (*HFE*) per la seva potencial gravetat i en l'obesitat per la seva elevada prevalença, sent la població d'estudi el pacient de la consulta d'atenció primària.

La primera publicació analitza la prevalença de la sobrecàrrega bioquímica de ferro i de l'hemocromatosi hereditària en una mostra de població que consulta a dos centres d'atenció primària de la nostra zona. L'anàlisi en aquest tipus de mostra representa una novetat respecte als estudis precedents sobre prevalença d'estats de sobrecàrrega fèrrica que s'havien realitzat en poblacions escollides a l'atzar o identificades prèviament principalment a partir d'individus donants de sang. En aquest sentit, doncs, és una valoració inèdita en la nostra àrea. A més la publicació estudia la sobrecàrrega bioquímica de ferro en relació a les patologies associades a aquesta situació com l'esteatosi hepàtica no alcohòlica (EHNA), la síndrome metabòlica i la DM. Alhora avalua el cost d'un programa de cribratge d'estats de sobrecàrrega bioquímica de ferro en atenció primària.

La segona publicació aprofundeix en la relació entre la reserva de ferro i l'obesitat. Se centra en l'estudi d'una mostra d'homes de raça caucàsica de la zona mediterrània obesos amb hiperferritinèmia i sense HH o altres causes més comunes de sobrecàrrega bioquímica de ferro, i conclou que presenten un increment en sèrum de les concentracions de la fracció soluble del receptor de la transferrina (sTFR). L'interès fonamental de l'estudi és haver detectat en homes obesos amb hiperferritinèmia un dèficit funcional de ferro d'acord amb la presència d'unes concentracions elevades de sTFR en sèrum, i determinar que aquest dèficit s'associa sobretot amb l'obesitat abdominal.

La tercera publicació, que podem trobar a l'annex, estudia una mostra d'homes de raça caucàsica de la nostra zona mediterrània amb hiperferritinèmia i amb o sense DM2, i en determina que les persones amb DM2 no insulíndependent no tenen major sobrecàrrega bioquímica de ferro (mesurada a partir de la ferritina en sèrum, l'índex de saturació de la transferrina (IST) i el sTFR) que els subjectes sense DM2. El grup amb DM2 presenta menor funció de les cèl·lules beta pancreàtiques (estimació percentual de la funció cel·lular beta en estat basal en l'*Homeostatic Model Assessment* (HOMA-%B)) però no hi ha diferències entre els dos grups (DM2 i no DM2) pel que fa a la sensibilitat a la insulina (estimació percentual de la sensibilitat a la insulina en l'*Homeostatic Model Assessment* (HOMA-%S)), a la inflamació (proteïna C reactiva) o a altres components de la síndrome metabòlica. Així doncs, aquest treball posaria en dubte el possible paper patogènic de la sobrecàrrega bioquímica de ferro en la DM2 en homes amb hiperferritinèmia.

Pel que fa a les futures línies d'investigació, una d'elles s'adreça a avaluar el paper de l'hepcidina com a possible nexa d'unió entre la inflamació de baix grau i el metabolisme del ferro en el context de la patogènia de la síndrome metabòlica, atès que és una molècula clau en el metabolisme del ferro relacionada amb diverses citocines inflamatòries com la interleucina (IL)-6 i el factor de necrosi tumoral-alfa (TNF $\alpha$ ). L'objectiu final seria trobar noves dianes terapèutiques per tractar o prevenir la síndrome metabòlica. D'altra banda, també estem valorant la possibilitat d'avaluar els estats de sobrecàrrega fèrrica en la prediabetis, monitoritzant els nivells de ferritina i de sTFR, tenint en compte

l'aportació de ferro a partir de la dieta i incorporant la quantificació del dipòsit tissular amb ressonància magnètica nuclear (RM) hepàtica. Finalment, una altra línia d'interès seria analitzar amb assajos clínics aleatoritzats i controlats, els potencials beneficis de la depleció periòdica de ferro en persones amb DM2 o prediabetis i sobrecàrrega bioquímica de ferro.

## **5. INTRODUCCIÓ**

---





## 5. INTRODUCCIÓ

### 5.1. HOMEÒSTASI DEL FERRO

El ferro és un oligoelement essencial per a gairebé tots els organismes vius. Té un paper clau en el transport d'oxigen, en la respiració mitocondrial i en la biosíntesi de DNA. El ferro lliure és tòxic i molt reactiu degut al fet que fàcilment accepta o dona electrons. De fet, un excés de ferro és perjudicial fonamentalment per la formació d'espècies reactives d'oxigen (ROS) que poden comportar danys orgànics greus. Per satisfer les necessitats biològiques de ferro i evitar la seva toxicitat, les reserves fèrriques han d'estar molt ben regulades per una xarxa molecular complexa que implica el fetge, l'intestí, la medul·la òssia i el sistema reticuloendotelial eritropoiètic (1).

En els organismes vius, la reactivitat química del ferro està limitada i dirigida per la seva associació amb grups prostètics i proteïnes. Les proteïnes poden contenir ferro en forma de clústers ferro-sofre o hemo. A més, l'element és coordinat directament per cadenes laterals d'aminoàcids, que sovint inclouen la histidina, glutamat, aspartat, i tirosina. Les proteïnes que contenen ferro són essencials per al metabolisme d'energia i el metabolisme intermediari, incloent la síntesi de nucleòtids, i juguen un paper en les vies de senyalització, així com en la defensa de l'hoste. En aquest sentit, el ferro forma part de proteïnes de **transport** o d'**emmagatzematge** (per exemple, l'hemoglobina o la mioglobina) i participa en reaccions metabòliques relacionades amb la **senyalització** i amb les **reaccions redox** antimicrobianes (per exemple, citocroms, la ribonucleòtid reductasa, la sintasa d'òxid nítric, l'oxidasa de nicotinamida adenina dinucleòtid fosfat en forma reduïda (NADPH), la mieloperoxidasa). Per una altra banda, el **transport i magatzem de ferro** està mediat per diverses proteïnes (per exemple, la transferrina, la lactoferrina o la ferritina) (2–4).

Malgrat que el ferro és un dels elements més abundants a la terra (el nucli de la terra està format principalment per ferro i per níquel), la seva escassetat en l'escorça és una condició principal per la vida de la majoria dels organismes que

viuen en ambients rics en oxigen. Aquesta paradoxa s'ha atribuït a la baixa solubilitat de les formes de ferro oxidades. Per aquest motiu, l'homeòstasi del ferro sistèmica, és a dir, els mecanismes que regulen l'absorció de ferro en la dieta i la concentració de ferro en el plasma i el medi extracel·lular, juga un paper essencial per a l'organisme. El **ferro inorgànic** són les formes ferroses ( $\text{Fe}^{2+}$ ) i fèrriques ( $\text{Fe}^{3+}$ ); el **ferro fèrric** ( $\text{Fe}^{3+}$ ) és la forma predominant en la dieta que és fàcilment absorbible i que cal reduir a **ferro ferrós** ( $\text{Fe}^{2+}$ ) en l'estómac per ser posteriorment absorbit en el duodè.

En els aliments d'origen vegetal, el ferro està formant un complex de formes insolubles i com a conseqüència, la seva absorció és ineficient. Això explica l'alta prevalença del dèficit de ferro en les poblacions humanes que consumeixen dietes vegetarianes (5). El ferro hemo de la carn, les aus i el peix s'absorbeix de manera eficient (6), però la disponibilitat és evolutivament recent i, social i geogràficament, limitada. Els éssers humans i altres mamífers van evolucionar en un entorn on la deficiència de ferro és comuna, i això es reflecteix en els mecanismes per la conservació eficaç i el reciclatge intern de ferro. A l'altre extrem, trobem la dieta amb excedent de ferro en els països pròspers. No obstant això, la majoria dels éssers humans són capaços de limitar l'absorció dietètica de ferro i evitar la toxicitat de l'acumulació de l'excés d'aquest.

### 5.1.1. Contingut de ferro en l'ésser humà

L'ésser humà adult conté de 3 a 5 g totals de ferro, la majoria està en l'hemoglobina dels eritròcits (2-3 g de ferro). Uns altres dels teixits rics en ferro són el fetge i la melsa. La major reserva de ferro en els òrgans es troba en els macròfags i els hepatòcits, gràcies a la presència d'una proteïna citoplasmàtica especialitzada en l'emmagatzematge de ferro anomenada ferritina. El múscul també conté ferro, sobretot en la mioglobina, una proteïna d'emmagatzematge d'oxigen. Totes les cèl·lules tenen concentracions més petites de ferro unit a proteïnes essencials per a la producció d'energia, el metabolisme i altres funcions. El ferro es distribueix als teixits a través del plasma sanguini que té només 2-4 mg de ferro unit a una proteïna de transport de ferro anomenada transferrina.

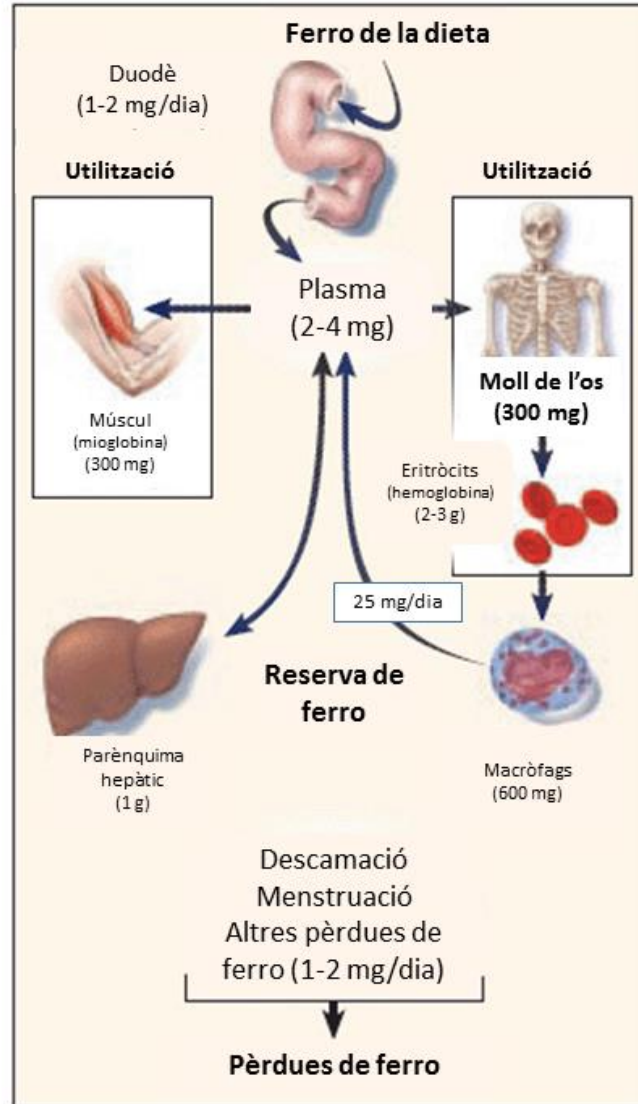
### 5.1.2. Recanvi de ferro

La **vida mitja** dels eritròcits és d'uns 120 dies i aproximadament un 0,8 % (o bé 15-25 mg) de tot el ferro dels eritròcits ha de ser reciclat cada dia. En el plasma hi ha un **recanvi** de ferro de 20-25 mg en 24 hores (Figura 1). D'entre totes les cèl·lules, els eritròcits tenen la major concentració de ferro, aproximadament 1 mg/ml. La majoria d'aquest ferro deriva dels eritròcits vells que són reciclats pels macròfags a la melsa i a altres òrgans. El ferro és posteriorment transportat per la transferrina i reaprofitat per a la síntesi de nous eritròcits i molècules d'hemoglobina en la medul·la òssia. Tanmateix, petites quantitats de ferro d'altres tipus de cèl·lules també són recuperades pels macròfags. Tot i la ràpida utilització del ferro, les seves concentracions en plasma són generalment estables, la qual cosa indica que el lliurament de ferro reciclat des dels macròfags al plasma ha de tenir un equilibri homeostàtic.

Entre 1950 i 1960 es van fer estudis de seguiment del ferro amb marcadors i es va demostrar que les **pèrdues** del cos són només d'1 a 2 mg/dia, principalment per la descamació de les superfícies epitelials (7). En circumstàncies normals, les pèrdues es compensen amb l'absorció de ferro en la dieta, principalment en el duodè proximal. Com a resultat d'aquestes pèrdues relativament petites, l'absorció de ferro a partir de la dieta normalment contribueix poc al flux de ferro total en els éssers humans. Les contribucions del reciclatge i de l'absorció de la dieta a la mobilització diària de ferro són diferents segons les espècies animals depenent del temps de vida dels seus eritròcits i de les pèrdues de ferro diàries. Atès que les pèrdues de ferro no estan regulades de manera precisa pel dèficit o l'excés de ferro sistèmic, la regulació del contingut de ferro en el cos depèn completament de l'absorció de ferro en la dieta (Figura 1).

Els mecanismes que controlen l'absorció de ferro en la **dieta** en els éssers humans han de fer front a les diferències en la **biodisponibilitat** del ferro en les diferents fonts d'aliments, que van des del 5-12 % en les dietes vegetarianes a 14-18 % en les dietes mixtes (8). Malgrat aquestes variacions i canvis en la demanda de ferro a causa del **creixement** o de la **pèrdua de sang** ocasional,

les reserves de ferro són estables en la majoria dels éssers humans que consumeixen una dieta adequada en ferro.



**Figura 1. Distribució del ferro en adults.** En l'estat d'homeòstasi, s'absorbeixen i es perden 1-2 mg de ferro cada dia. El ferro de la dieta s'absorbeix pels enteròcits duodenals i circula a través del plasma. La major part del ferro del cos es troba incorporat en l'hemoglobina dels precursors eritroides i els eritròcits madurs. Aproximadament, un 10-15 % del ferro està incorporat en les fibres musculars (en la mioglobina) i en altres teixits. El ferro s'emmagatzema en les cèl·lules del parènquima hepàtic i en els macròfags. Els macròfags proveeixen la majoria del ferro útil mitjançant la degradació de l'hemoglobina dels eritròcits vells. Adaptada d'Andrews, 1999 (4).

Des de la dècada de 1930 a la dècada de 1980, alguns estudis experimentals (9) van proporcionar suport detallat a l'existència de mecanismes homeostàtics que controlen el contingut total de ferro del cos mitjançant la regulació de l'absorció del ferro de la dieta i el control de la concentració de ferro en el plasma, predominantment mitjançant la regulació de l'alliberament de ferro reciclat a partir dels macròfags. Des de llavors, l'esforç s'ha centrat en conèixer les molècules específiques i els mecanismes implicats.

### 5.1.3. Teixits, cèl·lules i fluxos

Durant el desenvolupament fetal, el sinciciotrofoblast de la placenta fa transferències de ferro de la mare al fetus. En l'estadi postnatal, els tres tipus de cèl·lules clau que participen en l'homeòstasi del ferro són els **enteròcits duodenals**, que absorbeixen ferro de la dieta; els **macròfags**, que reciclen ferro a partir d'eritròcits i d'altres cèl·lules; i els **hepatòcits**, que emmagatzemen ferro i el poden alliberar quan sigui necessari. La clau que regula el pas en els teixits que transporten ferro és la transferència de ferro des d'aquestes cèl·lules transportadores al plasma.

L'hormona reguladora del ferro es l'**hepcidina**, produïda als hepatòcits (inclosos els hepatòcits fetals) i que controla la transferència de ferro al plasma des dels enteròcits, macròfags, hepatòcits i des del sinciciotrofoblast. El ferro que no es transfereix al plasma es reté a l'interior dels macròfags, dels hepatòcits i potser a la placenta, i funciona com a compartiment d'**emmagatzematge**. En canvi, el ferro retingut en els enteròcits es **perd** ràpidament del cos perquè aquestes cèl·lules tenen un recanvi de 2 a 5 dies (10–12), i s'eliminen a través de la femta arrossegant el ferro que no havia estat transferit al plasma. Per tant, la divisió de ferro entre els enteròcits duodenals (mucosa) i el plasma determina eficaçment el contingut de ferro del cos (13).

Les formes predominants de ferro en la **dieta** humana són l'**hemo**, la **ferritina** i el **ferro fèrric**, que formen un complex amb altres macromolècules. L'entorn àcid de l'estómac i l'exposició a enzims digestius causen un alliberament parcial d'aquestes formes de ferro. Hemo i ferro no hemo sembla que s'absorbeixin per

mecanismes separats (14), tot i que pot haver-hi una altra via implicada en l'absorció de la ferritina (15).

Tot i la importància de l'**hemo** i de la **ferritina** com a fonts de ferro i, malgrat alguns estudis (15–17), sabem encara poques coses sobre el seu transport i el metabolisme de l'enteròcit. Tanmateix, el transport del **ferro inorgànic** s'ha estudiat amb detall durant diverses dècades. L'absorció de ferro duodenal requereix que el ferro creui la membrana apical, seguit d'un emmagatzematge variable en forma de ferritina citoplasmàtica. A continuació, es transporta el ferro a través de l'enteròcit i es produeix la transferència de ferro a través de la membrana basolateral. Hi ha evidència de que no importa la forma en què és absorbit per l'enteròcit, el ferro en la seva forma **fèrrica** es lliura a la **transferrina** del plasma a prop de la superfície basolateral (14,15).

S'ha suggerit que el **ferro fèrric** també es pot moure a través de l'enteròcit en una **vacuola**, sense creuar les membranes cel·lulars (18). Una seqüència anàloga d'esdeveniments té lloc en els fagolisosomes dels macròfags quan fagociten els eritròcits vells. L'entorn hidrolític dels fagolisosomes digereix l'eritròcit i la seva hemoglobina, alliberant l'**hemo**, el qual és llavors degradat per l'**hemo oxigenasa 1 (HOX1)**. A continuació, el **ferro** és alliberat per a l'emmagatzematge en el citoplasma o per a l'exportació al plasma. La localització subcel·lular dels esdeveniments que tenen lloc després que l'hemo s'hagi alliberat en els fagolisosomes encara no s'ha pogut determinar amb precisió (19–22). Malgrat que la major part del ferro és exportat al **plasma** a través de la membrana cel·lular dels macròfags durant l'estrès hemolític, l'hemo podria ser exportat intacte pels transportadors d'hemo units a l'hemopectina, un transportador plasmàtic d'hemo. Així, dos conjunts de **transportadors** i la **ferritina** com a proteïna d'emmagatzematge de ferro citoplasmàtic participen en el **flux del ferro** mediat pels **enteròcits** i **macròfags**. Els transportadors de captació lliuren el ferro al citoplasma i un segon conjunt de transportadors transfereixen el ferro des del citoplasma al plasma sanguini (Figura 2).

#### 5.1.4. Importació del ferro

El transportador de la captació apical de **ferro inorgànic** més important en l'enteròcit és el *divalent metal transporter* (**DMT1**) que **importa** el **ferro ferrós** (s'obté per reducció del ferro fèrric ( $\text{Fe}^{3+}$ ) de la dieta) i altres diversos metalls divalents (23), però no **ferro trivalent (fèrric)** (forma predominant en la dieta que és fàcilment absorbible i que cal reduir a ferro ferrós ( $\text{Fe}^{2+}$ ) en l'estómac per ser posteriorment absorbit en el duodè) (24). L'evidència demostra que els precursors d'eritròcits i altres tipus de cèl·lules depenen de la transferrina pel subministrament de ferro i la **DMT1** té el paper imprescindible del **transport cap el citoplasma del ferro alliberat** per la **transferrina** (25,26).

A més, la DMT1 i una molècula relacionada, *natural resistance associated macrophage protein 1* (**NRAMP1**), també participen en el **transport de ferro en els macròfags** (20–22), però la seva funció específica en aquestes cèl·lules encara no és del tot clara. El transportador sembla ser essencial per l'homeòstasi del ferro normal i menys important per la dels altres metalls divalents.

El transport efectiu de ferro per la DMT1 depèn de la concentració de **ferro ferrós** i del cotransport de **protons** (18,24,27). Per tant, la funció de la **DMT1** necessita la **conversió** del ferro **fèrric** de la dieta al ferro **ferrós** abans del seu transport i també un ambient **àcid** en la vorera de raspall dels enteròcits. El citocrom b duodenal (**DCYTB**) contribueix a la reducció del ferro fèrric luminal, tot i que no es necessita per la funció de la DMT1 (27,28), potser perquè altres molècules amb activitat reductasa fèrrica també hi poden contribuir. L'**àcid ascòrbic**, com a conegut potenciador de l'absorció de ferro en la dieta, augmenta l'activitat reductasa del DCYTB, probablement actuant com el seu donant d'electrons preferencial (29–31) (Figura 2).

#### 5.1.5. Importació de l'hemo

Actualment hi ha dos candidats com a **transportadors de l'hemo** cap a dins del citoplasma, l'*heme carrier protein 1* (**HCP1**), capaç de transportar hemo i àcid fòlic (17), i l'*heme responsive gene 1* (**HRG1**), localitzat en els fagolisosomes

dels macròfags (16,19) de manera que podria estar implicat en el transport de l'hemo recuperat dels eritròcits vells i en el reciclatge del ferro (30) (Figura 2).

#### 5.1.6. Ferritina i magatzem citoplasmàtic

La **ferritina** és un heteropolímer esfèric compost per 24 subunitats de cadenes pesades (H) o lleugeres (L). La proporció relativa d'aquestes cadenes en el complex varia segons el teixits (32). És un component important de l'homeòstasi del ferro sistèmic, ja que pot emmagatzemar en el citoplasma grans quantitats de ferro en el seu interior. Les subunitats **H-ferritina** tenen funció ferroxidasa per facilitar la conversió del  $Fe^{2+}$  a una forma de mineral oxidat per l'emmagatzematge (33). La capacitat del compartiment de la ferritina per emmagatzemar el ferro en els enteròcits podria ser necessari per l'administració controlada de ferro als exportadors de ferro de la membrana basolateral. La **cadena L** de la ferritina promou la nucleació eficient i la mineralització.

El **ferro ferrós** és lliurat a la ferritina per proteïnes citoplasmàtiques, principalment per la ***poly(rC)-binding protein 1*** (24). L'alliberament de ferro des de la ferritina es pot produir a través de porus tancats o per autofàgia i degradació lisosomal de ferritina (34,35).

Al plasma sanguini trobem una **forma soluble** de la ferritina, relativament pobre en ferro. Aquesta forma és un polímer que conté 24 subunitats principalment de **L-ferritina** i que es deriva dels macròfags (36–38).

Les concentracions sèriques de ferritina es correlacionen amb les **reserves de ferro** en la majoria, però no en totes, les condicions fisiològiques i patològiques (39–41), amb excepcions que reflecteixen situacions patològiques en les quals els macròfags estan molt menys o molt més carregats de ferro que el parènquima del teixit, o situacions en què la síntesi de ferritina és deguda principalment a la inflamació.



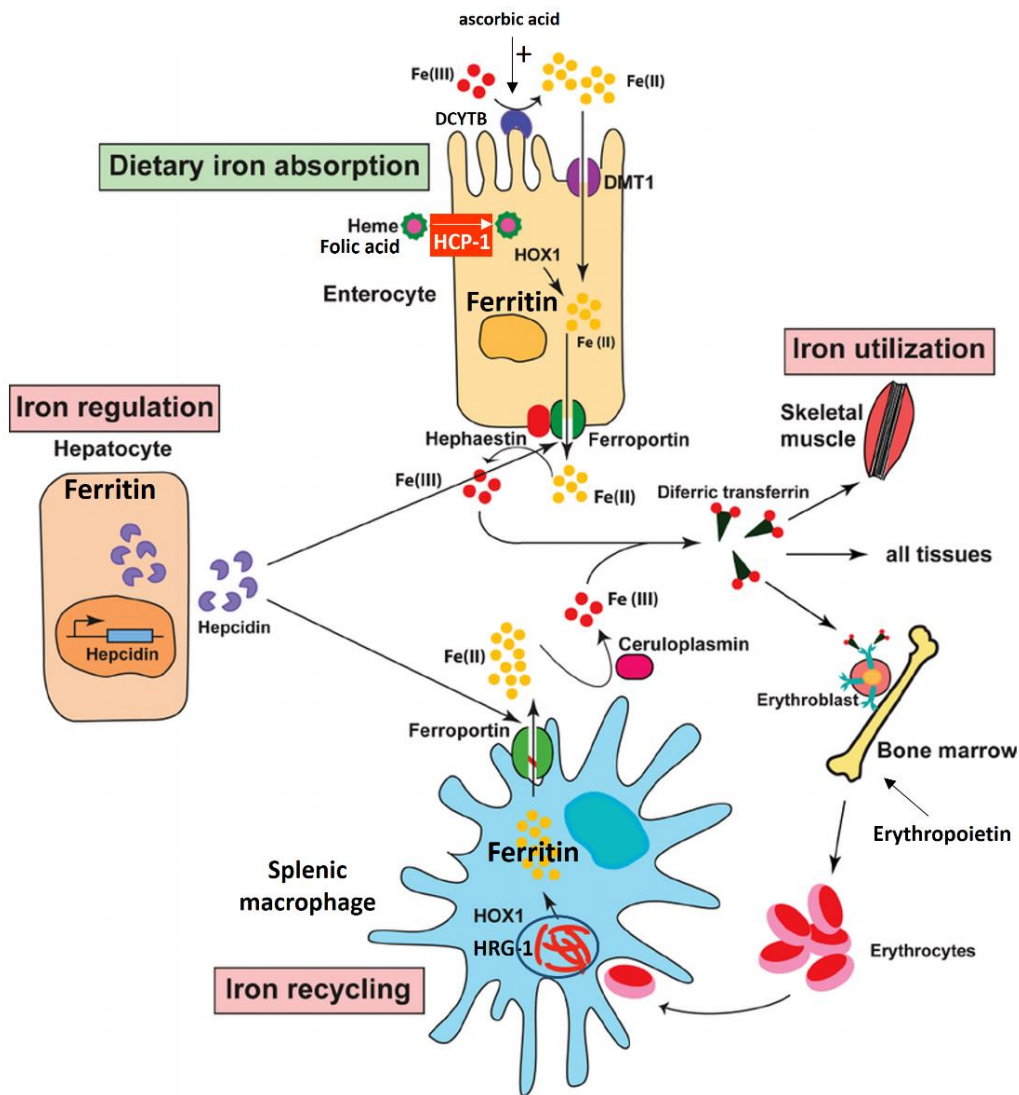
### 5.1.7. Exportadors de ferro

L'únic exportador de ferro que coneixem en els mamífers és la **ferroportina** que es va identificar alhora i de manera independent per tres laboratoris diferents (42–44). La ferroportina (**FPN**), també anomenada *solute carrier family 40 member 1* (**SCL40A1**), *iron-regulated gene 1* (**IREG1**) o *metal transporter protein 1* (**MTP1**) (42–44), és una proteïna transmembrana de diversos dominis codificada pel gen *SCL40A1*. Aquest és expressat per cèl·lules que regulen el metabolisme del ferro en el mamífers, el sincitiotroblast de la placenta, els eritròcits duodenals, els hepatòcits i els macròfags. S'expressa en superfícies cel·lulars implicades en la transferència de ferro al plasma, és a dir, en la membrana basolateral dels enteròcits duodenals (43,45), en les membranes plasmàtiques dels macròfags (45), en les superfícies sinusoïdals dels hepatòcits (46), i en la superfície basal del sincitiotroblast de la placenta fetal (43). La ferroportina exporta el  $\text{Fe}^{2+}$  i el  $\text{Zn}^{2+}$ , però no el  $\text{Mn}^{2+}$ , el  $\text{Cu}^{2+}$  o el  $\text{Cd}^{2+}$  (47).

Per una altra banda, l'exportació del ferro cel·lular depèn d'una **família de ferroxidases** que contenen **coure** (48), entre les quals trobem la **ceruloplasmina**, l'**hefastina** i la **zyklopen** (49–52). Aquestes proteïnes utilitzen l'oxigen per oxidar el ferro ferrós a ferro fèrric. Probablement aquestes ferroxidases faciliten el flux de ferroportina mitjançada per  $\text{Fe}^{2+}$  per oxidació de ferro a la seva forma fèrrica  $\text{Fe}^{3+}$ , i això facilita la seva absorció per l'apotransferrina i mantenint d'aquesta manera una baixa concentració de  $\text{Fe}^{2+}$  a la superfície cel·lular. El manteniment de gradient de  $\text{Fe}^{2+}$  a la part extracel·lular pot impulsar el transport de ferro mediat per la ferroportina (30) (Figura 2).

### 5.1.8. Exportadors de l'hemo

El *feline leukemia virus, tyme C, receptor 1* (**FLVCR1**) és l'**únic exportador conegut** de l'hemo (53). Hi ha dues isoformes funcionals de FLVCR1. La isoforma FLCVR1A s'expressa a la membrana plasmàtica, mentre que la isoforma FLCVR1B s'expressa en la mitocòndria. La isoforma FLCVR1B pot intervenir en l'exportació de l'hemo de la mitocòndria al citoplasma en els precursors dels eritròcits i d'altres cèl·lules amb síntesi activa d'hemo (54).



**Figura 2. Regulació del metabolisme del ferro.** La imatge mostra els principals òrgans i tipus cel·lulars involucrats en l'homeòstasi del ferro. Els enteròcits duodenals absorbeixen ferro de la dieta a través de la proteïna DMT1 localitzada en la membrana apical, després de la reducció de ferro fèrric ( $Fe(III)$ ) a ferro ferrós ( $Fe(II)$ ) catalitzada per l'enzim DCYTB i potenciada per l'àcid ascòrbic. D'altra banda, els enteròcits incorporen hemo i àcid fòlic a través del transportador HCP1. A continuació, el ferro associat als grups hemo és alliberat en el citoplasma mitjançant l'acció de la proteïna HOX1. La ferritina constitueix la principal reserva de ferro intracel·lular. Els macròfags de la melsa reciclen el ferro a partir de la fagocitosis dels eritròcits vells. El transportador HRG1 permet la incorporació de grups hemo des del fagolisosoma cap al citoplasma i l'acció de l'enzim HOX1 allibera el ferro associat a l'hemo. Els dos tipus cel·lulars exporten ferro a través del transportador ferroportina, amb l'ajut de l'hefastina, la qual oxida el ferro ferrós a ferro fèrric. El ferro també pot ser oxidat en la circulació per l'acció de la ceruloplasmina. La transferrina del plasma capta i transporta ferro en forma fèrrica cap a tots els teixits. L'hormona hepàtica hepcidina, a través de la seva unió a la ferroportina, regula l'exportació de ferro des de les cèl·lules cap a la circulació. Adaptada de Pantopoulos et al., 2012 (55).

La FLVCR1B es necessita pel desenvolupament i la diferenciació de la sèrie eritroide; sembla que sense ella l'hemo no arriba al citoplasma i no s'incorpora a l'hemoglobina. Si bé la FLVCR1B és essencial per l'exportació de l'hemo des de la mitocòndria al citoplasma, no sembla que estigui involucrada en l'homeòstasi sistèmica del ferro. En canvi, la isoforma FLVCR1A no es necessita pel desenvolupament de les cèl·lules eritroides.

### 5.1.9. Transportadors de ferro extracel·lulars

En circumstàncies normals, el **ferro fèrric** exportat des de les cèl·lules s'uneix al transportador **transferrina**, el qual pot portar fins a dos ions fèrrics. Aquests ions són lliurats als teixits diana per captació mediada pel **receptor de la transferrina (TFR)** 1. La transferrina té un paper important fins al punt que es produeix una anèmia greu quan hi ha una hipotransferrinèmia genètica o atranferrinèmia en els éssers humans i en els ratolins (56–58).

### 5.1.10. Control hormonal de l'homeòstasi del ferro per l'hepcidina i el seu receptor ferroportina

Malgrat les fluctuacions de ferro de la dieta humana i la pèrdua de sang ocasional per un traumatisme o per un part, la majoria d'humans adults **mantenen les concentracions** de ferro en el plasma en el rang 10-30  $\mu\text{M}$  i les **reserves** de ferro d'aproximadament 0,2-1 g (39). Per altra banda, en els períodes de dèficit de ferro la seva absorció augmenta i es redueix en situacions de sobrecàrrega de ferro via parenteral (9). Per tant, això ens porta a deduir que una o més hormones actuen sistemàticament regulant els fluxos principals de ferro i aquestes són alhora regulades pel ferro (9,11).

L'homeòstasi del ferro es manté gràcies l'hepcidina, un pèptid de 25 aminoàcids que funciona de forma anàloga a una hormona i mitjançant un mecanisme de retroalimentació negativa. El seu nom es deriva d'*hepatic bactericidal protein*. L'hepcidina és secretada pels hepatòcits i regulada positivament per la **sobrecàrrega de ferro** i la **inflamació**, i negativament per la **hipòxia** i l'**anèmia** (59). Exerceix les seves funcions de regulació de l'homeòstasi del ferro a través

de la unió a la **ferroportina**, de tal manera que indueix la seva fosforilació, i posterior degradació, bloquejant l'exportació del ferro cel·lular (veure apartat "Mecanisme d'acció de l'hepcidina") (60).

L'hepcidina va ser aïllada a partir d'un ultra-filtrat de sang humana i anomenada LEAP 1 (**Liver Expressed Antimicrobial Protein**) (61). El seu extrem C-terminal té efectes antimicrobians i antifúngics, i la proteïna està classificada, juntament amb les tionines i les defensines, dins el grup de la família dels pèptids antimicrobians rics en cisteïna i cations. Posteriorment, el mateix pèptid va ser aïllat independentment de l'orina humana (62) i del fetge de ratolí (63), i va ser assignat amb el nom d'hepcidina. Pigeon et al (63) van ser els primers en associar l'hepcidina amb el ferro i, poc temps després, els estudis amb ratolins transgènics van revelar que l'hepcidina regula el trànsit de ferro des de l'entorn (és a dir, des del lumen intestinal, o en el cas d'un fetus, des de la sang materna) cap el torrent sanguini. També regula l'alliberament de ferro des del compartiment d'emmagatzematge dels macròfags (12,64,65).

L'hepcidina circula en el plasma sanguini majoritàriament de forma lliure, excepte per una feble unió a l'albumina i a l' $\alpha$ 2-macroglobulina (66,67), i es filtra pels ronyons (62). El segment N-terminal de l'hepcidina (de 6 aminoàcids) està altament conservat entre espècies i és essencial per a la funció reguladora de l'hepcidina i per a la seva interacció amb la ferroportina (68). Durant la síntesi de l'hepcidina, es genera un prepropèptid de 84 aminoàcids que conté una seqüència conservada d'escissió reconeguda per una prohormona convertasa. L'escissió de la molècula dona lloc a un intermediari cel·lular anomenat **prohepcidina** que, a continuació, és processat cap a la forma madura i biològicament activa, l'hepcidina de 25 aminoàcids (61–63,69,70). No hi ha evidència que la molècula intermèdia tingui cap funció més que la de precursora de l'hepcidina madura. Per altra banda, s'han identificat formes més curtes de la molècula (22 i 20 aminoàcids) que es troben en **l'orina humana** o en **el plasma humà**, generalment a concentracions molt més baixes que la forma de longitud completa (62,71).

### 5.1.11. Mecanisme d'acció de l'hepcidina

L'expressió de l'hepcidina està regulada pels nivells de ferro de l'organisme (tant els nivells de magatzem de ferro al fetge com els ferro circulants; veure apartat "Regulació de l'hepcidina pel ferro") i per senyals inflamatòries. L'hepcidina també és una proteïna de tipus II de fase aguda que intervé en la hipoferrèmia associada a la infecció i a la inflamació. El senyal inflamatori que regula l'expressió de l'hepcidina es deu principalment a la **interleucina (IL)-6**. La IL6 és la citocina necessària per induir l'hepcidina durant la inflamació i l'eix IL6-hepcidina és el responsable de regular la hipoferrèmia de la inflamació (72).

L'hepcidina exerceix les seves funcions biològiques sobre el metabolisme del ferro mitjançant la unió al seu receptor a la membrana cel·lular, la ferroportina. La unió de l'hepcidina a la ferroportina implica la **internalització i degradació** lisosomal de la ferroportina, la qual cosa porta a una **disminució de l'exportació de ferro cel·lular**. La regulació postraduccional de ferroportina per hepcidina pot així completar un circuit homeostàtic: el ferro regula la secreció de l'hepcidina, que al seu torn controla la concentració de ferroportina en la superfície cel·lular (73,74). Les concentracions d'hepcidina necessàries per aquest efecte són entre 10 i 100 nM (73), i aquestes corresponen aproximadament en el plasma sanguini humà al rang superior en condicions patològiques d'hipoferrèmia (75). Aquest mecanisme de retroalimentació negativa manté el ferro a nivell adequat en la circulació per l'eritropoiesi sense que es causi dany oxidatiu a les cèl·lules. Més tard, si el ferro es necessita a la medul·la òssia per la síntesi d'hemoglobina, la producció d'hepcidina es redueix, la ferroportina s'expressa de nou a la superfície de la cèl·lula i l'exportació de ferro en el torrent sanguini es torna a activar.

La **sobreexpressió transgènica de l'hepcidina** causa anèmia per dèficit de ferro (76,77), per inhibició de l'absorció de ferro i per la restricció de l'alliberament de ferro emmagatzemat. De la mateixa manera, la sobreexpressió de l'hepcidina durant la vida fetal pot afectar la transferència de ferro, la qual cosa causa una anèmia per dèficit de ferro molt greu en el moment del naixement que pot provocar la mort durant el període perinatal (76). A l'altre extrem, trobem **dèficits d'hepcidina** en ratolins o en humans que causen hiperabsorció de ferro i

sobrecàrrega fèrrica en el parènquima d'òrgans com el fetge, el pàncrees i el cor, alhora que es produeix una paradoxal pèrdua del magatzem de ferro en els macròfags (78–80). Aquests efectes de l'excés o el dèficit de l'hepcidina evidencien el seu paper fonamental en el control de l'absorció i l'alliberament de ferro reciclat a partir de macròfags. La interacció hepcidina-ferroportina té un paper fonamental en l'homeòstasi del ferro que suggereix que la ferroportina pot ser l'única diana de l'hepcidina (Figura 3).

### **5.1.12. Mecanismes d'homeòstasi del ferro independents de l'hepcidina**

L'absència d'hepcidina en els invertebrats suggereix que hi ha mecanismes alternatius per a la regulació sistèmica de la ferroportina que podrien existir en invertebrats i persistir en els vertebrats, encara que podrien no ser prou eficaços per compensar les situacions patològiques en les quals l'hepcidina és deficient o excessiva.

Els dos factors que poden afectar l'homeòstasi del ferro per mecanismes independents de l'hepcidina són **la hipòxia** i **el dèficit de ferro cel·lular** (59), quan afecten les cèl·lules i els teixits involucrats en el transport sistèmic del ferro. En els ratolins, el RNAm (RNA missatger) de la ferroportina duodenal augmenta en condicions d'hipòxia o de dèficit de ferro (44,81–83). Per altra banda, la hipòxia i l'anèmia augmenten el RNAm de la ferroportina en els macròfags però no en els hepatòcits (81). Aquests efectes específics de teixit poden ser mitjançats pels factors induïts per hipòxia (**HIF**), especialment pel HIF2 $\alpha$  (23,84), els quals regulen la transcripció de la ferroportina. La degradació dels HIFs per les proli-hidroxilases depèn tant del ferro com de l'oxigen; així, les concentracions d'HIF2 $\alpha$  podrien augmentar pel dèficit de ferro cel·lular i per la hipòxia (Figura 3).

També cal assenyalar que un potencial mecanisme de regulació podria disminuir la ferroportina durant el dèficit de ferro cel·lular. Una forma del RNAm de la ferroportina conté un element de resposta al ferro (*IRE*) que podria reprimir la traducció de ferroportina en situació de dèficit de ferro, mentre que la forma alternativa de la ferroportina abundant al duodè i que no té l'element *IRE* eludiria

aquest efecte (83). El dèficit de ferro també pot reprimir la traducció de l'*HIF2α* a través de la interacció de proteïnes reguladores de ferro (IRP1 i 2) amb un element *IRE* en la regió 5' no traduïda del RNAm de l'*HIF2α* (84). Altres components de la maquinària de transport en el duodè, inclosos la **DMT1** i **DCTYB**, també són dianes de l'*HIF2α* i els seus RNAm estan **incrementats** durant la **hipòxia** i el **dèficit de ferro** (23). Queda per determinar si la **regulació hipòxica** representa la forma evolutivament més antiga de l'homeòstasi del ferro. Si és així, l'hepcidina podria haver evolucionat inicialment com un sistema mediador de defensa que no fa cas de les respostes homeostàtiques més primitives del ferro durant la infecció i, per tant, es podria haver adaptat i evolucionat en l'homeòstasi del ferro (30).

### 5.1.13. Regulació de l'hepcidina pel ferro

La relativa estabilitat de les concentracions de ferro en plasma degut al ràpid recanvi de ferro suggereix l'existència de mecanismes de **retroalimentació mediats per l'hepcidina** en resposta a canvis en els nivells de ferro. Aquest fet es va detectar en un experiment amb voluntaris humans (75) donant petites dosis de ferro suficients per elevar la concentració iònica en plasma de manera transitòria, però alhora massa petites per contribuir a augmentar de manera significativa les reserves de ferro. Es va observar que els nivells d'hepcidina sèrica augmentaven espectacularment en resposta als augments transitoris de ferro plasmàtic amb un retard d'aproximadament 8 hores (75). D'altra banda, les reserves de ferro limitades en homes i dones amb dietes variades suggereixen que les reserves corporals podrien regular l'hepcidina de manera independent dels efectes a curt termini de les concentracions de ferro en el plasma (39). Alhora, la regulació de l'hepcidina pel ferro del plasma i pel ferro emmagatzemat sembla que se situa en diferents moments del temps (hores *versus* dies després d'un canvi substancial en els nivells de ferro), cosa que podria permetre que els dos reguladors funcionin en paral·lel (75,85–87).

#### 5.1.14. Sensors i vies que regulen l'hepcidina

Els hepatòcits són els principals productors d'hepcidina (61–63,88). La ceruloplasmina i la ferroportina se situen predominantment a la zona periportal, en canvi l'hepcidina està distribuïda de manera uniforme entre els hepatòcits (46,89). Altres tipus de cèl·lules, com els macròfags i els adipòcits (88,90) tenen nivells molt més baixos de RNAm d'hepcidina.

L'única regulació coneguda de l'hepcidina és **transcripcional**. Els mecanismes moleculars que intervenen en la regulació de l'hepcidina pel ferro són complexos. Hi ha diversos gens implicats en la regulació de l'hepcidina pel ferro. L'eix central de la regulació de l'hepcidina està representat pel receptor de la *bone morphogenetic protein* (**BMP**) i la via de transducció de senyals mediada per la família *mothers against decapentaplegic homolog* (**SMAD**). Les proteïnes BMP són membres de la superfamília del factor de creixement transformant beta (TGF $\beta$ ) involucrats en la comunicació paracrina. Interaccionen amb receptors específics a la superfície cel·lular. Múltiples BMPs indueixen dràsticament l'expressió de l'hepcidina (91,92). S'han identificat diversos elements de resposta a BMP funcionals en el promotor de l'hepcidina (93–95) i l'efecte de l'ablació hepàtica específica de l'*SMAD4* bloqueja l'expressió de l'hepcidina (96).

La proteïna de membrana **hemojuvelina** és un coreceptor essencial per l'activació del receptor de BMP i la senyalització relacionada amb el ferro. La seva anul·lació porta a un dèficit greu d'hepcidina i a una important sobrecàrrega fèrrica en éssers humans (inici temprà, forma juvenil de l'HH) i en ratolins (97–99). La forma hepàtica de l'hemojuvelina sembla ser essencial per a la regulació de l'hepcidina mentre que la forma del múscul és prescindible (58,100). L'hemojuvelina soluble s'uneix a les **BMPs**, amb alta afinitat per la **BMP2, 4 i 6** (91,101,102) i això podria explicar la seva habilitat per antagonitzar el senyal de les BMP.

La naturalesa dels sensors extracel·lulars i com complementen la via de la BMP és poc conegut. Existeixen **receptors de la transferrina (TFR) 1 i 2** localitzats a la membrana cel·lular. Els nivells de TFR1, però no els de TFR2, estan regulats



pels nivells intracel·lulars de ferro. El **TFR2** és un ferm candidat com a sensor extracel·lular de la concentració d'**holotransferrina**. La TFR2 s'estabilitza per l'holotransferrina i la deficiència de *TFR2* en ratolins o éssers humans causa una pèrdua de detecció extracel·lular de ferro (103–107). El TFR2 està extraordinàriament expressat al fetge i fa de mitjancer en la captació del ferro unit a la transferrina en el hepatòcits *in vitro* (108), possiblement a través de l'endocitosi mitjançada pel receptor. La pèrdua de funció del TFR2 en micos (109) i en humans (110) s'associa amb una sobrecàrrega greu a l'hepatòcit. Igual que el TFR1, el TFR2 interactua amb la **proteïna de l'hemocromatosi humana (HFE)**, de manera que l'HFE i el TFR2 poden formar un complex de detecció del ferro que modula l'expressió de l'hepcidina en resposta als nivells sanguinis de transferrina difèrrica. En aquest model, la proteïna transferrina carregada de ferro i l'HFE competeixen per la unió al TFR1 (111), de manera que el complex HFE-TFR1 podria ser un altre sensor per l'**holotransferrina**, potser independent del TFR2 (112,113) o interactuar amb ell i amb l'**hemojuvelina** (114). Quan es produeix un augment de la saturació de la transferrina en sèrum (IST), l'HFE es dissocia del TFR1 i resta disponible per unir-se al TFR2. S'ha proposat que la interacció de la transferrina-HFE amb TFR2 podria funcionar com un complex efector-sensor-transductor de senyals de ferro que indicaria un alt contingut de ferro en sang (103,115). De forma resumida, l'**HFE** i el **TFR2** tenen papers independents, de tal manera que la sobreexpressió de l'*HFE* estimula la producció d'hepcidina (112,115), tant si el TFR2 hi és present com si no.

A més dels TFR1 i 2, cal fer referència a un receptor soluble de la transferrina (**sTFR**) corresponent a la porció extracel·lular escindida del TFR1 que s'allibera al sèrum (116). Aquest receptor és un dímer de proteïnes de dues subunitats idèntiques, unides entre elles per dos parells d'enllaços disulfur. El sTFR no s'ha implicat en el lliurament de la transferrina cap a l'interior de les cèl·lules ni en el magatzem de ferro intracel·lular. La determinació dels nivells de sTFR s'utilitza com a mesura del ferro funcional no subjecte a estats d'inflamació i indica l'estat real de les reserves de ferro (117).

Per altra banda, l'HFE no és necessari per la regulació transcripcional de la BMP6 en resposta al ferro de la dieta, però la pèrdua de l'*HFE* disminueix la

senyalització a través de la BMP6 *in vitro* i *in vivo* (118,119). Així doncs, l'HFE promou l'expressió de l'hepcidina a través d'algun tipus d'interacció amb la via de senyalització BMP6-SMAD. L'efecte de l'HFE, que es creu que té lloc al fetge via endocrina o paracrina, podria ser necessari per una resposta òptima als nivells baixos basals de BMP6 (119). En resum, els nivells sèrics de ferro (indicats per la quantitat de saturació de ferro de la transferrina (IST)) poden influir indirectament en la síntesi d'hepcidina a través de la via d'activació de la BMP (91,120) i mitjançant l'activació a través del complex TFR1-HFE.

Altres factors que poden inhibir l'expressió de l'hepcidina són la **neogenina** (102,121,122) i la proteasa matriptasa-2 (anomenada **TMPRSS6**) que regula negativament la senyalització de BMP relacionada amb l'hepcidina (123–127).

Les **reserves de ferro** són clarament potents reguladors de l'hepcidina, però no es coneix el mecanisme a través del qual regulen la transcripció de l'hepcidina. Sembla que hi podria estar implicat el receptor de BMP (28,106,128,129).

#### **5.1.15. Regulació de l'hepcidina per l'eritropoiesi**

L'absorció de ferro intestinal està incrementada en resposta a una **hemorràgia** o a l'**eritropoietina (EPO)** (9) de manera que un "regulador eritroide" modularia l'absorció intestinal de ferro assegurant el subministrament adequat de ferro quan és necessària una eritropoiesi accelerada (130,131).

Quan es va descobrir l'hepcidina, el concepte de regulador eritroide com a regulador de l'absorció es va modificar pensant en un regulador de l'hepcidina. Es va pensar inicialment que la hipòxia o l'EPO podien regular directament l'hepcidina (59,132,133). Les dades, però, van donar suport a un model en el qual la medul·la òssia produeix un supressor de l'hepcidina en resposta a l'EPO (134–137).

Recentment s'ha observat que l'hepcidina es reprimeix quan l'eritropoiesi és estimulada per l'EPO per afavorir el subministrament de ferro als eritroblasts en maduració. L'**eritroferrona (ERFE)** s'ha identificat com un dels reguladors que

inhibeixen l'hepcidina en les situacions d'estrès de l'eritropoiesi (després d'una hemorràgia, d'una hemòlisi i altres condicions que incrementen l'EPO). Per altra banda, la serina proteasa matriptase-2, codificada per **TMPRSS6**, és també un potent inhibidor de l'hepcidina en aquestes situacions; les seves mutacions poden causar anèmia per dèficit de ferro refractària a ferro (138) (Figura 3).

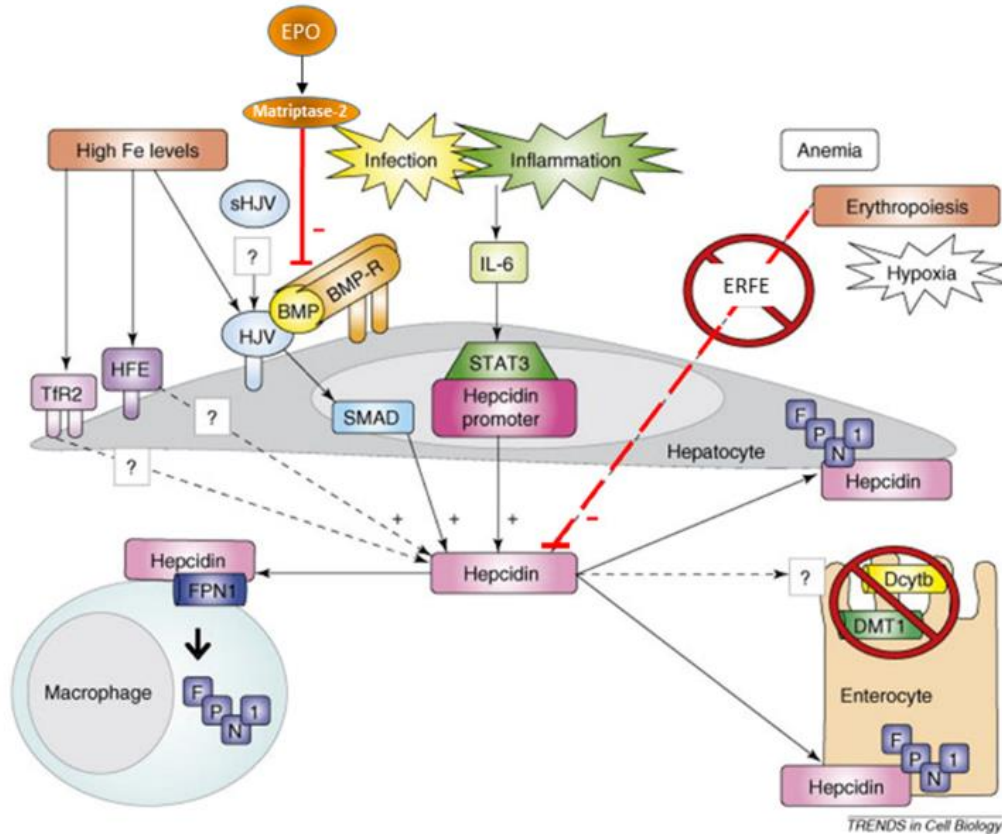
#### 5.1.16. Hecpidina i inflamació, dany hepàtic i defensa de l'hoste

La secreció d'hepcidina és part de la resposta immunitària innata, és a dir, està induïda per les infeccions i la inflamació (59,63). Aquesta resposta antimicrobiana ha estat ben definida i està relacionada amb la intervenció de les citocines inflamatòries, sobretot de la **IL6**, la qual activa el factor de transcripció *STAT3* (*signal transducer and activator of transcription 3*) (139). De la mateixa manera que altres proteïnes de fase aguda, la síntesi d'hepcidina s'indueix per esdeveniments intracel·lulars com l'estrès en el reticle endoplasmàtic a través del factor de transcripció CREBH (*cyclic AMP response element-binding protein H*) (140). Aquest mecanisme podria reservar ferro per funcions específiques en situacions d'estrès cel·lular (Figura 3).

La similitud estructural de l'hepcidina a pèptids antimicrobians, incloses les defensines i molècules relacionades, ha generat la hipòtesi segons la qual l'hepcidina té un paper important en la immunitat innata i podria regular els senyals inflamatoris (72).

Per una altra banda, l'hepcidina també s'indueix durant el dany hepàtic i la malaltia hepàtica. L'**estrès en el reticle endoplasmàtic** és el signe patològic que modula la **síntesi** d'hepcidina a través de l'activació de diferents factors de transcripció. En contrapartida, l'**estrès oxidatiu hepàtic** pot **suprimir** la producció d'hepcidina després de la ingesta d'alcohol o de malalties hepàtiques virals i causa una sobrecàrrega fèrrica que agreuja la lesió hepàtica. Els **factors de creixement epidèrmics i dels hepatòcits (EGF i HGF, respectivament)**, que contribueixen a la regeneració hepàtica després de la lesió, també poden suprimir l'hepcidina (85,141–150).

Sembla que la inducció de l'hepcidina pels factors microbians i inflamatoris serveix en la funció de defensa de l'hoste, però no hi ha massa evidència sobre aquest punt. Sabem que els pacients amb HH, la majoria dels quals tenen una



**Figura 3. Mecanismes de regulació de la producció d'hepcidina.** En resposta a elevats nivells de ferro, les proteïnes HFE, hemojuvelina i TFR2 incrementen l'expressió de l'hepcidina hepàtica. S'ha proposat que l'hemojuvelina actua com a coreceptor dels receptors de BMP. Un cop el lligand BMP i dos receptors de BMP s'uneixen a l'hemojuvelina en la superfície cel·lular s'activa la senyalització intracel·lular de BMP a través de la via SMAD, la qual indueix l'expressió de l'hepcidina. Tanmateix, els mecanismes a través dels quals les molècules HFE i TFR2 regulen l'expressió de l'hepcidina no estan del tot definits. La infecció i la inflamació augmenten la producció de citocines, com la IL6, la qual indueix l'expressió de l'hepcidina a través de mecanismes que inclouen la unió del factor de transcripció STAT3 al promotor de l'hepcidina. A continuació, l'hepcidina s'uneix a la ferroportina en la superfície de macròfags, enteròcits i hepatòcits. El complex és internalitzat i degradat, reduint tant l'alliberació de ferro pels macròfags i hepatòcits com l'absorció de ferro intestinal. S'ha suggerit també que l'hepcidina pot disminuir l'expressió de proteïnes involucrades en la captació de ferro intestinal, com la DCYTB i la DMT1, tot i que el mecanisme implicat no està clar. Per una altra banda, un augment de la producció d'EPO com a conseqüència de, per exemple, l'anèmia o la hipòxia, suprimeix l'expressió de l'hepcidina a través d'un mecanisme depenent de la matriptasa-2, el qual interfereix sobre la senyalització via BMP-SMAD. La molècula ERFE també ha estat identificada recentment com a reguladora negativa de l'expressió de l'hepcidina en aquestes condicions. Adaptada de Dunn et al., 2007 (155).

deficiència absoluta o relativa d'hepcidina, són més susceptibles a certes infeccions, per exemple *Vibrio vulnificus*, *Yersinia enterocolitica* i *Listeria monocytogenes* (151–154). No queda clar, però, en quina mesura diferents factors individuals, com ara la malaltia hepàtica, la sobrecàrrega fèrrica dels teixits, l'alta concentració de ferro extracel·lular, la manca de resposta hipoferrèmica a les infeccions i la manca d'hepcidina, contribueixen a augmentar la susceptibilitat a les infeccions.

S'ha plantejat la hipòtesi que no només la inflamació regula l'hepcidina, sinó que, de forma recíproca, els nivells d'hepcidina també modulen negativament els senyals inflamatoris. El mecanisme de l'efecte antiinflamatori de l'hepcidina inclouria la senyalització de l'hepcidina induïda per la ferroportina (156,157).

## 5.2. SOBRECÀRREGA FÈRRICA I ANÈMIA: DESORDRES GENÈTICS EN EL SISTEMA HEPCIDINA-FERROPORTINA

En condicions fisiològiques normals és necessari que els nivells de ferro al cos estiguin controlats amb gran precisió. La ingesta oral de ferro no ha de provocar sobrecàrrega bioquímica de ferro excepte en individus predisposats i que, a més, tenen una eritropoesi ineficaç. Quan existeix un defecte en els mecanismes de regulació del ferro apareixen els estats de **sobrecàrrega fèrrica** o d'**anèmia** que diferiran segons el mecanisme fisiopatològic alterat. Així, podem trobar alteracions en l'eix hepcidina-ferroportina (el més freqüent està associat a l'alteració del gen *HFE*), en la maduració de l'eritrocit o en el transport del ferro. Les síndromes per sobrecàrrega són heterogènies i poden ser adquirides o hereditàries.

Les mutacions en els gens que codifiquen l'hepcidina, els seus diferents reguladors o la seva diana molecular, la ferroportina, poden manifestar-se com a trastorns de la regulació del ferro (158,159). El dèficit d'hepcidina o la resistència a la ferroportina, porten a l'HH, un grup de malalties caracteritzades per una eritropoesi del ferro normal i una sobrecàrrega sistèmica de ferro deguda

a la hiperabsorció del ferro de la dieta (veure l'apartat "Hemocromatosi hereditària"). En aquests individus els macròfags alliberen més ferro que els d'individus sans (160), a més de presentar un increment de l'entrada de ferro des del tracte gastrointestinal que depèn principalment de l'increment del pas de ferro des dels enteròcits al plasma en comptes de l'augment de la captació des de la llum intestinal (64).

Aquesta absorció de ferro fora del control precís propi de les situacions fisiològiques, afegit a l'activitat eritropoietica normal, primer dona lloc a un augment de la saturació de la transferrina (IST) i, posteriorment, a la sobrecàrrega bioquímica de ferro prolongada en el temps. Aquesta situació sense tractament provoca un augment progressiu del contingut de ferro en les cèl·lules del parènquima que fa que finalment s'excedeixi la capacitat d'emmagatzematge del ferro intracel·lular a través de la proteïna ferritina. Com a conseqüència, es provoca un estrès oxidatiu greu amb una generació i pèrdua constant d'electrons d'alta energia de la cadena respiratòria mitocondrial (producció de ROS) (161,162).

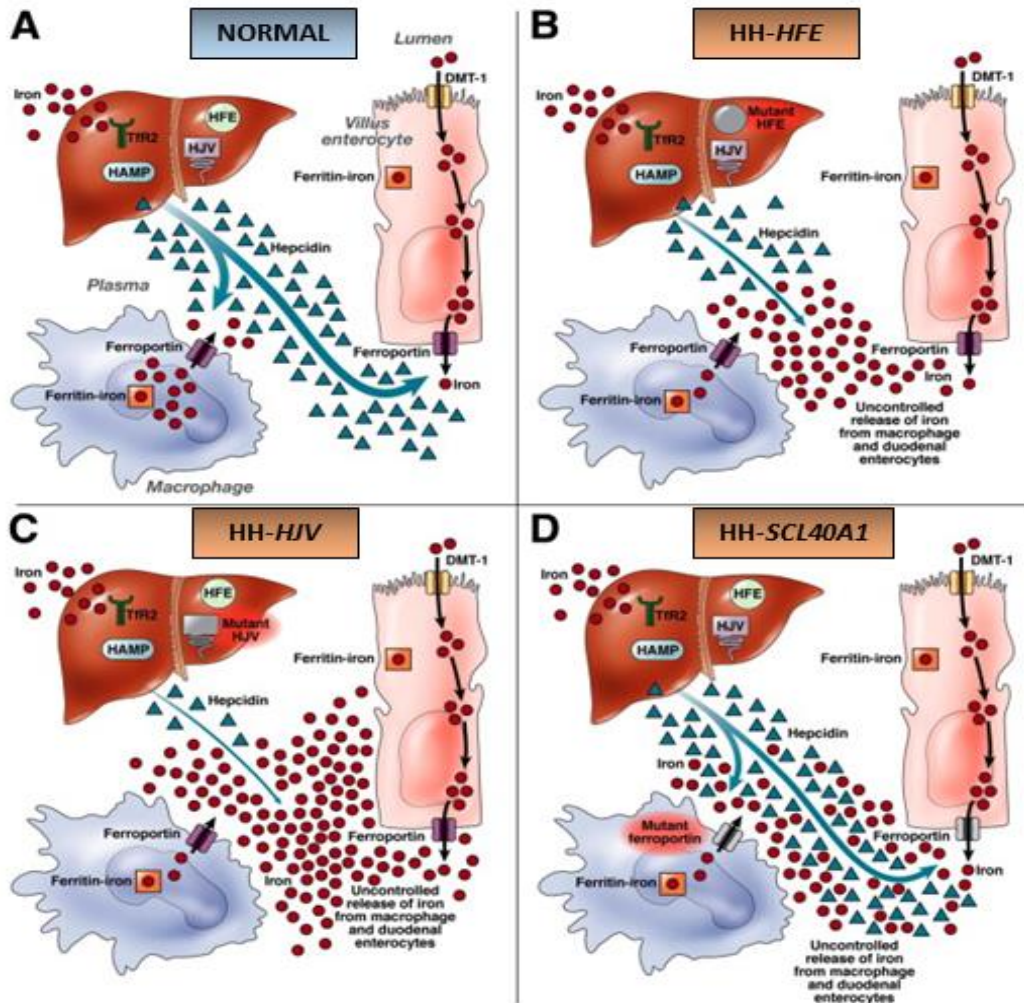
L'edat d'inici i la taxa de progressió de la malaltia es correlaciona amb la gravetat de la **deficiència de l'hepcidina**, però és probable que sigui modulada per gens encara no identificats com a part del sistema regulador del ferro, així com per l'ús i abús de l'alcohol, factors dietètics i la pèrdua de sang durant la menstruació (149,163,164). Així mateix, les mutacions heterozigotes en el gen de la **ferroportina (SCL40A1)** fan que disminueixi la concentració de la ferroportina a la membrana o que disminueixi la seva capacitat pel transport de ferro. Aquest trastorn dona lloc a la malaltia de la ferroportina, descrita el 1999 (165) i segona causa més comuna d'HH després de l'HH lligada a l'*HFE*. Està causada per un trastorn autosòmic dominant en el gen de la ferroportina (*SCL40A1*). Es tracta de les mutacions C326S (166) i C326Y (167) amb pèrdua de funció en la ferroportina (168–170) que es manifesta per una alteració en l'exportació del ferro, sobretot en els macròfags reticuloendotelials. Per aquest motiu, es produeix una resistència a l'hepcidina malgrat aquesta és produïda a nivells normals en resposta a l'augment dels nivells plasmàtics de ferro. Les mutacions en la ferroportina causen hiperabsorció de ferro de la dieta i acumulació de ferro

en els macròfags de la melsa, del fetge i de la medul·la, i es reflecteixen en uns nivells alts de ferritina en sèrum (170). Les cèl·lules del parènquima d'aquests òrgans són en gran part recanviades, i per tant es tracta d'una malaltia visceral lleu. Els nivells de ferro en sang són baixos (reflectit per un nivell baix-normal d'IST), tot i l'augment dels nivells de ferritina sèrica i, en determinades circumstàncies (per exemple en règims agressius de flebotomies), es produeix una tendència a l'anèmia (12).

En resum, en les sobrecàrregues fèrriques el trastorn en l'absorció excessiva de ferro sol estar relacionat amb una **síntesi deficient** o **activitat reduïda** de l'hepcidina. La majoria de casos d'HH són deguts a alteracions en els gens que regulen la **síntesi** d'hepcidina, entre els principals l'**HFE** (mutat en més del 80 % de casos d'HH) (171–173), el **TFR2** (174,175), l'**hemojuvelina (HFE2 o HJV)** (80,99) i la recentment descrita en relació al gen **BMP6** (176). Pel que fa a la **disminució de l'activitat** de l'hepcidina, podria ser deguda a mutacions en el gen que la codifica l'hepcidina (*hepcidin antimicrobial peptide (HAMP)*) o a mutacions que impedeixen la interacció de l'hepcidina amb la proteïna ferroportina (62,166,167) (Figura 4).

En el model de patogènesi de totes les formes d'HH, l'HFE, el TFR2 i l'hemojuvelina són reguladors independents però complementaris de la síntesi d'hepcidina en el fetge. Quan les formes funcionals del gen de l'hepcidina (*HAMP*) s'expressen a nivells normals i cada un dels tres reguladors funcionen correctament, la quantitat de ferro transferida a la sang serà l'adequada; no es dipositaran en els teixits nivells excessius de ferro. La pèrdua de funció de l'HFE o del TFR2 empitjora amb la quantitat de ferro que entra al torrent sanguini. Tanmateix, en aquests casos la funció de l'hemojuvelina és suficient per a l'expressió de l'hepcidina. Així, el ferro s'anirà acumulant als teixits de manera gradual, com passa en l'HH associada amb la pèrdua de la funció de l'HFE. El fenotip de la sobrecàrrega fèrrica associada a la pèrdua d'hemojuvelina és més greu i similar a l'associat amb la pèrdua d'hepcidina. Un fenotip similar seria l'esperat quan l'HFE i el TFR2 perden alhora la seva funció, sobretot si les dues proteïnes funcionen a través de vies diferents però complementàries. Les formes





**Figura 4. Les deficiències de l'hepcidina són el principal factor patogènic en l'hemocromatosi. (A)** En subjectes sans, l'hepcidina secretada pel fetge regula l'alliberament de ferro des dels macròfags i des dels enteròcits duodenals a través de la interacció amb la ferroportina expressada en les seves superfícies. Els gens *HFE*, *TFR2* i hemojuvelina (*HFE2* o *HJV*) són necessaris per ajustar l'expressió de l'hepcidina segons les necessitats de ferro. La pèrdua d'un dels reguladors de l'hepcidina porta a un flux de ferro cap al plasma sense cap restricció. Una part del ferro anirà cap a la medulla òssia per l'eritropoesi o cap al múscul esquelètic per incorporar-se a la mioglobina; una altra part del ferro s'emmagatzemarà en els hepatòcits en forma de ferritina. La resta romandrà en la circulació ja que a part de la menstruació, el cos no té cap manera efectiva d'eliminar el ferro sobrant. Des del plasma, l'excés de ferro es vessa al parènquima dels teixits on causarà dany oxidatiu cel·lular. Les característiques de la càrrega de ferro en la circulació depenen del tipus de regulador de l'hepcidina que s'hagi perdut. En absència del gen *HFE* (B), l'acumulació pot ser gradual i de lleu a moderada; o bé en cas de pèrdua de funció de l'hemojuvelina (*HFE2* o *HJV*) (C), l'acumulació serà massiva i ràpida. Per tant, trobarem formes més lleus (associades a l'*HFE*) o més greus d'hemocromatosi (associada a l'hemojuvelina (*HFE2* o *HJV*) o al *HAMP*). La pèrdua de *TFR2* probablement provoca un nivell intermedi de déficit d'hepcidina que porta a una síndrome de sobrecàrrega de ferro en l'adult que apareix de manera més precoç del que apareix en l'HH relacionada amb l'*HFE* i que és clínicament més greu. L'HH també pot estar associada a mutacions rares de la ferroportina (*SCL40A1*) (D) que fan que l'exportador de ferro no respongui a l'hepcidina. Malgrat que l'hepcidina és sintetitzada i alliberada de manera equilibrada segons els nivells plasmàtics de ferro, la mutació en la ferroportina continua deslliurant ferro de la dieta cap al plasma. Adaptada de Pietrangelo, 2004 (170).



greus de l'HH juvenil s'han descrit en individus amb mutacions en l'*HFE* i el *TFR2* (177). En ratolins, la supressió combinada de l'*HFE* i del *TFR2* provoca una massiva sobrecàrrega de ferro (113). Quan l'expressió de l'hepcidina és normal, les mutacions en el gen que codifica per a la ferroportina (*SCL40A1*) poden donar lloc a la resistència a l'hepcidina i a l'HH (12) (Figura 4).

A l'extrem oposat de l'espectre de trastorns genètics del ferro, tenim situacions en les quals la producció i les concentracions en sang de l'**hepcidina** són **inadequadament altes** o bé la **concentració a la membrana** o la **capacitat de transport** de la **ferroportina** està **reduïda**. També les lesions genètiques homozigotes en el gen de la **matriptasa-2** (*TMPRSS6*) causen la sobreproducció d'hepcidina i resulten en una síndrome d'anèmia per deficiència de ferro a causa de la disminució de l'absorció de ferro i el segrest de ferro en els macròfags (123,124,170,178,179).

### 5.3. HEMOCROMATOSI HEREDITÀRIA

#### 5.3.1. Antecedents històrics de l'hemocromatosi hereditària

La presència de ferro a la sang es va demostrar per primera vegada el 1713 però fins a dos segles més tard no es va poder descriure la primera proteïna relacionada amb el ferro, la ferritina, i no es van descobrir els principis bàsics de l'homeòstasi del ferro (12). A mitjans de la dècada de 1800 el metge francès Armand Trousseau va descriure l'hemocromatosi a partir de l'autòpsia d'un pacient amb DM (12). Va quedar impressionat per l'aparença de "rostre bronzejat del pacient". Va explicar que el fetge "era granular, d'un color uniforme gris groc i molt dens". En aquell moment l'única malaltia coneguda en relació al ferro era el que avui coneixem com a anèmia hipocròmica amb dèficit de ferro i a la qual anomenaven "clorosi o *morbus virgineus*" (12) degut a què era freqüent en les nenes i dones joves. Trousseau va promoure el tractament amb ferro tot i que es va classificar l'estat com a "malaltia nerviosa".

El terme “hemocromatosi” va ser inventat pel patòleg alemany Friederich Daniel Von Recklinhausen en un article curt publicat el 1889 (180). Va descriure la taca bronzejada dels òrgans que havia estat atribuïda a pigments sanguinis. Aquest terme va ser mantingut i hauria estat aplicat en diferents situacions, inclosos “*els casos de cirrosi pigmentària en associació a la diabetis*”, segons deia. Continuava, “*ha portat als autors francesos (Hanot i Schuchmann) a preguntar-se si el pigment bronzejat el produeix en excés el fetge malalt i d’allà passa al pàncreas i a la pell (melanodèrmia) o bé, com proposa Letulle, es forma principalment als vasos sanguinis a partir de la destrucció dels glòbuls vermells*”. Von Recklinhausen va pensar que es tractava de més d’una malaltia i, més tard, el terme hemocromatosi es va utilitzar per definir diferents alteracions, inclosa l’HH, la sobrecàrrega fèrrica associada a dany orgànic, la sobrecàrrega fèrrica a teixits i la sobrecàrrega fèrrica associada caracteritzada per cirrosi pigmentària i DM descrita durant el segle XIX. Fins a la meitat del segle XX aquesta condició es va atribuir a la DM, l’hemòlisi, les toxines i els trastorns metabòlics. El 1935 Joseph Sheldon va descriure la naturalesa multiorgànica de la síndrome i el probable paper del ferro com a causa principal (12). També va ser el primer en suggerir que el problema podria ser degut a un defecte metabòlic hereditari. En les dècades següents, els estudis sobre ferrocínètica van proporcionar més informació sobre la regulació del ferro i es van introduir les flebotomies com a tractament de l’hemocromatosi (12).

Fins a aquell moment la recerca sobre l’hemocromatosi s’havia limitat a observacions *postmortem*. Investigadors com MacDonald van qüestionar la naturalesa hereditària de l’hemocromatosi i van defensar el paper de l’alcohol i de la dieta rica en ferro en la seva patogènia, fins al 1975 quan en Simon et al. van relacionar la síndrome amb una alteració autosòmica recessiva situada al braç curt del cromosoma 6 (181). Vint anys més tard, Feder et al. van aconseguir clonar el gen *HFE* a partir d’estudis en rates i en humans, i van obtenir informació crucial sobre el metabolisme del ferro i l’hemocromatosi (171). El test genètic va revolucionar el diagnòstic d’HH i va posar de manifest que l’expressió fenotípica de la mutació del gen podia variar àmpliament (170). Es van desenvolupar proves genètiques dels polimorfismes del gen *HFE* i va quedar clar que el trastorn era molt més complex del que prèviament s’havia pensat. Es van identificar casos

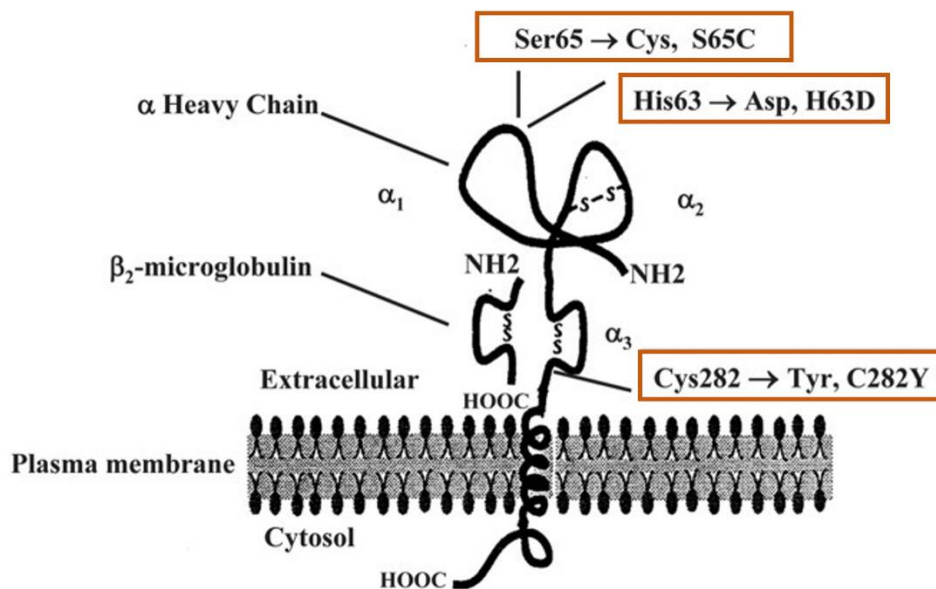
esporàdics i familiars d'hemocromatosi que no estaven associats amb el gen *HFE*, sobretot al sud d'Europa. El 1999 es va descriure un gran arbre genealògic de pacients amb sobrecàrrega hereditària de ferro, però el tret era autosòmic dominant i el ferro s'acumulava en el sistema reticuloendotelial en comptes d'en el parènquima (165). Dos anys més tard aquest fenotip es va associar a una mutació amb pèrdua de funció en el gen de la ferroportina (*SCL40A1*) (42–44,168).

El 1999 es va clonar el gen per a un segon receptor per la transferrina sèrica (*TFR2*) (108) i durant l'any següent es va descriure la mutació en *TFR2* en individus amb HH no relacionada amb el gen *HFE*. Estudis posteriors van revelar la patogènia de l'HH juvenil (12), que es va considerar una entitat diferent degut a la seva manifestació precoç, la ràpida progressió i la clínica greu que inclou miocardiopatia i alteracions endocrines en l'adolescent i l'adult jove. Així mateix, es va identificar l'hepcidina (61–63) i es van descobrir mutacions en el gen *HAMP* (80). Trobem, per tant, diversos gens implicats en la regulació de l'homeòstasi del ferro i les seves mutacions estan associades a diverses síndromes de sobrecàrrega bioquímica de ferro.

### 5.3.2. Genètica de l'hemocromatosi hereditària

L'HH és la malaltia genètica més freqüent en la raça caucàsica (3,182,183). L'HH està associada principalment a **dues mutacions** en el **gen *HFE***, la **C282Y** i la **H63D**, que són les causants d'una sobrecàrrega fèrrica que provoca les manifestacions clíniques de la malaltia; la seva expressió fenotípica depèn de factors ambientals. La forma més **prevalent** d'hemocromatosi és la relacionada amb l'**homozigosi C282Y** del gen *HFE*. Es tracta d'una substitució d'una cisteïna per una tirosina en la posició 282 de la proteïna (C282Y), la qual provoca un descens de l'expressió de l'hepcidina en resposta als nivells de ferro i la consegüent pèrdua de control sobre aquests (3). La seva **freqüència al·lèlica** mitjana, segons diversos estudis, és aproximadament d'un 6 % (184) i la seva **prevalença** és de l'ordre d'1/220-250 individus caucàsics descendents de població celta (185,186), molt menys freqüent entre els hispans, els asiàtic-americsans, els individus de les illes del pacífic i els individus de raça negra (185).

Hi ha dues altres mutacions identificades, una en la qual la histidina és substituïda per un àcid aspàrtic en la posició 63 (**H63D**), i una altra en la qual la serina és substituïda per una cisteïna en posició 65 (**S65C**). Aquestes no se solen associar a situacions de sobrecàrrega fèrrica, excepte en una minoria d'individus que, en situació d'heterozigosi composta **C282Y/H63D** o **C282Y/S65C** sí que poden estar-ne afectats. S'han descrit altres mutacions més rares en l'*HFE*, algunes en homozigosi o en heterozigosi amb la C282Y i sense expressió fenotípica (170,187–189) (Figura 5).



**Figura 5. Gen *HFE*.** Representació esquemàtica de la proteïna codificada pel gen *HFE*. La majoria de la proteïna és extracel·lular. Té una part intracitoplasmàtica curta i tres bucles extracel·lulars. S'indiquen les tres mutacions principals. Adaptada de Bacon et al., 2011 (195).

La mutació **C282Y** és menys freqüent que la **H63D** però la seva penetrància respecte a les manifestacions clíniques és marcadament més alta que en la mutació H63D (188,190–193). La mutació en posició **H63D** té una prevalença major en la població general (mitjana de freqüència al·lèlica del 14 %) (184) i està menys subjecta a variació geogràfica, tot i que no té penetrància (194). També s'han descrit diferències en la **prevalença** de les **mutacions del gen *HFE*** entre els individus del nord d'Europa i els d'Espanya o d'Itàlia (170,188,193).

Aproximadament entre el 85-90 % dels pacients afectats per formes heretades de sobrecàrrega fèrrica són **homozigots** per la mutació **C282Y** (184).

En un estudi de cribratge de les mutacions del gen *HFE* a Catalunya en voluntaris donants del Banc de Sang i de Teixits, es va observar una freqüència d'1/1004 d'homozigots C282Y, alhora es va trobar que el genotip C282Y/C282Y està associat a un increment en la ferritina i l'IST, i també que l'expressió bioquímica de la malaltia està present en el 80 % dels homes amb genotip C282Y/C282Y (196). En un altre estudi en nadons a Catalunya, es va detectar una freqüència de C282Y en homozigosi d'un 0,001, una freqüència de 0,01 de heterozigosi composta C282Y/H63D i de 0,002 de heterozigosi composta C282Y/S65C. La freqüència al·lèlica de la mutació va ser similar a l'observada al sud de França, a la República Txeca i en algunes àrees d'Itàlia. La freqüència al·lèlica de la mutació H63D a Catalunya va ser de les més altes detectades, de la mateixa manera que es va trobar que la mutació S65C és infreqüent (197).

Quan analitzem la presència de la mutació **C282Y** en altres malalties descobrim que l'**homozigosi** per aquesta mutació és freqüent entre els pacients amb DM, condrocalcosi, porfíria cutània tardana i/o malaltia hepàtica. Comparat amb la població general, la persona amb malaltia hepàtica té de 5 a 10 vegades més possibilitats de ser homozigot per la C282Y. Les probabilitats són encara més elevades si l'IST està elevat o si el pacient té un hepatocarcinoma, una de les complicacions més greus de l'hemocromatosis (184). Alguns individus amb **heterozigosi composta (C282Y/H63D)** o **homozigosi H63D** poden presentar paràmetres de ferro anormals i, fins i tot, augment dels dipòsits de ferro hepàtic, però aquests pacients solen tenir altres malalties concomitants (184,198–200).

Entre el 10-15 % dels pacients que tenen formes heretades de síndromes de sobrecàrrega bioquímica de ferro presenten **mutacions en altres gens** que codifiquen per proteïnes reguladores de l'homeòstasi del ferro: **hepcidina**, **hemojuvelina**, **TFR2**, **ferroportina** i **BMP6**. Aquestes cal tenir-les en compte en la majoria de les formes d'HH no relacionades amb el gen *HFE* (176,201).

Les formes d'hemocromatosi no relacionades amb el gen *HFE* són molt menys freqüents, però alhora estan molt més distribuïdes per diverses zones del món, sense tenir en compte la raça. La mutació **TFR2** més comuna associada a l'hemocromatosi és la mutació sense sentit (Y250X) que modifica el TFR2 en l'aminoàcid 250 (110). L'**hemocromatosi juvenil** també és poc freqüent; la malaltia es va veure que estava lligada a mutacions del gen que codifica l'**hepcidina (HAMP)** en individus de tres famílies (80) i també sovint a mutacions en el gen que codifica l'**hemojuvelina (HFE2 o HJV)** (s'han publicat 59 casos amb la seva genealogia). La mutació G320V en l'hemojuvelina s'ha detectat en el 50 % de les famílies amb hemocromatosi juvenil (99).

Per una altra banda, la majoria de les mutacions en la **ferroportina** que donen lloc a una síndrome de sobrecàrrega fèrrica s'associen a la malaltia de la ferroportina ja comentada en l'apartat "Sobrecàrrega fèrrica i anèmia: desordres genètics en els sistema hepcidina-ferroportina". Patogenèticament, es tracta d'una malaltia diferent a l'HH que dona lloc a una síndrome d'hemocromatosi per resistència a l'hepcidina (170). Recentment s'han descrit mutacions en el gen **BMP6** que s'associen a una lleu o moderada sobrecàrrega fèrrica d'inici tardà (176).

Les sobrecàrregues fèrriques greus també poden ser degudes a altres trastorns hereditaris com l'**aceruloplasminèmia** i la **hipotransferrinèmia** (o **atransferrinèmia**). Les dues entitats són molt poc freqüents i s'han de distingir de l'hemocromatosi per les seves característiques clíniques. L'aceruloplasminèmia té manifestacions neurològiques (signes extrapiramidals progressivament greus, atàxia cerebel·losa, demència), i la hipotransferrinèmia (o atransferrinèmia) causa anèmia potencialment mortal.

A part de les causes hereditàries, també existeixen **causes secundàries** de sobrecàrrega bioquímica de ferro en relació a les anèmies amb sobrecàrrega, a les malalties cròniques hepàtiques, a les sobrecàrregues per transfusió i a altres de diversa etiologia.

### 5.3.3. Clínica d'hemocromatosi i dels estats de sobrecàrrega fèrrica

En l'hemocromatosi, el **fenotip** està determinat principalment pel ritme i la magnitud de la sobrecàrrega de ferro circulant que alhora depèn de la proteïna específica que s'altera i de la seva interacció amb l'hepcidina. Les persones amb HH habitualment estan **asimptomàtiques**, sobretot en estadis inicials. Els símptomes de presentació són subtils i inespecífics. Podem trobar des de simples resultats bioquímics alterats fins a dany tissular greu amb malaltia avançada i irreversible. Les variacions en els símptomes són degudes al fet que en les manifestacions de l'**homozigosi C282Y** intervenen també, tal com ja hem comentat, **factors ambientals** (12). Actualment rarament es presenten amb la clàssicament descrita "diabetis bronzejada", la tríada clàssica de cirrosi, DM i pigmentació bronzejada de la pell. Tampoc es veuen sovint en la pràctica habitual els debuts amb altres alteracions endocrines, inflamació articular o cardiopatia.

Inicialment, podem trobar manifestacions clíniques com ara astènia, letargia, artràlgies i impotència, i més tard, artràlgies més greus, osteoporosi, cirrosi, hepatocarcinoma, cardiomiopatia, insuficiència cardíaca, arítmia, DM i hipogonadisme (Taula 1). El cor i el sistema endocrí són particularment susceptibles a la ràpida sobrecàrrega de ferro (65). En les **formes juvenils** d'HH trobem greus alteracions als òrgans en edats precoces que inclouen insuficiència cardíaca i insuficiència endocrina. Pel contrari, la càrrega gradual de ferro porta a un fenotip més lleu amb inici més tardà dels símptomes, l'anomenada **HH associada al gen HFE**. S'han descrit fenotips intermedis. És, però, important recordar que malgrat les variacions, totes aquestes mutacions genètiques poden causar la mateixa síndrome perquè el grau de toxicitat del ferro és idèntic al fetge, al cor i a les glàndules endocrines.

L'HH simptomàtica no sol aparèixer en persones menors de 40 anys. En les dones, la menstruació endarrereix l'acumulació de ferro, de manera que els símptomes apareixen a partir de la menopausa o bé quan han patit una histerectomia o després d'un ús prolongat d'anticonceptius orals. Des de l'existència de tests de diagnòstic genètic la mitjana d'edat del diagnòstic és

similar en homes i dones, però en les dones les manifestacions són menys greus (3). El major coneixement de la malaltia entre els metges ha permès diagnosticar l'hemocromatosi en etapes inicials, sobretot en els països amb una alta prevalença. Els símptomes actualment més comuns inclouen fatiga, malestar general, artràlgies i hepatomegàlia. Tanmateix, l'HH està associada a patologia maligna, especialment a **hepatocarcinoma**. Aproximadament un 6 % dels pacients amb HH i cirrosi desenvolupen un hepatocarcinoma. Això representa un risc 20 vegades superior al de la població general i una taxa d'incidència anual d'un 4 % (202). Ja hem comentat que el mecanisme patogènic que incrementa el risc és el dany oxidatiu de l'ADN provocat per l'excés de ferro. I aquest excés de ferro dipositat als hepatòcits és tòxic i pot provocar una cirrosi. Pot ser el factor pronòstic més important en pacients amb HH, de tal manera que la supervivència es pot escurçar en els pacients amb cirrosi o amb DM. El diagnòstic precoç i el tractament podrien prevenir la morbiditat i la mortalitat (203). La taxa de supervivència a cinc anys en pacients que tenen HH no tractada i cirrosi es redueix un 50 % en comparació amb els que no tenen cirrosi (203). A més, els pacients amb HH que consumeixen més de 60 g d'alcohol al dia (4 unitats) tenen nou vegades més incidència de cirrosi (204). Cal remarcar que la sobrecàrrega fèrrica lleu associada a la **heterozigosi simple** per la mutació **C282Y** del gen *HFE* dona susceptibilitat a la malaltia del fetge gras no alcohòlic, també anomenada **esteatosi hepàtica no alcohòlica (EHNA)** i causa un **dèficit relatiu d'insulina** (205) (Taula 1).

Una metanàlisi amb 1.382 pacients **homozigots** per a la mutació **C282Y** del gen *HFE* (descrit en 16 estudis) va demostrar que el 26 % de les dones i el 32 % dels homes presentaven nivells augmentats de **ferritina** ( $> 200 \mu\text{g/L}$  en les dones i  $> 300 \mu\text{g/L}$  en els homes) en el moment del diagnòstic. Entre els 625 homozigots per a la mutació C282Y als que es va fer biòpsia hepàtica (descrits en 13 estudis diferents), l'excés de ferro en els teixits ( $> 25 \mu\text{mol/g}$  en el teixit hepàtic o un augment en el nivell d'hemosiderosi) es va detectar en el 52 % de les pacients femenines i en el 75 % dels pacients masculins (184). En els pacients amb hemocromatosi relacionada amb l'*HFE* els nivells de ferritina sèrica superiors a 1000 mg/L poden indicar fibrosi hepàtica, fins i tot amb nivells de transaminases



normals (206). Una vegada es desenvolupa la cirrosi, els pacients tenen més risc de carcinoma hepatocel·lular.

**Taula 1. Espectre clínic relacionat amb l'hemocromatosi hereditària.** Adaptada de Crownover & Covey, 2013 (3).

Amenorrea
Apatia
Arítmies
Artràlgies
Ascites
Asimptomàtic
Atròfia testicular
Augment de la pigmentació (diabetis bronzejada)
Carcinoma hepatocel·lular
Cardiomiopatia
Cirrosi
Debilitat
Diabetis mellitus
Dolor abdominal
Esplenomegàlia
Hepatomegàlia
Hipogonadisme
Hipotiroidisme
Impotència
Inflamació articular (especialment segona i tercera metacarpofalàngiques)
Insuficiència cardíaca congestiva
Letargia
Manifestacions cutànies de malaltia crònica hepàtica ( <i>spider nevi</i> , eritema palmar)
Osteoporosi
Pèrdua de la libido
Pèrdua de pes
Varices esofàgiques

Una altra metanàlisi va concloure que del 10 al 33 % dels pacients **homozigots** per la mutació **C282Y** de l'*HFE* desenvolupaven morbiditat associada a l'hemocromatosi (207). El risc era més alt en famílies amb individus amb hemocromatosi (32-35 %) que en els subjectes identificats a través d'estudis en la població general (27-29 %). Entre el 24 % i el 32 % dels homozigots C282Y identificats per cribratge presentaven nivells elevats en els **enzims hepàtics** en el moment del diagnòstic. En un subgrup es va realitzar una biòpsia del fetge i es va trobar **fibrosi** entre el 30 % i el 42 % dels pacients homes i entre el 2,7 % i el 4 % de les pacients dones; la **cirrosi** era present en el 4,4 % i l'11,8 % dels pacients de sexe masculí i fins el 2,7 % de les pacients de sexe femení (208,209)

En tres estudis longitudinals de cribratge poblacional es va seguir els pacients durant 20 anys i es va demostrar que la malaltia només progressava en una

minoria dels pacients *HFE* C282Y no tractats (210–212). Entre el 38 i el 50 % dels pacients homozigots C282Y de l'*HFE* desenvolupen sobrecàrrega fèrrica i entre el 10 % i el 33 % poden desenvolupar hemocromatosi associada a morbiditat (207). Un cop més el risc de malaltia deguda a la sobrecàrrega de ferro és molt més alt entre els **homes homozigots C282Y** de l'*HFE* (28 % *versus* 1 % en les pacients dones) (212). A més del sexe masculí i de la pèrdua de sang deguda a la menstruació en les dones, que són els principals factors associats amb la penetrància de l'homozigosi C282Y de l'*HFE*, les combinacions de mutacions en els **gens** que codifiquen per a l'**hepcidina (HAMP)** o l'**hemojuvelina (HFE2 o HJV)** han estat associades a l'expressió clínica de la sobrecàrrega bioquímica de ferro, encara que aquestes situacions són poc freqüents (213,214). S'ha proposat que els polimorfismes en altres **gens que regulen el ferro** (215–219) o l'**estrès oxidatiu** (220) podrien determinar la **penetrància** de l'hemocromatosi. En aquest sentit, les variants de la proteïna **BMP2** han estat associades a l'augment de la penetrància en el homozigots C282Y (221), però l'abús d'**alcohol** és el principal factor modificador relacionat amb l'hemocromatosi associada a cirrosi (222).

L'HH que està associada a mutacions en el **TFR2** habitualment es presenta en edats més precoces que l'HH associada a l'*HFE* i el fenotip és habitualment més greu. Molts dels individus ja presenten malaltia simptomàtica (malaltia hepàtica, DM, cardiomiopatia) en el moment del diagnòstic. A diferència de l'HH relacionada amb l'*HFE*, aquesta forma afecta a persones de raça blanca i no blanca amb freqüències similars. Els pacients amb HH d'inici juvenil solen tenir símptomes relacionats amb el cor i les glàndules endocrines, que es desenvolupen abans que en les formes de l'adult (Taula 2).

S'ha suggerit que la sobrecàrrega de ferro podria incrementar el **càncer de pulmó** (223,224), tot i que no es disposa d'una evidència clara. Un estudi de cohorts prospectiu en dones va demostrar que no hi havia associació entre el càncer de pulmó i els dipòsits de ferro al cos (225).

Per una altra banda, la sobrecàrrega fèrrica causa **cardiomiopatia restrictiva**, disfunció diastòlica, fallada cardíaca, arítmies i defectes de conducció com els

bloqueigs auriculoventriculars, bradiarítmies, taquiarítmies i mort sobtada. La cardiomiopatia per sobrecàrrega de ferro és reversible si la teràpia comença abans que es manifesti la insuficiència cardíaca (3,226–228).

**Taula 2. Presentacions típiques de les principals formes d'hemocromatosi.** Adaptada de Pietrangelo 2010 (12).

<b>HEMOCROMATOSI <i>HFE</i></b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Homes caucàsians, 40-50 anys</li> <li>• Cansament, pell bronzejada, artràlgia i/o hepatomegàlia</li> <li>• IST i ferritina elevades</li> </ul>
<b>HEMOCROMATOSI <i>TFR2</i></b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dones o homes, caucàsians o no caucàsians, 30-40 anys</li> <li>• Cardiomiopatia, endocrinopatia, malaltia hepàtica</li> <li>• IST i ferritina elevades</li> </ul>
<b>HEMOCROMATOSI HEMOJUVELINA I HEMOCROMATOSI HEPCLIDINA</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dones o homes, caucàsians o no caucàsians, 15-20 anys</li> <li>• Impotència/amenorrea i/o cardiomiopatia</li> <li>• IST i ferritina altes</li> </ul>
<b>MALALTIA DE LA FERROPORTINA</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dones i homes, caucàsians i no caucàsians, 10-80 anys</li> <li>• Un familiar amb hiperferritinèmia no explicada</li> <li>• Ferritina amb elevació inexplicada i IST normal</li> </ul>

### 5.3.3.a. Estadis de l'hemocromatosi hereditària

Freqüentment es diagnostica l'alteració genètica en individus cas asimptomàtics i en familiars de pacients que pateixen la malaltia en situació **presimptomàtica**. Aquests individus que no han desenvolupat la malaltia tenen “**susceptibilitat genètica**” per desenvolupar una sobrecàrrega fèrrica però potser mai la desenvoluparan per raons que encara no estan clares (185,212,229). L'expressió fenotípica només la trobem en un 70 % dels homozigots C282Y i menys del 10 % dels homozigots desenvoluparan una sobrecàrrega fèrrica greu amb dany als teixits i manifestacions clíniques d'HH (212,229). En aquest sentit,

en la conferència de consens de l'*European Association for the Study of Liver Diseases* (EASL) del 2000 (230) es van identificar diferents estadis en la progressió de l'hemocromatosi:

- Estadi 1: individus amb el trastorn genètic (tenen "susceptibilitat genètica") però sense increment de la reserva de ferro.
- Estadi 2: pacients amb el trastorn genètic que tenen evidència fenotípica de sobrecàrrega bioquímica de ferro però sense dany als teixits dels òrgans.
- Estadi 3: pacients que tenen el trastorn genètic amb sobrecàrrega bioquímica de ferro i amb evidència de dipòsit i de dany en els teixits i òrgans.

### 5.3.4. Diagnòstic de l'hemocromatosi hereditària

#### 5.3.4.a. Bioquímica

L'índex de saturació de la transferrina (**IST**) normalment és més elevat en pacients amb HH. A mesura que evoluciona el procés, també els nivells de **ferritina** comencen a elevar-se indicant una possible acumulació de ferro als teixits. Per tant, els pacients amb HH simptomàtica tenen inevitablement sobrecàrrega bioquímica de ferro que es reflecteix en l'augment dels nivells de ferritina sèrica. En pacients simptomàtics que presenten nivells de ferritina elevats i nivells d'IST normals cal excloure altres causes d'hiperferritinèmia. Si aquestes altres causes s'han descartat o si la hiperferritinèmia persisteix després d'haver estat tractada de manera adequada, s'han d'avaluar les reserves de ferro hepàtic per mitjans directes (RM o biòpsia hepàtica) (12) (Figura 6).

#### 5.3.4.b. Gen *HFE*

En l'HH que està associada a l'*HFE*, el diagnòstic es basa en la detecció de l'**homozigosi C282Y** en pacients amb sobrecàrrega fèrrica circulant i en el parènquima. Els nivells de ferro en sang i l'IST no reflecteixen quantitativament els dipòsits de ferro al cos i no s'haurien d'utilitzar com a marcadors indirectes

de sobrecàrrega fèrrica als teixits. Les mesures dels nivells de ferritina són les utilitzades universalment per determinar de manera indirecta la sobrecàrrega fèrrica als teixits. Si els nivells de ferritina són normals s'ha de descartar qualsevol sobrecàrrega fèrrica als teixits. Tanmateix, els nivells augmentats de ferritina de vegades són difícils d'interpretar perquè poden ser deguts a diferents situacions com estats d'inflamació, alteracions metabòliques com la DM i l'obesitat, malalties neoplàsiques, l'abús d'alcohol i la necrosi cel·lular hepàtica. En absència d'aquests factors, la hiperferritinèmia en un pacient homozigot per la mutació C282Y de l'*HFE* indica sobrecàrrega fèrrica. Els pacients amb cirrosi, DM i miocardiopatia sovint tenen nivells alts de ferritina i d'IST. Per tant, en els individus simptomàtics amb nivells elevats de ferritina cal fer la prova de les mutacions de l'*HFE* (12,195) (Figura 6).

#### 5.3.4.c. Biòpsia hepàtica

Abans que el gen *HFE* fos identificat l'HH es diagnosticava basant-se en els resultats de la biòpsia hepàtica i en el contingut de ferro al fetge i la seva distribució (aproximadament des de la dècada dels 1950). Bàsicament, avui en dia, els pacients es diagnostiquen en base a l'homozigosi C282Y de l'*HFE* i als nivells elevats d'IST i de ferritina en sang. Per tant, l'anàlisi de les mostres de biòpsia hepàtica no són necessàries pel diagnòstic d'HH en els homozigots C282Y (170). La biòpsia podria utilitzar-se en certs casos per **descartar la presència de fibrosi hepàtica o de cirrosi**, per exemple, en pacients que són homozigots per la C282Y de l'*HFE*, majors de 40 anys, amb nivells de ferritina sèrica > 1000 mg/L, amb nivells elevats de transaminases i hepatomegàlia (195,206,231,232).

L'hepatocarcinoma és molt poc freqüent en pacients sense cirrosi; així doncs el que realment és important és detectar i tractar la sobrecàrrega fèrrica en les primeres etapes. Cal fer una ecografia de cribratge cada 6-12 mesos a tots els pacients amb HH i cirrosi. Si es troba una lesió d'1 cm o més, es recomana el seguiment amb RM multidetectora de quatre fases i biòpsia (233) per determinar el grau i la distribució de la càrrega de ferro present (recomanat per les guies amb un nivell d'evidència 2C (195)). L'acumulació de ferro al fetge afecta

típicament els hepatòcits, mentre que les cèl·lules de Küpffer se salven fins a etapes finals de la progressió de la malaltia. S'acumulen grànuls fins d'hemosiderina principalment al pol biliar de les cèl·lules, i la distribució lobular mostra un gradient decreixent des de l'àrea periportal a la zona centrolobulillar. Apareixen dipòsits de ferro al mesènquima quan el contingut de ferro de les cèl·lules hepàtiques és prou alt com per causar necrosi cel·lular. Quan la sobrecàrrega fèrrica es limita només als hepatòcits, la primera condició que s'ha d'excloure és l'anèmia amb sobrecàrrega fèrrica per bloqueig del ferro deguda a l'eritropoesi ineficaç (anèmia per malaltia crònica). També s'ha de descartar una etapa final de cirrosi. En aquest cas, el ferro es distribueix heterogèniament d'un nòdul a un altre i no s'han detectat dipòsits a nivell de teixits fibrosos o a les parets dels conductes biliars i dels vasos sanguinis. De la mateixa manera, les guies recomanen una biòpsia hepàtica per establir l'estadi de l'hepatopatia secundària en els homozigots C282Y o en els heterozigots compostos C282Y/H63D si els enzims hepàtics (alanina-aminotransferasa (ALT), aspartat-aminotransferasa (AST)) estan elevats o si la ferritina  $> 1000 \mu\text{g/L}$  (evidència 1B). La biòpsia hepàtica es recomana pel diagnòstic i el pronòstic en els pacients amb marcadors fenotípics de sobrecàrrega fèrrica que no són homozigots C282Y o heterozigots compostos (nivell d'evidència 2C) (195).

Cal tenir en compte altres condicions comunes que poden alterar els resultats de les proves, com per exemple els trastorns metabòlics, l'hepatitis crònica, les malalties hepàtiques alcohòliques. Això es particularment important en pacients de raça no blanca en els quals l'HH relacionada amb l'*HFE* és extremadament rara. En aquests casos, si una biòpsia hepàtica indica un patró de sobrecàrrega fèrrica compatible amb hemocromatosis, caldrà primer pensar en altres causes de sobrecàrrega fèrrica del parènquima hepàtic (per exemple les anèmies amb sobrecàrrega fèrrica) i, si es descarten, realitzar les proves genètiques d'HH no relacionada amb l'*HFE* (Figura 6).

#### **5.3.4.d. Ressonància magnètica nuclear**

El ferro dipositat al fetge es pot avaluar també de manera no invasiva mitjançant la RM quan es troba en quantitat suficient per ser detectat (170,234). La RM és

una prova que permet quantificar la concentració de ferro en el fetge estudiant tot l'òrgan, a diferència de la biòpsia que només obté una mostra d'una petita àrea del parènquima i, per altra banda, comporta un risc més important. El valor normal de la concentració de ferro al fetge és de  $< 36 \mu\text{mol Fe/g}$ . Valors per sobre de  $71 \mu\text{mol Fe/g}$  són altament suggestius d'HH. L'índex de ferro hepàtic s'obté en dividir la concentració de ferro al fetge per l'edat del pacient. Un valor d'índex de ferro al fetge  $\geq 1,9$  es considera indicatiu d'HH. Les limitacions de la RM les trobem en els pacients amb esteatosi hepàtica i patrons atípics de distribució del dipòsit de ferro (235,236) (Figura 6).

### 5.3.5. Cribratge d'hemocromatosi hereditària

No es recomana el cribratge genètic universal per l'HH. L'argument és la discrepància en la penetrància de la malaltia en persones fenotípicament afectades i les diferències racials en la prevalença de la malaltia. (238,239). Es recomana la detecció selectiva. S'hauria de fer cribratge genètic als **familiars de primer grau** de les persones amb HH. En el cas dels nens amb un pare amb HH, primer caldria el cribratge de l'altre progenitor. Si el cribratge de l'altre progenitor és negatiu (és a dir, absència de defectes genètics C282Y, H63D o S65C), el nen serà heterozigot simple i no té un risc augmentat de desenvolupar sobrecàrrega fèrrica. Les guies recomanen que les estratègies de diagnòstic utilitzant marcadors sèrics del metabolisme del ferro han de dirigir-se a grups d'alt risc, com aquells amb antecedents familiars d'HH o aquells amb sospita d'afectació d'òrgans (184,186,195,207,240) (Figura 6).

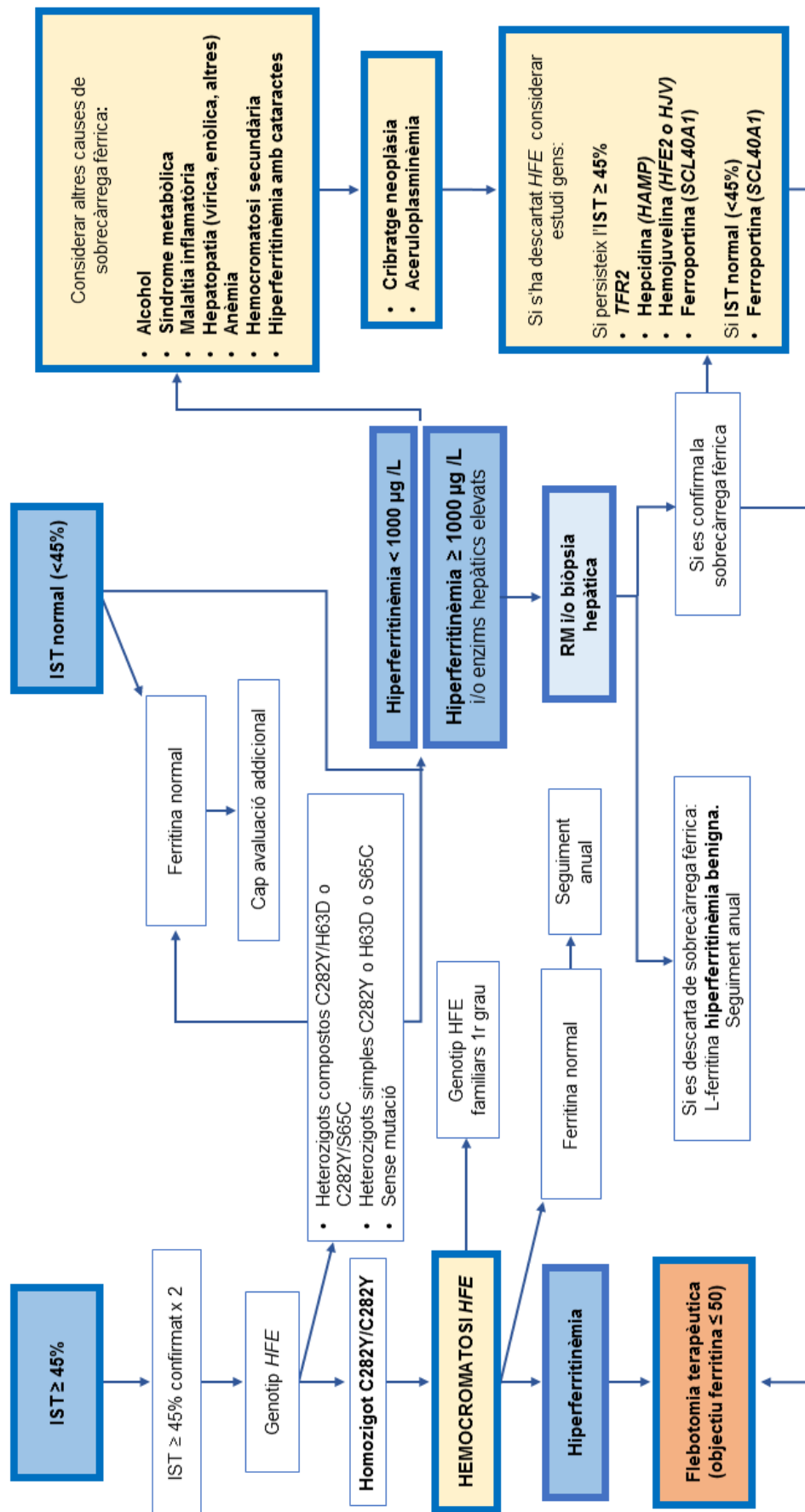


Figura 6. Algorisme de diagnòstic i maneig de les situacions de sobrecàrrega fèrrica. Continua en la pàgina següent.



**Figura 6. Algoritme de diagnòstic i de maneig de les situacions de sobrecàrrega fèrrica.** Els paràmetres del ferro s'han d'avaluar en els pacients amb símptomes o signes d'hemocromatosi. Si algun dels símptomes està relacionat amb hemocromatosi, l'IST estarà persistentment elevat, habitualment amb hiperferritinèmia. L'elevació almenys dues vegades de l'IST  $\geq 45$  % amb o sense hiperferritinèmia, indica que cal fer el cribratge del gen *HFE*, amb alta probabilitat que el gen estigui mutat si el subjecte és de raça caucàsica, i amb menys probabilitat si es tracta de raça no caucàsica. Si en resulta un homozigot C282Y es confirma el diagnòstic d'hemocromatosi relacionada amb l'*HFE*. En presència de qualsevol altre genotip o en situació de no presentar cap tipus de mutació i de presentar hiperferritinèmia amb o sense enzims hepàtics elevats, s'han de tenir en compte, en primer lloc, les comorbiditats com per exemple el consum crònic d'alcohol, la síndrome metabòlica, la inflamació, l'hepatopatia, l'anèmia, l'hemocromatosi postransfusional i la hiperferritinèmia amb cataractes. Un cop descartats aquests factors, cal considerar el cribratge de neoplàsia i l'aceruloplasminèmia. Les neoplàsies que més es relacionen amb hiperferritinèmia són el càncer de mama, de pulmó, de fetge, el neuroblastoma (en nens) i les neoplàsies hematològiques, sent molt menys freqüent la relació amb en els tumors digestius i ginecològics. Els factors fins aquí descrits són gairebé sempre els responsables de l'alteració dels paràmetres del ferro en pacients no caucàsics, que pràcticament mai tenen hemocromatosi relacionada amb el gen *HFE*. En absència d'aquestes comorbiditats, si les alteracions del ferro persisteixen amb hiperferritinèmia  $\geq 1000$   $\mu\text{g/L}$  cal confirmar la sobrecàrrega de ferro primer amb RM i si no és possible amb biòpsia hepàtica, abans de considerar altres formes d'hemocromatosi no relacionada amb l'*HFE*. En absència de trastorns hematològics o de cirrosi avançada, la sobrecàrrega de ferro amb persistència d'IST  $\geq 45$  % és típica en l'hemocromatosi relacionada amb el *TFR2* o amb altres formes com la mutació del gen de l'hepcidina (*HAMP*), del gen de l'hepcidina (*HFE2* o *HJV*) i del gen de la ferroportina (*SCL40A1*), i en el cas d'IST normal ( $< 45$  %) principalment cal descartar la mutació també del gen de la ferroportina (*SCL40A1*). En pacients amb hemocromatosi *HFE* o bé en pacients simptomàtics amb heterozigosi composta C282Y/H63D o heterozigosi simple C282Y si presenten un augment dels valors dels paràmetres del ferro i una lleu sobrecàrrega hepàtica de ferro cal revertir la situació amb flebotomia (objectiu ferritina entre 50-150 ng/ml). En pacients simptomàtics amb IST i ferritina sèrica normals, es pot excloure l'hemocromatosi, ja que l'afectació orgànica en aquesta patologia s'acompanya invariablement d'una hiperferritinèmia. En pacients simptomàtics amb augment dels nivells de ferritina sèrica i amb IST normal, l'estudi diagnòstic s'ha de centrar en les altres causes comunes d'hiperferritinèmia ja comentades. Si no es troben i persisteix la ferritina elevada després del tractament, el següent pas depèn de si el contingut de ferro en el fetge està incrementat en la RM o en la biòpsia hepàtica. Si es descarta la sobrecàrrega fèrrica en la RM o en la biòpsia, considerarem que es tracta d'una hiperferritinèmia benigna relacionada amb la L-ferritina. Si es confirma la sobrecàrrega fèrrica, es pot considerar valorar la malaltia de la ferroportina, que implica una sobrecàrrega de ferro hereditària no relacionada amb l'*HFE*. Adaptada de Pietrangelo, 2010, Bacon et al., 2011 i Altes et al., 2014 (12,195,237).

## 5.4. TRASTORNS DEL FERRO, SÍNDROME METABÒLICA I INFLAMACIÓ DE BAIX GRAU

### 5.4.1. Síndrome metabòlica

Avui en dia es considera que la **síndrome metabòlica** és l'associació seqüencial o no, d'una sèrie d'alteracions metabòliques i no metabòliques com la intolerància hidrocarbonada, la DM, la dislipèmia, l'obesitat de predomini central, la hipertensió arterial (HTA), la hiperuricèmia, les alteracions de l'hemostàsia (fibrinòlisi) i la disfunció endotelial (241). La importància de la síndrome metabòlica rau en la seva elevada i creixent prevalença en els països desenvolupats. És un dels problemes més importants de salut pública del segle XXI ja que s'estima que afecta a un 30 % de la població adulta en els països rics

(242). Està inclosa en les guies d'HTA i de cardiologia com un dels indicadors de risc cardiovascular elevat o molt elevat i també és un dels indicadors de risc de l'EHNA (243). Malgrat que els mecanismes exactes del seu desenvolupament no han estat definits en la seva totalitat, la seva etiologia inclou factors genètics i factors ambientals modificables, com els hàbits alimentaris i la vida sedentària. Aquestes alteracions estan associades a un augment en la prevalença de la DM2 (fins a 5 vegades més que en la resta de la població) i de les malalties cardiovasculars (fins a 2-3 vegades més) (244–249). Al llarg del temps s'han postulat diferents definicions sobre la síndrome metabòlica per part de diversos grups d'estudi i organitzacions (243, 250-264).

Tal com es pot observar en les definicions de la síndrome metabòlica (Taula 3), en aquesta juga un paper fonamental la **resistència a la insulina**, definida com la disminució de la sensibilitat dels teixits a la insulina que té com a resultat la menor captació de glucosa per part dels teixits i la hiperinsulinèmia. En els adults l'obesitat és el principal factor de risc pel desenvolupament de la resistència a la insulina, la síndrome metabòlica, la DM2, les malalties cardiovasculars i l'augment de diversos tipus de càncer (265,266).

Els **trastorns del ferro** s'observen freqüentment en aquests pacients amb **obesitat**, amb **resistència a la insulina** o amb **EHNA** (205,267–272). Per exemple, en un estudi a França es va observar en adolescents amb obesitat, que la distribució androide del greix, la resistència a la insulina i les concentracions elevades de ferritina s'associaven a anomalies hepàtiques en el grup d'estudi (273).

#### **5.4.2. Obesitat i sobrecàrrega fèrrica hepàtica associada a resistència a insulina i a sobrecàrrega fèrrica dismetabòlica**

Com a part fonamental d'aquesta síndrome metabòlica, tenim l'**obesitat**, que per ella mateixa i associada als altres factors que conformen la síndrome s'ha convertit en els últims temps en una càrrega socioeconòmica en els països industrialitzats, alhora que cada vegada és més prevalent en els països en desenvolupament amb l'expansió dels compostos dels aliments amb alt

Taula 3. Criteris de síndrome metabòlica segons l'OMS (Organització Mundial de la Salut) 1998, l'EGIR (European Group for Study of Insulin Resistance) 2001, NCEP ATP III (National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III) 2001, AACE (American Association of Clinical Endocrinologists) 2003, IDF (International Diabetes Federation) 2005, NCEP ATP III AHA/NHLBI (American Heart Association / National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement) 2005, ESC/ESH (The International Consensus of the European Society of Cardiology and the European Society of Hypertension) 2007. (Continua en la següent pàgina).

	OMS (1999)	EGIR (1999)	NCEP ATP-III (2001)	AACE (2003)	IDF (2005)	NCEP ATP II AHA/NHLBI (2005)	ESC/ESH (2007)
Resistència a la insulina	TGA, GBA, DM2 o disminució de la sensibilitat a la insulina Més 2 criteris següents	Insulina plasmàtica > P75 Més 2 criteris següents	No Més 3 criteris següents	TGA, GBA Més algun dels criteris següents	No	No Més 3 criteris següents	No Més 3 criteris següents
Obesitat	Ràtio cintura -maluc Homes > 0,9 Dones > 0,85 IMC ≥ 30 Kg/m <sup>2</sup>	PC Homes ≥ 94 cm Dones ≥ 80 cm	PC Homes > 102 cm Dones > 88 cm	IMC ≥ 25 Kg/m <sup>2</sup>	Augment de la PC específic per ètnia (IDF 2005) Més dos criteris següents	PC Homes > 102 cm Dones > 88 cm	PC Homes > 102 cm Dones > 88 cm
Dislipèmia	TG ≥ 150 mg/dL i/o cHDL < 35 mg/dL H < 39 mg/dL D	TG ≥ 150 mg/dL i/o cHDL < 39 mg/dL H o D	TG ≥ 150 mg/dL i/o cHDL < 40 mg/dL H < 50 mg/dL D	TG ≥ 150 mg/dL i/o cHDL < 40 mg/dL H < 50 mg/dL D	TG ≥ 150 mg/dL o i/o cHDL < 40 mg/dL H < 50 mg/dL D o tractament farmacològic específic qualsevol dels dos casos	TG ≥ 150 mg/dL o i/o cHDL < 40 mg/dL H < 50 mg/dL D o tractament farmacològic específic qualsevol dels dos casos	TG ≥ 150 mg/dL i/o cHDL < 40 mg/dL H < 46 mg/dL D o
Pressió arterial	≥ 140/90 mmHg o tractament farmacològic específic	≥ 140/90 mmHg o tractament farmacològic específic	≥ 130/85mmHg o tractament farmacològic específic	≥ 130/85mmHg o tractament farmacològic específic	TAS ≥ 130 mmol Hg o TAD ≥ 85 mm Hg tractament farmacològic específic	TAS ≥ 130 mmol Hg o TAD ≥ 85 mm Hg tractament farmacològic específic	TAS ≥ 130 mmol Hg o TAD ≥ 85 mm Hg
Glucosa	TGA, GBA o DM2	TGA, GBA o DM2	≥ 110 mg/dL en dejú	TGA o GBA o DM2	≥ 100 mg/dL o DM2 diagnosticada prèviament	≥ 100 mg/dL o DM2 diagnosticada prèviament	≥ 100 mg/dL o DM2 diagnosticada prèviament
Altres	Microalbuminúria ≥ 20 µg/min						

**Taula 3. Criteris de síndrome metabòlica segons l'OMS (Organització Mundial de la Salut) 1998, l'EGIR (European Group for Study of Insulin Resistance) 2001, NCEP ATP III (National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III) 2001, AACE (American Association of Clinical Endocrinologists) 2003, IDF (International Diabetes Foundation) 2005, NCEP ATP III AHA/NHNBI (American Heart Association / National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement) 2005, ESC/ESH (The International Consensus of the European Society of Cardiology and the European Society of Hypertension) 2007.** (Continuació). cHDL, colesterol unit a lipoproteïnes d'alta densitat; DM2, diabetis mellitus tipus 2; GBA, glucèmia basal alterada; IMC: índex de massa corporal; PC: perímetre de la cintura; TAD, tensió arterial diastòlica; TAS, tensió arterial sistòlica; TG, triglicèrids; TGA, tolerància a la glucosa alterada. <sup>a</sup>Valors específics per ètnia de la circumferència abdominal com a mesura de l'obesitat abdominal. Europeus: homes  $\geq 94$  cm, dones  $\geq 80$  cm; asiàtics del sud: homes  $\geq 90$  cm, dones  $\geq 80$  cm; xinesos: homes  $\geq 90$  cm; dones  $\geq 80$  cm; japonesos: homes  $\geq 85$  cm, dones  $\geq 90$  cm; ètnies d'Amèrica del Sud i d'Amèrica Central: utilitzar les dades de l'ètnia del sud d'Àsia fins que es disposi de dades més adequades; africans subsaharians: utilitzar les dades dels europeus fins que es disposi de dades més adequades; mediterranis de l'est i del mig est (àrabs): utilitzar les dades dels europeus fins que es disposi de dades més adequades. Adaptada de Grundy et al., 2005 (274)

contingut energètic i l'estil de vida sedentari (265). Contràriament al que suposàriem, l'obesitat, que és una situació condicionada per l'excés de nutrients i de calories, s'associa al dèficit de ferro. No obstant això, els canvis profunds en l'homeòstasi de l'energia en el teixit adipós, en el fetge i en altres òrgans implicats, estan estretament vinculats als diferents canvis en l'homeòstasi del ferro. El dèficit de ferro i l'obesitat són, doncs, dues epidèmies globals que afecten a milers de persones de diferents regions del món (275). Aquestes dues condicions estan molecularment vinculades i s'afecten mútuament (276).

Les concentracions elevades d'hepcidina poden ser considerades com el punt clau de la desregulació de ferro en l'obesitat. Per una banda, l'obesitat pot provocar el dèficit de ferro per la inhibició de l'absorció de ferro de la dieta a nivell del duodè (90,277,278). D'altra banda, l'obesitat ens porta a la condició anomenada síndrome de la sobrecàrrega de ferro dismetabòlica (*dysmetabolic iron overload*, **DIOS**), que és un dels diagnòstics diferencials de les situacions amb ferritina elevada (279,280). Poden representar diferents manifestacions del mateix procés fisiopatològic subjacent en l'homeòstasi del ferro (281,282). Mentre que l'hepcidina elevada en la DIOS està relacionada amb l'augment de les reserves de ferro, en l'obesitat greu amb deficiència de ferro està

principalment vinculada als marcadors inflamatoris (279,283). Les concentracions elevades d'hepcidina expliquen una menor expressió duodenal de la ferroportina i la disminució de l'absorció de ferro en la dieta. En aquest sentit, es detecta l'expressió de l'hepcidina de forma específica en el teixit adipós dels subjectes amb obesitat mòrbida anèmics, però no en el teixit magre (276).

El 1997 Moiran et al. van descriure la síndrome sobrecàrrega fèrrica hepàtica associada a la resistència a la insulina (*insulin resistance-hepatic iron overload*, **IR-HIO**) caracteritzada per una sobrecàrrega de ferro hepàtica amb IST normal o lleugerament elevat associada a ferro en sèrum baix i amb elevació de la ferritina lleu o moderada, comprovada histològicament en les biòpsies hepàtiques (hemosiderosi) d'individus de mitjana edat, amb sobrepès/obesitat definit per l'elevació del perímetre abdominal, metabolisme anormal de la glucosa i dislipèmia (271,284,285). Aquesta situació es va descriure més tard com a **DIOS** i ara sabem que es produeix aproximadament en un terç dels subjectes amb **EHNA** o amb síndrome metabòlica i que és la part més greu de la **hiperferritinèmia dismetabòlica** (286). Alhora es tracta de la causa més freqüent de consulta per l'augment dels nivells de ferritina sèrica en la pràctica diària (287). La sobrecàrrega de ferro real es troba poques vegades en la biòpsia hepàtica d'aquests individus i es correlaciona feblement amb el nivell de les concentracions de ferritina en sèrum. Es pot associar a manifestacions greus (288). Els mecanismes que porten a la hiperferritinèmia dismetabòlica i a la sobrecàrrega fèrrica hepàtica són complexes i diversos. A més d'incloure les alteracions de l'absorció de ferro induïdes per la dieta, la modulació de la gliconeogènesi i les modificacions de la secreció i de l'acció de l'hepcidina esmentades a dalt, també comprenen la interrupció del ritme circadiari de la glucosa mediat per l'hemo i la reducció de la disponibilitat del coure (289).

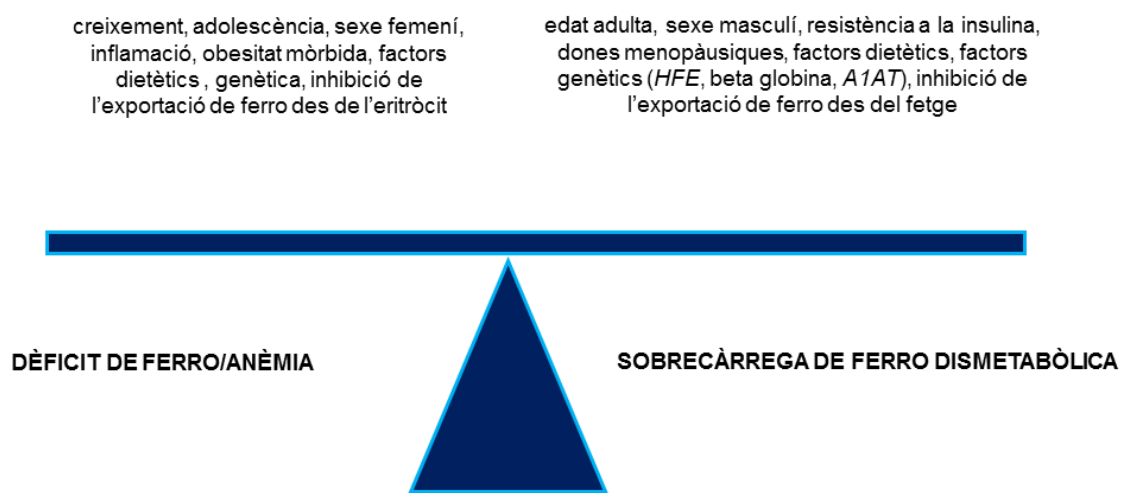
#### 5.4.3. Obesitat i deficiència de ferro

El dèficit de ferro en l'obesitat ha estat extensament estudiat. Es van observar concentracions baixes de ferro en el sèrum amb un augment de l'índex de massa corporal (IMC) en diversos estudis en **adolescents** que posteriorment es van confirmar (290–292). En l'anàlisi del programa d'estudis dissenyat per avaluar

l'estat de salut i nutricional d'adults i nens a Estats Units, *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES), es va trobar que el risc de dèficit de ferro, que es defineix com a IST baix i ferritina baixa en sèrum, era el doble en adolescents amb sobrepès en comparació amb adolescents amb pes normal (293). Es van trobar resultats similars en un estudi en població israeliana (294) i en estudis iranians i xinesos (295,296). Un altre estudi nord-americà va trobar una forta relació entre el dèficit de ferro i l'IMC en totes les races i edats en relació a les quantitats d'aliment ingerit (297). Aquests estudis van demostrar una menor disponibilitat de ferro en sèrum amb l'augment de la massa de teixit adipós en adolescents. A més, l'absorció de ferro des del duodè està limitat en obesos en comparació amb nens de pes normal (298). Contràriament, un estudi en adolescents amb poc teixit adipós o amb només un lleu sobrepès, sense una obesitat greu, va concloure que les altes concentracions de ferritina en sèrum i d'IST es correlacionen amb un increment dels quartils d'IMC, similar al que s'ha trobat en poblacions d'adults (299).

En **adults** diverses anàlisis han demostrat que hi ha concentracions de ferro més baixes en relació a l'augment d'IMC, sobretot en les dones. No obstant això, els resultats semblen més complexes que els que es descriuen en adults joves. Trobem, doncs, un estudi que va descriure concentracions baixes de ferro en sèrum en les dones amb sobrepès però sense diferències entre els homes (300). En un altre estudi es va veure que no hi havia diferències en les concentracions de ferro en sèrum entre els obesos i els controls amb pes normal (301). En cohorts d'obesos mòrbids sotmesos a cirurgia bariàtrica, el dèficit de ferro ha estat identificat com una condició freqüent (302). L'associació entre l'obesitat en adults i la reserva baixa de ferro o anèmia s'ha avaluat en una metanàlisi de tots els estudis controlats (303). Malgrat que el dèficit de ferro apareix com una troballa típica en l'obesitat greu, la revisió va concloure que la majoria d'estudis havien demostrat majors concentracions d'hemoglobina i de ferritina en subjectes obesos en comparació amb els adults de pes normal. Tanmateix, el ferro sèric i l'IST disminueixen a mesura que augmenta l'IMC; això s'ha atribuït principalment a l'efecte creixent de la inflamació relacionada amb l'augment de graus d'obesitat. Una possible explicació a les diferències sorgides dels diversos estudis podria ser que l'augment de la demanda de ferro deguda al creixement

físic, a l'increment de la massa grassa o del volum de sang (293,304), juntament amb la captació de ferro disminuïda en l'adolescent obès, serien responsables de l'associació trobada entre l'obesitat i el dèficit de ferro en adolescents (294). En canvi, aquesta associació es perd en les etapes posteriors de la vida, per exemple, en les dones en la postmenopausa o en homes amb resistència a la insulina, on podrien prevaldre els factors que afavoreixen l'acumulació de ferro. Tot i aquestes consideracions, en algunes cohorts d'adults es pot produir una associació entre el dèficit de ferro i l'obesitat. Per exemple, en pacients amb inflamació pronunciada del teixit adipós (pacients amb obesitat greu) sotmesos a cirurgia bariàtrica, o en dones amb pèrdua menstrual de ferro, en els quals l'equilibri s'inclina cap al dèficit de ferro (305) (Figura 7).



**Figura 7. Resum d'estímuls potencials i característiques amb un efecte potencial sobre el fenotip del ferro en l'obesitat.** Ambdues entitats, el dèficit de ferro i la síndrome de sobrecarrega fèrrica dismetabòlica representen manifestacions de l'homeòstasi del ferro. La combinació dels diferents estímuls definiran el fenotip del ferro de cada pacient. Adaptada d' Aigner et al., 2014 (306).

#### 5.4.4 Resposta dels paràmetres del ferro a la pèrdua de pes

S'han estudiat els canvis en l'homeòstasi del ferro en resposta a la pèrdua de pes. En un estudi es va observar un augment de l'IST, una ferritina sense canvis i una milloria dels marcadors d'inflamació (307). En un altre estudi es va observar una disminució de l'hepcidina juntament amb un augment de l'absorció de ferro

després d'un programa de pèrdua de pes en nens obesos durant sis mesos (308). Tanmateix, en un altre estudi en nens obesos no es van observar canvis en l'estat del ferro després d'una dieta hipocalòrica durant 13 setmanes, tot i que els paràmetres eren normals a l'inici de l'estudi (309). També es va observar que una dieta molt baixa en calories fins i tot havia induït una disminució addicional en els dipòsits de ferro en els nens obesos, però aquesta intervenció no és considerada una manera saludable ni recomanable de pèrdua de pes (310). S'han obtingut dades interessants resultat de l'observació de la millora de l'estat del ferro funcional indicat per l'augment de l'IST i la disminució de la concentració de l'hepcidina en sèrum en resposta a la pèrdua de pes deguda a la cirurgia bariàtrica restrictiva (311). L'evidència suggereix que la pèrdua de pes de manera saludable en subjectes obesos s'acompanya d'una millora dels marcadors inflamatoris al restablir l'absorció de ferro en la dieta i de les concentracions de ferro en sèrum com a indicació per un restabliment de l'homeòstasi fisiològica del ferro.

#### **5.4.5. Metaflamació i lipotoxicitat, resistència a la insulina i sobrecàrrega fèrrica**

En l'obesitat i en la resistència a la insulina, així com en l'EHNA, es produeix una elevació desproporcionada de la **ferritina** com a conseqüència de l'excés de ferro i de la **inflamació de baix grau** (285,312). Atès que el ferro és un potent catalitzador de la formació de **ROS**, amb la conseqüent generació d'estrès oxidatiu, es considera el principal mecanisme subjacent en la **insulinoresistència** associada a la sobrecàrrega fèrrica (276,306).

En l'**obesitat** es produeix una expansió desmesurada del teixit adipós, amb hiperplàsia i hipertròfia dels adipòcits, que s'acompanya d'un alliberament d'intermediaris lipídics que s'acumulen en altres teixits. Aquesta situació provoca una disfunció cel·lular mediada per la **lipotoxicitat**. L'acumulació de metabòlits lipídics promou la infiltració i activació de macròfags i una **resposta inflamatòria crònica de baixa intensitat (metaflamació)**, que està inicialment restringida als teixits adiposos però eventualment afecta a altres teixits com el fetge, l'esquelet, el múscul cardíac o les cèl·lules pancreàtiques beta (313). Per altra banda, els



passos inicials en la metaflamació també inclouen una major **producció de ROS** i un **estrès del reticle endoplasmàtic** en els adipòcits hipertròfics, que indueixen la resistència a la insulina, ja sigui directament o mitjançant la potenciació de la immunitat innata per la via de la resposta inflamatòria (314).

La metaflamació està considerada com un dels factors etiològics més importants de la resistència a la insulina. Citocines inflamatòries i intermediaris lipídics són els principals inductors de la resistència a la insulina perquè activen rutes de senyalització inflamatòries que inhibeixen la cascada de transducció de senyals del receptor de la insulina (313). Les citocines proinflamatòries com la **IL1**, la **IL6** i el factor de necrosi tumoral alfa (**TNF $\alpha$** ) condueixen a una inflamació de baix grau (315). Les **adipocines**, terme per descriure les molècules generades pels adipòcits en analogia a les citocines, són un grup heterogeni d'hormones peptídiques que medien els efectes metabòlics del teixit adipós sobre els altres teixits. L'expressió d'adipocines en el teixit adipós es modifica quan en l'obesitat el teixit adipós transforma el seu fenotip (316). S'han observat associacions entre les adipocines i els paràmetres del metabolisme del ferro. L'**adiponectina** actua com a agent antiinflamatori i agent sensibilitzant de la insulina, i les seves concentracions disminueixen en l'obesitat i en la resistència a la insulina (317). La **leptina** indica probablement sacietat i plenitud de les reserves d'energia en condicions fisiològiques, però l'obesitat es caracteritza per la hiperleptinèmia i la resistència hipotalàmica a la leptina (318). La **resistina** està estretament lligada a la inflamació del teixit adipós i probablement a les malalties cardiovasculars i a la resistència a la insulina (319). L'*adypocyte fatty acid binding protein* (**A-FABP**) que s'expressa en adipòcits madurs i en macròfags activats s'associa positivament a paràmetres de l'adipositat, la resistència a la insulina i a la síndrome metabòlica. En un estudi es va observar que els rosegadors que no tenien A-FABP estaven protegits de diverses conseqüències adverses de l'obesitat (320).

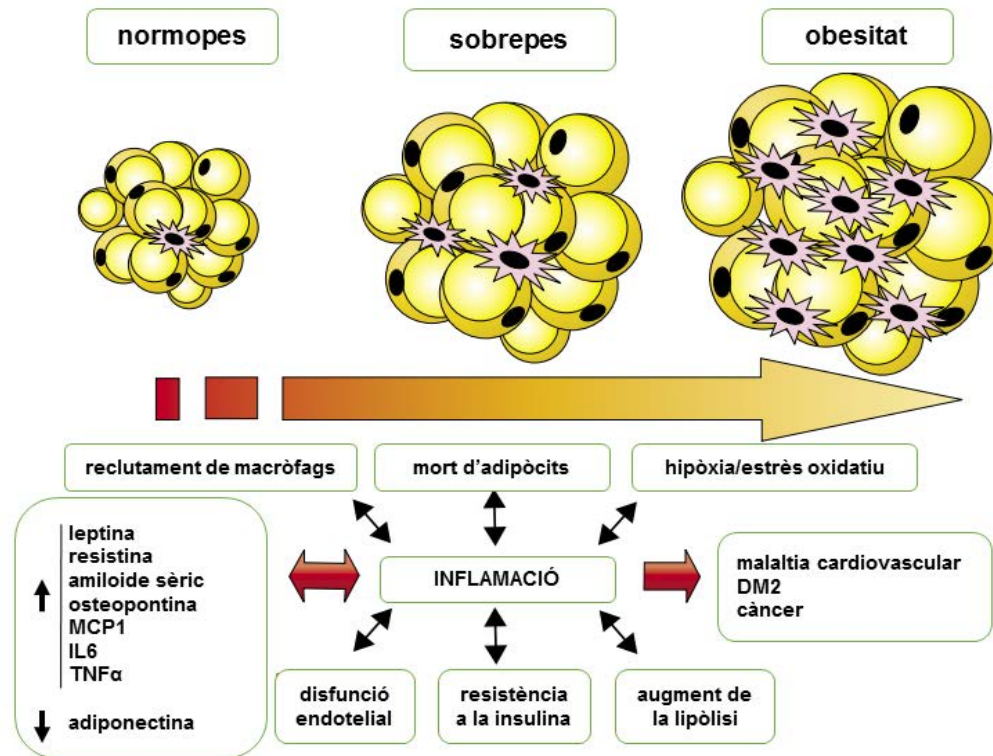
La resistència a la insulina fa que els adipòcits amb augment de l'activitat lipolítica provoquin un augment del flux d'àcids grassos lliures del teixit adipós cap al fetge o al múscul (320). A més, l'excés de teixit adipós central té com a conseqüència un augment en la lipòlisi basal amb l'alliberació conseqüent

d'àcids grassos al torrent sanguini; en arribar a les seves cèl·lules diana, aquests són captats per ser metabolitzats. L'augment dels àcids grassos intracel·lulars té com a conseqüència l'activació de **vies metabòliques no oxidatives**, com ara la formació de ceramides, la degradació lisosomal i la generació d'**estrès del reticle endoplasmàtic**. Aquest últim té com a conseqüència l'activació de vies de senyalització relacionades amb l'inici de la mort cel·lular programada (apoptosi). Aquest augment en l'**apoptosi** és característica de les malalties relacionades amb la deposició ectòpica d'àcids grassos en els teixits, com l'EHNA, la disfunció de les cèl·lules beta pancreàtiques i la cardiotoxicitat.

Un altre esdeveniment clau és la **polarització dels macròfags** locals d'un estat antiinflamatori a un estat proinflamatori. De la resposta a l'estrès dels adipòcits en resulta la secreció de la citocina **TNF $\alpha$** . A més, els mastòcits, els limfòcits T i les cèl·lules *Natural-Killer* s'activen i produeixen a nivell local la citocina interferó-gamma (**IFN $\gamma$** ). Aquestes citocines provoquen un estat **proinflamatori** en els macròfags del teixit adipós que els fa més sensibles a altres estímuls proinflamatoris, inclosos els leucotriens, els complexos àcids grassos lliures–fetuina A i els patrons moleculars associats a perill (*danger-associated molecular patterns*) derivats d'adipòcits necròtics (321). A diferència de la inflamació aguda, la metaflamació no es resol amb el temps; els teixits romanen en un estat **anabòlic** i donen lloc a la remodelació d'aquests i al deteriorament metabòlic sistèmic, encara que els mecanismes que mantenen la cronicitat i eviten la resolució de la inflamació són poc coneguts (322) (Figura 8).

#### **5.4.6. Esteatosi hepàtica no alcohòlica i sobrecàrrega fèrrica.**

En la patogènia de l'EHNA s'hi ha implicat la resistència a la insulina com a factor causal. En un primer pas anomenat “primer impacte”, la disminució de la capacitat cel·lular de respondre a l'acció de la insulina produeix una hiperinsulinèmia compensatòria. En el teixit adipós, la hiperinsulinèmia actua sobre la lipasa sensible a hormones (LSH) i afavoreix la lipòlisi amb la conseqüent alliberació d'àcids grassos lliures al fetge. El múscul esquelètic disminueix la captació de la glucosa, mentre que a l'hepatòcit la hiperinsulinèmia



**Figura 8. Relació entre l'expansió del teixit adipós i l'increment de l'estat proinflamatori.** A mesura que augmenta el teixit adipós, es modifica la producció d'adipocines i es desencadenen una sèrie de processos fisiopatològics relacionats amb la inflamació que conduiran a un increment del risc de patir malaltia cardiovascular, DM2 i càncer entre altres comorbiditats. MCP1, proteïna quimioatracent dels monòcits 1. Adaptada de *Fisiogenòmica Salut* (323).

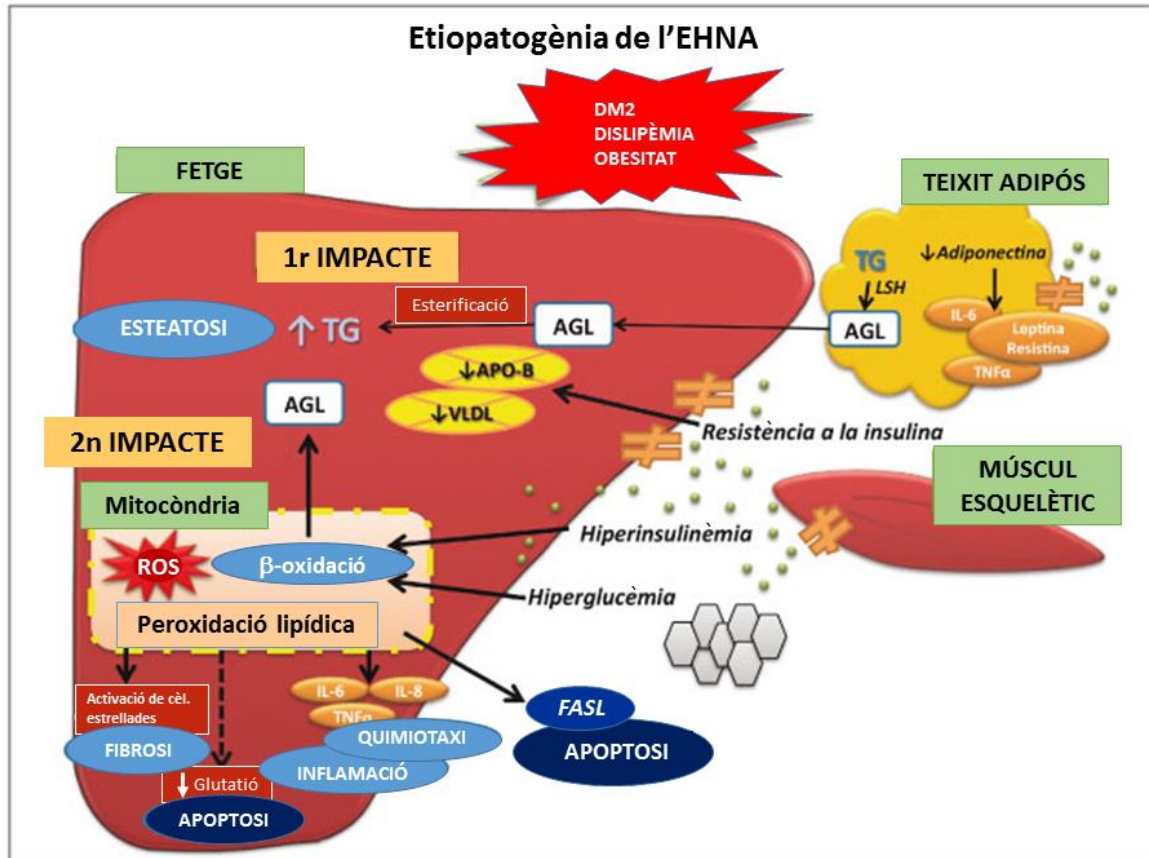
augmenta la gliconeogènesi, disminueix la síntesi de glicogen i augmenta la captació dels àcids grassos, altera el transport de triglicèrids i inhibeix la seva beta-oxidació. Aquestes alteracions en el metabolisme dels greixos són la base de l'aparició de l'esteatosi hepàtica. Aquest primer impacte resulta de la interacció de diversos factors, com la resistència hepàtica a la leptina o la reducció dels nivells d'adiponectina, amb predomini d'un o altre segons els pacients. El segon pas, anomenat "segon impacte", és conseqüència de l'estrès oxidatiu en els hepatòcits que es compensa al principi pels mecanismes antioxidants cel·lulars. Tanmateix, la sobrecàrrega hepàtica d'àcids grassos genera ROS a la cadena mitocondrial que actuen sobre els àcids grassos de les membranes cel·lulars i causen la peroxidació lipídica. Les ROS indueixen la síntesi de citocines proinflamatòries per les cèl·lules de Kùpffer i els hepatòcits

(TNF $\alpha$ , que activa la via de les caspases (proteïnes pertanyents al grup de les cisteïn-proteases) i que comporta l'apoptosi dels hepatòcits; el TGF $\beta$ 1, que activa la síntesi de col·lagen per les cèl·lules estrellades; el lligand de Fas, proteïna de membrana de la família del TNF que indueix la mort per apoptosi dels hepatòcits adjacents; i la IL8, potent quimiotàctic de neutròfils). Els productes finals de la peroxidació lipídica, el 4-hidroxinonenal i el malonildialdehid, també estan implicats en la gènesi de les lesions hepàtiques per toxicitat directa, poden intervenir en la formació de cossos de Mallory i incrementen la síntesi de col·lagen per les cèl·lules estrellades; a més el 4-hidroxinonenal té activitat quimiotàctica de neutròfils. Aquesta segona fase explicaria l'evolució cap a fenòmens necroinflamatoris, fibrosi i cirrosi hepàtica (324) (Figura 9).

En un estudi recent es va demostrar que la presència de ferritina elevada en sèrum és un factor independent de gravetat histològica i de fibrosi avançada com a predictor de la gravetat de l'EHNA (325). L'excés de ferro en el fetge també pot estar relacionat amb el desenvolupament d'hepatocarcinoma en pacients amb EHNA associada a la fibrosi (326). Alguns estudis havien revisat la relació entre la sobrecàrrega fèrrica de les mutacions C282Y i l'H63D i la presència d'EHNA. Tanmateix, en un altre estudi no es va demostrar aquesta relació (327). No obstant això, sí que va suggerir que les mutacions en els gens que codifiquen  $\beta$ -globina i  $\alpha$ 1-antitripsina podrien estar involucrats en la presència d'EHNA, almenys en poblacions on les respectives mutacions es produeixen freqüentment (327,328). Alguns autors han suggerit que per establir de forma definitiva quina és la rellevància de l'excés de ferro en la progressió de l'EHNA, s'hauria de disposar d'estudis prospectius que incloguessin biòpsies de fetge en una cohort d'un mida suficient com per corregir la resta de cofactors establerts en la progressió de la malaltia (329,330).

En l'HH, que és un dels diagnòstics diferencials més importants de l'EHNA, la coincidència de transaminases hepàtiques elevades i d'hiperferritinèmia podria indicar una sobrecàrrega de ferro. Per tant, en el pacient amb **hiperferritinèmia** caldrà valorar l'IST, estudiar el genotip de l'**HFE** si s'escau, demanar la història detallada del consum d'**alcohol** i considerar les altres causes de sobrecàrrega

fèrrica, i en algun cas valorar la **RM** i/o la **biòpsia** hepàtica. Tot plegat ens ajudarà a esbrinar l'origen de les concentracions elevades de ferritina (276).



**Figura 9. Mecanisme patogènic de l'EHNA.** La patogènia de l'EHNA implica l'aparició de diferents esdeveniments (impactes). El primer impacte inclou una hiperinsulinèmia compensatòria, un augment de la gliconeogènesi, una disminució de la síntesi de glicogen i una major captació dels àcids grassos. Les alteracions en el metabolisme dels greixos són la base de l'aparició de l'esteatosi hepàtica. El segon impacte té lloc per l'estrès oxidatiu dels hepatòcits i implica la síntesi de citocines proinflamatòries i comporta la mort dels hepatòcits. Alguns dels productes finals de la peroxidació lipídica indueixen lesions hepàtiques per toxicitat directa. AGL, àcids grassos lliures; LSH, lipasa sensible a hormones; TG, triglicèrids; VLDL, lipoproteïnes de molt baixa densitat. Adaptada de Martín-Domínguez et al. 2013 (324).

#### 5.4.7. Resistència a la insulina, diabetis i sobrecàrrega fèrrica

La incidència de la **DM2** està augmentant a tot el món, especialment com a resultat de l'augment de l'**obesitat**. La resistència a la insulina s'ha associat a diferents factors, incloent l'activació de la **immunitat innata** (amb augment de la

IL6, la fracció soluble del receptor tipus 2 del TNF $\alpha$  (sTNFR2) i la proteïna C reactiva (PCR)) i la **sobrecàrrega bioquímica de ferro**. Les citocines influeixen la reserva de ferro en diferents teixits, però diferents estudis han demostrat que la relació entre els nivells alts de ferro i les alteracions metabòliques són independents de la inflamació (331).

L'**excés** o la **deficiència de ferro** influeixen en els mecanismes de l'homeòstasi de la glucosa i en el desenvolupament i progressió de la **DM2**. No obstant això, la relació entre homeòstasi del ferro i homeòstasi de la glucosa és bidireccional, de manera que diverses vies del metabolisme del ferro es modifiquen d'acord amb els nivells de glucosa sistèmics, alhora que l'acció i la secreció d'insulina estan influïdes pels canvis en relació a l'excés de ferro (332). La sobrecàrrega de ferro podria empitjorar la resistència a la insulina interferint sobre el senyal del receptor d'insulina i inhibint la capacitat de catabolisme de carbohidrats en el fetge i en el múscul (276). En estudis prospectius de cohorts, s'ha demostrat que els nivells de ferritina són predictors d'un major risc de DM i de DM gestacional (333–335).

En les situacions de sobrecàrrega fèrrica, com en l'hemocromatosi, s'ha descrit una alta prevalença de DM, variable segons els estudis. En els estudis inicials la prevalença de DM en individus amb hemocromatosi es trobava entre un 7-40 %, però es tractava d'estudis amb mostres petites i amb biaix de selecció (336,337). Més tard, amb la identificació de la causa genètica de l'hemocromatosi, es disposava d'una eina objectiva pel diagnòstic d'hemocromatosi i els càlculs de la prevalença de DM es van realitzar en els pacients amb hemocromatosi detectats per diagnòstic genètic. Els estudis més recents, doncs, mostren en individus amb hemocromatosi, una prevalença de DM del 13-23 % i una prevalença d'intolerància oral a la glucosa del 18-30 % (338,339).

Diversos estudis moleculars i genètics en humans i en ratolins han intentat estudiar la relació entre l'hepcidina i el desenvolupament de DM2. Alguns estudis epidemiològics han mostrat una associació entre l'hepcidina i la DM2 a nivell poblacional, però les troballes encara no són prou concloents (340). La **prohepcidina**, precursor de l'hepcidina, es troba significativament més elevada

en el sèrum dels homes amb intolerància oral a la glucosa o DM2 que en aquells amb tolerància a la glucosa normal. A més, el nivell de prohepcidina presenta una correlació negativa amb la **sensibilitat a la insulina**. Per tant, la conclusió és que la prohepcidina s'associa a la **resistència a la insulina** i a l'alteració del metabolisme de la glucosa (341). La **resistència a la insulina** comporta un augment de la secreció d'insulina per les cèl·lules beta pancreàtiques, fet que podria regular directament l'hepcidina, i provocar la supressió de la seva síntesi en el fetge. Aquesta és la raó principal de la sobrecàrrega de ferro en les persones amb DM2 (342,343).

L'hepcidina disminuïda podria tenir un paper a través del control de l'absorció de ferro perquè, tal com hem comentat abans, el dèficit de ferro provoca una disminució de l'expressió de l'hepcidina que afavoreix la captació de ferro. També s'ha proposat que la hiperinsulinèmia afavoriria el dipòsit hepàtic de ferro a partir d'un mecanisme que redistribuiria els receptors de la transferrina des dels compartiments intracel·lulars a la superfície cel·lular (344). És un mecanisme de retroalimentació positiva: la sobrecàrrega fèrrica hepàtica acaba provocant l'estrès oxidatiu amb l'alliberació de les ROS i de les citocines inflamatòries. Un estudi demostra que existeix una forta correlació positiva entre l'hepcidina en sèrum i la ferritina en els pacients amb DM2. En aquest treball se suggereix que la sobrecàrrega fèrrica i/o la inflamació podrien regular l'expressió de l'hepcidina en els pacients amb DM2 (345).

El ferro està augmentat en les biòpsies de teixit visceral i en el teixit adipós subcutani dels pacients obesos i es correlaciona negativament amb l'expressió de l'adiponectina, fet que podria contribuir a la resistència a la insulina i a les complicacions metabòliques de l'obesitat (346). Altres estudis corroboren a partir de mesures realitzades amb RM que el teixit subcutani i el múscul dels pacients obesos conté major concentració de ferro que la dels subjectes no obesos (347,348).

En adipòcits aïllats la transferrina i ferro indueixen la resistència a la insulina i redueixen la captació de glucosa en els adipòcits a través d'un mecanisme independent dels àcids grassos que podria explicar l'associació entre les

reserves de ferro del cos i el risc de DM2 (349). A més, la ferritina està inversament relacionada amb les concentracions en sèrum d'**adiponectina** en els subjectes amb insulinoresistència i en els individus amb disminució de la sensibilitat a la insulina (350). El ferro sembla reduir la síntesi d'adiponectina a l'inhibir la seva transcripció. Els ratolins modificats genèticament que no expressen la proteïna exportadora del ferro ferroportina en els seus adipòcits, presenten una sobrecàrrega fèrrica en aquestes cèl·lules, disminució de la síntesi d'adiponectina i important resistència a la insulina (351). S'ha trobat una associació positiva entre les reserves de ferro i els nivells circulants de l'adipocina anomenada proteïna d'unió a retinol 4 (**RBP4**); els dos experimenten una disminució davant una baixada de ferro circulant (352). S'ha observat la mateixa associació entre les concentracions de l'adipocina **visfatina** en sèrum i els paràmetres del metabolisme del ferro (353). Aquestes observacions podrien reflectir la coincidència de l'increment de les reserves de ferro amb altres marcadors de resistència a la insulina i no ser el resultat d'una relació causal entre aquestes adipocines i la modulació de l'homeòstasi del ferro. S'ha proposat que l'excés del ferro en la dieta podria ser redirigit al teixit adipós visceral i alterar la secreció d'adipocines com la **resistina** (286), fet que podria tractar-se del mecanisme que lliga les concentracions elevades de ferritina amb les adipocines (276). Per una altra banda, l'adipocina **leptina**, que està elevada en l'estat de resistència a la insulina, és capaç d'induir la transcripció de l'**hepcidina** en cultius d'hepatòcits. Per tant, la síntesi d'hepcidina induïda per la leptina podria contribuir a les alteracions del ferro presents en l'EHNA (354).

## 5.5. TRACTAMENT DE L'HEMOCROMATOSI I DELS ESTATS DE SOBRECÀRREGA FÈRRICA

L'excés de ferro està associat a una evolució adversa en general. Per tant, reduir l'excés de ferro amb **flebotomies** després de descartar la inflamació (infecció, neoplàsies malignes i malaltia autoimmune) podria ser part del tractament. Es tracta d'una teràpia fàcil, segura, econòmica i amb efectes beneficiosos sobre la resistència a la insulina, els nivells de transaminases i la inflamació (3,355). De



fet, hi ha un acord general en què cal utilitzar totes les possibilitats terapèutiques per tractar les situacions de sobrecàrrega fèrrica.

Pel que fa a l'HH, malgrat que no s'han fet estudis randomitzats i controlats sobre flebotomia *versus* no flebotomia en el tractament d'aquesta malaltia, no hi ha dubte que iniciar la flebotomia abans que es desenvolupi la cirrosi i/o la DM redueix la morbiditat i la mortalitat associades a l'HH (356,357). Per tant, es recomana la identificació i el tractament precoç dels individus que estan en risc. També es recomana que iniciïn el tractament els individus asimptomàtics amb homozigosi HH i marcadors de sobrecàrrega fèrrica, així com els subjectes amb nivells elevats de ferro al fetge. En els pacients asimptomàtics està indicat aquest tractament per reduir la progressió del dany tissular.

Tots els pacients amb HH homozigòtica i evidència de sobrecàrrega fèrrica (és a dir, IST  $\geq$  45 % i ferritina sèrica  $>$  300 ng/ml (674,10 pmol/L) en homes i  $>$  200 ng/ml (449,40 pmol/L) en dones) s'han de tractar, independentment dels símptomes. L'objectiu és aconseguir nivells de ferritina dins dels límits normals. Segons els experts, els límits normals en els nivells de ferritina sèrica varien entre 50 i 150 ng/ml (112,35 i 337,05 pmol/L) (3,195). De cada 1 ml d'hematies s'extreu 1 mg de ferro. Cada unitat de 450-500 ml de sang sencera (que conté de 200 a 250 ml de glòbuls vermells) extreu de 200 mg a 250 mg de ferro i redueix la ferritina sèrica a nivells aproximadament de 30 ng/ml (67,41 pmol/L). Els nivells d'hemoglobina s'han de comprovar abans de cada flebotomia. La teràpia normalment s'atura quan el nivell d'hemoglobina és inferior a 12,5 g/dl (125 g/L). La freqüència de la flebotomia està indicada en les guies de referència com a una setmanal en la fase de depleció. Alguns pacients (homes o dones) necessiten una flebotomia mensual de manteniment, i altres es mantenen amb 1-2 flebotomies anuals (195). Els beneficis que s'esperen d'una flebotomia terapèutica inclouen una reducció del magatzem de ferro tissular a nivells normals, la resolució de la fatiga i de la letargia; una considerable milloria de la pigmentació/bronzejat en la pell; una milloria de les alteracions dels enzims hepàtics, de l'hepatomegàlia i del dolor en el quadrant superior abdominal dret si en presentaven; també milloria de la funció cardíaca; i en algun cas, del control de la DM (195). Les flebotomies en fases inicials de la sobrecàrrega prevenen

l'evolució a cirrosi i redueixen la morbiditat i la mortalitat (222,356,358). Ara bé, la flebotomia no reverteix la cirrosi quan ja està establerta ni tampoc millora l'artropatia, l'atròfia testicular o la disfunció tiroïdal (195).

Les guies recomanen que els pacients sense diagnòstic d'HH i amb lesió d'òrgans diana degut a la sobrecàrrega de ferro han de ser sotmesos a la flebotomia regular amb els mateixos criteris de valoració que s'han descrit anteriorment (grau d'evidència 1A). Així mateix, recomanen el tractament amb flebotomia dels pacients amb sobrecàrrega de ferro no lligada a la mutació del gen *HFE* i que tenen una elevada concentració hepàtica de ferro (grau d'evidència 1B) (195).

La sang procedent de les flebotomies es pot utilitzar en algunes institucions. L'*American Red Cross* i la *U.S. Food and Drug Administration* consideren que aquesta sang és segura per a les transfusions. A Espanya, a Irlanda i a França, la sang de pacients amb HH associada a l'*HFE* pot ser utilitzada per a transfusions. Concretament a Espanya la *Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia* (SEHH) admet que la sang de persones amb HH és apta per a transfusió; tanmateix limita en número de donacions que poden usar-se anualment a 3 concentrats a l'any en dones i a 4 en homes. En canvi, a altres països europeus, la utilització de sang procedent de flebotomies terapèutiques està explícitament prohibida (195).

En pacients amb sobrecàrrega fèrrica o síndromes diseritropoiètiques o anèmia hemolítica crònica que no toleren la flebotomia, es recomana la teràpia amb **quelants del ferro**, ja sigui amb deferoxamina o deferasirox (195). Hem comentat que les citocines (TNF $\alpha$ , IL1 i IL6), les adipocines (leptina, resistina) o l'hepcidina són senyals inflamatoris en el teixit adipós que faciliten els canvis en l'homeòstasi del ferro. En aquest sentit, les anàlisis *in vitro* demostren que la quelació del ferro millora la senyalització del receptor de la insulina i que l'excés de ferro disminueix l'activitat del receptor de la insulina. La depleció intracel·lular de ferro amb deferoxamina porta a un increment de la fosforilació de diversos mediadors dels efectes de la insulina en la gliconeogènesi. De la mateixa manera s'ha descrit un augment d'expressió d'alguns gens implicats en la captació i la

utilització de glucosa en les cèl·lules de l'hepatoma. Així doncs, l'ús de quelants reduiria l'estrès oxidatiu milloraria l'esteatosi hepàtica i les manifestacions de la síndrome metabòlica (359).

En general no són necessaris els canvis en la **dieta**. Ja hem comentat que en condicions normals el ferro es manté en equilibri: la quantitat absorbida en la dieta diària coincideix amb la quantitat que es perd cada dia amb la descamació cel·lular, aproximadament 1 mg (360). Atès que els pacients amb hemocromatosi poden absorbir 4 mg de ferro per dia, els suplementes de ferro s'han d'evitar, així com els de vitamina C. Les dosis farmacològiques de vitamina C acceleren la mobilització del ferro a nivells que poden saturar la circulació de transferrina, i tenen com a resultat un increment en prooxidants i/o activitat dels radicals lliures. L'EASL recomana limitar la dosi de vitamina C a 500 mg/dia (184,361). Cal destacar, també, que els mariscs crus s'han d'evitar perquè poden ser portadors del *Vibrio vulnificus*, una bactèria que pot causar una infecció potencialment mortal en pacients amb alts nivells de ferro. Les reserves de ferro elevades poden alterar l'eficaç activitat bactericida de l'hepcidina (360). Tenint en compte que la ingesta d'alcohol i el consegüent estrès oxidatiu hepàtic pot suprimir la producció d'hepcidina, no es recomana la seva ingesta en situacions de sobrecàrrega fèrrica (184). En les anèmies amb sobrecàrrega fèrrica la contribució del ferro de la dieta a la sobrecàrrega total dependrà de si el pacient està rebent transfusions. Però inclús els pacients que mai no han rebut transfusions tenen risc alt de sobrecàrrega letal (195).

En el futur probablement disposarem de **nous agents quelants** i **noves teràpies**, com per exemple la transferrina exògena (362), l'hepcidina exògena (201,363,364), els anàlegs de l'hepcidina (365) i els agonistes dels senyals de l'hepcidina. Totes aquestes estratègies podrien ser alternatives per al grup de patologies que tenen en comú la sobrecàrrega bioquímica de ferro (11), però encara calen més estudis per avaluar la seva eficàcia.



## **6. HIPÒTESIS**

---



## 6. HIPÒTESIS

**ESTUDI 1:** *Detection of hereditary hemochromatosis and biochemical iron overload in primary care: A multicenter case finding study in Spain.*

Hipòtesi 1:

Tenint en compte que l'hemocromatosi hereditària és una de les malalties genètiques amb més prevalença en la nostra població general i amb unes característiques genètiques diferents de les formes pròpies del nord d'Europa (baixa freqüència de la mutació C282Y del gen *HFE* en estudis de cribratge en nadons i en poblacions concretes de donants voluntaris de sang) i que no es recomana el seu cribratge genètic en la població general perquè no es cost-efectiu, varem formular les següents hipòtesis:

1. Que un programa de detecció d'hemocromatosi hereditària en atenció primària de la nostra àrea en el que limitem l'estudi genètic a les persones ateses amb sobrecàrrega bioquímica de ferro podria millorar el diagnòstic d'hemocromatosi hereditària.
2. Que aquest estudi permetria identificar les característiques genètiques i clíniques de les persones amb hemocromatosi hereditària detectades als centres d'atenció primària del nostre entorn.

**ESTUDI 2:** *Serum soluble transferrin receptor concentrations are increased in central obesity. Results from a screening programme for hereditary hemochromatosis in men with hyperferritinemia.*

Hipòtesi 2:

L'obesitat s'associa a la hiperferritinèmia (sobrecàrrega bioquímica de ferro), la qual pot estar afavorida per l'estat d'inflamació crònica de baix grau. Per altra banda, l'obesitat pot comportar un dèficit de ferro o una anèmia.

## 6. Hipòtesis

Així mateix, un valor baix en les concentracions en sèrum de la fracció soluble del receptor de la transferrina (sTFR) es considera un bon indicador de la sobrecàrrega tissular de ferro.

Existeixen també factors de confusió, com ara l'augment dels nivells de sTFR en situacions de resistència a la insulina o la disminució de sTFR en persones amb la mutació H63D del gen *HFE*.

Tenint en compte tots aquestes consideracions, vam formular la següent hipòtesi:

1. Que el sTFR sèric en homes obesos amb hiperferritinèmia hauria d'estar elevat si presentessin un dèficit tissular de ferro associat a l'obesitat.



## **7. OBJECTIUS**

---



## 7. OBJECTIUS

Objectiu principal:

Determinar la prevalença de la sobrecàrrega bioquímica de ferro en la població atesa en l'atenció primària i la seva relació amb l'hemocromatosis hereditària i amb l'obesitat.

Aquest objectiu s'ha assolit a través de dos estudis diferents que anomenem ESTUDI 1 i ESTUDI 2.

**ESTUDI 1:** *Detection of hereditary hemochromatosis and biochemical iron overload in primary care: A multicenter case finding study in Spain.*

Objectiu secundari 1:

Determinar en la mateixa població la prevalença d'hemocromatosis hereditària i de les mutacions genètiques lligades al gen HFE, així com avaluar el cost econòmic de l'estratègia utilitzada per a la detecció de persones amb sobrecàrrega bioquímica de ferro en atenció primària com a pas previ per realitzar el cribratge genètic d'hemocromatosis hereditària.

Objectiu secundari 2:

Descriure les altres causes patològiques de sobrecàrrega bioquímica de ferro diferents a l'hemocromatosis hereditària.

**ESTUDI 2:** *Serum soluble transferrin receptor concentrations are increased in central obesity. Results from a screening programme for hereditary hemochromatosis in men with hyperferritinemia.*

Objectiu secundari 3:

Determinar en homes obesos amb sobrecàrrega bioquímica de ferro, diagnosticada per la presència de hiperferritinèmia en un programa de cribratge genètic d'hemocromatosi hereditària desenvolupat en l'atenció primària, les concentracions en sèrum del sTFR com a índex de sobrecàrrega tissular de ferro. Es tindran en compte els possibles factors de confusió com la inflamació crònica de baix grau, la resistència a la insulina o la presència de la mutació H63D del gen *HFE*.

Objectiu secundari 4:

Determinar en la mateixa població si el sTFR en sèrum s'associa a la presència d'obesitat central o abdominal, definida com la presència d'una circumferència abdominal superior a 102 cm i tenint en compte els mateixos factors de confusió.

## **8. MÉTODES**

---



## 8. MÈTODES

**8.1. ESTUDI 1:** *Detection of hereditary hemochromatosis and biochemical iron overload in primary care: A multicenter case finding study in Spain.*

### 8.1.1. Disseny

Estudi transversal sobre la prevalença de sobrecàrrega bioquímica de ferro i d'hemocromatosi hereditària a atenció primària. Seguiment prospectiu de 5 anys de les persones detectades amb hemocromatosi hereditària per avaluar la simptomatologia d'aquesta patologia.

### 8.1.2. Subjectes. Programa de detecció de sobrecàrrega bioquímica de ferro i d'hemocromatosi hereditària

**Criteris d'inclusió:** des del febrer de 2004 al setembre de 2004 es va convidar a participar a l'estudi a tots els individus majors de 15 anys que tenien una visita rutinària a les consultes d'adults de Medicina Familiar i Comunitària de dos Centres d'Atenció Primària (CAPs) situats, l'un a Sant Just Desvern (Barcelona) i l'altre a Cerdanyola del Vallès (Barcelona).

En total van participar 2.739 individus dels quals 1.712 eren dones (62,5 %) i 1.027 eren homes (37,5 %) un cop descartats els que presentaven els següents **criteris d'exclusió:**

1. Anèmia (hemoglobina < 130 g/L)
2. Neoplàsia en els últims cinc anys
3. Concentracions de creatinina > 115  $\mu\text{mol/L}$
4. Esdeveniments cardiovasculars en els tres mesos previs
5. Tractament amb ferro, aspirina o glucocorticoides durant l'any previ
6. Donació de sang durant els sis mesos anteriors
7. Tabaquisme actiu els sis mesos anteriors
8. Ètnia no caucàsica

Les persones seleccionades es van sotmetre al següent programa de detecció de sobrecàrrega bioquímica de ferro i d'hemocromatosi hereditària dissenyat en tres etapes:

1. **Primera etapa:** realització d'una primera extracció de sang en dejú per obtenir sèrum en el que es determinava la ferritina i l'IST. Es va considerar que existia una sobrecàrrega bioquímica de ferro quan la ferritina en sèrum era  $> 300$  ng/mL i/o l'IST era  $> 50$  %, segons els articles de referència del moment (196,197,230).
2. **Segona etapa:** en cas que l'individu presentés un o els dos paràmetres anteriors elevats, es va realitzar una segona determinació en sèrum en dejú de ferritina i d'IST entre 2 i 3 mesos després de la primera extracció. En els casos en què es va confirmar la presència de sobrecàrrega bioquímica de ferro, el seu diagnòstic va quedar definitivament establert.
3. **Tercera etapa:** En les persones amb diagnòstic definitiu de sobrecàrrega bioquímica de ferro es van fer les avaluacions de l'apartat següent, que inclouen l'estudi genètic de les mutacions del gen *HFE*.

### **8.1.3. Avaluacions de la tercera etapa del programa de detecció de subjectes amb sobrecàrrega bioquímica de ferro i hemocromatosi hereditària**

#### **8.1.3.a. Anamnesi**

Es van recollir les següents dades: edat, sexe, ingesta d'alcohol confirmada almenys per un membre de la família, consum de tabac, antecedents patològics i tractament mèdic habitual.

El diagnòstic de DM es va fer d'acord amb els criteris de l'*American Diabetes Association* (366).



Per diagnosticar la síndrome metabòlica es van utilitzar els criteris del NCEP ATP III modificats per l'*American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement* (AHA/NHLBI) (247).

### **8.1.3.b. Exploració física i mesures antropomètriques**

Es va determinar el pes, la talla, l'IMC i la circumferència abdominal (amb una cinta mètrica flexible a l'alçada del melic).

L'obesitat es va determinar d'acord amb la definició de l'OMS (IMC  $\geq$  30 Kg/m<sup>2</sup>) (367). L'obesitat central o abdominal es va definir com la presència de una circumferència abdominal  $>$  88 cm en dones i  $>$  102 cm en homes, segons els criteris del NCEP ATP III modificats per l'*American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement* (AHA/NHLBI) (247).

La pressió arterial es va mesurar amb el dispositiu semiautomàtic i validat Omron 705 CP (*Omron Healthcare*, Kyoto, Japó). Els participants van estar asseguts i en repòs en una consulta tranquil·la, es van realitzar tres preses de pressió sobre l'artèria braquial a intervals de 3 minuts. La mitjana de les dues últimes determinacions es va considerar com la pressió arterial braquial definitiva. Es van definir com a persones amb hipertensió arterial aquelles amb unes xifres  $\geq$  140/90 o que estiguessin tractades amb fàrmacs antihipertensius.

### **8.1.3.c. Tercera extracció de sang: determinacions analítiques**

Les mostres de sang es van extreure per punció venosa en estat de dejuni (10-12 h). Per una banda, es van obtenir leucòcits dels quals es van fer extraccions d'ADN. Les mostres d'ADN es van emmagatzemar a -80 °C fins a la seva utilització per fer l'estudi genètic del gen *HFE* de l'HH.

Per una altra banda, es van analitzar les mostres de sang total, plasma i sèrum i es van realitzar les següents determinacions segons les tècniques estàndards utilitzades al laboratori d'hematologia i bioquímica clínica:

- Hemograma complet, índexs (inclòs el recompte de reticulòcits) i hemoglobina, ferritina, IST (IST= ferro en sèrum x 70.9/transferrina sèrica), glucosa en plasma, creatinina, perfil lipídic (colesterol total, triglicèrids, colesterol de lipoproteïnes d'alta densitat (cHDL), colesterol de lipoproteïnes de baixa densitat (cLDL)), enzims hepàtics (aspartat-aminotransferasa (AST), alanina-aminotransferasa (ALT), gammaglutamiltranspeptidasa (GGT)), proteïna C reactiva (PCR) i serologies dels virus de les hepatitis B i C.
- La ferritina es va mesurar per un mètode turbidimètric de taxa fixa (*Olympus System Reagent, Olympus Diagnostica GmbH, Wendenstrabe, Hamburg*); la transferrina per un mètode turbidimètric de punt final (*Olympus System Reagent, Olympus Diagnostica GmbH*) i el ferro per una prova fotomètrica per a analitzadors químics clínics (*Olympus System Reagent, Olympus Diagnostica GmbH*).
- Les serologies dels virus de les hepatitis B i C (l'antigen de superfície del virus de l'hepatitis B (HBsAg) i la immunoglobulina M (IgM) en l'antigen del nucli del virus de l'hepatitis B (HBcAg), i els anticossos del virus de l'hepatitis C (Anti-VHC)) es van determinar per un immunoassaig enzimàtic de micropartícules totalment automatitzat (*Abbot GmbH, Wiesbaden-Delkenheim, Alemanya*).

#### **8.1.3.d. Estudi molecular del gen *HFE***

Es va fer a partir de mostres d'ADN obtingut de leucòcits i prèviament emmagatzemades a -80 °C. Es va utilitzar una tècnica de reacció en cadena de la polimerasa de cicle ràpid amb sondes fluorescents específiques dels al·lels d'interès. Aquesta metodologia va ser portada a terme mitjançant un fluorímetre acoblat a un termociclador (*Roche Diagnostics lightcycler*) en el Servei de Genètica de l'Hospital de Sant Pau de Barcelona, centre pioner en l'estudi de l'HH. L'adquisició contínua de les dades de fluorescència durant l'anàlisi de la corba de dissociació de les sondes al llarg de la reacció en cadena de la polimerasa va permetre la detecció de mutacions degut a la pèrdua de

fluorescència de forma al·lel-específica (189). Bàsicament, es va analitzar l'existència de les mutacions C282Y, H63D i S65C.

#### **8.1.3.e. Ecografia hepàtica**

Es va utilitzar un ecògraf model *Toshiba Just Vision 400 Ssa-325* (*Toshiba Medical Systems Corporation*, Tochigi, Japó) per realitzar les ecografies hepàtiques.

#### **8.1.4. Seguiment anual durant 4 anys més de les persones amb hemocromatosi hereditària**

Les persones que van ser diagnosticades d'HH, van ser avaluades (anamnesis, exploració física, avaluacions analítiques, ecografia hepàtica) anualment durant 4 anys més per estudiar l'evolució de l'HH amb un seguiment total de 5 anys.

#### **8.1.5. Consideracions ètiques i legals**

El protocol de l'estudi va ser aprovat pel Comitè Ètic d'Investigació Clínica de la Fundació d'Investigació en Atenció Primària Jordi Gol i Gurina, Institut per a la Recerca a l'Atenció Primària de Salut (IDIAP). Es va informar de les característiques de l'estudi i es va obtenir el consentiment informat per escrit de tots els participants inclosos en l'estudi. L'estudi es va desenvolupar d'acord amb la Declaració de Helsinki i la normativa legal vigent del moment (Llei 21/2000 sobre els drets d'informació sobre la salut i l'autonomia del pacient, i la documentació clínica).

#### **8.1.6. Anàlisi estadística**

Les dades estan presentades com a valors absoluts i percentatges per totes les variables descrites al manuscrit, tret de l'evolució dels valors de ferritina i d'IST de les persones afectades per HH, els quals es van expressar com a mitjana (+ desviació estàndard). En aquest estudi no es va utilitzar l'estadística inferencial.

Tots els càlculs es van fer amb el programa estadístic SPSS (v.16.0.1 for Mac; Chicago, IL, EUA).

**8.2. ESTUDI 2:** *Serum soluble transferrin receptor concentrations are increased in central obesity. Results from a screening programme for hereditary hemochromatosis in men with hyperferritinemia.*

### 8.2.1. Disseny

Estudi de casos i controls transversal en un subgrup d'homes amb sobrecàrrega bioquímica de ferro i sense HH detectats en un programa de detecció de sobrecàrrega bioquímica de ferro i d'HH en atenció primària. Els casos eren obesos (IMC  $\geq$  30 kg/m<sup>2</sup>) i els controls no obesos (IMC < 30 kg/m<sup>2</sup>), segons els criteris de l'OMS (367).

### 8.2.2. Selecció de subjectes. Criteris d'inclusió i d'exclusió

En aquest estudi es van avaluar 1.512 homes d'un total de 4.006 subjectes, entre dones i homes, que van participar en el programa de detecció de sobrecàrrega bioquímica de ferro i d'HH descrit en l'estudi 1 i formulat en tres etapes. Aquest estudi es va dur a terme exclusivament al CAP Canaletes de Cerdanyola del Vallès amb inclusió de subjectes des del febrer de 2005 al febrer de 2006.

En aquest estudi, a diferència de l'estudi 1, el punt de tall per la ferritina en sèrum va ser de > 200  $\mu$ g/L en lloc de > 300  $\mu$ g/L, atenent als articles de referència sobre el paper de la sobrecàrrega bioquímica de ferro en les patologies cardiovasculars (182,368,369) i en la disfunció vascular (268).

En resum es van estudiar un total de 75 homes amb sobrecàrrega bioquímica de ferro després d'aplicar els següents **criteris d'exclusió**:

1. Edat < 18 anys
2. Anèmia (hemoglobina < 130 g/L)

3. Situacions d'expansió de la sèrie eritroide (volum corpuscular mig (VCM) > 98 fl i/o recompte de reticulòcits > 2,5 % dels glòbuls vermells)
4. Inflamació o malalties infeccioses en els 3 mesos previs
5. Neoplàsia en els últims 5 anys
6. Presentar alguna de les principals causes de sobrecàrrega bioquímica de ferro: consum d'alcohol > 20 g/dia, HH (homozigots per la mutació C282Y del gen *HFE*), anèmies hemolítiques i hepatopaties cròniques (cirrosi, hepatitis crònica, i/o enzims hepàtics 2 o 3 vegades per sobre del límit normal, determinat per 45 U/L per l'ALT i per 40 U/L per l'AST i la GGT)
7. Concentracions de creatinina sèrica > 115  $\mu\text{mol/L}$
8. Esdeveniments cardiovasculars en els tres mesos previs
9. Tractament amb ferro, aspirina o glucocorticoides durant l'any previ
10. Donació de sang durant els sis mesos previs
11. Tabaquisme actiu els sis mesos anteriors
12. Diabetis mellitus
13. Canvis en el pes de més d'un 3 % en els tres mesos previs o bé ús de tractaments que poguessin afectar el pes corporal el mateix període
14. Ètnia no caucàsica

### 8.2.3. Avaluació dels subjectes

Els homes seleccionats es van avaluar de forma similar a la realitzada en la tercera etapa de l'estudi 1. No hi va haver diferències respecte a l'estudi 1 pel que fa a l'anamnesi i a l'exploració física. Les determinacions fetes en la mostres de sang obtingudes en la tercera extracció de sang van ser les mateixes que en l'estudi 1, incloent l'anàlisi molecular del gen *HFE*. A més, en aquest estudi es van afegir les següents determinacions que es van realitzar amb el sèrum de mostres sanguínies emmagatzemades a -80 °C immediatament després de la seva obtenció:

- Receptor soluble de la transferrina (sTFR) per l'immunoassaig QUANTIKINETM *transferrin receptor ELISA kit* (R&D Systems, Minneapolis, EUA), amb coeficients de variació intraassaig de 0,6 a 3 %, i interassaig de 2 a 3 %.

- Proteïna C reactiva d'alta sensibilitat (PCRhs) per immunofelometria altament sensible (*Dade Behring*, Marburg, Alemanya).
- Insulina per ELISA (*R&D Systems*, Minneapolis, MN, EUA).
- La resistència a la insulina es va calcular per l'índex *Homeostatic Model Assessment Insulin Resistance* (HOMA-IR) (370).

Cap malalt es va avaluar amb ecografia hepàtica.

#### **8.2.4. Consideracions ètiques i legals**

El protocol d'aquest estudi es va aprovar pel Comitè Ètic d'Investigació Clínica de l'Hospital de Sabadell. Es va informar de les característiques de l'estudi i es va obtenir el consentiment informat per escrit de tots els participants inclosos en l'estudi. L'estudi es va realitzar d'acord amb la Declaració de Helsinki i la normativa legal vigent del moment (Llei de Recerca Biomèdica 14/2007).

#### **8.2.5. Anàlisi estadística**

Les dades estan presentades com a percentatges per les variables qualitatives, mitjana (+ desviació estàndard) per les quantitatives amb distribució normal, i mediana (interval interquartil) per les quantitatives amb distribució no normal.

Per fer les anàlisis de les diferències entre casos i controls, les variables qualitatives es van comparar amb la prova de  $X^2$  o amb el test de Fisher (per mostres petites). En el cas de les variables quantitatives, primer es va analitzar si seguien o no una distribució normal (test de Kolmogorov-Smirnov). Si seguien una distribució normal, es va utilitzar la prova de t de Student per comparar els dos grups. En cas que no seguissin aquesta distribució, es va realitzar una transformació logarítmica per utilitzar proves paramètriques, o bé es van analitzar amb proves no paramètriques (U de Mann-Whitney). Les correlacions entre les variables analitzades es van realitzar amb els coeficients de correlació de Pearson o Spearman segons correspongués.

Aquest estudi va incloure models de regressió lineal múltiple (*backward stepwise*) amb la variable dependent sTFR. En aquests models, les variables potencialment independents es van seleccionar en funció de la seva significació estadística en les correlacions univariades i/o de la seva potencial relació amb la variable dependent tenint en compte la literatura prèvia. Tots aquests models utilitzaven un valor de  $p < 0,10$  per eliminar les variables i de  $p < 0,05$  per mantenir-les en els models. Es va utilitzar per tots els càlculs el programa estadístic SPSS (*v.16.0.1 for Mac*; Chicago, IL, EUA). Tots els valors de  $p$  van ser bilaterals i es van considerar com a estadísticament significatius valors de  $p < 0,05$ .





## **9. RESULTATS**

---



## 9. RESULTATS

Els resultats estan descrits amb més detall en les dues publicacions originals que s'adjunten. En aquest apartat s'ofereix un resum del que es considera més rellevant.

**ESTUDI 1:** *Detection of hereditary hemochromatosis and biochemical iron overload in primary care: A multicenter case finding study in Spain.* Núria Freixenet, Maria Sierra Moreno-Rosel, Maria Jesús Barceló, Antonia Serrano, Marina Payà, Lourdes Crespo, Maria José Pérez-Lucena, Albert Altés, Montserrat Baiget, Jordi Félez. *Am J Hematol.* 2010 Apr;85(4):294-6.  
Erratum a: *Am J Hematol*, 2014 Sep;89 (9):940.

Es van avaluar un total de  $n = 2.739$  individus reclutats en dos CAPs de l'àrea de Barcelona dels quals 1.712 eren dones (62,5 %) i 1.027 eren homes (37,5 %).

Atenent a l'objectiu principal del nostre estudi, la prevalença de la sobrecàrrega bioquímica de ferro és:

- Prevalença sobrecàrrega bioquímica de ferro: 126/2.739 (4,6 %).

Atenent a l'objectiu secundari 1, els nostres resultats indiquen:

- Prevalença d'HH lligada a l'*HFE* segons les guies del moment en què va ser realitzat l'estudi (230): 1/304 (0,32 %) tenint en compte els individus amb homozigosi C282Y (0,07 %) i els individus amb heterozigosi composta C282Y/H63D (0,25 %).
- Tipus de mutacions d'HH lligada a l'*HFE* i prevalença de cadascuna d'elles:

- a. Dos individus amb homozigosi C282Y: prevalença 0,07 %.

- b. Set individus amb heterozigosi composta C282Y/H63D: prevalença 0,25 %.
  - c. Es va identificar una nova mutació V284M (189).
- Cost econòmic de les determinacions de la ferritina i de l'IST del programa: el cost d'aquestes determinacions va ser en total de 15.810 € tenint en compte els costos de les determinacions fetes als familiars de les persones amb HH detectades en el programa. Aquest import va permetre detectar 126 persones amb sobrecàrrega bioquímica de ferro, de les quals 14 presentaven HH lligada a l'*HFE*.

Tenint en compte l'objectiu secundari 2 respecte a la relació mutacions i expressió clínica, trobem que:

- Les persones amb diagnòstic d'HH lligada a l'*HFE* no presentaven clínica relacionada amb l'HH, situació que es va mantenir durant el seguiment anual dels 4 anys addicionals.
- Cap dels dos homozigots C282Y presentava criteris ecogràfics d'EHNA. Tres dones heterozigotes compostes C282Y/H63D presentaven criteris ecogràfics d'EHNA lleu.
- Un 27 % de les dones i un 40 % dels homes amb sobrecàrrega bioquímica de ferro presentaven criteris de DM2. Cap dels subjectes diagnosticats d'HH lligada a l'*HFE* presentava DM2.
- Un 45 % i un 43 % de dones i homes, respectivament, amb sobrecàrrega bioquímica de ferro presentaven criteris de síndrome metabòlica, independentment de la presència o no de mutacions del gen *HFE*. Cap dels dos homozigots C282Y presentava criteris de síndrome metabòlica. Dues dones heterozigotes compostes C282Y/H63D presentaven criteris de síndrome metabòlica.

## Detection of hereditary hemochromatosis and biochemical iron overload in primary care: A multicenter case finding study in Spain

Núria Freixenet,<sup>1</sup> Maria Sierra Moreno-Rosel,<sup>1</sup> Maria Jesús Barceló,<sup>2</sup> Antonia Serrano,<sup>1</sup> Marina Payà,<sup>3</sup> Lourdes Crespo,<sup>3</sup> Maria José Pérez-Lucena,<sup>4</sup> Albert Altés,<sup>5</sup> Montserrat Baiget,<sup>2</sup> and Jordi Féléz<sup>1</sup>

Although the C282Y HFE gene substitution is the most common mutation among individuals from Northern Europe in Spain and Italy, this mutation has a lower prevalence and thus a lower proportion of Spanish and Italian patients are C282Y homozygotes in comparison to Northern European descendants. These differences prompted us to explore the expression of hereditary hemochromatosis (HH) in a set of Spanish individuals in primary care settings. We undertook a multicenter prospective case-finding study including 2,739 individuals. Subjects with consistent elevated transferrin saturation and/or serum ferritin levels were referred as having elevated iron measures (EIM), and molecular analyses for HFE-gene were performed. EIM were consistently found in 126 subjects. Among them 14 HH patients were identified (3 C282Y homozygotes and 11 compound C282Y/H63D heterozygotes), including subjects from familial studies. A hitherto new mutation of HFE was detected (V284M/H63D) as well as a family carrying a hereditary hyperferritinemia/cataract syndrome (HHCS) with a C39T mutation in L-ferritin gene. A 5-year follow-up of patients with HH showed a steady state of the iron measurements as well as in their clinical situation. Forty-five percent of patients with EIM had metabolic syndrome. This is the first case-finding study performed in Spain on these topics.

HH is one of the most frequent genetic diseases in Caucasians [1,2]. HH is associated to two point mutations in the HFE gene (C282Y and H63D), which account for the vast majority of iron overload related clinical complications [3–5]. C282Y mutation has a lower gene frequency than H63D mutation but its iron overload related clinical penetrance is markedly higher than in H63D mutation [6–10]. Additional missense and nonsense mutations in HFE gene have also been described in association with clinical phenotype of hemochromatosis [11–14]. A different prevalence of HFE mutations have been reported among individuals from Northern Europe [6,12,13] in Spain and Italy. These differences prompted us to explore the expression of HH in a set of Spanish individuals in primary care settings.

In this study, 2,739 individuals were enrolled: 1,712 women (62.5%) and 1,027 men (37.5%). Among these individuals, we initially found 271 subjects (211 men and 61 women) with EIM. That was confirmed 2–3 months after the first determination on 126 subjects (104 men and 22 women), which represented 6% of the total population screened. The age between the women first enrolled in the study was not markedly different:  $51 \pm 19$  and  $52 \pm 17$  for women and men, respectively. In contrast, in the group of cases where EIM was confirmed ( $n = 126$ ), the age of the women with EIM ( $n = 22$ , mean of age  $65 \pm 11$ ) was significantly higher ( $P > 0.01$ ) than that of the men with EIM ( $n = 104$ , mean of age  $57 \pm 11$ ) and it was also higher than the average age of the individuals firstly enrolled in the study ( $P > 0.01$ ).

Among the 126 subjects with confirmed EIM, two unrelated patients, a 60-year-old man and a 37-year-old woman both originally from Catalonia-Spain, were identified as homozygous C282Y. The homozygote C282Y 60-year-old man (who was a "blood donor") had a TS of 66–86% and sF levels of 55–67 ng/mL, whereas the homozygote 37-year-old woman had a TS of 58–67% and her sF levels ranged from 227 to 287 ng/mL. Seven additional individuals belonging to unrelated families were also detected as compound heterozygotes for C282Y and H63 HFE gene mutation (five women and two men). In addition, we identified a new HFE gene mutation (V284M) in a patient with EIM [14]. Among compound heterozygotes, the mean TS and sF levels were  $65\% \pm 13\%$  and  $337 \pm 164$  ng/mL, respectively, for women, and  $41\% \pm 2\%$  and  $543 \pm 37$  ng/mL for men. The HFE-genotypes found in the group of 126 individuals with EIM are summarized in Table I.

In our study HFE-gene mutation analyses were performed on phenotypically screened participants when EIM were confirmed. Because of this initial selection, prevalence of HFE mutations among the total population can only be estimated. 0.07 and 0.25% of the participants were homozygotes for C282Y and compound heterozygotes for C282Y/H63D, respectively. These data are in agreement with genetic studies performed by our group on the prevalence of HH in Spain, and they are similar to the ones described in populations from Southern France, Czech Republic, and several other regions of Italy [15]. That means that we have detected one HH in 304 screened individuals. Studies of differing populations have estimated that the prevalence ranges from 1 in 357 subjects to 1 in 625 in general population to rates almost as high as 1 in 135 persons in Norwegian men (reviewed in Ref. 16).

Among adults, liver diseases, such as cirrhosis and hepatic carcinoma are the most specific manifestations of HH [17]. Nonspecific symptoms attributed to HH, such as excessive fatigue, arthropaties, and impotence are considered no more common in C282Y homozygotes than they are in the general population [17]. None of our HH patients suffered any severe hepatic disease as assessed by detection of cytotoxicity and abdominal ultrasound examination. The two C282Y homozygote individuals were healthy. Both had high TS but normal sF levels and other biochemical blood tests were also normal. Among the five women with C282Y/H63D mutations, four had elevated TS and the one with normal TS was identified due to a high sF ( $\sim 570$  ng/mL). This later 51-year-old woman had polyarthralgias and metabolic syndrome with a grade II hepatic steatosis. An additional 66-year-old woman suffered polyarthralgias related to well known arthrosic process, one had hyperthyroidism, one had hypothyroidism, and another one had glaucoma. No other clinical or biochemical alterations had to be considered. The two compound heterozygote men had normal TS but high sF levels ( $\sim 540$  ng/mL). One of them (61-year-old) had obesity (BMI 31) and the other one (73-year-old) had metabolic syndrome and grade II steatosis. No clinical complications were detected among the family members carrying a new mutation of HFE gene (V284M) recently described by our group [14].

To extend our study to relatives of patients with HH, molecular studies were performed in 20 subjects with C282Y mutations. Sixty-three additional cases were analyzed. A 44-year-old C282Y/C282Y woman was found. She had a TS of 74% with sF levels of 105 ng/mL but she was completely asymptomatic. Four compound heterozygotes for C282Y/H63D were also identified: three men with ages ranging from 21- to 27-year-old and a 33-year-old woman, all of them with normal TS and sF levels that were also asymptomatic. The extension of HH detection among relatives of affected individuals increased HH prevalence to 1 in 197 individuals enrolled in the study.

Distinct to hospital diagnosed population, our study detected HH patients with moderate high levels of sF, and probably they will not have clinical complications related to their genetic HH. This is supported by data from our clinical and biological follow-up of these individuals conducted throughout a 5-year period (see Fig. 1). We found that compound heterozygotes have a higher EIM than homozygotes. These data seem to contradict our knowledge on HFE-HH but it could be explained by the design of our study where homozygotes with more severe phenotype probably have been missed. Another possibility is that compound heterozygotes have a higher prevalence of metabolic disorders. We are currently exploring this hypothesis in an ongoing case-control study.

We have calculated a cost of 5 € for iron measurements (2.87 € for sF and 2.13 € for TS). We performed 3,162 iron measures, including those performed in familial studies. That means that using the present protocol we

**TABLE I. Characteristics of HFE Gene Mutations Detected and Their Frequency**

Genotype	Patients	Over Patients with EIM (n = 126) (%)
A) With clinical penetrance <sup>a</sup>		
282Y/C282Y	2	1.6
282Y/H63D	7	5.5
B) Without clinical penetrance <sup>a</sup>		
63D/H63D	8	6.3
282Y/C65S	2	1.6
63D/C65S	3	2.4
282M-H63D	1	0.8
282Y/W	11	8.7
63D/W	39	31.0
65S/W	1	0.8

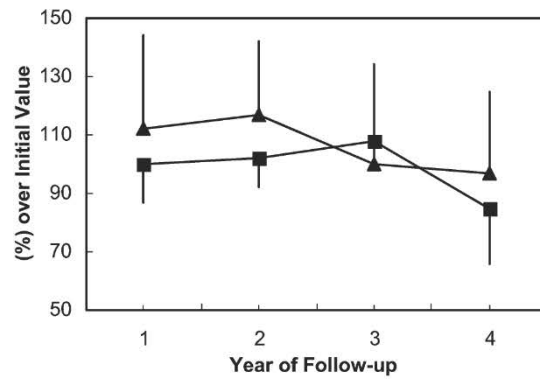
<sup>a</sup>Patients with HFE gene mutations are grouped by (A) with possible clinical expression and (B) without clinical expression, according to literature. W: wild allele.

expend 15,810 € in detecting 14 patients with HH and 162 individuals with a ferropenic status. Due to its cost molecular HFE screening in general population has not recommended by several experts panels, whereas case-finding studies may be considered for the initial selection of individuals with HH [16]. Although TS is considered the golden test for detection of HH, in recent studies it has been suggested that genetic studies should only be performed when sF levels are very high (~ or >1,000 ng/mL) [17]. Rationality for this is based upon the fact that high levels of sF will detect patients who will be clinically affected. In several studies performed on individuals with a different geographical background, it has been demonstrated that cirrhosis of the liver occurs only extremely rarely in HH patients with sF ≤ 1000 ng/mL. Since sF for HH does not rise over long periods of time, patients with levels <1000 ng/mL should not need phlebotomies [18,19]. This cutoff can be modified by co-factors such as an increased alcohol intake, and other hepatotoxic factors [20]. In these situations measurement of hepatic iron should be the definitive measure of iron loading, especially in those with ferritin of greater than 1000 ng/mL.

High levels of sF may also detect other clinically significant diseases in patients who do not have HH [21]. For example, we found a young individual (23-year-old male) with persistent serum ferritin elevation (~900 ng/mL) affected by a HHCS (see Table II). Among 126 patients with consistent EIM, 52 (41%) had no HH and most of them not had a marked increase in TS. Clinical characteristics of these individuals are displayed in Table II. Dysmetabolic iron overload syndrome is related to diabetes, insulin resistance, and metabolic syndrome [22,23] and generally characterized by normal TS [24,25]. In our set of 126 individuals with EIM, 6/22 (27%) women and 42/104 (40%) men had diabetes. This represents a higher expression than the one found in our setting of primary care population (14,000 individuals) with the same range of age: 15 and 18% for women and men, respectively. In addition, we also found a high prevalence of MS among EIM individuals by comparing our data on prevalence of MS among Spanish employees [26]. We found a prevalence of 45 and 44% of MS among our men and women with EIM, respectively. In contrast, among a ~100-fold higher number of individuals with uncharacterized EIM but similar age range, the prevalence of MS was 14 and 16% for men and women, respectively. This confirmed a strong association between diabetes, MS and EIM in our Mediterranean population. The hypothetical EIM modulation by controlling MS seems to be confirmed by preliminary evaluation of these ongoing analyses and it is the aim of future studies.

**Patients and Methods Summary**

*Patients and study design.* This multicenter prospective study involved 2,739 individuals from 15- to 96-year-old, attending one of the two participating community-based primary care centers from Spain: ABS Canaletes (Cerdanyola del Vallès-Barcelona) and ABS Sant Just (Sant Just Desvern-Barcelona). Individuals were systematically enrolled in the study from February to September 2004. TS and sF levels were included among blood tests. TS was measured by immuno (chemiluminescence) assay using the Roche/Hitachi 717 kit (Roche Diagnostics SL, Barcelona, Spain). Serum Ferritin was measured by colorimetric assay using the Elecsys (Roche). Iron blood tests were reassessed in a period of 2–3 months in patients which had EIM: high sF levels (>300 ng/mL, cutoff level in our lab), elevated TS (>50%) or both. Only subjects with confirmed EIM in the two independent blood tests were finally enrolled. These



**Figure 1.** Five-year evolution of serum ferritin levels and transferrin saturation in hereditary hemochromatosis individuals. Ferritin (triangles) and TS (squares) were assessed once per year among C282Y homozygotes (three individuals) and compound C282Y/H63D heterozygotes (nine subjects). Results are depicted as of percentage (mean ± SD) calculated every year over the first determination during a period of 5 years.

**TABLE II. Clinical and Biological Manifestations of Individuals with EIM**

	Women (%)	Men (%)
n	22 (100)	104 (100)
Metabolic syndrome <sup>a</sup>	10 (45)	44 (43)
Type II diabetes	6 (27)	42 (40)
ESR/CRP increased <sup>b</sup>	9 (41)	13 (12.5)
Anti-core BHV	5 (23)	8 (7.7)
Hypothyroidism	4 (18)	3 (2.8)
Increased γGT <sup>c</sup>	2 (9)	6 (5.8)
Seropositive for CHV	3 (14)	1 (1)
Alcohol abuse <sup>d</sup>	1 (4.5)	5 (4.8)
Talasemia minor	1 (4.5)	2 (1.9)
HHCS <sup>e</sup>	0 (0)	1 (4.5)
MCV-EBC > 99 fL <sup>f</sup>	0 (0)	3 (2.9)
Seropositive for HIV	0 (0)	0 (0)

Age MS (mean ± SD) in years: women 65 ± 11, men 57 ± 11.

<sup>a</sup>Metabolic syndrome as defined by IDF (see details in the text).

<sup>b</sup>ESR (erythrocyte sedimentation rate) >10 and >15 for men and women, respectively, or C-reactive protein > 0.4 mg dL.

<sup>c</sup>Gamma glutamyl transferase × 3 over control values.

<sup>d</sup>Alcohol abuse confirmed because patients were under specific treatment units.

<sup>e</sup>HHCS, hyperferritinemia/cataract syndrome related to C39T mutation in L-ferritin gene.

<sup>f</sup>MCV-EBC mean of corpuscular volume of red blood cells.

subjects were again appointed to be submitted to full anamnesis, clinical exploration, abdominal ultrasound study, and new blood test including molecular analyses for HFE mutations. Informed consent was obtained in agreement to Helsinki's declaration and approved by Fondo de Investigaciones Sanitarias (Ministerio de Sanidad y Consumo, Spain). A third blood test included: hemogram, sF, TS, erythrocyte sedimentation rate and/or C-reactive protein, glycermia, glycolysated hemoglobin (HbA1c), blood urea nitrogen, serum creatinin, serum urate, alanine transaminase, aspartate aminotransferase, γ-glutamyl transferase, alkaline phosphatase, cholesterol (total, high density lipoproteins and calculated low density lipoproteins), thyroid stimulating hormone and T4 when indicated, serum markers for hepatitis B and C viruses, and human immunodeficiency virus. α-Feto-protein, CEA and PSA (in males) were also quantified. In addition, uncoagulable blood was also obtained for DNA extraction from leucocytes and frozen until molecular analyses were carried out. Abdominal ultrasound examinations were performed using a Thoshiba Just Vision 400 (Thoshiba Medical Systems Corporation, Tochigi, Japan). These clinical, biological and ultrasound studies were repeated on an annual basis for a 4-year period on homozygotes for C282Y HFE mutation or compound C282Y/H63D heterozygotes as well as patients with a bIO.

*Molecular analyses of HFE gene.* The HFE gene mutations were analyzed using an assay that combines rapid-cycle PCR with allele-specific fluorescent probe melting profiles. It is a single-tube analysis and was performed on the Roche diagnostics lightcycler, a microvolume fluorimeter integrated

## letters

with a thermal cycler. Continuous acquisition of fluorescence data during a melting curve analysis at completion of PCR allows the detection of mutations given the loss of fluorescence in an allele-specific manner. By plotting melting peaks, the different alleles are readily distinguishable [27]. This melting analysis identifies single-base changes in PCR products with a sensitivity and specificity comparable or superior to conventional mutation scanning methods [28]. Specific details on these methods have been previously described [14].

**Statistical analyses.** *T* and  $\chi^2$  tests were used for comparisons of the means. Determination of prevalence of diabetes and hypertension on several primary care centers (Badia del Vallès, Barberà del Vallès, Canaletes-Fontetes, Ripollat and Serraparera from West Vallès in Barcelona, Spain) were performed by analyses of computerized data (e-CAP<sup>®</sup>; Institut Català de la Salut, Generalitat de Catalunya, Barcelona, Spain).

**Acknowledgments**

The authors thank C. Cabistañ, T. Vila, J. Tarres, D. Gacia-Perez, J. Muniesa, R. Rabaneda, C. Calvo, A. Barbero, and Y Sanchez for their contribution in the analyses of data and preparation of the manuscript and J. Salvia for his support in abdominal ultrasound analyses.

<sup>1</sup>ABS Canaletes, Institut Català de la Salut (ICS), Cerdanyola del Vallès, Barcelona

<sup>2</sup>Servei Genètica Hospital de Sant Pau, Barcelona

<sup>3</sup>ABS Sant Just, ICS, Cerdanyola del Vallès, Barcelona

<sup>4</sup>ABS Serraparera, ICS, Cerdanyola del Vallès, Barcelona

<sup>5</sup>Servei Hematologia, Fundació Althaia, Manresa, Barcelona

Contract grant numbers: FIS 03/0459 and FIS 08/0956.

\*Corresponding author: Jordi Felez, ICS-CAP Canaletes, Passeig d'Horta, 17, Cerdanyola del Vallès, Spain 08290;

E-mail: jordifelez@hotmail.com

Conflict of interest: Nothing to report.

Published online 8 January 2010 in Wiley InterScience

(www.interscience.wiley.com).

DOI: 10.1002/ajh.21634

**References**

- Edwards CQ, Griffen LM, Goldgar D, et al. Prevalence of hemochromatosis among 11,065 presumably healthy blood donors. *N Engl J Med* 1988;318:1355–1362.
- Phatak PD, Sham RI, Raubertas RF, et al. Prevalence of hereditary hemochromatosis in 16,031 primary care patients. *Ann Intern Med* 1998;129:954–961.
- Feder JN, Gnirke A, Tomas W, et al. A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary hemochromatosis. *Nat Genet* 1996;13:399–408.
- Jouanolle AM, Gandon G, Jezequel P, et al. Hemochromatosis and HLA-H. *Nat Genet* 1996;14:251–252.
- De Villiers JN, Hillerman R, Loubser L, Kotze JM. Spectrum of mutations in the HFE gene implicated in hemochromatosis and porphyria. *Hum Mol Genet* 1999;8:1517–1522.
- Merryweather-Clarke AT, Pinton JJ, Sherman JD, Robson KJH. Global prevalence of putative hemochromatosis mutations. *J Med Genet* 1997;34:265–268.
- Njajou OT, Houwing-Duistermaat JJ, Osborne RH, et al. A population-based study of the effect of the HFE C282Y and H63D mutations on iron metabolism. *Eur J Hum Genet* 2003;11:225–231.
- Phatak PD, Ryan DH, Cappuccio J, et al. Prevalence and penetrance of HFE mutations in 4,865 unselected primary care patients. *Blood Cells Mol Dis* 2002;29:41–47.
- Olynyk JK, Cullen DJ, Aquilia S, et al. A population-based study of the clinical expression of the hemochromatosis gene. *N Engl J Med* 1999;341:718–724.
- Beutler E, Felitti V, Koziol J, et al. Penetrance of 845G A (C282Y) HFE hereditary hemochromatosis mutations in the USA. *Lancet* 2002;359:211–218.
- Mura C, Raguene O, Ferec C. HFE mutations analysis in 711 hemochromatosis probands: evidence for S65C implication in mild form of hemochromatosis. *Blood* 1999;93:2502–2505.
- Pietrangolo A. Hereditary Hemochromatosis: A new look at an old disease. *N Engl J Med* 2004;350:2383–2397.
- Olynyk JK, Cullen DJ, Aquilia S, et al. A population-based study of the clinical expression of the hemochromatosis gene. *N Engl J Med* 1999;341:718–724.
- Bach V, Barceló MJ, Altés A, et al. Genotyping the HFE gene by melting point analysis with the LightCycler system: Pros and cons. *Blood Cells Mol Dis* 2006;36:288–291.
- 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;60:828–832.
- Qaseem A, Aronson M, Fitterman N, et al. Screening for hereditary hemochromatosis: A clinical practice guideline from the American College of Physicians. *Ann Intern Med* 2005;143:517–521.
- Waalens J, Felitti VJ, Gelbart T, Beutler E. Screening for hemochromatosis by measuring ferritin levels: a more effective approach. *Blood* 2008;111:3373–3376.
- Olynyk JK, Hagan SE, Cullen DJ, et al. Evolution of untreated hereditary hemochromatosis in the Busselton population: A 17-year study. *Mayo Clin Proc* 2004;79:309–313.
- Yamashita C, Adams PC. Natural history of the C292Y homozygote for the hemochromatosis gene (HFE) with a normal serum ferritin level. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2003;1:388–391.
- Ferrannini E. Insulin resistance, iron, and the liver. *Lancet* 2000;355:2181–2182.
- Camaschella C, Poggiagli E. Towards explaining "unexplained hyperferritinemia." *Haematologica* 2009;94:307–309.
- Jiang R, Manson JE, Meigs JB, et al. Body iron stores in relation to risk of type 2 diabetes in apparently healthy women. *JAMA* 2004;291:711–717.
- Ford ES, Cogswell ME, et al. Diabetes and serum ferritin concentration among U.S. adults. *Diabetes Care* 1999;22:1978–1983.
- Moirand R, Mortaji AM, Loréal O, et al. A new syndrome of liver iron overload with normal transferrin saturation. *Lancet* 1997;349:95–97.
- Riva A, Trombini P, Mariani R, et al. Reevaluation of clinical and histological criteria for diagnosis of dysmetabolic iron overload syndrome. *World J Gastroenterol* 2008;14:4745–4752.
- Cordero A, Alegria E, León M. Prevalencia de síndrome metabólico. *Rev Esp Cardiol* 2005;5:11–15.
- Wittner C, Firie K, Andrew R, et al. The LightCycler: A microvolume multi-sample fluorimeter with rapid temperature control. *Biotechniques* 1997;22:176–181.
- Reed HG, Wittner C. Sensitivity and specificity of single-nucleotide polymorphism scanning by high-resolution melting analysis. *Clin Chem* 2004;50:1748–1754.

## Development of Löffler's endocarditis in FIP1L1-PDGFRalpha-positive hypereosinophilic syndrome despite continuous imatinib mesylate therapy and continuous complete remission

Jan Václavík,<sup>1\*</sup> Tomáš Szotkowski,<sup>2</sup> Martin Hutýra,<sup>1</sup> Jiří Kozák,<sup>3</sup> Jan Lukl,<sup>1</sup> and Miloš Táborský<sup>1</sup>

We present a case of a 32-year-old male with FIP1L1-PDGFRalpha-positive hypereosinophilic syndrome (HES), whose complete clinical, hematological, and molecular remission was achieved and maintained on 100 mg of imatinib mesylate daily. The markedly increased thickness of the left ventricular (LV) apical myocardium at the time of the diagnosis decreased very quickly after imatinib and warfarin therapy and there was no detectable intramural thrombus on repeated echocardiographic check-ups. After 28 months of imatinib therapy and 16 months after warfarin withdrawal, both asymptomatic endocardial fibrosis and

LV apical thrombus developed, consistent with the diagnosis of Löffler's endocarditis, and these findings were confirmed by cardiac magnetic resonance imaging (MRI). Resumption of warfarin therapy led to the disappearance of the apical thrombus after 7 months, whereas endomyocardial fibrosis persists and the LV systolic and diastolic functions remain normal. To our knowledge, no similar case of the development of Löffler's endocarditis during imatinib therapy with continuous complete remission of HES has been described up to the present. We suggest that frequent echocardiographic or preferably gadolinium-enhanced MRI

**ERRATUM**

---



## Detection of hereditary hemochromatosis and biochemical iron overload in primary care: A multicenter case finding study in Spain



By Núria Freixenet,<sup>1</sup> Maria Sierra Moreno-Rosel,<sup>1</sup> Maria Jesús Barceló,<sup>2</sup> Antonia Serrano,<sup>1</sup> Marina Payà,<sup>3</sup> Lourdes Crespo,<sup>3</sup> Maria José Pérez-Lucena,<sup>4</sup> Albert Altés,<sup>5</sup> Montserrat Baiget,<sup>2</sup> and Jordi Félez<sup>1</sup>

Am. J. Hematol. 2010 Apr; 85(4):294-6. Doi: 10.1002/ajh.21634

In the above-referenced article, the author did not include the name of the *Universitat Autònoma de Barcelona (UAB)*, to which the authors were affiliated.

We apologize for any confusion this error might have caused.

Received for publication: 11 July 2014  
Am. J. Hematol. 89:940, 2014.  
Published online: in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).  
DOI: 10.1002/ajh.23803

© 2014 Wiley Periodicals, Inc.



**ESTUDI 2:** *Serum soluble transferrin receptor concentrations are increased in central obesity. Results from a screening programme for hereditary hemochromatosis in men with hyperferritinemia.* Núria Freixenet, Ángel Remacha, Eugenio Berlanga, Assumpta Caixàs, Olga Giménez-Palop, Francisco Blanco-Vaca, Vanessa Bach, Montserrat Baiget, Yolanda Sánchez, Jordi Félez, José Miguel González-Clemente. Clin Chim Acta. 2009 Feb;400(1-2):111-6.  
Erratum a: Clin Chim Acta. 2014 Sep 25; 436:351.

Atenent als objectius secundaris 3 i 4, en aquest estudi es va analitzar un subgrup de 75 homes amb sobrecàrrega bioquímica de ferro (ferritina  $\geq 200 \mu\text{g/L}$ ) i sense HH lligada a l'*HFE* ni DM, dels quals 32 (43 %) es van classificar com a obesos (IMC  $\geq 30$ ) i 43 (57 %) com a no obesos. L'edat mitjana dels obesos va ser de 55,6 ( $\pm 12,2$ ) anys i la dels no obesos de 52,2 ( $\pm 12,6$ ) anys ( $p = 0,896$ ). En conjunt, 26 individus (34,7 %) estaven diagnosticats d'hipertensió arterial i en tractament amb fàrmacs antihipertensius. Globalment, 14 individus (18,7 %) estaven diagnosticats d'hipercolesterolèmia i en tractament amb hipolipemiants.

En aquest estudi es va observar que:

- L'IMC va ser de 32,3 ( $\pm 2,2$ )  $\text{Kg/m}^2$  en els obesos i de 26,2 ( $\pm 1,9$ )  $\text{Kg/m}^2$  en els no obesos ( $p < 0,001$ ), i la circumferència abdominal d'1,06 ( $\pm 0,91$ ) m en els obesos i de 0,95 ( $\pm 0,62$ ) m en els no obesos ( $p < 0,001$ ).
- Els valors de ferritina sèrica no van ser diferents entre els dos grups (obesos: 554 (421-798) *versus* 574 (508-669)  $\mu\text{g/L}$ ) ( $p = 0,770$ ).
- Només 11 (14,7 %) presentaven un IST  $\geq 45$  %.
- Cap d'ells presentava una PCRhs  $> 10 \text{ mg/L}$ .
- Els individus obesos presentaven, en relació als no obesos, concentracions més altes d'hemoglobina ( 157 ( $\pm 12$ ) *versus* 152 ( $\pm 11$ )  $\text{g/L}$ ;  $p = 0,049$ ) i de sTFR (2,95 (2,22-3,28) *versus* 2,28 (1,88-2,91)  $\text{mg/L}$ ;  $p = 0,013$ ) i una major resistència a la insulina mesurada per l'índex

HOMA-IR (1,38 (1,04-2,69) *versus* 1,02 (0,60-1,55);  $p = 0,009$ ), però no van presentar diferències en la pressió arterial, el recompte de reticulòcits, el VCM, la ferritina sèrica, l'IST, la glucèmia basal, el cHDL, els triglicèrids basals, els enzims hepàtics, la PCRhs i les mutacions del gen *HFE* de l'HH.

- Ajustant per tots els potencials factors de confusió avaluats, es va demostrar una correlació positiva entre les concentracions sèriques de sTFR i l'IMC ( $\beta=0,277$ ;  $p=0,041$ ), que va ser encara més significativa entre els valors de sTFR i els de circumferència abdominal ( $\beta=0,421$ ;  $p=0,002$ ).
- No es van trobar correlacions significatives entre el sTFR i la resta de les variables avaluades (edat:  $r = -0,183$ ,  $p = 0,124$ ; tensió arterial sistòlica (TAS):  $r = -0,076$ ,  $p = 0,534$ ; tensió arterial diastòlica (TAD):  $r = 0,135$ ,  $p = 0,268$ ; hemoglobina:  $r = 0,190$ ,  $p = 0,112$ ; ferritina sèrica  $r = -0,088$ ,  $p = 0,891$ , IST:  $r = -0,046$ ,  $p = 0,701$ ; glicèmia basal:  $r = 0,074$ ,  $p = 0,537$ , HDL-colesterol:  $r = -0,183$ ,  $p = 0,125$ ; triglicèrids:  $r = 0,116$ ,  $p = 0,339$ ; índex HOMA-IR:  $r = 0,043$ ,  $p = 0,740$ ; PCRhs:  $r = 0,036$ ,  $p = 0,766$ ; AST:  $r = 0,176$ ,  $p = 0,216$ ; ALT:  $r = 0,141$ ,  $p = 0,254$ ; GGT:  $r = 0,117$ ,  $p = 0,336$ ).



## Serum soluble transferrin receptor concentrations are increased in central obesity. Results from a screening programme for hereditary hemochromatosis in men with hyperferritinemia

Núria Freixenet<sup>a</sup>, Ángel Remacha<sup>b</sup>, Eugenio Berlanga<sup>c</sup>, Assumpta Caixàs<sup>a</sup>, Olga Giménez-Palop<sup>a</sup>, Francisco Blanco-Vaca<sup>d</sup>, Vanessa Bach<sup>e</sup>, Montserrat Baiget<sup>e</sup>, Yolanda Sánchez<sup>f</sup>, Jordi Félez<sup>f</sup>, José Miguel González-Clemente<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Diabetes, Endocrinology and Nutrition, Hospital de Sabadell, Sabadell, Barcelona, Spain

<sup>b</sup> Hematology Department, Hospital de Sant Pau, Barcelona, Spain

<sup>c</sup> Biochemistry Department, UDIAT, Sabadell, Barcelona, Spain

<sup>d</sup> Biochemistry Department and Research Institute, Hospital de Sant Pau, Barcelona, Spain

<sup>e</sup> Department of Genetics and Research Institute, Hospital de Sant Pau, Barcelona, Spain

<sup>f</sup> CAP Canaletes, Institut Català de la Salut, Cerdanyola del Vallès, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 21 July 2008

Received in revised form 21 October 2008

Accepted 21 October 2008

Available online 30 October 2008

#### Keywords:

Soluble transferrin receptor

Central obesity

Ferritin

Protein C-reactive

### ABSTRACT

**Background:** A decrease in the serum concentrations of the soluble transferrin receptor (sTfR) is considered a good index of tissue iron. Because obesity is associated with hyperferritinemia and this is considered a sign of iron overload, a decrease in sTfR would be expected for the obese. We evaluated whether obese men with hyperferritinemia, detected in a genetic screening programme for hereditary hemochromatosis (HH), have lower serum concentrations of sTfR than their non-obese counterparts.

**Methods:** 75 men (age: 55.4±12.4 years) with hyperferritinemia (serum ferritin – SF >200 µg/L) and no known conditions of iron overload were evaluated for body mass index (BMI), waist circumference (WC), blood pressure, traditional indices of iron status, sTfR, fasting plasma glucose, lipid profile, insulin resistance (HOMA-IR), highly-sensitive C-reactive protein, hepatic enzymes and HFE gene mutations of HH.

**Results:** sTfR correlated with BMI ( $r=0.289$ ;  $p=0.014$ ) and with WC ( $r=0.420$ ;  $p<0.001$ ). Thirty-two subjects were obese ( $\text{BMI} \geq 30 \text{ kg/m}^2$ ) and had a significantly higher sTfR (2.95 (2.22–3.28) vs 2.28 (1.88–2.91) mg/L;  $p=0.013$ ), hemoglobin ( $157 \pm 12$  vs  $152 \pm 11 \text{ gr/L}$ ;  $p=0.049$ ) and HOMA-IR (1.38 (1.04–2.69) vs 1.02 (0.60–1.55) mg/L;  $p=0.009$ ) than the non-obese. WC explained separately more variability of the sTfR than BMI ( $r^2=0.177$ ;  $p=0.002$  and  $r=0.077$ ;  $p=0.042$ , respectively), after adjusting for potential confounders.

**Conclusion:** An increase in serum concentrations of sTfR is associated with central obesity in men with hyperferritinemia.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Iron overload measured through an increase in concentrations of serum ferritin (SF) is a frequent finding among adults in developed countries, especially in men [1,2]. Several diseases, such as hereditary hemochromatosis (HH), viral hepatitis or alcoholism and rarer dis-

orders, share an increase in SF as a common phenotypic expression [3]. In addition, an increase in SF is found in several metabolic conditions. In men the prevalence of central obesity (waist circumference – WC > 1.02 m) increases from 24% to 38% when SF goes from the 1st quartile (<86 µgr/L) to the 4th quartile (>231 µgr/L) [4] and hyperferritinemia has also been associated with diabetes mellitus [4] [5], dyslipidemia [4], hypertension [6] and insulin resistance [7,8]. Even a syndrome called insulin-resistance hepatic iron overload (IR-HIO), was described in 1997 [9,10]. This syndrome affects middle-aged men, is not related to HH and is characterized by a mild to moderate increase in SF concentrations with a normal or slightly increased transferrin saturation index (TSI). In the IR-HIO syndrome subjects have an increased prevalence of overweight with elevated waist-to-hip ratio, hyperlipidemia and diabetes [11]. From a pathogenic point of view, iron overload could participate in the mechanisms involved in the pathogenesis of the several components of the metabolic syndrome or

**Abbreviations:** SF, serum ferritin; HH, hereditary hemochromatosis; WC, waist circumference; IR-HIO, insulin-resistance hepatic iron overload; TSI, transferrin saturation index; TfR, transferrin receptor; sTfR, soluble transferrin receptor; BMI, body mass index; hs-CRP, high-sensitivity C-reactive protein; ASAT, aspartate aminotransferase; ALAT, alanine aminotransferase; GGT, gamma glutamil transpeptidase; HOMA-IR, homeostatic metabolic assessment insulin resistance index.

\* Corresponding author. Department of Diabetes, Endocrinology and Nutrition, Hospital de Sabadell, Parc Tauli s/n, 08208 Sabadell, Spain. Tel.: +34 93 745 84 12; fax: +34 93 716 0646.

E-mail address: [jmgonzalez@tauli.cat](mailto:jmgonzalez@tauli.cat) (J.M. González-Clemente).

0009-8981/\$ – see front matter © 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.  
doi:10.1016/j.cca.2008.10.019

in the cardiovascular disease associated with it, because it catalyzes the formation of hydroxyl radicals [12] and activates the pro-inflammatory pathway of the NF-kappa B [13] and both pro-oxidant and pro-inflammatory mechanisms are involved in the pathogenesis of such conditions.

However, one important issue regarding the measurement of body iron stores is how to measure them. SF is a measure of the size of iron stores provided that the subject is healthy. However, in inflammatory disorders a cytokine-mediated pathway can activate the ferritin gene, causing hyperferritinemia, which is commonly seen in conditions such as obesity. This mechanism is iron independent [14]. Another important protein that participates in iron homeostasis, is the transferrin receptor (TfR). This is a transmembrane protein that practically all cells have on their surfaces, although most is on the erythroid cells. It is involved in the uptake of iron by the cells and its expression on the cell surface increases as iron cellular demands increase. This protein has a soluble form (sTfR) in serum, which is the truncated form of the cellular receptor [15]. Serum sTfR concentrations closely reflect the expression of TfR on the cell surface: they increase in the iron deficiency anemia [16] and decrease when iron overload exists [17,18]. In contrast to SF, this sTfR do not change when inflammatory conditions exist. Because obesity is a low-grade systemic inflammatory condition, the use of serum sTfR instead of SF could be a more accurate index for determining tissue iron availability. However, only two studies on serum sTfR concentrations in subjects with obesity have been performed up to now [19,20]. In these two studies, in which obesity was defined according to body mass index (BMI), sTfR has been found to be higher in the obese than in the non-obese, suggesting that in obesity a tissue iron deficit would eventually exist [19,20]. However, none of these studies have simultaneously taken into account three potential confounding factors: low-grade systemic inflammatory response, insulin resistance [21] and the H63D mutation of the HFE gene of the HH (such a mutation is quite prevalent in the Caucasian [22] and it is associated with a decrease in sTfR concentrations [23]). In addition, measures of central or abdominal obesity were provided in none of them, although the measures of central obesity show significant association with SF (independently of BMI) [24] and central obesity is a stronger predictor of obesity-related outcomes than BMI [25,26]. To get more insight into iron metabolism in obesity, we measured serum sTfR concentrations in a group of men (obese and non-obese) who supposedly had an iron overload because of the presence of hyperferritinemia. These men had been detected through a genetic screening programme for HH and in all of them the most common conditions associated with hyperferritinemia had been excluded (viral hepatitis, alcoholism, HH). Our results confirm an increase in the serum concentrations of sTfR in the men with hyperferritinemia who are also obese. In addition, we found that this increase is more associated with central obesity (WC) than with BMI.

## 2. Subjects and methods

### 2.1. Subjects

A one-year genetic screening programme for HH involving more than 4000 Caucasian subjects was carried out in a primary care center near Barcelona. This programme had three stages. In the first stage, a SF was determined in all subjects attending the center for routine blood analysis. In the second step, if the previous determination of SF was higher than 200 µg/L, a second one was carried out one month later. This limit of 200 µg/L was chosen because it had been previously used in studies evaluating the role of iron overload in cardiovascular disease [27,28] and vascular dysfunction in diabetes [29]. In the third stage, if the second SF determination was also higher than 200 µg/L the following were done:

- 1) Anamnesis and physical examination for assessing age, sex, alcohol intake, smoking, body weight and height for calculating BMI, WC, blood pressure, diabetes mellitus history and drug intake. Body weight was measured to the nearest 0.1 kg and height to the nearest 0.5 cm. BMI was calculated as weight (kg) divided by height squared (m<sup>2</sup>). WC was measured midway between the lowest rib and the iliac crest to the nearest 0.1 cm with a flexible tape. Obesity was defined according to the World Health Organization definition as a BMI of at least 30 kg/m<sup>2</sup> [30]. Blood pressure was

**Table 1**  
Univariate comparison between obese and non-obese men with hyperferritinemia

	Non-obese (BMI < 30 kg/m <sup>2</sup> ; n=43)	Obese (BMI ≥ 30 kg/m <sup>2</sup> ; n=32)	p
Age	55.2 ± 12.6	55.6 ± 12.2	0.896
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	26.2 ± 1.9	32.3 ± 2.2	<0.001
WC (m)	0.95 ± 0.62	1.06 ± 0.91	<0.001
Systolic blood pressure (mm Hg)	138 ± 15	144 ± 21	0.130
Diastolic blood pressure (mm Hg)	81 ± 10	83 ± 12	0.326
Hemoglobin (gr/L)	152 ± 11	157 ± 12	0.049
Reticulocyte count (/1000 red cells)	8.5 (3.8–41.1)	7.9 (3.1–49.3)	0.801
Mean corpuscular volume (fL)	92 (91–94)	92 (89–94)	0.503
SF (µg/L)	574 (508–669)	554 (421–798)	0.770
TSI (%)	34.0 (31.8–39.9)	34.9 (28.8–45.0)	0.204
sTfR (mg/L)	2.28 (1.88–2.91)	2.95 (2.22–3.28)	0.013
Fasting plasma glucose (mmol/L)	5.3 ± 0.6	5.3 ± 0.7	0.856
HDL-cholesterol (mmol/L)	1.11 ± 0.27	1.08 ± 0.28	0.592
Triglycerides (mmol/L)	1.45 (0.98–2.23)	1.98 (1.139–2.59)	0.614
HOMA-IR	1.02 (0.60–1.55)	1.38 (1.04–2.69)	0.009
hs-CRP (mg/L)	2.21 (1.09–4.11)	1.95 (1.00–5.51)	0.291
ASAT (U/L)	23.0 (21.5–26.8)	37.0 (22.3–46.8)	0.295
ALAT (U/L)	24.5 (19.8–34.0)	43.4 (22.8–59.5)	0.183
GGT (U/L)	28.0 (22.8–43.0)	34.1 (22.8–61.2)	0.254
HFE gene mutations (n (%))			
C282Y	2 (4.7)	4 (14.3)	0.392
H63D	19 (51.2)	19 (59.4)	0.494
S65C	3 (7.0)	2 (6.3)	1.000

Data are expressed as mean ± SD, median (interquartile range) or number (percentage). The obese had higher concentrations of hemoglobin and sTfR and were more insulin-resistant (higher HOMA-IR values) than the non-obese.

Abbreviations: ALAT, alanine aminotransferase; ASAT, aspartate aminotransferase; BMI, body mass index; GGT, gamma glutamil transpeptidase; hs-CRP, high-sensitivity C-reactive protein; HOMA-IR, Homeostasis Model Assessment-insulin resistance; SF, serum ferritin; sTfR, soluble transferrin receptor; TSI, transferrin saturation index; WC, waist circumference.

measured using a mercury sphygmomanometer (mean of three determinations in a sitting position after resting for at least 5 min). Alcohol intake was confirmed by at least one family member. Diabetes mellitus was defined according to the criteria from the American Association Diabetes [31].

- 2) Blood samples taken by venipuncture in the fasting state (10–12 h) to determine: red and white cell counts and indices (including reticulocyte counts), SF, TSI (calculated as serum iron × 70.9/transferrin), serum sTfR, plasma glucose, lipid profile (total cholesterol, triglycerides, HDL-cholesterol), insulinemia, high-sensitivity C-reactive protein – hs-CRP, hepatic enzymes (aspartate aminotransferase – ASAT, alanine aminotransferase – ALAT, gamma glutamil transpeptidase – GGT), hepatitis B and C serologies and mutations of the HFE gene of the HH (C282Y, H63D, S65C). To perform all these determinations, samples of plasma, serum and DNA were immediately separated after blood extractions and were frozen at –80 °C until performing determinations.

For the present study we excluded all the women and we included only those men who did not meet the following exclusion criteria: 1) anemia (hemoglobin < 130 gr/L), 2) expansion of the erythroid marrow (mean corpuscular volume > 98 fl and/or reticulocyte counts > 2.5% red cells); 3) inflammatory or infectious diseases during the previous three months; 4) neoplastic disease; 5) main known causes of iron overload: alcohol intake > 20 gr/day, HH (homozygosity for the C282Y HFE mutation), hemolytic anemias and chronic hepatopathy (cirrhosis, chronic hepatitis, and/or liver enzymes two or more times the upper normal limit – these upper normal limits were 45 U/L for ALAT and 40 U/L for ASAT and GGT); 6) serum creatinine concentrations > 115 µmol/L; 7) acute cardiovascular events in the previous three months; 8) iron, aspirin or glucocorticoid treatment during the previous year; 9) blood donation during the previous six months; 10) active smoking in the previous six months; 11) diabetes mellitus and 12) change of more than 3% of body weight in the preceding three months or use of drugs that affected body weight.

Informed written consent was obtained from all participants. The study was approved by the local ethic committee and was conducted according to the principles of the Declaration of Helsinki.

### 2.2. Laboratory analysis

Blood and white cell counts, whole blood hemoglobin, plasma glucose, cholesterol, triglycerides, HDL cholesterol, ASAT, ALAT and GGT were determined by the standard



techniques used in clinical chemistry laboratory. Anti-hepatitis B core antigen, hepatitis B surface-antigen and antihpatitis C virus were tested by a fully automated microparticle enzyme immunoassay (Abbot GmbH, Wiesbaden-Delkenheim, Germany). Serum insulin concentrations were determined by ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Insulin resistance was calculated by the homeostatic metabolic assessment insulin resistance index (HOMA-IR) as previously described [32]. Plasma high-sensitive CRP was determined by a highly sensitive immunonephelometry kit (Dade Behring, Marburg, Germany). Ferritin was measured by a turbidimetric fixed rate method Olympus System Reagent, Olympus Diagnostica GmbH, Wendenstrabe, Hamburg), transferrin by a turbidimetric end point method (Olympus System Reagent, Olympus Diagnostica GmbH) and serum iron by a photometric colour test for clinical chemistry analysers (Olympus System Reagent, Olympus Diagnostica GmbH). The determination of sTfR was done by a commercial immunoassay (QUANTIKINE™, transferrin receptor ELISA kit, R&D Systems, Minneapolis, USA), being the intra-assay coefficients of variation of 0.6% to 3%, and the inter-assay coefficients of 2% to 3% [14]. C282Y, H63D and S65C HFE mutations were searched after extracting genomic DNA from peripheral leukocytes as previously reported [22].

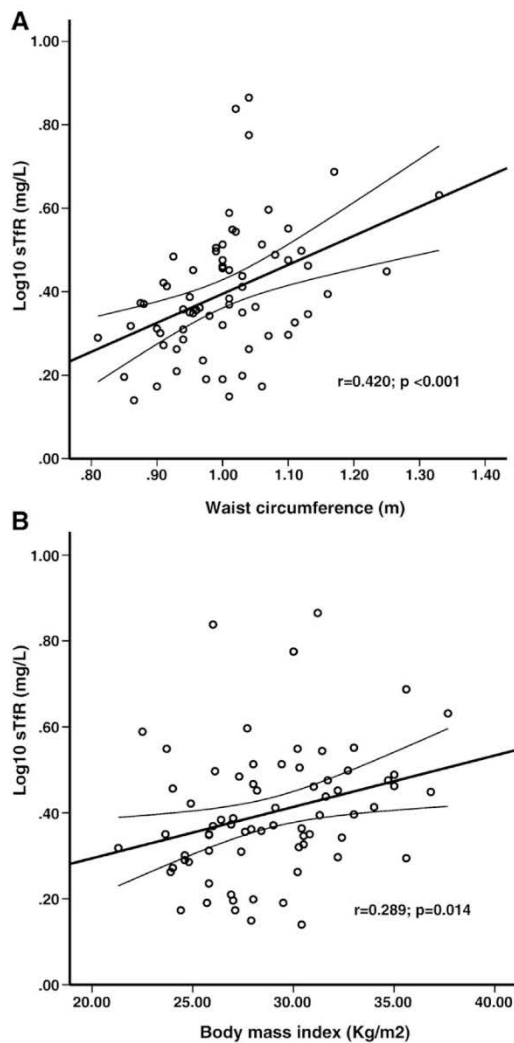


Fig. 1. A. Positive and significant crude correlation between  $\text{Log}_{10}$  sTfR and WC. B. Positive and significant crude correlation between  $\text{Log}_{10}$  sTfR and BMI.

**Table 2**  
Backward stepwise multiple regression models with the sTfR as the dependent variable in men with hyperferritinemia

Variables	Initial model (all variables)		Intermediate model 1		Intermediate model 2		Final model	
	$\beta$	p	$\beta$	p	$\beta$	p	$\beta$	p
Systolic blood pressure (mm Hg)	-0.002	0.986						
Hemoglobin (gr/L)	-0.003	0.983						
$\text{Log}_{10}$ ALAT (U/L)	-0.050	0.823						
$\text{Log}_{10}$ triglycerides (mmol/dL)	0.064	0.640						
$\text{Log}_{10}$ hs-CRP (mg/L)	0.079	0.564						
$\text{Log}_{10}$ TSI (%)	-0.146	0.315	-0.135	0.305				
$\text{Log}_{10}$ HOMA-IR $\times 10$	-0.192	0.236	-0.188	0.160				
H63D mutation (yes/no)	-0.133	0.346	-0.135	0.293				
Age (years)	-0.223	0.242	-0.200	0.105	-0.192	0.120		
Ferritin ( $\mu\text{g/L}$ )	0.289	0.054	0.298	0.023	0.252	0.043		
Waist circumference (m)	0.435	0.007	0.449	0.001	0.415	0.001	0.421	0.002

sTfR and WC are independently and positively associated after adjusting for potential confounders and WC explains the 18% variability of sTfR.

Dependent variable:  $\text{Log}_{10}$  sTfR. Triglycerides were included in the model in mmol/dL to allow appropriate log transformations for calculations. In the backward stepwise procedure, the variables were sequentially removed as follows: systolic blood pressure, hemoglobin,  $\text{Log}_{10}$  ALAT,  $\text{Log}_{10}$  triglycerides,  $\text{Log}_{10}$  hs-CRP,  $\text{Log}_{10}$  TSI,  $\text{Log}_{10}$  HOMA-IR  $\times 10$ , H63D mutation, age and ferritin. Only two intermediate models (model 1: six variables; model 2: three variables) obtained through this procedure, were reported. Abbreviations: ALAT, alanine aminotransferase; BMI, body mass index; hs-CRP, high-sensitivity C-reactive protein; HOMA-IR, Homeostasis Model Assessment-insulin resistance; TSI, transferrin saturation index.

### 2.3. Statistical analysis

Data are presented as percentages, means  $\pm$  SD for variables normally distributed or medians (interquartile range) for variables not normally distributed (Kolmogorov-Smirnov test). To improve skewness and kurtosis variables not normally distributed were log transformed. These variables were tested for significance on this log scale and then back-transformed to their natural units for illustration in the tables. Subjects were classified into obese and non-obese and comparisons between these two groups were done using Student *t* tests for continuous variables and the  $\chi^2$  test for categorical variables. The potential relationships between serum sTfR and the rest of the variables were also explored using correlation tests (Pearson or Spearman's tests, where appropriate). When a significant crude correlation was found, multiple linear regression models with a subsequent backward stepwise procedure were used to adjust for potential confounders. Variables to be included in these models were based on the previous univariate analyses or had previously been shown to be associated with sTfR. All stepwise selection models used a  $p < 0.05$  level for entry and a  $p < 0.10$  for removal. The SPSS statistical program (v.16.0 for Mac; Chicago, IL, USA) was used for all these calculations. All *p* values were 2-sided and a *p* value  $< 0.05$  was considered statistically significant.

### 3. Results

A total of 75 consecutive men with SF  $> 200 \mu\text{gr/L}$  were recruited for this study according to the previously described protocol. Of these subjects, 32 were classified as obese and the rest as non-obese. Their clinical characteristics are shown in Table 1. There were 26 (34.7%) subjects on antihypertensive drugs and 14 (18.7%) on cholesterol lowering drugs. Only 11 (14.7%) subjects had a TSI higher than 45% and none of the subjects evaluated had hs-CRP serum concentrations higher than 10 mg/L. The obese subjects had higher serum concentrations of sTfR than the non-obese (Table 1). In addition, they also had higher concentrations of hemoglobin and were more insulin resistant (higher HOMA-IR values) than the non-obese (Table 1). No differences were found between the obese and the non-obese regarding the other indices of iron status, hepatic enzymes, hs-CRP and HFE gene mutations.

Fig. 1 shows the positive significant crude correlations between sTfR and BMI and sTfR and WC. No other significant correlations were found between sTfR and the rest of the variables evaluated (age:  $r = -0.183$ ,  $p = 0.124$ ; systolic blood pressure:  $r = -0.076$ ,  $p = 0.534$ ; diastolic blood pressure:  $r = 0.135$ ,  $p = 0.268$ ; hemoglobin:  $r = 0.190$ ,

**Table 3**  
Backward stepwise multiple regression models with the sTfR as the dependent variable in men with hyperferritinemia

Variables	Initial model (all variables)		Intermediate model 1		Intermediate model 2		Final model	
	$\beta$	<i>p</i>	$\beta$	<i>p</i>	$\beta$	<i>p</i>	$\beta$	<i>p</i>
Systolic blood pressure (mm Hg)	-0.004	0.981						
Hemoglobin (gr/L)	0.071	0.648						
Log <sub>10</sub> ALAT (U/L)	-0.112	0.628						
Log <sub>10</sub> triglycerides (mmol/dL)	0.078	0.583						
Log <sub>10</sub> hs-CRP (mg/L)	0.109	0.435						
Log <sub>10</sub> TSI (%)	-0.186	0.224	-0.163	0.241				
Log <sub>10</sub> HOMA-IR × 10	-0.119	0.467	-0.131	0.346				
H63D mutation (yes/no)	-0.181	0.214	-0.183	0.172	-0.239	0.066		
Age (years)	-0.248	0.211	-0.210	0.104				
Ferritin (μg/L)	0.296	0.054	0.293	0.032	0.218	0.090		
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	0.286	0.077	0.309	0.027	0.258	0.048	0.277	0.041

sTfR and BMI are independently and positively associated after adjusting for potential confounders and BMI explains the 8% variability of sTfR.

Dependent variable: Log<sub>10</sub> sTfR. Triglycerides were included in the model in mmol/dL to allow appropriate log transformations for calculations. In the backward stepwise procedure, the variables were sequentially removed as follows: systolic blood pressure, hemoglobin, Log<sub>10</sub> ALAT, Log<sub>10</sub> triglycerides, Log<sub>10</sub> hs-CRP, Log<sub>10</sub> HOMA-IR × 10, Log<sub>10</sub> TSI, age, ferritin and H63D mutation. Only two intermediate models (model 1: six variables; model 2: three variables) obtained through this procedure, were reported. Abbreviations: ALAT, alanine aminotransferase; BMI, body mass index; hs-CRP, high-sensitivity C-reactive protein; HOMA-IR, Homeostasis Model Assessment-insulin resistance; TSI, transferrin saturation index.

$p=0.112$ ; TSI:  $r=-0.046$ ,  $p=0.701$ ; fasting plasma glucose:  $r=0.074$ ,  $p=0.537$ ; HDL-cholesterol:  $r=-0.183$ ,  $p=0.125$ ; triglycerides:  $r=0.116$ ,  $p=0.339$ ; HOMA-IR:  $r=0.043$ ,  $p=0.740$ ; hs-CRP:  $r=0.036$ ,  $p=0.766$ ; AST:  $r=0.176$ ,  $p=0.216$ ; ALT:  $r=0.141$ ,  $p=0.254$ ; GGT:  $r=0.117$ ,  $p=0.336$ ).

Tables 2 and 3 show the multiple linear regression models regarding the relationship between obesity indices (either WC – Table 2 or BMI – Table 3) and sTfR, after adjusting for potential confounders. Table 2 shows the initial model, two intermediate models and the final model regarding the relationship between WC and sTfR. This relationship was positive and persisted after adjusting for potential confounding factors. In the final model (Table 2) WC explains the 18% variance in sTfR. Likewise, Table 3 shows the initial model, two intermediate models and the final model about the relationship between BMI and sTfR. This relationship was positive. In this case, in the final model, BMI explains the 8% variance in sTfR, after adjusting for the same potential confounding factors as in Table 2.

#### 4. Discussion

The present study shows an increase in the serum concentration of the sTfR in the obese men with hyperferritinemia and without HH or other common causes of iron overload as compared to the hyperferritinemic non-obese. This increase correlates positively with central obesity and persists after adjusting for confounding factors such as insulin resistance or the mutation H63D of the HFE gene of HH. In theory, this finding would indicate a tissue deficiency of iron and it is of special interest because it has been found in subjects with hyperferritinemia, who otherwise would have been classified as having an iron overload.

First of all, there are at least two possible factors to explain an increase in serum sTfR concentrations: an expansion of the erythroid marrow, a tissue deficiency of iron or a combination of these two factors [33]. Conditions associated with an expansion of the erythroid marrow can be reasonably ruled out by performing a reticulocyte count to exclude hemolytic anemia and by determining the mean corpuscular volume to exclude patients with macrocytosis caused by

an underlying ineffective erythropoiesis [34]. All our patients have normal reticulocyte counts and none of them have macrocytosis. Consequently, it can be assumed that the increase in serum sTfR observed in our hyperferritinemic obese subjects would be due to a functional iron deficiency, a situation defined by tissue iron deficiency despite adequate iron stores [35]. Our findings agree with results of studies assessing the iron status through the measurements of serum iron concentrations – ferremia [36–39]. This parameter has been found lower in the obese than in the non obese, but in contrast to sTfR, it shows larger day-to-day variations [40,41] and is affected by inflammation. In addition, our data cannot be considered as a surprise, because they agree with the results from two recent studies, in which sTfR was measured to assess the iron status in postmenopausal women [20] and in a group of adult subjects recruited from an outpatient clinic [19], respectively. In none of these two studies, specific information about the relationships between central obesity and serum sTfR concentrations were provided and several mechanisms have been proposed to explain the presence of functional iron deficiency in the obese. These mechanisms have included a deficient iron intake or intestinal absorption, greater iron requirements in the obese due to their larger blood volume, or a functional iron deficiency due to inflammatory mechanisms [19].

Nevertheless, although the increase in serum sTfR concentrations in the obese could really reflect a functional iron deficiency, our finding that sTfR are more strongly associated to central obesity than to BMI in hyperferritinemic men, allow us to speculate on another potential mechanism to explain the increase in serum sTfR concentrations. The main source of SF is the ferritin placed in hepatocytes and macrophages and it would reflect the iron storage compartment [41]. All the subjects in the current study were hyperferritinemic and most of them had a normal TSI. This biochemical pattern is consistent with an accumulation of iron in the macrophages instead of the tissues [42] and it is similar to the one described in the IR-HIO syndrome [43]. Obesity is associated with an increased macrophage infiltration of the adipose tissue, which may be an important component of the chronic inflammation associated to obesity [44]. This infiltration is higher in the visceral than in the subcutaneous adipose tissue [45] and, consequently, it would be more important when the accumulation of adipose tissue occurs mainly in the abdominal compartment. In contrast to the rest of cellular types, the expression of TfR on the surface of macrophages increases as their cellular iron stores in ferritin increase [46]. Therefore, it may be speculated that the increase in macrophages in the abdominal adipose tissue of our obese subjects, would account for a significant increase in their serum sTfR concentrations. The accumulation of iron in macrophages in a context of relative functional iron deficiency would be mediated by hepcidin. This hormone is produced mainly in the hepatocytes, but it is also produced in the adipose tissue [47,48]. Its action is to block the release of iron from the macrophages, apart from regulating iron intestinal absorption. An increase in hepcidin to explain the changes in iron metabolism is an attractive explanation for our findings, but this hypothesis awaits further exploration.

Finally, another potential mechanism could be put forward to explain the increase in serum sTfR observed in relation to obesity. Obesity may be associated with intermittent hypoxia in the form of obstructive sleep apnea and chronic hypoxia in the form of the Pickwickian syndrome. The TfR gene has a recognition element for the master regulator of the hypoxic response [49], the hypoxia inducible factor, and the TfR gene is upregulated by hypoxia [50]. Unfortunately we do not have any data regarding hypoxia in our subjects. Nevertheless, subjects with obesity had higher hemoglobin concentrations, which is consistent with the possibility that an upregulated hypoxic response could occur. This hypothesis will require further analyses in the future.

The current study has the strength to describe that the obese men with hyperferritinemia have a functional iron deficiency when serum sTfR concentrations are taken into account. This deficiency is mainly



associated with abdominal obesity and even exists after adjusting for potential confounders, such as the quite common H63D mutation of the HFE gene of HH or the components of the metabolic syndrome and insulin resistance. In particular, it should be kept in mind that insulin is known to cause a marked stimulation of iron uptake by fat cells in *in vitro* studies, redistributing TFRs from an intracellular membrane compartment to the cell surface [51]. In addition, it has been recently reported that insulin resistance is associated independently with an increase in the serum STR concentrations but only in those subjects with a normal glucose tolerance test (not in subjects with diabetes or impaired glucose tolerance) [21]. To take into account this factor, we excluded subjects with diabetes and we adjusted for insulin resistance in the multiple regression models. However, some limitations have to be acknowledged too. Firstly, the present study includes possible bias arising from the non-agreement of the subjects who met the criteria to participate in the screening programme. Nevertheless, this bias was very limited, because less than 1% of the potential candidates refused to take part in the study. Secondly, there is a lack of standardization of serum TFR assays [33,52], which would invalidate the comparisons between results obtained through different methods. Thirdly, the study was limited to Caucasian men with hyperferritinemia. Consequently, the results may not be directly applicable to women, subjects without hyperferritinemia or subjects from other ethnic groups. Finally, the study was cross-sectional in its design and therefore, no conclusions regarding cause and effect relationships can be drawn. However, a recent study in rat suggests that perinatally iron deficiency could take part in the pathogenesis of central obesity [53].

In conclusion, an increase in serum STR concentrations is associated with central obesity in Caucasian men with hyperferritinemia. This finding could reflect a lower tissue iron bioavailability in the central obese than in the non-central obese. Our findings stress the need to carry out further studies to assess iron metabolism in obesity and its likely role in the obesity complications.

#### Acknowledgements

Financial support: Ministerio de Sanidad y Consumo, Instituto de Salud Carlos III (FIS PI050631, PI030459; 2008 Intensification Grant to José Miguel González Clemente), Spain; Associació Catalana de Diabetis (Research Grant), Spain. We are indebted to Neil Hossack, Dídac Mauricio, Gabriel Giménez-Pérez, Cristina Cabistañ, Jordi Tarrés and Albert Altés for their help in the development of this study.

#### References

- [1] Beard J. Iron status of free-living elderly individuals. *Am J Clin Nutr* 2001;73:503–4.
- [2] Fleming DJ, Jacques PF, Tucker KL, et al. Iron status of the free-living, elderly Framingham Heart Study cohort: an iron-replete population with a high prevalence of elevated iron stores. *Am J Clin Nutr* 2001;73:638–46.
- [3] Altes A, Remacha AF, Sureda A, et al. Patients with biochemical iron overload: causes and characteristics of a cohort of 150 cases. *Ann Hematol* 2003;82:127–30.
- [4] Jehn M, Clark JM, Guallar E. Serum ferritin and risk of the metabolic syndrome in U.S. adults. *Diabetes Care* 2004;27:2422–8.
- [5] Ford ES, Cogswell ME. Diabetes and serum ferritin concentration among U.S. adults. *Diabetes Care* 1999;22:1978–83.
- [6] Piperno A, Trombini P, Gelosa M, et al. Increased serum ferritin is common in men with essential hypertension. *J Hypertens* 2002;20:1513–8.
- [7] Tuomainen TP, Nyyssönen K, Salonen R, et al. Body iron stores are associated with serum insulin and blood glucose concentrations. Population study in 1,013 eastern Finnish men. *Diabetes Care* 1997;20:426–8.
- [8] Fernández-Real JM, Ricart-Engel W, Arroyo E, et al. Serum ferritin as a component of the insulin resistance syndrome. *Diabetes Care* 1998;21:62–8.
- [9] Moirand R, Mortaji AM, Loréal O, Paillard F, Brissot P, Deugnier Y. A new syndrome of liver iron overload with normal transferrin saturation. *Lancet* 1997;349:95–7.
- [10] Mendler MH, Turlin B, Moirand R, et al. Insulin resistance-associated hepatic iron overload. *Gastroenterology* 1999;117:1155–63.
- [11] Bozzini C, Girelli D, Olivieri O, et al. Prevalence of body iron excess in the metabolic syndrome. *Diabetes Care* 2005;28:2061–3.
- [12] McCord JM. Effects of positive iron status at a cellular level. *Nutr Rev* 1996;54:85–8.
- [13] Xiong S, She H, Tsukamoto H. Signaling role of iron in NF-kappa B activation in hepatic macrophages. *Comp Hepatol* 2004;3(suppl1):S36.
- [14] Remacha AF, Sarda MP, Parellada M, Ubeda J, Manteiga R. The role of serum transferrin receptor in the diagnosis of iron deficiency. *Haematologica* 1998;83:963–6.
- [15] Ponka P, Lok CN. The transferrin receptor: role in health and disease. *Int J Biochem Cell Biol* 1999;31:1111–37.
- [16] Suominen P, Punnonen K, Rajamäki A, Irjala K. Serum transferrin receptor and transferrin receptor-ferritin index identify healthy subjects with subclinical iron deficits. *Blood* 1998;92:2934–9.
- [17] Khumalo H, Gomo ZA, Moyo VM, et al. Serum transferrin receptors are decreased in the presence of iron overload. *Clin Chem* 1998;44:40–4.
- [18] Looker AC, Loyevsky M, Gordeuk VR. Increased serum transferrin saturation is associated with lower serum transferrin receptor concentration. *Clin Chem* 1999;45:2191–9.
- [19] Yanoff LB, Menzie CM, Denkiner B, et al. Inflammation and iron deficiency in the hypoferrinemia of obesity. *Int J Obes (London)* 2007;31:1412–9.
- [20] Lecube A, Carrera A, Losada E, Hernández C, Simó R, Mesa J. Iron deficiency in obese postmenopausal women. *Obesity (Silver Spring, Md)* 2006;14:1724–30.
- [21] Fernández-Real JM, Moreno JM, López-Bermejo A, Chico B, Vendrell J, Ricart W. Circulating soluble transferrin receptor according to glucose tolerance status and insulin sensitivity. *Diabetes Care* 2007;30:604–8.
- [22] Altes A, Ruiz A, Barceló MJ, et al. Prevalence of the C282Y, H63D, and S65C mutations of the HFE gene in 1,146 newborns from a region of Northern Spain. *Genet Test* 2004;8:407–10.
- [23] Bárez V, Camps J, Arja V, et al. Soluble transferrin receptor and mutations in hemochromatosis and transferrin genes in a general Catalan population. *Clin Chim Acta* 2005;353:205–8.
- [24] Gillum RF. Association of serum ferritin and indices of body fat distribution and obesity in Mexican American men—the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Int J Obes (London)* 2001;25:639–45.
- [25] Cameron AJ, Zimmet PZ. Expanding evidence for the multiple dangers of epidemic abdominal obesity. *Circulation* 2008;117:1624–6.
- [26] Wang J. Waist circumference: a simple, inexpensive, and reliable tool that should be included as part of physical examinations in the doctor's office. *Am J Clin Nutr* 2003;78:902–3.
- [27] Salonen JT, Nyyssönen K, Korpela H, Tuomilehto J, Seppänen R, Salonen R. High stored iron levels are associated with excess risk of myocardial infarction in eastern Finnish men. *Circulation* 1992;86:803–11.
- [28] Klipstein-Grobusch K, Koster JF, Grobbee DE, et al. Serum ferritin and risk of myocardial infarction in the elderly: the Rotterdam Study. *Am J Clin Nutr* 1999;69:1231–6.
- [29] Fernández-Real JM, Peñarroja G, Castro A, García-Bragado F, López-Bermejo A, Ricart W. Blood letting in high-ferritin type 2 diabetes: effects on vascular reactivity. *Diabetes Care* 2002;25:2249–55.
- [30] Consultation on Obesity 1 Geneva WHO. Obesity: Preventing and Managing the Global Epidemic: Report of a WHO Consultation on Obesity, Geneva, 3–5 June 1997. Geneva: World Health Organization; 1998.
- [31] American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2008;31(Suppl 1):S55–60.
- [32] Wallace TM, Levy JC, Matthews DR. Use and abuse of HOMA modeling. *Diabetes Care* 2004;27:1487–95.
- [33] Cook JD. Defining optimal body iron. *Proc Nutr Soc* 1999;58:489–95.
- [34] Cook JD. The measurement of serum transferrin receptor. *Am J Med Sci* 1999;318:269–76.
- [35] Beguin Y. Soluble transferrin receptor for the evaluation of erythropoiesis and iron status. *Clin Chim Acta* 2003;329:9–22.
- [36] Chambers EC, Heshka S, Gallagher D, Wang J, Pi-Sunyer FX, Pierson RN. Serum iron and body fat distribution in a multiethnic cohort of adults living in New York City. *J Am Diet Assoc* 2006;106:680–4.
- [37] Nead KG, Halterman JS, Kaczorowski JM, Auinger P, Weitzman M. Overweight children and adolescents: a risk group for iron deficiency. *Pediatrics* 2004;114:104–8.
- [38] Pinhas-Hamiel O, Newfield RS, Koren I, Agmon A, Lilos P, Phillip M. Greater prevalence of iron deficiency in overweight and obese children and adolescents. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2003;27:416–8.
- [39] Menzie CM, Yanoff LB, Denkiner BI, McHugh T, Sebring NG, Calis KA, et al. Obesity-related hypoferrinemia is not explained by differences in reported intake of heme and nonheme iron or intake of dietary factors that can affect iron absorption. *J Am Diet Assoc* 2008;108:145–8.
- [40] Borel MJ, Smith SM, Derr J, Beard JL. Day-to-day variation in iron-status indices in healthy men and women. *Am J Clin Nutr* 1991;54:729–35.
- [41] Baynes RD. Assessment of iron status. *Clin Biochem* 1996;29:209–15.
- [42] Camaschella C. Understanding iron homeostasis through genetic analysis of hemochromatosis and related disorders. *Blood* 2005;106:3710–7.
- [43] Turlin B, Mendler MH, Moirand R, Guyader D, Guillygomarc'h A, Deugnier Y. Histologic features of the liver in insulin resistance-associated iron overload. A study of 139 patients. *Am J Clin Pathol* 2001;116:263–70.
- [44] Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 2003;112:1796–808.
- [45] Ferrante AW. Obesity-induced inflammation: a metabolic dialogue in the language of inflammation. *J Intern Med* 2007;262:408–14.
- [46] Testa U, Petrini M, Quaranta MT, et al. Iron up-modulates the expression of transferrin receptors during monocyte-macrophage maturation. *J Biol Chem* 1989;264:13181–7.
- [47] Ganz T. Hcpidin in iron metabolism. *Curr Opin Hematol* 2004;11:251–4.
- [48] Bekri S, Gual P, Anty R, et al. Increased adipose tissue expression of hepcidin in severe obesity is independent from diabetes and NASH. *Gastroenterology* 2006;131:788–96.

## 9. Resultats

116

N. Freixenet et al. / *Clinica Chimica Acta* 400 (2009) 111–116

- [49] Lok CN, Ponka P. Identification of a hypoxia response element in the transferrin receptor gene. *J Biol Chem* 1999;274:24147–52.
- [50] Tacchini L, Bianchi L, Bernelli-Zazzera A, Cairo G. Transferrin receptor induction by hypoxia. HIF-1-mediated transcriptional activation and cell-specific post-transcriptional regulation. *J Biol Chem* 1999;274:24142–6.
- [51] Davis RJ, Corvera S, Czech MP. Insulin stimulates cellular iron uptake and causes the redistribution of intracellular transferrin receptors to the plasma membrane. *J Biol Chem* 1986;261:8708–11.
- [52] Feelders RA, Kuiper-Kramer EP, van Eijk HG. Structure, function and clinical significance of transferrin receptors. *Clin Chem Lab Med* 1999;37:1–10.
- [53] Komolova M, Bourque SL, Nakatsu K, Adams MA. Sedentariness and increased visceral adiposity in adult perinatally iron-deficient rats. *Int J Obes (London)* 2008;32:1441–4.





Contents lists available at ScienceDirect

Clinica Chimica Acta

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/clinchim](http://www.elsevier.com/locate/clinchim)

## Corrigendum

Corrigendum to “Serum soluble transferrin receptor concentrations are increased in central obesity. Results from a screening programme for hereditary hemochromatosis in men with hyperferritinemia” [*Clin Chim Acta* 400 (2009) 111–116]



Núria Freixenet<sup>a</sup>, Àngel Remacha<sup>b</sup>, Eugenio Berlanga<sup>c</sup>, Assumpta Caixàs<sup>a</sup>, Olga Giménez-Palop<sup>a</sup>, Francisco Blanco-Vaca<sup>d</sup>, Vanessa Bach<sup>e</sup>, Montserrat Baiget<sup>e</sup>, Yolanda Sánchez<sup>f</sup>, Jordi Félez<sup>f</sup>, José Miguel González-Clemente<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Diabetes, Endocrinology and Nutrition, Hospital de Sabadell, Sabadell, Barcelona, Spain

<sup>b</sup> Hematology Department, Hospital de Sant Pau, Barcelona, Spain

<sup>c</sup> Biochemistry Department, UDIAT, Sabadell, Barcelona, Spain

<sup>d</sup> Biochemistry Department and Research Institute, Hospital de Sant Pau, Barcelona, Spain

<sup>e</sup> Department of Genetics and Research Institute, Hospital de Sant Pau, Barcelona, Spain

<sup>f</sup> CAP Canaletes, Institut Català de la Salut, Cerdanyola del Vallès, Spain

This study was carried out within the framework of a Doctorate in Medicine from the Universitat Autònoma de Barcelona. Hospital de Sabadell/UDIAT belongs to Corporació Sanitària Parc Taulí, Sabadell, Barcelona, Spain and is affiliated to the Universitat Autònoma de Barcelona.

Hospital de Sant Pau, Barcelona, Spain is affiliated to the Universitat Autònoma de Barcelona.

The authors would like to apologise for any inconvenience caused.

DOI of original article: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2008.10.019>.

E-mail address: [jmgonzalez@tauli.cat](mailto:jmgonzalez@tauli.cat) (J.M. González-Clemente).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2014.06.008>

0009-8981/© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.



## **10. DISCUSSIÓ**

---



## 10. DISCUSSIÓ

Aquesta tesi doctoral es va plantejar aprofundir en l'estudi de la sobrecàrrega bioquímica de ferro des de la consulta d'atenció primària. En primer lloc, la tesi estudia els estats de sobrecàrrega bioquímica de ferro des de la consulta d'atenció primària en la nostra àrea mediterrània i la seva relació amb l'HH (estudi 1). Posteriorment, esten l'anàlisi a la seva relació amb patologies amb més alta prevalença en atenció primària com l'obesitat dins el context de la síndrome metabòlica (estudi 2).

### 10.1. ESTUDI 1

Atès que l'HH és una de les malalties hereditàries més freqüents en la raça caucàsica i tenint present que s'ha descrit una prevalença diferent entre les mutacions del gen *HFE* al nord d'Europa i al sud d'Europa (Itàlia o Espanya) (170,196,197), vam voler conèixer la situació dels trastorns del ferro en la nostra àrea en relació a aquestes patologies.

#### 10.1.1. La prevalença de la sobrecàrrega bioquímica de ferro

La **prevalença de sobrecàrrega bioquímica de ferro** a la nostra mostra va ser de 126/2.739, un **4,6 %**. D'aquests subjectes 22 (17,5 %) eren dones i 104 (82,5 %) eren homes, amb una mitjana d'edat entre les dones amb sobrecàrrega bioquímica de ferro de  $65 \pm 11$  significativament més alta ( $p > 0,01$ ) que entre els homes amb sobrecàrrega bioquímica de ferro amb una mitjana d'edat de  $57 \pm 11$ . Aquestes mitjanes d'edat també van ser significativament més altes que la dels individus inicialment reclutats en l'estudi ( $p > 0,01$ ).

El 2002 la Direcció General de Salut Pública de la Generalitat de Catalunya va realitzar un Examen de Salut a Catalunya amb el propòsit d'avaluar els objectius del Pla de Salut de Catalunya (371). En una submostra de 1.296 individus de la població adulta de Catalunya escollits a l'atzar, representatius de la població,

convocats en un centre de salut proper al seu domicili, es va observar una prevalença global de la sobrecàrrega bioquímica de ferro determinada per valors de ferritina superiors a 300  $\mu\text{g/l}$  en el cas dels homes i de 200  $\mu\text{g/l}$  en les dones, d'un 9,3 %. Per sexes, el 14,7 % dels homes i el 3,8 % de les dones. Per edats, l'11,7 % dels homes joves i fins el 20,4 % dels homes majors de 50 anys, presentaven una sobrecàrrega bioquímica de ferro. Entre les dones, l'1,2 % de les dones joves i fins el 9,4 % de les dones majors de 50 anys presentaven una sobrecàrrega bioquímica de ferro (372).

Altres estudis en països occidentals, observaven prevalences diferents. En un estudi d'avaluació de l'estat fèrric d'una població de 1.016 ancians d'entre 67 i 96 anys que pertanyien al *Framingham Heart Study*, un 13 % van presentar sobrecàrrega fèrrica definida amb criteris idèntics als comentats en l'estudi previ (en els homes ferritina en sèrum major a 300  $\mu\text{g/L}$  i en les dones ferritina en sèrum major a 200  $\mu\text{g/L}$ ) (373). Així mateix, en un estudi realitzat en la població danesa en el període entre 1984 i 1994 es va observar un increment de la prevalença de la sobrecàrrega bioquímica de ferro de l'11,3 al 18,9 % en els homes. Per altra banda, en un altre estudi en el mateix període realitzat en la població danesa i en el que s'agafaven punts de tall de la ferritina diferents als dels anteriors estudis comentats (ferritina en sèrum major a 300  $\mu\text{g/L}$  en dones), es va observar un increment de la prevalença de sobrecàrrega bioquímica de ferro del 2,4 al 5,5 % en les dones postmenopàusiques (374,375). En la mateixa línia, l'estudi HEIRS (*Hemochromatosis and Iron Overload Screening*) que tenia per objectiu determinar la prevalença de l'HH en una extensa població nord-americana sana (101.168 individus en total), va trobar entre els 98.529 individus en els que es va valorar la ferritina, que el 5,9 % dels blancs i el 19 % dels asiàtics presentaven valors de ferritina elevats (determinant la sobrecàrrega bioquímica de ferro en els homes amb ferritina en sèrum major a 300  $\mu\text{g/L}$  i en les dones amb ferritina en sèrum major a 200  $\mu\text{g/L}$ ) (185).

Així doncs, entre els estudis que avaluen la sobrecàrrega bioquímica de ferro en la població caucàsica dels dos sexes trobem diferències importants pel que fa a la seva prevalença, essent d'un 18,9 % (374), d'un 13 % (373), d'un 9,3 % (372), d'un 5,9 % (185), i finalment, d'un 4,6 % en el nostre estudi.

Per explicar aquestes discrepàncies cal tenir en compte que els criteris utilitzats com a indicadors de sobrecàrrega bioquímica de ferro per reclutar els individus en aquests estudis no són els mateixos que els utilitzats en el nostre estudi en el qual es van tenir en compte dos paràmetres: la ferritina i l'IST. De la mateixa manera, la població sobre la qual es va realitzar els anteriors estudis és diferent a la del nostre treball. En el nostre estudi es van reclutar individus que venien a una visita rutinària a la consulta del CAP a diferència dels altres estudis de la nostra zona en els que els subjectes eren o bé escollits a l'atzar o bé havien estat prèviament identificats a través de la donació de sang. Per altra banda, cal també tenir en compte que alguns d'aquests estudis estan realitzats en la població caucàsica del nord en la qual la prevalença de la mutació homozigota C282Y del gen *HFE*, amb la corresponent predisposició a la sobrecàrrega bioquímica de ferro, pot ser major que en les poblacions caucàsiques del sud, tal com valorem més endavant (170,184,188,193).

La **definició de sobrecàrrega bioquímica de ferro** no va ser la mateixa en els dos estudis que conformen aquesta tesi. A l'estudi 1 els punts de tall van ser de ferritina en sèrum  $> 300$  ng/mL indistintament en dones i en homes i/o d'IST  $> 50$  %, en base als articles de què es disposava en aquell moment referents al valor indicatiu de sobrecàrrega bioquímica de ferro (196,197,230). A l'estudi 2 van ser de ferritina en sèrum  $> 200$  ng/mL i/o IST  $> 50$  %, seguint les referències del moment sobre el paper de la sobrecàrrega bioquímica de ferro en les patologies cardiovasculars (182,368,369) i en la disfunció vascular (268).

Al llarg dels anys els estudis han utilitzat diversos punts de tall per l'IST per identificar els individus elegibles per fer una prova addicional per detectar mutacions del gen *HFE* de l'HH. Actualment s'ha establert un punt de tall d'IST  $\geq 45$  % perquè s'ha demostrat que aquest nivell té una alta sensibilitat per la detecció d'homozigots C282Y, malgrat que té una menor especificitat i un menor valor predictiu positiu en comparació amb valors de tall més alts. Amb el punt de tall d'IST  $\geq 45$  % també s'identifiquen persones amb sobrecàrrega de ferro menor com els heterozigots compostos C282Y/altra mutació (195,376).

La ferritina en sèrum té menys variabilitat biològica que l'IST, però té l'inconvenient que la seva elevació provocada, per exemple, per la inflamació, sovint és un fals positiu de sobrecàrrega bioquímica de ferro. En aquest sentit, la ferritina pot estar elevada en absència d'un increment en el magatzem de ferro en pacients amb malaltia necroinflamatòria hepàtica (malaltia alcohòlica hepàtica, hepatitis crònica B i C, malaltia no alcohòlica hepàtica), en neoplàsies (càncer de mama, de pulmó, de fetge, neuroblastoma en nens, i neoplàsies hematològiques, sent molt menys freqüent la relació amb altres tumors digestius i ginecològics), en pacients amb altres condicions de malaltia crònica inflamatòria no hepàtica, en la síndrome metabòlica i en l'alcoholisme crònic (237).

La sobrecàrrega bioquímica de ferro, doncs, no és la principal causa d'elevació del nivell de ferritina. Tanmateix, en absència d'altres processos inflamatoris, diversos estudis en famílies amb HH han demostrat que la concentració de la ferritina en sèrum proporciona una correlació valuosa amb el grau de reserva de ferro del cos. En un estudi d'individus < 35 anys d'edat, la ferritina sèrica en l'interval normal en combinació amb un IST < 45 % va tenir un valor predictiu negatiu del 97 % per excloure la sobrecàrrega (377). En un gran estudi de correlació fenotípica i genotípica dels marcadors en una població d'atenció primària a Califòrnia, una ferritina sèrica > 250 mg/l en homes i > 200 mg/l en dones va permetre detectar 77 % i 56 % respectivament, d'homozigots C282Y (191). En l'estudi HEIRS ja comentat, que va comptar en total amb 101.168 participants d'Amèrica del Nord, els nivells de ferritina utilitzats van ser més elevats (ferritina > 300 mg/l en els homes i > 200 mg/l en dones) i van permetre detectar el 57 % de les dones i el 88 % dels homes homozigots C282Y (184). També sabem que hi ha malalties no relacionades amb la sobrecàrrega bioquímica de ferro que, en absència d'IST elevat, poden provocar un augment inespecífic en la ferritina sèrica. Per altra banda, la sobrecàrrega fèrrica pot estar present en un pacient amb ferritina elevada i IST normal, especialment la sobrecàrrega de ferro no relacionada amb l'HFE o en una heterozigosi composta C282Y/H63D (378). A més, els nivells de ferritina en sèrum tenen un valor addicional com a predictors de fibrosi avançada en l'HH confirmada, alhora que diversos estudis han demostrat que el nivell de ferritina < 1000 µg/L és un indicador precís de l'absència de cirrosi, independentment de la durada de la



malaltia (206,232,379). Un nivell de ferritina sèrica  $> 1000 \mu\text{g/L}$  amb un nivell elevat d'aminotransferasa (ALT o AST) i un recompte de plaquetes  $< 200 \times 10^9$  prediu la presència de cirrosi en el 80 % dels homozigots C282Y (231).

### 10.1.2 La prevalença de l'hemocromatosi hereditària

Si ens centrem en l'HH, segons les guies europees més recentment publicades, la definició d'HH es reduiria als homozigots C282Y pel gen *HFE*, amb increment dels dipòsits de ferro amb o sense símptomes clínics (184). Segons les guies americanes, s'inclourien en la definició els homozigots C282Y (serien del 80-85 % dels pacients amb HH), i els heterozigots compostos C282Y/H63D i C282Y/S65C (195). Sabem que la mutació C282Y del gen *HFE* és menys freqüent que la mutació H63D, però té una penetrància molt més alta. S'han descrit altres mutacions del gen *HFE* amb poc o sense cap significat. A Espanya la mutació més freqüent és l'H63D i la mutació S65C és molt poc freqüent (197). En els últims 10 anys, les mutacions d'altres gens que codifiquen proteïnes reguladores del ferro s'han implicat en les síndromes de sobrecàrrega de ferro heretades anomenades formes no-*HFE* de l'HH (per exemple, l'hepcidina (*HAMP*), l'hemojuvelina (*HFE2* o *HJV*), el *TFR2*, la ferroportina (*SCL40A1*) i la *BMP6*) (176,195).

En el nostre estudi, l'anàlisi de les mutacions del gen *HFE* de l'HH es va fer en individus ja seleccionats en els qui prèviament s'havia confirmat la sobrecàrrega bioquímica de ferro. A causa d'aquesta selecció inicial, la prevalença de les mutacions del gen *HFE* sobre el total de la població s'ha de considerar només com a una estimació:

1. El 0,07 % dels participants van ser homozigots C282Y i el 0,25 % dels participants van ser heterozigots compostos C282Y/H63D. Això significa que vam detectar HH en 1/304 individus estudiats (**prevalença del 0,32 %**), segons el criteris de l'any 2000 de l'EASL (230) d'incloure com a HH *HFE* els homozigots C282Y i els heterozigots compostos C282Y/H63D.

2. Segons la guia de l'any 2010 de l'EASL (184), en la qual es considera com a HH *HFE* només els homozigots C282Y, tindríem HH en 1/1.369 individus (**prevalença del 0,07 %**).
3. Segons la guia de l'AASLD (*American Association for the Study of Liver Diseases*) de 2011 (195) contemplaríem com a HH els homozigots C282Y (prevalença del 0,07 %), els heterozigots compostos C282Y/H63D (prevalença del 0,25 %) i els heterozigots compostos C282Y/C65S (prevalença del 0,07 %). Això implicaria que la prevalença d'HH seria de 1/249 individus (**prevalença del 0,39 %**), la més alta de les tres estimacions calculades.

La prevalença general d'HH entre els descendents caucàsians de raça celta es d'aproximadament 1/220-250 individus (195). En estudis en la població masculina noruega, es va descriure l'HH en 1/135 homes (0,74 %) (380). Altres estudis detecten en l'atenció primària d'Estats Units i d'Amèrica del Nord 1/270 i 1/333 subjectes, respectivament; entre la població general de Noruega 1/220 individus; i en la població general d'Austràlia 1/146 subjectes (195). Per altra banda, els estudis recents consideren una prevalença d'un 5/1000 (0,5 %) entre els descendents caucàsians del nord d'Europa (12,381).

Tal com hem dit, la prevalença de l'HH lligada a l'*HFE* que resulta del nostre estudi tenint en compte la definició de la guia l'EASL de 2000 (230), seria d'1/304 individus estudiats (prevalença del 0,32 %), segons els criteris de l'EASL de 2010 (184) d'1/1.369 subjectes (prevalença del 0,07 %), i segons la guia de l'AASLD de 2011 (195) d'1/249 persones (prevalença del 0,39 %). Tenint en compte les freqüències de les mutacions trobades i la definició d'HH de les guies de cada moment, les nostres dades són similars a la primera prevalença descrita a Catalunya de la mutació C282Y comparant les freqüències al·lèliques de les mutacions del gen *HFE* en individus voluntaris d'Espanya d'ètnia basca i gitana i en voluntaris donants de sang de Catalunya (382). Posteriorment aquestes freqüències al·lèliques es van confirmar en voluntaris donants del Banc de Sang i de Teixits a Catalunya, estudi en el qual es va observar una freqüència d'homozigots C282Y d'un 1/1004 individus (196) i que estan en concordança

amb un altre estudi de cribratge de mutacions relacionades amb el gen *HFE* realitzat en nadons també a Catalunya on es va observar una proporció de C282Y en homozigosi d'un 0,001, una proporció de 0,01 d'heterozigosi composta C282Y/H63D i de 0,002 d'heterozigosi composta C282Y/S65C (197). De la mateixa manera també estan d'acord amb la prevalença descrita, un estudi de cribratge de mutacions relacionades amb el gen *HFE* en nadons del sud de França (383); un estudi de la població de la República Txeca realitzat a partir d'un cribratge de mutacions relacionades amb el gen *HFE* en nadons (384); així com amb una mostra de donants de sang del nord-oest d'Itàlia descendents d'europèus del nord (385). En aquests estudis s'havia estimat una prevalença d'HH d'entre 1/357 (0,28 %) i 1/625 (0,16 %) en subjectes de la població general.

En l'estudi previ a dalt esmentat sobre la població general a Catalunya a partir del cribratge en nadons (197) es va observar que la freqüència al·lèlica de la mutació H63D era de les més altes estudiades (proporció del 0,2), de la mateixa manera que es va observar que la mutació S65C era molt infreqüent (proporció del 0,009). Per tant, la freqüència al·lèlica elevada de la mutació H63D a Catalunya podria jugar un paper clínicament rellevant en la sobrecàrrega bioquímica de ferro amb l'impacte conseqüent epidemiològic sobre la població de Catalunya, malgrat la seva influència sobre el metabolisme del ferro seria menys important que la causada per la mutació C282Y (197). La prevalença d'aquesta mutació en la nostra mostra va ser també la més alta, un 2,1 % respecte la mutació C282Y que va presentar una prevalença del 0,84 % i la mutació S65C amb una prevalença del 0,22 %. La mutació S65C també va ser baixa en estudis previs a Catalunya, donant suport a la hipòtesi de que aquesta mutació no és rellevant en el diagnòstic de l'HH al nostre territori (197,386).

### **10.1.3. Manifestacions clíniques de les persones amb hemocromatosi hereditària**

Sabem que les manifestacions més característiques de l'HH en els adults són les hepatopaties com la cirrosi i l'adenocarcinoma hepàtic. Altra simptomatologia atribuïda a l'HH, com la fatiga, les artropaties, la disfunció erèctil, es considera

que no són més freqüents en els homozigots C282Y que en la població general (387).

Les persones amb HH de la nostra mostra estaven asimptomàtiques i en els HH homozigots C282Y l'ecografia hepàtica va ser normal. Els dos homozigots C282Y, una dona de 37 anys i un home de 60 anys, presentaven un IST > 50 % i nivells de ferritina normals. Els dos estaven asimptomàtics.

Es van detectar set individus heterozigots compostos: cinc dones i dos homes. De les cinc dones heterozigotes compostes C282Y/H63D, quatre presentaven un IST > 50 % amb ferritina normal i una presentava un IST normal amb una ferritina elevada ( $\approx 570$  ng/mL). Aquesta última dona tenia 51 anys i presentava artràlgies probablement per artrosi, síndrome metabòlica i EHNA lleu segons el criteri ecogràfic. Sobre les altres quatre heterozigotes compostes C282Y/H63D amb un IST > 50 %: una dona de 66 anys presentava artràlgies per artrosi ben estudiada; una altra presentava hipertiroïdisme; una altra hipotiroïdisme i una altra patia glaucoma. Pel que fa als dos homes amb heterozigosi composta C282Y/H63D identificats, cal destacar que presentaven un IST normal amb nivells elevats de ferritina ( $\approx 540$  ng/mL). Un d'ells de 61 anys presentava obesitat (IMC 31) i un segon de 73 anys presentava síndrome metabòlica i EHNA lleu segons el criteri ecogràfic.

No es va detectar cap alteració clínica en l'individu amb la nova mutació *HFE* V284M ni en els seus familiars (189).

Finalment, vam detectar un home jove de 23 anys amb una sobrecàrrega bioquímica de ferro persistent (ferritina  $\approx 900$  ng/mL), afectat de la síndrome hereditària d'hiperferritinèmia i cataractes (HHCS) que està en relació a la mutació C39T en el gen de la L-ferritina. Es tracta d'una malaltia autosòmica dominant causada per mutacions heterogènies en l'element *IRE* de la regió 5' no traduïda de l'ARNm que codifica la cadena L de la ferritina. Aquestes mutacions redueixen la unió de les proteïnes reguladores de ferro en trans i, en conseqüència, la síntesi de la cadena L està constitutivament augmentada. En les diverses famílies identificades fins el moment, els nivells sèrics i tissulars de

L-ferritina són de 5 a 20 vegades superiors als controls no afectats, el metabolisme del ferro és aparentment normal, i l'únic símptoma clínic rellevant és l'aparició primerenca de cataracta bilateral (388).

En realitzar l'extensió de l'estudi als **familiars de primer grau** dels pacients amb HH, es van analitzar 63 casos addicionals entre els quals es va detectar 20 subjectes amb la mutació C282Y. Es va detectar una dona de 44 anys amb homozigosi C282Y que presentava un IST de 74 % amb nivells de ferritina normals de 105 ng/mL i estava totalment asimptomàtica. També es van identificar quatre heterozigots compostos C282Y/H63D tres homes d'edats compreses entre el 21 i els 27 anys i una dona de 33 anys, tots ells amb nivells d'IST i de ferritina normals, i asimptomàtics. L'extensió de la detecció entre els familiars dels individus afectats va augmentar la **prevalença d'HH a 1/197** individus detectats en l'estudi.

Un aspecte que cal destacar és que l'estudi consisteix en un cribratge des de l'atenció primària. Probablement aquesta particularitat és la responsable que les persones detectades amb HH tinguessin nivells moderats de ferritina sèrica i no presentessin complicacions clíniques.

Pel que fa al seguiment durant 5 anys en total, els nivells de ferritina en sèrum en les persones amb HH per homozigosi C282Y van ser al llarg del temps els següents: la dona homozigota C282Y de 37 anys va presentar un IST de 58-67 % i una ferritina sèrica de 227-287 ng/mL, i l'home homozigot C282Y de 60 anys, donant habitual de sang, un IST de 66-86 % i una ferritina sèrica 55-67 ng/mL, aquests últims nivells probablement deguts a les donacions de sang que feia periòdicament. Per altra banda, els heterozigots compostos tenien una major sobrecàrrega bioquímica de ferro mesurada amb la ferritina sèrica que els homozigots. Aquesta dada sembla contradictòria, però es podria explicar si partim del fet que en el nostre estudi les persones amb HH per homozigosi amb expressió fenotípica greu probablement no havien estat incloses per trobar-se en l'àmbit hospitalari.

En el nostre estudi i tal com recomanen les guies (184,195) vam avaluar les persones amb resultats anormals reiterats en l'estudi del metabolisme del ferro com a possibles persones amb HH, fins i tot en absència de símptomes (nivell d'evidència A). Per altra banda, les guies recomanen que tots els pacients amb evidència de malaltia hepàtica haurien de ser avaluats per l'HH (nivell d'evidència 1B). En aquest cas, vam descartar les persones amb malaltia hepàtica segons el protocol explicat.

El protocol aplicat al nostre estudi va seguir les recomanacions de les guies segons les quals en una persona amb símptomes suggestius, troballes físiques o antecedents familiars, és necessària una combinació d'IST i de ferritina sèrica per obtenir una major aproximació diagnòstica, en comptes de basar-nos en una sola de aquestes determinacions (nivell d'evidència 1B). Si el resultat fos anormal (IST  $\geq$  45 % o una ferritina per sobre del límit superior de la normalitat) s'hauria de realitzar l'anàlisi de la mutació del gen *HFE* (nivell d'evidència 1B). A més a més, vam aplicar el cribratge (estudi del metabolisme del ferro i anàlisi genètica de l'*HFE*) en els familiars de primer grau dels individus amb HH per detectar malaltia en fase inicial i poder prevenir les seves complicacions, segons les recomanacions de les guies (nivell d'evidència 1A). Tal com hem comentat, en estendre el nostre estudi als familiars de primer grau dels individus que presentaven la mutació C282Y en homozigosi o heterozigosi composta, vam analitzar 63 nous subjectes i vam detectar 5 noves HH lligades a l'*HFE*.

En el nostre estudi, els pacients amb sobrecàrrega bioquímica de ferro i HH van ser sotmesos a una flebotomia setmanal terapèutica (segons la tolerància), seguint les recomanacions dels estudis del moment i amb l'objectiu d'arribar a un nivell de ferritina en sèrum de 50-100  $\mu\text{g/l}$  amb una monitorització periòdica.

S'ha de tenir en compte que el nivell de ferritina de la majoria del homozigots pel gen *HFE* no s'eleva durant llargs períodes de temps. Per tant és aconsellable el seguiment dels pacients amb HH i amb ferritina  $\leq$  1000 per a no perdre l'oportunitat de que puguin beneficiar-se del tractament precoç amb flebotomies (210,387,389).

Altres recomanacions de les guies estan especificades en l'annex 1.

#### **10.1.4. Cost econòmic del programa**

Tot i que no va ser l'objectiu principal fer un estudi de cost-efectivitat del programa, vam observar que el seu cost econòmic va ser relativament baix. El cost de les determinacions d'IST i de ferritina sèrica va ser de 15.810 €, fet que va permetre detectar 126 individus amb sobrecàrrega bioquímica de ferro i 14 persones amb HH, 5 d'elles familiars de persones amb HH (inclou, per tant, els costos de les determinacions fetes també a tots els familiars de les persones amb HH detectades en l'estudi).

De les dades obtingudes se'n desprenen conclusions que coincideixen amb les recomanacions de les guies clíniques sobre el maneig de l'HH. D'acord amb les guies actuals, el cribratge general d'HH *HFE* en la població a partir de l'IST no està recomanat (nivell d'evidència 1B) per la seva baixa penetrància. A més, tampoc és cost-efectiu perquè la majoria de subjectes detectats no presenten clínica i molt probablement no la desenvoluparan. Tal com hem comentat, diversos estudis demostren que tan sols les persones amb ferritina sèrica  $> 1000 \mu\text{g/L}$  tenen risc de cirrosi, una de les principals complicacions de l'HH (206,231,232,379). Però també cal tenir en compte les altres causes rellevants de ferritina sèrica elevada com són, principalment, les patologies que conformen la síndrome metabòlica, la ingesta excessiva d'alcohol, el càncer o les hepatopaties. Per tant, la detecció de l'HH a partir dels nivells de ferritina elevats inclourà la majoria de pacients que es veuran afectats clínicament. Els nivells elevats de ferritina també podran servir per a detectar altres malalties clínicament significatives en pacients que no tenen genotips d'HH.

#### **10.1.5. Manifestacions clíniques de les persones amb sobrecàrrega bioquímica de ferro**

En els individus de la nostra mostra amb sobrecàrrega bioquímica de ferro ( $n = 126$ ) un 27 % de dones i un 40 % homes presentaven DM2. Aquests resultats estan en línia amb altres estudis realitzats en poblacions amb sobrecàrrega

fèrrica i hemocromatosi, en les quals s'ha descrit una alta prevalença de DM2, tanmateix, variable segons els estudis. En els estudis inicials la prevalença de DM en pacients amb hemocromatosi s'objectivava entre un 7-40%, però es tractava d'estudis amb baix nombre d'individus i un cert grau de biaix de selecció (336,337). Més tard, amb la identificació de les alteracions genètiques causants de l'hemocromatosi, es va passar a disposar d'una eina objectiva pel diagnòstic de la malaltia i els càlculs de la prevalença de DM es van portar a terme a partir dels pacients detectats per diagnòstic genètic. Els estudis més recents, doncs, mostren una prevalença de DM del 13-23% i una prevalença de pacients amb una intolerància oral a la glucosa del 18-30% (338,339).

En el nostre entorn l'estudi poblacional Di@betes, en persones de 46 a 60 anys, que seria l'interval d'edat aplicable a la nostra mostra, la prevalença de DM2 en dones va ser del 10,9 % i en homes va ser del 23,8 % (390).

Pel que fa a la síndrome metabòlica, la presentaven un 45 % de les dones i un 43 % dels homes de la nostra mostra amb sobrecàrrega bioquímica de ferro. L'estudi MESYAS, les dades del qual estaven disponibles durant l'elaboració de l'estudi 1, indicava una prevalença de síndrome metabòlica a Espanya del 10,2 % que ajustada per edat i sexe era del 5,8 % i significativament superior en homes (8,7 %) que en dones (3,0 %) (391). Tanmateix, l'estudi MESYAS feia referència a una població més jove que la del nostre estudi. Per aquest motiu i tenint en compte l'edat dels individus de la nostra mostra, és més precís comparar el nostre estudi amb l'estudi DARIOS publicat posteriorment i que va agrupar 11 estudis poblacionals d'arreu d'Espanya (edats de 35 a 74 anys). En l'estudi DARIOS es descriu que la prevalença de la síndrome metabòlica a Espanya és del 31 % (en dones del 29 % i en homes del 32 %) (252). Així doncs, els resultats obtinguts suggereixen una possible associació de la sobrecàrrega bioquímica de ferro amb la DM2 i amb la síndrome metabòlica en la població del nostre estudi.



## 10.2. ESTUDI 2

A partir del primer estudi vam dissenyar un segon i un tercer estudi per explorar la sobrecàrrega bioquímica de ferro en l'obesitat i en la DM2. En aquesta tesi s'inclou només l'estudi sobre l'obesitat. L'estudi sobre DM2 s'ha adjuntat com a annex 2, d'acord amb les indicacions fetes per la comissió acadèmica del programa de doctorat en Medicina amb data 16 de març de 2017.

### 10.2.1. Obesitat, obesitat central i dèficit tissular de ferro

El nostre estudi va mostrar una elevació en les concentracions sèriques de sTFR en els homes obesos amb hiperferritinèmia sense HH o altres causes més prevalents de sobrecàrrega bioquímica de ferro com la DM, en comparació amb els homes no obesos. Aquesta elevació es va correlacionar positivament amb l'obesitat abdominal o central després d'ajustar per potencials factors de confusió, com ara l'augment dels nivells de sTFR en situacions de resistència a la insulina (268) o la disminució de sTFR en persones amb la mutació H63D del gen *HFE* de l'HH (392), força freqüent en la nostra àrea. En teoria això indicaria un dèficit tissular de ferro en els homes obesos en relació als no obesos, dada especialment interessant atès que s'haurien classificat com a portadors d'una sobrecàrrega fèrrica tenint en compte que tots ells presentaven hiperferritinèmia. El sTFR sèric és la fracció truncada del TFR. En aquest treball ja hem descrit que el TFR és una proteïna transmembrana present gairebé a tots el tipus cel·lulars, especialment en les cèl·lules de la sèrie eritroide. Aquesta proteïna és la responsable de la captació de ferro extracel·lular. L'expressió del TFR a la membrana cel·lular augmenta a mesura que creixen les demandes intracel·lulars de ferro, fet que determina també un increment de la seva forma truncada, el sTFR en sèrum. En conseqüència, les concentracions sèriques del sTFR augmenten quan hi ha un dèficit tissular de ferro com és el cas d'una anèmia i disminueixen quan hi ha una sobrecàrrega tissular de ferro. Per tant, com més gran sigui el nivell de ferritina sèrica, menor serà la concentració del sTFR (332). A diferència de la ferritina sèrica, el sTFR sèric no es modificaria en els processos inflamatoris de baix grau.

En el nostre estudi existirien almenys dos possibles factors que explicarien de forma aïllada o en combinació, un augment en les concentracions sèriques de sTFR: una expansió de la sèrie eritroide o una deficiència tissular de ferro, o bé la combinació d'aquests dos factors. Les situacions associades a una expansió de la sèrie eritroide es poden descartar mitjançant la realització d'un recompte de reticulòcits per excloure l'anèmia hemolítica i la determinació del VCM per excloure la macrocitosi per eritropoesi ineficaç subjacent (393). Tots els subjectes avaluats presentaven recomptes de reticulòcits normals i cap d'ells presentava macrocitosi. Per tant, és raonable assumir que l'elevació observada en les concentracions sèriques de sTFR serien degudes a un dèficit funcional de ferro, situació en què es produeix una deficiència tissular de ferro en presència d'unes reserves de ferro adequades (394). Aquestes dades estan en línia amb resultats d'altres estudis que han avaluat les concentracions de ferro sèric en persones amb obesitat i que les han trobat disminuïdes en relació a les persones sense obesitat (293,294,395,396). Però el ferro sèric, a diferència del sTFR sèric, té una alta variabilitat d'un dia a un altre i es veu molt afectat per processos inflamatoris (397,398). Finalment, els nostres resultats també estarien d'acord amb dos altres estudis que van mesurar el sTFR en relació a l'obesitat, l'un en dones postmenopàusiques (399) i l'altre en grup de persones adultes reclutades en un centre de assistència ambulatoria (400). En aquests dos estudis es va observar una elevació del sTFR que indica dèficit de ferro tissular en les persones amb obesitat definida per l'IMC. Per explicar aquest resultat es va proposar una mancança en la ingesta o un dèficit en l'absorció intestinal de ferro, unes majors necessitats de ferro de la persona obesa degut al seu major volum de sang, i/o una major inflamació de baix grau que causarien un dèficit funcional de ferro (400). No obstant, en cap d'aquests dos estudis es va mesurar l'obesitat abdominal i tampoc es van ajustar per factors de confusió com la mutació H63D del gen *HFE*.

Tot i què l'increment en les concentracions sèriques de sTFR observades en els homes obesos amb hiperferritinèmia podrien reflectir un dèficit funcional tissular real de ferro, el fet que l'associació sigui més intensa amb la circumferència abdominal que amb l'IMC ens permetria especular sobre altres mecanismes que podrien ajudar a explicar aquesta associació. La ferritina que es troba en els

hepatòcits i en els macròfags és la principal font de ferritina en sèrum (397). Tots els subjectes de l'estudi presentaven hiperferritinèmia i la majoria d'ells tenia un IST normal. Aquest patró bioquímic reflectiria una acumulació de ferro en els macròfags en lloc dels teixits (401), i seria similar al descrit en la sobrecàrrega fèrrica hepàtica associada a la resistència a la insulina (síndrome d'IR-HIO) (285). L'obesitat s'associa a un augment de la infiltració del teixit adipós blanc per macròfags, cosa que forma part important de la inflamació crònica de baix grau associada a l'obesitat (315). Aquesta infiltració és major en el compartiment de teixit adipós blanc visceral que en del teixit adipós blanc subcutani (402). En conseqüència, globalment també serà més important com major sigui l'obesitat abdominal. D'altra banda, a diferència del que passa amb la resta de tipus cel·lulars, en el macròfag l'expressió del TFR a la seva superfície augmenta en incrementar la reserva de ferro del macròfag en forma de ferritina (403). Per tant, una major infiltració de macròfags en el teixit adipós visceral podria ser responsable almenys d'una part de l'augment en les concentracions sèriques del sTFR en els subjectes amb obesitat de la nostra mostra. Aquesta acumulació de ferro en els macròfags en el context d'una deficiència funcional de ferro podria estar mitjançada per l'hepcidina. Aquesta hormona es produeix principalment en els hepatòcits, però també en el teixit adipós blanc (90,404). Com ja hem comentat, la seva acció és bloquejar l'alliberament de ferro dels macròfags, a més de regular l'absorció intestinal de ferro. Un augment de l'hepcidina podria contribuir als canvis en el metabolisme del ferro observats en el nostre estudi, tot i que aquesta hipòtesi s'haurà d'avaluar en futurs estudis.

Un altre mecanisme que pot ajudar a explicar l'associació entre obesitat i unes concentracions més elevades del sTFR circulant, seria la hipòxia tissular. L'obesitat pot associar-se amb una hipòxia intermitent en forma d'apnea obstructiva del son i/o amb una hipòxia crònica en la forma de la síndrome de Pickwick. El gen *TFR* té un element de reconeixement per al regulador central de la resposta hipòxica, el factor de transcripció HIF (405). Aquest factor que augmenta com a resposta a la hipòxia, incrementa l'expressió del gen del *TFR* (344) i, per tant, podria augmentar la producció de TFR. No tenim dades sobre la hipòxia en els subjectes avaluats. No obstant això, els individus amb obesitat

presentaven unes concentracions d'hemoglobina més altes, dada que recolzaria l'associació entre els nivells augmentats del sTFR i la hipòxia.

L'interès fonamental del nostre estudi és haver detectat en homes obesos amb hiperferritinèmia un dèficit funcional de ferro d'acord amb la presència d'unes concentracions elevades de sTFR en sèrum. Aquest dèficit s'associa sobretot amb l'obesitat abdominal i és independent de la presència de factors que poden incrementar les concentracions sèriques de sTFR, com la mutació H63D del gen *HFE* o la resistència a la insulina. Concretament, en relació a aquesta resistència a la insulina, s'ha descrit que la insulina provoca una important estimulació de la captació de ferro en els adipòcits *in vitro* alhora que redistribueix el TFR des de compartiments intracel·lulars a la membrana plasmàtica (344). A més, també s'ha observat que la resistència a la insulina s'associa independentment amb un augment en les concentracions en sèrum de sTFR, però només en aquells subjectes amb una prova normal de tolerància oral a la glucosa, no en subjectes amb DM o intolerància oral a la glucosa (406). Per controlar aquest factor, el nostre treball d'una banda va excloure els subjectes amb DM i per altra banda, va ajustar els resultats per la presència de la resistència a la insulina.

Tanmateix, el nostre estudi presenta algunes limitacions que s'han de reconèixer. En primer lloc, hi pot haver un biaix de selecció ocasionat per la dificultat de reclutar tots els subjectes que complien els criteris de participació a l'estudi. De fet, només van participar a l'estudi aquells que havien signat el consentiment informat. Tot i això, aquest biaix va ser molt limitat, ja que menys d'un 1 % dels potencials candidats a participar a l'estudi van refusar-ho. En segon lloc, hi ha una manca d'estandardització d'assajos sobre el sTFR en sèrum (393,407), fet que dificultaria les comparacions entre els resultats obtinguts a través de diferents mètodes. En tercer lloc, l'estudi es va limitar als homes de raça caucàsica amb hiperferritinèmia. En conseqüència, els resultats poden no ser directament aplicables a les dones, als subjectes sense hiperferritinèmia o a altres grups ètnics. Finalment, donat que l'estudi és transversal no es poden concloure relacions causa-efecte. No obstant això, un estudi en rates suggereix que la deficiència de ferro perinatal podria participar en la patogènesi de l'obesitat central (408).

En conclusió, l'augment en les concentracions sèriques de sTFR s'associa amb l'obesitat central en homes caucàsics amb hiperferritinèmia. Aquesta troballa podria reflectir una biodisponibilitat de ferro tissular menor en les persones amb obesitat de predomini central. Els nostres resultats suggereixen la necessitat de dur a terme més estudis per avaluar el metabolisme del ferro en l'obesitat.



## **11. CONCLUSIONS**

---





## 11. CONCLUSIONS

1. La prevalença de sobrecàrrega bioquímica de ferro en la població atesa a centres d'atenció primària de la nostra àrea mediterrània és d'un 4,6 %.
2. La prevalença d'hemocromatosi hereditària en la mateixa població és molt baixa (0,32 %; 1/304 persones estudiades). La prevalença d'homozigots per a la mutació C282Y del gen *HFE* de l'hemocromatosi hereditària és 0,07 % i la prevalença d'heterozigots compostos C282Y/H63D del gen *HFE* de l'hemocromatosi hereditària és 0,25 %. La mutació més freqüent de l'*HFE* és l'H63D amb una prevalença del 2,1 %, sent les mutacions C282Y i S65C molt menys freqüents amb una prevalença del 0,84 % i del 0,22 %, respectivament. L'estudi ha permès identificar una nova mutació del gen *HFE*, la V284M. Totes les persones detectades estaven asimptomàtiques en relació a les patologies pròpies de l'hemocromatosi hereditària i es van mantenir asimptomàtiques durant un període de seguiment addicional de 4 anys.
3. Un programa d'avaluació sistemàtica de la sobrecàrrega bioquímica de ferro mitjançant la determinació inicial de l'índex de saturació de la transferrina i de la ferritina sèrica en atenció primària té un cost relativament baix i permet detectar persones amb hemocromatosi hereditària.
4. Tot i que el programa va detectar persones amb hemocromatosi hereditària, les patologies amb més prevalença associades a la sobrecarrega bioquímica de ferro són aquelles que formen part del ventall de trastorns de la síndrome metabòlica.
5. Els homes obesos amb hiperferritinèmia, detectats amb un programa d'avaluació sistemàtica de sobrecàrrega bioquímica de ferro en atenció primària, en els que es descarta una hemocromatosi hereditària o altres causes comunes de sobrecàrrega bioquímica de ferro, presenten un

increment en sèrum de les concentracions de sTFR. Aquesta situació suggereix que aquests individus tenen un dèficit tissular de ferro.

6. En aquest subgrup d'homes amb hiperferritinèmia, després d'ajustar per tots els potencials factors de confusió, l'increment de les concentracions sèriques de sTFR (dèficit tissular de ferro) s'associa independentment a un major índex de massa corporal. Aquesta associació encara es més forta entre unes concentracions sèriques més elevades de sTFR i uns majors valors de circumferència abdominal, com a mesura d'obesitat central.

## **12. LÍNIAS DE FUTUR**

---



## 12. LÍNIES DE FUTUR

En la línia d'investigació de la tesi s'inclou com a annex 2 una tercera publicació, on s'avalua un grup d'homes amb hiperferritinèmia detectats amb el programa de detecció d'HH descrit en aquesta tesi, seleccionats en funció de si presenten o no DM2 no insulinodepenent segons els criteris de l'*American Diabetes Association* (366). L'estudi de la sobrecarrega fèrrica a la DM2 té un gran interès científic per les seves potencials implicacions patogèniques (409). Com es pot comprovar en l'annex 2, els homes amb hiperferritinèmia i DM2 no insulinodepenent no presenten major sobrecàrrega de ferro (mesurada a través de la ferritina, l'IST i el sTFR) que els homes sense DM2. A més, presenten una menor funció de les cèl·lules beta pancreàtiques (HOMA-%B) però no s'observen diferències entre els dos grups (DM2 i no DM2) pel que fa a la sensibilitat a la insulina (HOMA-%S), a la inflamació (PCR) o als altres components de la síndrome metabòlica. Així doncs, aquest treball posaria en dubte el possible paper patogènic de la sobrecàrrega bioquímica de ferro en la DM2 en homes amb hiperferritinèmia.

Un altre aspecte d'interès científic potencial que caldrà investigar en un futur és el paper de l'hepcidina en la patogènia dels diferents components de la síndrome metabòlica i de la sobrecàrrega bioquímica de ferro, tenint en compte la seva relació amb diverses citocines inflamatòries com la IL6 i el TNF $\alpha$ . L'objectiu final de totes aquestes investigacions hauria de ser trobar noves dianes terapèutiques per prevenir o tractar les diverses patologies que conformen la síndrome metabòlica.

Des d'un punt de vista més pràctic, també té un gran interès l'avaluació en assajos clínics aleatoritzats de la depleció periòdica de ferro mitjançant els quelants (410) o les flebotomies (411–413) com a tractament en les persones amb sobrecàrrega bioquímica de ferro, per tal de poder valorar els possibles beneficis i la seva seguretat en aquests individus. Això seria especialment interessant si aquestes persones presenten DM2 o prediabetis, inclús si la

sobrecàrrega bioquímica de ferro és moderada (ferritina entre 100-300 mg/dl) (289).

Finalment, en aquestes situacions de prediabetis també seria interessant avaluar el potencial paper del sTFR sèric. En el seguiment d'aquests pacients, es podria considerar la monitorització dels nivells de ferritina sèrica i de sTFR, valorar el contingut de ferro de la dieta i objectivar la situació de sobrecàrrega fèrrica real a través de RM (234,414).

## **13. BIBLIOGRAFIA**

---





## 13. BIBLIOGRAFIA

1. Hentze MW, Muckenthaler MU, Andrews NC. Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. *Cell*. 2004 Apr 30;117(3):285–97.
2. Geissler C, Singh M. Iron, meat and health. *Nutrients*. 2011 Mar 28;3(3):283–316.
3. Crownover B, Covey C. Hereditary Hemochromatosis. *Am Fam Physician*. 2013;87(3):183–90.
4. Andrews NC. Disorders of iron metabolism. *N Engl J Med*. 1999 Dec 23;341(26):1986–95.
5. Zimmermann MB, Hurrell RF. Nutritional iron deficiency. *Lancet (London, England)*. 2007 Aug 11;370(9586):511–20.
6. Brissot P, Troadec M-B, Bardou-Jacquet E, Le Lan C, Jouanolle A-M, Deugnier Y, et al. Current approach to hemochromatosis. *Blood Rev*. 2008 Jul;22(4):195–210.
7. Green R, Charlton R, Seftel H, Bothwell T, Mayet F, Adams B, et al. Body iron excretion in man. *Am J Med*. Elsevier; 1968 Sep 1;45(3):336–53.
8. Hurrell R, Egli I. Iron bioavailability and dietary reference values. *Am J Clin Nutr*. 2010 May;91(5):1461S–1467S.
9. Finch C. Regulators of iron balance in humans. *Blood*. American Society of Hematology; 1994 Sep 15;84(6):1697–702.
10. Creamer B. The turnover of the epithelium of the small intestine. *Br Med Bull*. 1967 Sep;23(3):226–30.
11. Fleming RE, Ponka P. Iron Overload in Human Disease. *N Engl J Med*. 2012 Jan 26;366(4):348–59.
12. Pietrangelo A. Hereditary hemochromatosis: Pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Gastroenterology*. Elsevier Inc.; 2010;139(2):393–408.e2.
13. Donovan A, Lima CA, Pinkus JL, Pinkus GS, Zon LI, Robine S, et al. The iron exporter ferroportin/Slc40a1 is essential for iron homeostasis. *Cell Metab*. 2005 Mar;1(3):191–200.

### 13. Bibliografia

14. Wyllie JC, Kaufman N. An electron microscopic study of heme uptake by rat duodenum. *Lab Invest.* 1982 Nov;47(5):471–6.
15. Theil EC, Chen H, Miranda C, Janser H, Elsenhans B, Núñez MT, et al. Absorption of iron from ferritin is independent of heme iron and ferrous salts in women and rat intestinal segments. *J Nutr.* 2012 Mar;142(3):478–83.
16. Rajagopal A, Rao AU, Amigo J, Tian M, Upadhyay SK, Hall C, et al. Haem homeostasis is regulated by the conserved and concerted functions of HRG-1 proteins. *Nature.* 2008 Jun 19;453(7198):1127–31.
17. Shayeghi M, Latunde-Dada GO, Oakhill JS, Laftah AH, Takeuchi K, Halliday N, et al. Identification of an intestinal heme transporter. *Cell.* 2005 Sep 9;122(5):789–801.
18. Hubert N, Hentze MW. Previously uncharacterized isoforms of divalent metal transporter (DMT)-1: implications for regulation and cellular function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Sep 17;99(19):12345–50.
19. Delaby C, Rondeau C, Pouzet C, Willemetz A, Pilard N, Desjardins M, et al. Subcellular localization of iron and heme metabolism related proteins at early stages of erythrophagocytosis. *PLoS One.* 2012 Jan;7(7):e42199.
20. Soe-Lin S, Apte SS, Andriopoulos B, Andrews MC, Schranzhofer M, Kahawita T, et al. Nramp1 promotes efficient macrophage recycling of iron following erythrophagocytosis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Apr 7;106(14):5960–5.
21. Soe-Lin S, Apte SS, Mikhael MR, Kayembe LK, Nie G, Ponka P. Both Nramp1 and DMT1 are necessary for efficient macrophage iron recycling. *Exp Hematol.* 2010 Aug;38(8):609–17.
22. Soe-Lin S, Sheftel AD, Wasyluk B, Ponka P. Nramp1 equips macrophages for efficient iron recycling. *Exp Hematol.* 2008 Aug;36(8):929–37.
23. Shah YM, Matsubara T, Ito S, Yim S-H, Gonzalez FJ. Intestinal hypoxia-inducible transcription factors are essential for iron absorption following iron deficiency. *Cell Metab.* 2009 Mar;9(2):152–64.

24. Shawki A, Knight PB, Maliken BD, Niespodzany EJ, Mackenzie B. H(+)-coupled divalent metal-ion transporter-1: functional properties, physiological roles and therapeutics. *Curr Top Membr.* 2012 Jan;70:169–214.
25. Fleming MD, Romano MA, Su MA, Garrick LM, Garrick MD, Andrews NC. Nramp2 is mutated in the anemic Belgrade (b) rat: evidence of a role for Nramp2 in endosomal iron transport. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Feb 3;95(3):1148–53.
26. Fleming MD, Trenor CC, Su MA, Foernzler D, Beier DR, Dietrich WF, et al. Microcytic anaemia mice have a mutation in Nramp2, a candidate iron transporter gene. *Nat Genet.* 1997 Aug;16(4):383–6.
27. Gunshin H, Mackenzie B, Berger U V, Gunshin Y, Romero MF, Boron WF, et al. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature.* 1997 Jul 31;388(6641):482–8.
28. Choi J, Masaratana P, Latunde-Dada GO, Arno M, Simpson RJ, McKie AT. Duodenal reductase activity and spleen iron stores are reduced and erythropoiesis is abnormal in Dcytb knockout mice exposed to hypoxic conditions. *J Nutr.* 2012 Nov 1;142(11):1929–34.
29. McKie AT. The role of Dcytb in iron metabolism: an update. *Biochem Soc Trans.* 2008 Dec 1;36(Pt 6):1239–41.
30. Ganz T. Systemic Iron Homeostasis. *Physiol Rev.* 2013;93(4):1721–41.
31. Shawki A, Engevik MA, Kim RS, Knight PB, Baik RA, Anthony SR, et al. Intestinal brush-border Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger-3 drives H<sup>+</sup>-coupled iron absorption in the mouse. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol.* 2016 Sep 1;311(3):G423–30.
32. Harrison PM, Arosio P. The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochim Biophys Acta.* 1996 Jul 31;1275(3):161–203.
33. Vanoaica L, Darshan D, Richman L, Schümann K, Kühn LC. Intestinal ferritin H is required for an accurate control of iron absorption. *Cell Metab.* 2010 Sep 8;12(3):273–82.
34. Theil EC, Kidane TZ, Sauble E, Linder MC. Release of iron from ferritin requires lysosomal activity. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2006 Sep 12;114(3):C445–55.
35. Theil EC. Mining ferritin iron: 2 pathways. *Blood.* 2009 Nov 12;114(20):4325–6.

36. Cohen LA, Gutierrez L, Weiss A, Leichtmann-Bardoogo Y, Zhang D, Crooks DR, et al. Serum ferritin is derived primarily from macrophages through a nonclassical secretory pathway. *Blood*. 2010 Sep 2;116(9):1574–84.
37. De Domenico I, Vaughn MB, Paradkar PN, Lo E, Ward DM, Kaplan J. Decoupling ferritin synthesis from free cytosolic iron results in ferritin secretion. *Cell Metab*. 2011 Jan 5;13(1):57–67.
38. Wang W, Knovich MA, Coffman LG, Torti FM, Torti S V. Serum ferritin: Past, present and future. *Biochim Biophys Acta*. 2010 Aug;1800(8):760–9.
39. Cook JD, Flowers CH, Skikne BS. The quantitative assessment of body iron. *Blood*. 2003 May 1;101(9):3359–64.
40. Jacobs A, Worwood M. Ferritin in serum. Clinical and biochemical implications. *N Engl J Med*. 1975 May 1;292(18):951–6.
41. Origa R, Galanello R, Ganz T, Giagu N, Maccioni L, Faa G, et al. Liver iron concentrations and urinary hepcidin in beta-thalassemia. *Haematologica*. 2007 May;92(5):583–8.
42. Abboud S, Haile DJ. A novel mammalian iron-regulated protein involved in intracellular iron metabolism. *J Biol Chem*. 2000 Jun 30;275(26):19906–12.
43. Donovan A, Brownlie A, Zhou Y, Shepard J, Pratt SJ, Moynihan J, et al. Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. *Nature*. 2000 Feb 17;403(6771):776–81.
44. McKie AT, Marciani P, Rolfs A, Brennan K, Wehr K, Barrow D, et al. A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation. *Mol Cell*. 2000 Feb;5(2):299–309.
45. Canonne-Hergaux F, Donovan A, Delaby C, Wang H, Gros P. Comparative studies of duodenal and macrophage ferroportin proteins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006 Jan;290(1):G156-63.
46. Ramey G, Deschemin J-C, Durel B, Canonne-Hergaux F, Nicolas G, Vaulont S. Hepcidin targets ferroportin for degradation in hepatocytes. *Haematologica*. 2010 Mar;95(3):501–4.

47. Mitchell CJ, Shawki A, Ganz T, Nemeth E, Mackenzie B. Functional properties of human ferroportin, a cellular iron exporter reactive also with cobalt and zinc. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2014 Mar 1;306(5):C450-9.
48. Kosman DJ. Redox cycling in iron uptake, efflux, and trafficking. *J Biol Chem.* 2010 Aug 27;285(35):26729–35.
49. Cherukuri S, Potla R, Sarkar J, Nurko S, Harris ZL, Fox PL. Unexpected role of ceruloplasmin in intestinal iron absorption. *Cell Metab.* 2005 Nov;2(5):309–19.
50. Cherukuri S, Tripoulas NA, Nurko S, Fox PL. Anemia and impaired stress-induced erythropoiesis in aceruloplasminemic mice. *Blood Cells Mol Dis.* 2004 Jan;33(3):346–55.
51. Harris ZL, Durley AP, Man TK, Gitlin JD. Targeted gene disruption reveals an essential role for ceruloplasmin in cellular iron efflux. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Sep 14;96(19):10812–7.
52. Vulpe CD, Kuo YM, Murphy TL, Cowley L, Askwith C, Libina N, et al. Hephaestin, a ceruloplasmin homologue implicated in intestinal iron transport, is defective in the sla mouse. *Nat Genet.* 1999 Feb;21(2):195–9.
53. Keel SB, Doty RT, Yang Z, Quigley JG, Chen J, Knoblauch S, et al. A heme export protein is required for red blood cell differentiation and iron homeostasis. *Science.* 2008 Feb 8;319(5864):825–8.
54. Chiabrando D, Marro S, Mercurio S, Giorgi C, Petrillo S, Vinchi F, et al. The mitochondrial heme exporter FLVCR1b mediates erythroid differentiation. *J Clin Invest.* 2012 Dec;122(12):4569–79.
55. Pantopoulos K, Porwal SK, Tartakoff A, Devireddy L. Mechanisms of Mammalian Iron Homeostasis. *Biochemistry.* 2012 Jul 24;51(29):5705–24.
56. Bartnikas TB, Andrews NC, Fleming MD. Transferrin is a major determinant of hepcidin expression in hypotransferrinemic mice. *Blood.* 2011 Jan 13;117(2):630–7.
57. Bartnikas TB. Known and potential roles of transferrin in iron biology. *Biometals.* 2012 Aug;25(4):677–86.
58. Gkouvatsos K, Papanikolaou G, Pantopoulos K. Regulation of iron transport and the role of transferrin. *Biochim Biophys Acta.* 2012 Mar;1820(3):188–202.

### 13. Bibliografia

59. Nicolas G, Chauvet C, Viatte L, Danan JL, Bigard X, Devaux I, et al. The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. *J Clin Invest*. 2002 Oct;110(7):1037–44.
60. Ganz T. Hepcidin and iron regulation, 10 years later. *Blood*. 2011 Apr 28;117(17):4425–33.
61. Krause A, Neitz S, Mägert HJ, Schulz A, Forssmann WG, Schulz-Knappe P, et al. LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. *FEBS Lett*. 2000 Sep 1;480(2–3):147–50.
62. Park CH, Valore E V, Waring AJ, Ganz T. Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J Biol Chem*. 2001 Mar 16;276(11):7806–10.
63. Pigeon C, Ilyin G, Courselaud B, Leroyer P, Turlin B, Brissot P, et al. A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. *J Biol Chem*. 2001 Mar 16;276(11):7811–9.
64. 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 May;117(5):390–401.
65. Lesnefsky EJ, Moghaddas S, Tandler B, Kerner J, Hoppel CL. Mitochondrial dysfunction in cardiac disease: ischemia--reperfusion, aging, and heart failure. *J Mol Cell Cardiol*. 2001 Jun;33(6):1065–89.
66. Itkonen O, Stenman U-H, Parkkinen J, Soliymani R, Baumann M, Hämäläinen E. Binding of hepcidin to plasma proteins. *Clin Chem*. 2012 Jul;58(7):1158–60.
67. Peslova G, Petrak J, Kuzelova K, Hrdy I, Halada P, Kuchel PW, et al. Hepcidin, the hormone of iron metabolism, is bound specifically to alpha-2-macroglobulin in blood. *Blood*. 2009 Jun 11;113(24):6225–36.
68. Nemeth E, Preza GC, Jung C-L, Kaplan J, Waring AJ, Ganz T. The N-terminus of hepcidin is essential for its interaction with ferroportin: structure-function study. *Blood*. 2006 Jan 1;107(1):328–33.
69. Valore E V, Ganz T. Posttranslational processing of hepcidin in human hepatocytes is mediated by the prohormone convertase furin. *Blood Cells Mol Dis*. Jan;40(1):132–8.

70. Wallace DF, Summerville L, Lusby PE, Subramaniam VN. Prohepcidin localises to the Golgi compartment and secretory pathway in hepatocytes. *J Hepatol.* 2005 Oct;43(4):720–8.
71. Campostrini N, Traglia M, Martinelli N, Corbella M, Cocca M, Manna D, et al. Serum levels of the hepcidin-20 isoform in a large general population: the Val Borbera study. *J Proteomics.* 2012 Dec 5;76 Spec No:28–35.
72. Nemeth E, Rivera S, Gabayan V, Keller C, Taudorf S, Pedersen BK, et al. IL-6 mediates hypoferrremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *J Clin Invest.* 2004 May 1;113(9):1271–6.
73. Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, Vaughn MB, Donovan A, Ward DM, et al. Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science.* 2004 Dec 17;306(5704):2090–3.
74. Knutson MD, Oukka M, Koss LM, Aydemir F, Wessling-Resnick M. Iron release from macrophages after erythrophagocytosis is up-regulated by ferroportin 1 overexpression and down-regulated by hepcidin. *Proc Natl Acad Sci.* 2005 Jan 21;102(5):1324–8.
75. Ganz T, Olbina G, Girelli D, Nemeth E, Westerman M. Immunoassay for human serum hepcidin. *Blood.* 2008 Nov 15;112(10):4292–7.
76. Nicolas G, Bennoun M, Porteu A, Mativet S, Beaumont C, Grandchamp B, et al. Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver hepcidin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Apr 2;99(7):4596–601.
77. Roy CN, Mak HH, Akpan I, Losyev G, Zurakowski D, Andrews NC. Hepcidin antimicrobial peptide transgenic mice exhibit features of the anemia of inflammation. *Blood.* 2007 May 1;109(9):4038–44.
78. Lesbordes-Brion J-C, Viatte L, Bennoun M, Lou D-Q, Ramey G, Houbron C, et al. Targeted disruption of the hepcidin 1 gene results in severe hemochromatosis. *Blood.* 2006 Aug 15;108(4):1402–5.
79. Nicolas G, Bennoun M, Devaux I, Beaumont C, Grandchamp B, Kahn A, et al. Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (USF2) knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Jul 17;98(15):8780–5.

80. Roetto A, Papanikolaou G, Politou M, Alberti F, Girelli D, Christakis J, et al. Mutant antimicrobial peptide hepcidin is associated with severe juvenile hemochromatosis. *Nat Genet.* 2003 Jan;33(1):21–2.
81. Chiabrando D, Fiorito V, Marro S, Silengo L, Altruda F, Tolosano E. Cell-specific regulation of Ferroportin transcription following experimentally-induced acute anemia in mice. *Blood Cells Mol Dis.* 2013 Jan;50(1):25–30.
82. Masaratana P, Patel N, Latunde-Dada GO, Vaulont S, Simpson RJ, McKie AT. Regulation of iron metabolism in *Hamp* (-/-) mice in response to iron-deficient diet. *Eur J Nutr.* 2013 Feb;52(1):135–43.
83. Zhang D-L, Hughes RM, Ollivierre-Wilson H, Ghosh MC, Rouault TA. A ferroportin transcript that lacks an iron-responsive element enables duodenal and erythroid precursor cells to evade translational repression. *Cell Metab.* 2009 May;9(5):461–73.
84. Taylor M, Qu A, Anderson ER, Matsubara T, Martin A, Gonzalez FJ, et al. Hypoxia-inducible factor-2 $\alpha$  mediates the adaptive increase of intestinal ferroportin during iron deficiency in mice. *Gastroenterology.* 2011 Jun;140(7):2044–55.
85. Aoki CA, Rossaro L, Ramsamooj R, Brandhagen D, Burritt MF, Bowlus CL. Liver hepcidin mRNA correlates with iron stores, but not inflammation, in patients with chronic hepatitis C. *J Clin Gastroenterol.* 2005 Jan;39(1):71–4.
86. D tivaud L, Nemeth E, Boudjema K, Turlin B, Troadec M-B, Leroyer P, et al. Hepcidin levels in humans are correlated with hepatic iron stores, hemoglobin levels, and hepatic function. *Blood.* 2005 Jul 15;106(2):746–8.
87. Gehrke SG, Herrmann T, Kulaksiz H, Merle U, Bents K, Kaiser I, et al. Iron stores modulate hepatic hepcidin expression by an HFE-independent pathway. *Digestion.* 2005;72(1):25–32.
88. Zhang A-S, Xiong S, Tsukamoto H, Enns CA. Localization of iron metabolism-related mRNAs in rat liver indicate that HFE is expressed predominantly in hepatocytes. *Blood.* 2004 Feb 15;103(4):1509–14.



89. Troadec M-B, Fautrel A, Drénou B, Leroyer P, Camberlein E, Turlin B, et al. Transcripts of ceruloplasmin but not hepcidin, both major iron metabolism genes, exhibit a decreasing pattern along the portocentral axis of mouse liver. *Biochim Biophys Acta*. 2008 Apr;1782(4):239–49.
90. Bekri S, Gual P, Anty R, Luciani N, Dahman M, Ramesh B, et al. Increased adipose tissue expression of hepcidin in severe obesity is independent from diabetes and NASH. *Gastroenterology*. 2006 Sep;131(3):788–96.
91. Babitt JL, Huang FW, Wrighting DM, Xia Y, Sidis Y, Samad TA, et al. Bone morphogenetic protein signaling by hemojuvelin regulates hepcidin expression. *Nat Genet*. 2006 May;38(5):531–9.
92. Babitt JL, Huang FW, Xia Y, Sidis Y, Andrews NC, Lin HY. Modulation of bone morphogenetic protein signaling in vivo regulates systemic iron balance. *J Clin Invest*. 2007 Jul;117(7):1933–9.
93. Casanovas G, Mleczko-Sanecka K, Altamura S, Hentze MW, Muckenthaler MU. Bone morphogenetic protein (BMP)-responsive elements located in the proximal and distal hepcidin promoter are critical for its response to HJV/BMP/SMAD. *J Mol Med (Berl)*. 2009 May;87(5):471–80.
94. Truksa J, Lee P, Beutler E. Two BMP responsive elements, STAT, and bZIP/HNF4/COUP motifs of the hepcidin promoter are critical for BMP, SMAD1, and HJV responsiveness. *Blood*. 2009 Jan 15;113(3):688–95.
95. Verga Falzacappa MV, Casanovas G, Hentze MW, Muckenthaler MU. A bone morphogenetic protein (BMP)-responsive element in the hepcidin promoter controls HFE2-mediated hepatic hepcidin expression and its response to IL-6 in cultured cells. *J Mol Med (Berl)*. 2008 May;86(5):531–40.
96. Wang R-H, Li C, Xu X, Zheng Y, Xiao C, Zervas P, et al. A role of SMAD4 in iron metabolism through the positive regulation of hepcidin expression. *Cell Metab*. 2005 Dec;2(6):399–409.
97. Huang FW, Pinkus JL, Pinkus GS, Fleming MD, Andrews NC. A mouse model of juvenile hemochromatosis. *J Clin Invest*. 2005 Aug;115(8):2187–91.
98. Niederkofler V, Salie R, Arber S. Hemojuvelin is essential for dietary iron sensing, and its mutation leads to severe iron overload. *J Clin Invest*. 2005 Aug;115(8):2180–6.

13. Bibliografia

99. Papanikolaou G, Samuels ME, Ludwig EH, MacDonald MLE, Franchini PL, Dubé M-P, et al. Mutations in HFE2 cause iron overload in chromosome 1q-linked juvenile hemochromatosis. *Nat Genet.* 2004 Jan;36(1):77–82.
100. Chen W, Huang FW, de Renshaw TB, Andrews NC. Skeletal muscle hemojuvelin is dispensable for systemic iron homeostasis. *Blood.* 2011 Jun 9;117(23):6319–25.
101. Wu Q, Sun CC, Lin HY, Babitt JL. Repulsive guidance molecule (RGM) family proteins exhibit differential binding kinetics for bone morphogenetic proteins (BMPs). *PLoS One.* 2012;7(9):e46307.
102. Xia Y, Babitt JL, Sidis Y, Chung RT, Lin HY. Hemojuvelin regulates hepcidin expression via a selective subset of BMP ligands and receptors independently of neogenin. *Blood.* 2008 May 15;111(10):5195–204.
103. Goswami T, Andrews NC. Hereditary hemochromatosis protein, HFE, interaction with transferrin receptor 2 suggests a molecular mechanism for mammalian iron sensing. *J Biol Chem.* 2006 Sep 29;281(39):28494–8.
104. Johnson MB, Chen J, Murchison N, Green FA, Enns CA. Transferrin receptor 2: evidence for ligand-induced stabilization and redirection to a recycling pathway. *Mol Biol Cell.* 2007 Mar;18(3):743–54.
105. Johnson MB, Enns CA. Diferric transferrin regulates transferrin receptor 2 protein stability. *Blood.* 2004 Dec 15;104(13):4287–93.
106. Ramos E, Kautz L, Rodriguez R, Hansen M, Gabayan V, Ginzburg Y, et al. Evidence for distinct pathways of hepcidin regulation by acute and chronic iron loading in mice. *Hepatology.* 2011 Apr;53(4):1333–41.
107. Robb A, Wessling-Resnick M. Regulation of transferrin receptor 2 protein levels by transferrin. *Blood.* 2004 Dec 15;104(13):4294–9.
108. Kawabata H, Yang R, Hiramata T, Vuong PT, Kawano S, Gombart AF, et al. Molecular cloning of transferrin receptor 2. A new member of the transferrin receptor-like family. *J Biol Chem.* 1999 Jul 23;274(30):20826–32.
109. Fleming RE, Ahmann JR, Migas MC, Waheed A, Koeffler HP, Kawabata H, et al. Targeted mutagenesis of the murine transferrin receptor-2 gene produces hemochromatosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Aug 6;99(16):10653–8.

110. Camaschella C, Roetto A, Calì A, De Gobbi M, Garozzo G, Carella M, et al. The gene TFR2 is mutated in a new type of haemochromatosis mapping to 7q22. *Nat Genet.* 2000 May;25(1):14–5.
111. Lebrón JA, West AP, Bjorkman PJ. The hemochromatosis protein HFE competes with transferrin for binding to the transferrin receptor. *J Mol Biol.* 1999 Nov 19;294(1):239–45.
112. Schmidt PJ, Fleming MD. Transgenic HFE-dependent induction of hepcidin in mice does not require transferrin receptor-2. *Am J Hematol.* 2012 Jun;87(6):588–95.
113. Wallace DF, Summerville L, Crampton EM, Frazer DM, Anderson GJ, Subramaniam VN. Combined deletion of Hfe and transferrin receptor 2 in mice leads to marked dysregulation of hepcidin and iron overload. *Hepatology.* 2009 Dec;50(6):1992–2000.
114. D’Alessio F, Hentze MW, Muckenthaler MU. The hemochromatosis proteins HFE, TfR2, and HJV form a membrane-associated protein complex for hepcidin regulation. *J Hepatol.* 2012 Nov;57(5):1052–60.
115. Schmidt PJ, Toran PT, Giannetti AM, Bjorkman PJ, Andrews NC. The transferrin receptor modulates Hfe-dependent regulation of hepcidin expression. *Cell Metab.* 2008 Mar;7(3):205–14.
116. Cook JD, Skikne BS, Baynes RD. Serum Transferrin Receptor. *Annu Rev Med.* 1993 Feb;44(1):63–74.
117. Skikne BS. Serum transferrin receptor. *Am J Hematol.* 2008 Nov;83(11):872–5.
118. Corradini E, Garuti C, Montosi G, Ventura P, Andriopoulos B, Lin HY, et al. Bone morphogenetic protein signaling is impaired in an HFE knockout mouse model of hemochromatosis. *Gastroenterology.* 2009 Oct;137(4):1489–97.
119. Kautz L, Meynard D, Besson-Fournier C, Darnaud V, Al Saati T, Coppin H, et al. BMP/Smad signaling is not enhanced in Hfe-deficient mice despite increased Bmp6 expression. *Blood.* 2009 Sep 17;114(12):2515–20.
120. Andriopoulos B, Corradini E, Xia Y, Faasse SA, Chen S, Grgurevic L, et al. BMP6 is a key endogenous regulator of hepcidin expression and iron metabolism. *Nat Genet.* 2009 Apr;41(4):482–7.

### 13. Bibliografia

121. Lee DH, Zhou LJ, Zhou Z et al. Neogenin inhibits HJV secretion and regulates BMP induced hepcidin expression and iron homeostasis. *Blood*. 2010;115:3136–3145.
122. Zhang A-S, Yang F, Wang J, Tsukamoto H, Enns CA. Hemojuvelin-neogenin interaction is required for bone morphogenic protein-4-induced hepcidin expression. *J Biol Chem*. 2009 Aug 21;284(34):22580–9.
123. Du X, She E, Gelbart T, Truksa J, Lee P, Xia Y, et al. The serine protease TMPRSS6 is required to sense iron deficiency. *Science*. 2008 May 23;320(5879):1088–92.
124. Finberg KE, Heeney MM, Campagna DR, Aydinok Y, Pearson HA, Hartman KR, et al. Mutations in TMPRSS6 cause iron-refractory iron deficiency anemia (IRIDA). *Nat Genet*. 2008 May;40(5):569–71.
125. Silvestri L, Pagani A, Nai A, De Domenico I, Kaplan J, Camaschella C. The serine protease matriptase-2 (TMPRSS6) inhibits hepcidin activation by cleaving membrane hemojuvelin. *Cell Metab*. 2008 Dec;8(6):502–11.
126. Finberg KE, Whittlesey RL, Fleming MD, Andrews NC. Down-regulation of Bmp/Smad signaling by Tmprss6 is required for maintenance of systemic iron homeostasis. *Blood*. 2010 May 6;115(18):3817–26.
127. Folgueras AR, de Lara FM, Pendás AM, Garabaya C, Rodríguez F, Astudillo A, et al. Membrane-bound serine protease matriptase-2 (Tmprss6) is an essential regulator of iron homeostasis. *Blood*. 2008 Sep 15;112(6):2539–45.
128. Zhang A-S, Gao J, Koeberl DD, Enns CA. The role of hepatocyte hemojuvelin in the regulation of bone morphogenic protein-6 and hepcidin expression in vivo. *J Biol Chem*. 2010 May 28;285(22):16416–23.
129. Kautz L, Meynard D, Monnier A, Darnaud V, Bouvet R, Wang R-H, et al. Iron regulates phosphorylation of Smad1/5/8 and gene expression of Bmp6, Smad7, Id1, and Atoh8 in the mouse liver. *Blood*. 2008 Aug 15;112(4):1503–9.
130. Cazzola M, Finch CA. Iron balance in thalassemia. *Prog Clin Biol Res*. 1989;309:93–100.

131. Pippard MJ, Callender ST, Warner GT, Weatherall DJ. Iron absorption and loading in beta-thalassaemia intermedia. *Lancet* (London, England). 1979 Oct 20;2(8147):819–21.
132. Peyssonnaud C, Zinkernagel AS, Schuepbach RA, Rankin E, Vaulont S, Haase VH, et al. Regulation of iron homeostasis by the hypoxia-inducible transcription factors (HIFs). *J Clin Invest*. 2007 Jul;117(7):1926–32.
133. Pietrangelo A, Dierssen U, Valli L, Garuti C, Rump A, Corradini E, et al. STAT3 is required for IL-6-gp130-dependent activation of hepcidin in vivo. *Gastroenterology*. 2007 Jan;132(1):294–300.
134. Liu Q, Davidoff O, Niss K, Haase VH. Hypoxia-inducible factor regulates hepcidin via erythropoietin-induced erythropoiesis. *J Clin Invest*. 2012 Dec 3;122(12):4635–44.
135. Mastrogiannaki M, Matak P, Mathieu JRR, Delga S, Mayeux P, Vaulont S, et al. Hepatic hypoxia-inducible factor-2 down-regulates hepcidin expression in mice through an erythropoietin-mediated increase in erythropoiesis. *Haematologica*. 2012 Jun 1;97(6):827–34.
136. Pak M, Lopez MA, Gabayan V, Ganz T, Rivera S. Suppression of hepcidin during anemia requires erythropoietic activity. *Blood*. 2006 Dec 1;108(12):3730–5.
137. Vokurka M, Krijt J, Sulc K, Necas E. Hepcidin mRNA levels in mouse liver respond to inhibition of erythropoiesis. *Physiol Res*. 2006;55(6):667–74.
138. Nai A, Rubio A, Campanella A, Goubeyre O, Artuso I, Bordini J, et al. Limiting hepatic Bmp-Smad signaling by matriptase-2 is required for erythropoietin-mediated hepcidin suppression in mice. *Blood*. 2016 May 12;127(19):2327–36.
139. Ganz T. Hepcidin--a peptide hormone at the interface of innate immunity and iron metabolism. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2006 Jan;306:183–98.
140. Vecchi C, Montosi G, Zhang K, Lamberti I, Duncan SA, Kaufman RJ, et al. ER stress controls iron metabolism through induction of hepcidin. *Science*. 2009 Aug 14;325(5942):877–80.
141. Fujita N, Horiike S, Sugimoto R, Tanaka H, Iwasa M, Kobayashi Y, et al. Hepatic oxidative DNA damage correlates with iron overload in chronic hepatitis C patients. *Free Radic Biol Med*. 2007 Feb 1;42(3):353–62.

13. Bibliografia

142. Fujita N, Sugimoto R, Takeo M, Urawa N, Mifuji R, Tanaka H, et al. Hepcidin expression in the liver: relatively low level in patients with chronic hepatitis C. *Mol Med*. 2007;13(1–2):97–104.
143. Girelli D, Pasino M, Goodnough JB, Nemeth E, Guido M, Castagna A, et al. Reduced serum hepcidin levels in patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol*. 2009 Nov;51(5):845–52.
144. Harrison-Findik DD. Role of alcohol in the regulation of iron metabolism. *World J Gastroenterol*. 2007 Oct 7;13(37):4925–30.
145. Harrison-Findik DD. Is the iron regulatory hormone hepcidin a risk factor for alcoholic liver disease? *World J Gastroenterol*. 2009 Mar 14;15(10):1186–93.
146. Harrison-Findik DD, Schafer D, Klein E, Timchenko NA, Kulaksiz H, Clemens D, et al. Alcohol metabolism-mediated oxidative stress down-regulates hepcidin transcription and leads to increased duodenal iron transporter expression. *J Biol Chem*. 2006 Aug 11;281(32):22974–82.
147. Kowdley K V. Alcohol intake and iron overload: another role for hepcidin? Kowdley K, McCaughan G, Trautwein C, editors. *Hepatology*. 2007 Feb;45(2):541–3.
148. Nishina S, Hino K, Korenaga M, Vecchi C, Pietrangelo A, Mizukami Y, et al. Hepatitis C virus-induced reactive oxygen species raise hepatic iron level in mice by reducing hepcidin transcription. *Gastroenterology*. 2008 Jan;134(1):226–38.
149. Ohtake T, Saito H, Hosoki Y, Inoue M, Miyoshi S, Suzuki Y, et al. Hpcidin is down-regulated in alcohol loading. *Alcohol Clin Exp Res*. 2007 Jan;31(1 Suppl):S2-8.
150. Sugimoto R, Fujita N, Tomosugi N, Hara N, Miyachi H, Tanaka H, et al. Impaired regulation of serum hepcidin during phlebotomy in patients with chronic hepatitis C. *Hepatol Res*. 2009 Jun;39(6):619–24.
151. Barton JC, Acton RT. Hemochromatosis and *Vibrio vulnificus* wound infections. *J Clin Gastroenterol*. 2009 Oct;43(9):890–3.
152. Bergmann TK, Vinding K, Hey H. Multiple hepatic abscesses due to *Yersinia enterocolitica* infection secondary to primary haemochromatosis. *Scand J Gastroenterol*. 2001 Aug;36(8):891–5.

153. Gerhard GS, Levin KA, Price Goldstein J, Wojnar MM, Chorney MJ, Belchis DA. *Vibrio vulnificus* septicemia in a patient with the hemochromatosis HFE C282Y mutation. *Arch Pathol Lab Med*. 2001 Aug;125(8):1107–9.
154. Höpfner M, Nitsche R, Rohr A, Harms D, Schubert S, Fölsch UR. *Yersinia enterocolitica* infection with multiple liver abscesses uncovering a primary hemochromatosis. *Scand J Gastroenterol*. 2001 Feb;36(2):220–4.
155. Dunn LL, Rahmanto YS, Richardson DR. Iron uptake and metabolism in the new millennium. *Trends Cell Biol*. 2007 Feb;17(2):93–100.
156. De Domenico I, Zhang TY, Koenig CL, Branch RW, London N, Lo E, et al. Hepcidin mediates transcriptional changes that modulate acute cytokine-induced inflammatory responses in mice. *J Clin Invest*. 2010 Jul 1;120(7):2395–405.
157. Pagani A, Nai A, Corna G, Bosurgi L, Rovere-Querini P, Camaschella C, et al. Low hepcidin accounts for the proinflammatory status associated with iron deficiency. *Blood*. 2011 Jul 21;118(3):736–46.
158. Brissot P, Bardou-Jacquet E, Jouanolle A-M, Loréal O. Iron disorders of genetic origin: a changing world. *Trends Mol Med*. 2011 Dec;17(12):707–13.
159. Camaschella C, Poggiali E. Inherited disorders of iron metabolism. *Curr Opin Pediatr*. 2011 Feb;23(1):14–20.
160. Fillet G, Beguin Y, Baldelli L. Model of reticuloendothelial iron metabolism in humans: abnormal behavior in idiopathic hemochromatosis and in inflammation. *Blood*. 1989 Aug 1;74(2):844–51.
161. Gan EK, Powell LW, Olynyk JK. Natural history and management of HFE-hemochromatosis. *Semin Liver Dis*. 2011 Aug 7;31(3):293–301.
162. Pietrangelo A, Caleffi A, Corradini E. Non-HFE hepatic iron overload. *Semin Liver Dis*. 2011 Aug 7;31(3):302–18.
163. Anderson ER, Taylor M, Xue X, Martin A, Moons DS, Omary MB, et al. The hypoxia-inducible factor-C/EBP $\alpha$  axis controls ethanol-mediated hepcidin repression. *Mol Cell Biol*. 2012 Oct 1;32(19):4068–77.
164. Fletcher LM, Powell LW. Hemochromatosis and alcoholic liver disease. *Alcohol*. 2003 Jun;30(2):131–6.

13. Bibliografia

165. Pietrangelo A, Montosi G, Totaro A, Garuti C, Conte D, Cassanelli S, et al. Hereditary hemochromatosis in adults without pathogenic mutations in the hemochromatosis gene. *N Engl J Med*. 1999 Sep 2;341(10):725–32.
166. Sham RL, Phatak PD, West C et al. Autosomal dominant hereditary hemochromatosis associated with a novel ferroportin mutation and unique clinical features. *Blood Cells Mol Dis*. 2005;34:157–161.
167. Lok CY, Merryweather-Clarke AT, Viprakasit V, Chinthammitr Y, Srichairatanakool S, Limwongse C, et al. Iron overload in the Asian community. *Blood*. 2009 Jul 2;114(1):20–5.
168. Montosi G, Donovan A, Totaro A, Garuti C, Pignatti E, Cassanelli S, et al. Autosomal-dominant hemochromatosis is associated with a mutation in the ferroportin (SLC11A3) gene. *J Clin Invest*. 2001 Aug;108(4):619–23.
169. Njajou OT, Vaessen N, Joosse M, Berghuis B, van Dongen JW, Breuning MH, et al. A mutation in SLC11A3 is associated with autosomal dominant hemochromatosis. *Nat Genet*. 2001 Jul;28(3):213–4.
170. Pietrangelo A. Hereditary hemochromatosis--a new look at an old disease. *N Engl J Med*. 2004 Jun 3;350(23):2383–97.
171. Feder JN, Gnirke A, Thomas W et al. A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nat Genet*. 1996;13:399–408.
172. Bridle KR, Frazer DM, Wilkins SJ, Dixon JL, Purdie DM, Crawford DHG, et al. Disrupted hepcidin regulation in HFE-associated haemochromatosis and the liver as a regulator of body iron homeostasis. *Lancet (London, England)*. 2003 Feb 22;361(9358):669–73.
173. Gehrke SG, Kulaksiz H, Herrmann T, Riedel H-D, Bents K, Veltkamp C, et al. Expression of hepcidin in hereditary hemochromatosis: evidence for a regulation in response to the serum transferrin saturation and to non-transferrin-bound iron. *Blood*. 2003 Jul 1;102(1):371–6.
174. Plattner HC, Nussbaumer T RA. [Juvenile and familial hemochromatosis with endocrinomyocardiac syndrome.]. *Helv Med Acta*. 1951;18:499–502.
175. Nemeth E, Roetto A, Garozzo G, Ganz T, Camaschella C. Hepcidin is decreased in TFR2 hemochromatosis. *Blood*. 2005 Feb 15;105(4):1803–6.



176. Piubelli C, Castagna A, Marchi G, Rizzi M, Busti F, Badar S, et al. Identification of New BMP6 Pro-Peptide Mutations in Patients with Iron Overload. *Am J Hematol*. 2017 Mar 23;
177. Pietrangelo A, Caleffi A, Henrion J, Ferrara F, Corradini E, Kulaksiz H, et al. Juvenile hemochromatosis associated with pathogenic mutations of adult hemochromatosis genes. *Gastroenterology*. 2005 Feb;128(2):470–9.
178. Finberg KE. Iron-refractory iron deficiency anemia. *Semin Hematol*. 2009 Oct;46(4):378–86.
179. Melis MA, Cau M, Congiu R, Sole G, Barella S, Cao A, et al. A mutation in the TMPRSS6 gene, encoding a transmembrane serine protease that suppresses hepcidin production, in familial iron deficiency anemia refractory to oral iron. *Haematologica*. 2008 Oct 1;93(10):1473–9.
180. Von Recklinghausen F. Hamochromatose. *Tageblatt der Naturforschenden Versammlung*. 1889;324.
181. Simon M, Pawlotsky Y, Bourel M, Fauchet R, Genetet B. [Letter: Idiopathic hemochromatosis associated with HL-A 3 tissular antigen]. *Nouv Presse Med*. 1975 May 10;4(19):1432.
182. Edwards CQ, Griffen LM, Goldgar D, Drummond C, Skolnick MH, Kushner JP. Prevalence of hemochromatosis among 11,065 presumably healthy blood donors. *N Engl J Med*. 1988 May 26;318(21):1355–62.
183. Phatak PD, Sham RL, Raubertas RF, Dunnigan K, O’Leary MT, Braggins C, et al. Prevalence of hereditary hemochromatosis in 16031 primary care patients. *Ann Intern Med*. 1998 Dec 1;129(11):954–61.
184. European Association for the Study of the Liver. EASL clinical practice guidelines for HFE hemochromatosis. *J Hepatol*. 2010;53(1):3–22.
185. Adams PC, Reboussin DM, Barton JC, McLaren CE, Eckfeldt JH, McLaren GD, et al. Hemochromatosis and iron-overload screening in a racially diverse population. *N Engl J Med*. 2005 Apr 28;352(17):1769–78.
186. Phatak PD, Bonkovsky HL, Kowdley K V. Hereditary hemochromatosis: time for targeted screening. *Ann Intern Med*. 2008 Aug 19;149(4):270–2.

13. Bibliografia

187. Mura C, Raguenes O FC. HFE mutations analysis in 711 hemochromatosis probands: evidence for S65C implication in mild form of hemochromatosis. *Blood Cells Mol Dis.* 1999;93:2502–5.
188. Olynyk JK, Cullen DJ AS et al. A population-based study of the clinical expression of the hemochromatosis gene. *N Engl J Med.* 1999;(341):718–24.
189. Bach V, Barceló MJ, Altés A, Remacha A, Félez J BM. Genotyping the HFE gene by melting point analysis with the LightCycler system: Pros and cons. *Blood Cells, Mol Dis.* 2006;36:288–91.
190. Phatak PD, Ryan DH, Cappuccio J, Oakes D, Braggins C, Provenzano K, et al. Prevalence and Penetrance of HFE Mutations in 4865 Unselected Primary Care Patients 1. *Blood Cells Mol Dis.* 2002;29(1):41–7.
191. Beutler E, Felitti VJ, Koziol JA, Ho NJ, Gelbart T. Penetrance of 845G--> A (C282Y) HFE hereditary haemochromatosis mutation in the USA. *Lancet* (London, England). 2002 Jan 19;359(9302):211–8.
192. Njajou OT, Houwing-Duistermaat JJ, Osborne RH, Vaessen N, Vergeer J, Heeringa J, et al. A population-based study of the effect of the HFE C282Y and H63D mutations on iron metabolism. *Eur J Hum Genet.* 2003 Mar 2;11(3):225–31.
193. Merryweather-Clarke AT, Pointon JJ, Sherman JD RK. Global prevalence of putative haemochromatosis mutations. *J Med Genet.* 1997 Apr;34(4):265–8.
194. 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 Mar;122(3):646–51.
195. Bacon BR, Adams PC, Kowdley K V, Powell LW, Tavill AS. Diagnosis and management of hemochromatosis: 2011 practice guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases. C(Baltimore, Md). 2011 Jul;54(1):328–43.
196. Sánchez M, Villa M, Ingelmo M, Sanz C, Bruguera M, Ascaso C, et al. Population screening for hemochromatosis: a study in 5370 Spanish blood donors. *J Hepatol.* 2003 Jun;38(6):745–50.

197. Altes A, Ruiz A, Barceló MJ, Remacha AF, Puig T, Maya AJ, et al. Prevalence of the C282Y, H63D, and S65C Mutations of the *HFE* Gene in 1,146 Newborns from a Region of Northern Spain. *Genet Test*. 2004 Dec;8(4):407–10.
198. 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 Jul;50(1):94–101.
199. Lim EM, Rossi E, De Boer WB, Reed WD, Jeffrey GP. Hepatic iron loading in patients with compound heterozygous HFE mutations. *Liver Int*. 2004 Dec;24(6):631–6.
200. Walsh A, Dixon JL, Ramm GA, Hewett DG, Lincoln DJ, Anderson GJ, et al. The clinical relevance of compound heterozygosity for the C282Y and H63D substitutions in hemochromatosis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2006 Nov;4(11):1403–10.
201. Pietrangelo A. Heparin in human iron disorders: therapeutic implications. *J Hepatol*. 2011 Jan;54(1):173–81.
202. Harrison SA, Bacon BR. Relation of hemochromatosis with hepatocellular carcinoma: epidemiology, natural history, pathophysiology, screening, treatment, and prevention. *Med Clin North Am*. 2005 Mar;89(2):391–409.
203. Valenti L, Varena M, Fracanzani AL, Rossi V, Fargion S, Sinigaglia L. Association between iron overload and osteoporosis in patients with hereditary hemochromatosis. *Osteoporos Int*. 2009 Apr;20(4):549–55.
204. Guggenbuhl P, Deugnier Y, Boisdet JF, Rolland Y, Perdriger A, Pawlotsky Y, et al. Bone mineral density in men with genetic hemochromatosis and HFE gene mutation. *Osteoporos Int*. 2005 Dec;16(12):1809–14.
205. Valenti L, Dongiovanni P, Fracanzani AL, Santorelli G, Fatta E, Bertelli C, et al. Increased susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease in heterozygotes for the mutation responsible for hereditary hemochromatosis. *Dig Liver Dis*. 2003 Mar;35(3):172–8.
206. Guyader D, Jacquelinet C, Moirand R et al. Noninvasive prediction of fibrosis in C282Y homozygous hemochromatosis. *Gastroenterology*. 1998;115:929–936.

207. Whitlock EP, Garlitz BA, Harris EL et al. Screening for hereditary hemochromatosis: a systematic review for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med.* 2006;145:209–223.
208. Powell LW, Dixon JL, Ramm GA et al. Screening for hemochromatosis in asymptomatic subjects with or without a family history. *Arch Intern Med.* 2006;166:294–301.
209. Gleeson F, Ryan E, Barrett S et al. Clinical expression of haemochromatosis in Irish C282Y homozygotes identified through family screening. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2004;16:859–863.
210. Olynyk JK, Hagan SE, Cullen DJ et al. Evolution of untreated hereditary hemochromatosis in the Busseton population: a 17-year study. Olynyk JK, Hagan SE, Cullen DJ, al. 2004;79:309–313.
211. Andersen RV, Tybjaerg-Hansen A, Appleyard M et al. Hemochromatosis mutations in the general population: iron overload progression rate. *Blood.* 2004;103:2914–2919.
212. Allen KJ, Gurrin LC, Constantine CC et al. . Iron-overload-related disease in HFE hereditary hemochromatosis. *N Engl J Med.* 2008;358:221–230.
213. Jacolot S, Le Gac G, Scotet V et al. HAMP as a modifier gene that increases the phenotypic expression of the HFE pC282Y homozygous genotype. *Blood.* 2004;103:2835–2840.
214. Le Gac G, Scotet V, Ka C et al. The recently identified type 2A juvenile haemochromatosis gene (HJV), a second candidate modifier of the C282Y homozygous phenotype. *Hum Mol Genet.* 2004;13:1913–1918.
215. Lee PL, Gelbart T, West C et al. A study of genes that may modulate the expression of hereditary hemochromatosis: transferrin receptor-1, ferroportin, ceruloplasmin, ferritin light and heavy chains, iron regulatory proteins (IRP)-1 and -2, and hepcidin. *Blood Cells Mol Dis.* 2001;27:783–802.
216. Lee P, Gelbart T, West C et al. Seeking candidate mutations that affect iron homeostasis. *Blood Cells Mol Dis.* 2002;29:471–487.

217. Van Vlierberghe H, Langlois M, Delanghe J et al. Haptoglobin phenotype 2-2 overrepresentation in Cys282Tyr hemochromatotic patients. *J Hepatol.* 2001;35:707–711.
218. Carter K, Bowen DJ, McCune CA et al. Haptoglobin type neither influences iron accumulation in normal subjects nor predicts clinical presentation in HFE C282Y haemochromatosis: phenotype and genotype analysis. *Br J Haematol.* 2003;(122):326–332.
219. Kelleher T, Ryan E, Barrett S et al. DMT1 genetic variability is not responsible for phenotype variability in hereditary hemochromatosis. *Blood Cells Mol Dis.* 2004;33:35–39.
220. Osterreicher CH, Datz C, Stickel F et al. TGF-beta1 codon 25 gene polymorphism is associated with cirrhosis in patients with hereditary hemochromatosis. *Cytokine.* 2005;31:142–148.
221. Milet J, Dehais V, Bourgain C et al. Common variants in the BMP2, BMP4, and HJV genes of the hepcidin regulation pathway modulate HFE hemochromatosis penetrance. *Am J Hum Genet.* 2007;81:799–807.
222. Fletcher LM, Dixon JL, Purdie DM, Powell LW, Crawford DHG. Excess alcohol greatly increases the prevalence of cirrhosis in hereditary hemochromatosis. *Gastroenterology.* 2002 Feb;122(2):281–9.
223. Thompson HJ, Kennedy K, Witt M, Juzefyk J. Effect of dietary iron deficiency or excess on the induction of mammary carcinogenesis by 1-methyl-1-nitrosourea. *Carcinogenesis.* 1991 Jan;12(1):111–4.
224. Diwan BA, Kasprzak KS, Anderson LM. Promotion of dimethylbenz[a]anthracene-initiated mammary carcinogenesis by iron in female Sprague-Dawley rats. *Carcinogenesis.* 1997 Sep;18(9):1757–62.
225. Mannello F, Tonti GA, Medda V, Simone P, Darbre PD. Analysis of aluminium content and iron homeostasis in nipple aspirate fluids from healthy women and breast cancer-affected patients. *J Appl Toxicol.* 2011 Apr;31(3):262–9.
226. Shizukuda Y, Bolan CD, Tripodi DJ, Yau Y-Y, Nguyen TT, Botello G, et al. Significance of left atrial contractile function in asymptomatic subjects with hereditary hemochromatosis. *Am J Cardiol.* 2006 Oct 1;98(7):954–9.

13. Bibliografía

227. Shizukuda Y, Bolan CD, Nguyen TT, Botello G, Tripodi DJ, Yau Y-Y, et al. Oxidative stress in asymptomatic subjects with hereditary hemochromatosis. *Am J Hematol.* 2007 Mar;82(3):249–50.
228. Murphy CJ, Oudit GY. Iron-overload cardiomyopathy: pathophysiology, diagnosis, and treatment. *J Card Fail.* 2010 Nov;16(11):888–900.
229. Asberg A, Hveem K, Thorstensen K, Ellekjer E, Kannelønning K, Fjøsne U, et al. Screening for hemochromatosis: high prevalence and low morbidity in an unselected population of 65,238 persons. *Scand J Gastroenterol.* 2001 Oct;36(10):1108–15.
230. Adams P, Brissot P, Powell LW. EASL International Consensus Conference on Haemochromatosis. *J Hepatol.* 2000 Sep;33(3):485–504.
231. Beaton M, Guyader D, Deugnier Y et al. Noninvasive prediction of cirrhosis in C282Y-linked hemochromatosis. *Hepatology.* 2002;36:673–678.
232. Morrison ED, Brandhagen DJ, Phatak PD et al. Serum ferritin level predicts advanced hepatic fibrosis among U.S. patients with phenotypic hemochromatosis. *Ann Intern Med.* 2003;138:627–633.
233. Bruix J, Sherman M. Management of hepatocellular carcinoma: an update. *Hepatology.* 2011 Mar;53(3):1020–2.
234. Altés, Albert, Alústiza, José María, Arrizabalaga, Beatriz et al. Utilidad de la resonancia magnética en el diagnóstico de la sobrecarga férrica. *Farmacéutica N*, editor. 2012.
235. Alústiza Echeverría JM, Castiella Eguzkiza A, De Juan Echávarri M, Emparanza Knorr JI, Artetxe Okasar J, Uranga Uranga M, et al. [Diagnosis and quantification of iron overload in the liver using MRI]. *Radiología.* 50(1):29–36.
236. Alústiza JM, Artetxe J, Castiella A, Agirre C, Emparanza JI, Otazua P, et al. MR quantification of hepatic iron concentration. *Radiology.* 2004 Feb;230(2):479–84.
237. Altés A, Pérez-Lucena MJ, Bruguera M, Comisión de Hiperferritinemia del Grupo Ibérico de Ferropatología. Sistemática diagnóstica en la hiperferritinemia. *Med Clin (Barc).* 2014 May 6;142(9):412–7.

238. Gan EK, Ayonrinde OT, Trinder D, Olynyk JK. Phenotypic expression of hereditary hemochromatosis: what have we learned from the population studies? *Curr Gastroenterol Rep*. 2010 Feb;12(1):7–12.
239. Rossi E, Olynyk JK, Jeffrey GP. Clinical penetrance of C282Y homozygous HFE hemochromatosis. *Expert Rev Hematol*. 2008 Dec;1(2):205–16.
240. Iron Disorders [Internet]. Iron Disorders Institute. Available from: <http://www.irondisorders.org/>
241. Hauner H. Insulin resistance and the metabolic syndrome—a challenge of the new millennium. *Eur J Clin Nutr*. 2002 Mar;56 Suppl 1:S25-9.
242. Alkerwi A, Donneau A-F, Sauvageot N, Lair M-L, Scheen A, Albert A, et al. Prevalence of the metabolic syndrome in Luxembourg according to the Joint Interim Statement definition estimated from the ORISCAV-LUX study. *BMC Public Health*. 2011 Jan 4;11(1):4.
243. Mancia G, De Backer G, Dominiczak A, Cifkova R, Fagard R, Germano G, et al. 2007 Guidelines for the Management of Arterial Hypertension: The Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *J Hypertens*. 2007 Jun;25(6):1105–87.
244. Cordero Fort A, Moreno Arribas J, Martín Arnau A, Nasarre Lorite E, Alegría Barrero E, Alegría Ezquerro E. [Prevalence of metabolic syndrome and association with ischemic heart disease in cardiological outpatients]. *Rev clínica española*. 2006 Jun;206(6):259–65.
245. Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet*. 2005 Jan;365(9468):1415–28.
246. Galassi A, Reynolds K, He J. Metabolic syndrome and risk of cardiovascular disease: a meta-analysis. *Am J Med*. 2006 Oct;119(10):812–9.
247. Grundy SM, Brewer HB, Cleeman JI, Smith SC, Lenfant C. Definition of metabolic syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Circulation*. 2004 Jan 27;109(3):433–8.

248. Zimmet P, Alberti KG, Shaw J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature*. 2001 Dec 13;414(6865):782–7.
249. Zimmet PZ, Alberti KGMM, Shaw JE. Mainstreaming the metabolic syndrome: a definitive definition. *Med J Aust*. 2005 Aug 15;183(4):175–6.
250. Hanefeld M LW. Das metabolische Syndrom. *Dtsch Gesundheitswes*. 1981;36:545–51.
251. Alberti KGMM, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, et al. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International . *Circulation*. 2009 Oct 20;120(16):1640–5.
252. Fernández-Bergés D, Cabrera de León A, Sanz H, Elosua R, Guembe MJ, Alzamora M, et al. Metabolic syndrome in Spain: prevalence and coronary risk associated with harmonized definition and WHO proposal. DARIOS study. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*. 2012 Mar;65(3):241–8.
253. Sarmiento Méndez LM, Roca-Cusachs Coll A, Arroyo Díaz JA, Benet Gustà MT, Solé Villa MJ, Franco Peral M. [Comparison of the definitions of the metabolic syndrome according to ATP III and IDF]. *Rev clínica española*. Jan;208(7):333–8.
254. Alberti G. Introduction to the metabolic syndrome. *Eur Hear J Suppl*. 2005;7((supplement D)):D3–5.
255. Reaven GM. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*. 1988 Dec;37(12):1595–607.
256. Lemieux I, Pascot A, Couillard C, Lamarche B, Tchernof A, Alméras N, et al. Hypertriglyceridemic waist: A marker of the atherogenic metabolic triad (hyperinsulinemia; hyperapolipoprotein B; small, dense LDL) in men? *Circulation*. 2000 Jul 11;102(2):179–84.
257. Kaplan NM. The deadly quartet. Upper-body obesity, glucose intolerance, hypertriglyceridemia, and hypertension. *Arch Intern Med*. 1989 Jul;149(7):1514–20.
258. Fagan TC, Deedwania PC. The cardiovascular dysmetabolic syndrome. *Am J Med*. 1998 Jul 6;105(1A):77S–82S.



259. World Health Organization W. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Report of a WHO consultation. [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/66040/1/WHO\\_NCD\\_NCS\\_99.2.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/66040/1/WHO_NCD_NCS_99.2.pdf). 1999. p. 1–59.
260. Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA*. 2001 May 16;285(19):2486–97.
261. American College of Endocrinology position statement on the insulin resistance syndrome. [Internet]. Available from: <https://www.aace.com/files/american-college-of-endocrinology-position-statement-on-the-insulin-resistance-syndrome>.
262. Cameron AJ, Shaw JE, Zimmet PZ. The metabolic syndrome: prevalence in worldwide populations. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2004 Jun;33(2):351–75, table of contents.
263. Alberti KGM, Zimmet P, Shaw J. The metabolic syndrome—a new worldwide definition. *Lancet*. 2005 Sep;366(9491):1059–62.
264. Simmons RK, Alberti KGMM, Gale EAM, Colagiuri S, Tuomilehto J, Qiao Q, et al. The metabolic syndrome: useful concept or clinical tool? Report of a WHO Expert Consultation. *Diabetologia*. 2010 Apr 11;53(4):600–5.
265. Lear SA, Teo K, Gasevic D, Zhang X, Poirier PP, Rangarajan S, et al. The association between ownership of common household devices and obesity and diabetes in high, middle and low income countries. *CMAJ*. 2014 Mar 4;186(4):258–66.
266. Myint PK, Kwok CS, Luben RN, Wareham NJ, Khaw K-T. Body fat percentage, body mass index and waist-to-hip ratio as predictors of mortality and cardiovascular disease. *Heart*. 2014 Oct 15;100(20):1613–9.
267. George DK, Goldwurm S, MacDonald GA, Cowley LL, Walker NI, Ward PJ, et al. Increased hepatic iron concentration in nonalcoholic steatohepatitis is associated with increased fibrosis. *Gastroenterology*. 1998 Feb;114(2):311–8.

268. Fernández-Real JM, Peñarroja G, Castro A, García-Bragado F, López-Bermejo A, Ricart W. Blood letting in high-ferritin type 2 diabetes: effects on vascular reactivity. *Diabetes Care*. 2002 Dec;25(12):2249–55.
269. Fargion S, Mattioli M, Fracanzani AL, Sampietro M, Tavazzi D, Fociani P, et al. Hyperferritinemia, iron overload, and multiple metabolic alterations identify patients at risk for nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol*. 2001 Aug;96(8):2448–55.
270. Wood RJ. The iron-heart disease connection: is it dead or just hiding? *Ageing Res Rev*. 2004 Jul;3(3):355–67.
271. Mendler MH, Turlin B, Moirand R, Jouanolle AM, Sapey T, Guyader D, et al. Insulin resistance-associated hepatic iron overload. *Gastroenterology*. 1999 Nov;117(5):1155–63.
272. Fierbințeanu-Braticevici C, Bengus A, Neamțu M, Usvat R. The risk factors of fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis. *Rom J Intern Med*. 2002 Jan;40(1–4):81–8.
273. Dubern B, Girardet J-P, Tounian P. Insulin resistance and ferritin as major determinants of abnormal serum aminotransferase in severely obese children. *Int J Pediatr Obes*. 2006 Jan;1(2):77–82.
274. Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, Donato KA, Eckel RH, Franklin BA, et al. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute scientific statement: Executive Summary. *Crit Pathw Cardiol*. 2005 Dec;4(4):198–203.
275. Low S, Chin MC, Deurenberg-Yap M. Review on epidemic of obesity. *Ann Acad Med Singapore*. 2009 Jan;38(1):57–9.
276. Datz C, Felder TK, Niederseer D, Aigner E. Iron homeostasis in the Metabolic Syndrome. *Eur J Clin Invest*. 2013;43(2):215–24.
277. del Giudice EM, Santoro N, Amato A, Brienza C, Calabrò P, Wiegerinck ET, et al. Hepcidin in obese children as a potential mediator of the association between obesity and iron deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009 Dec;94(12):5102–7.

278. Aeberli I, Hurrell RF, Zimmermann MB. Overweight children have higher circulating hepcidin concentrations and lower iron status but have dietary iron intakes and bioavailability comparable with normal weight children. *Int J Obes.* 2009 Oct 28;33(10):1111–7.
279. Aigner E, Theurl I, Theurl M, Lederer D, Haufe H, Dietze O, et al. Pathways underlying iron accumulation in human nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Clin Nutr.* 2008 May;87(5):1374–83.
280. Barisani D, Pelucchi S, Mariani R, Galimberti S, Trombini P, Fumagalli D, et al. Hepcidin and iron-related gene expression in subjects with Dysmetabolic Hepatic Iron Overload. *J Hepatol.* 2008 Jul;49(1):123–33.
281. Mujica-Coopman MF, Brito A, López de Romaña D, Pizarro F, Olivares M. Body mass index, iron absorption and iron status in childbearing age women. *J Trace Elem Med Biol.* 2015 Apr;30:215–9.
282. Ruivard M, Lainé F, Ganz T, Olbina G, Westerman M, Nemeth E, et al. Iron absorption in dysmetabolic iron overload syndrome is decreased and correlates with increased plasma hepcidin. *J Hepatol.* 2009 Jun;50(6):1219–25.
283. McClung JP, Karl JP. Iron deficiency and obesity: the contribution of inflammation and diminished iron absorption. *Nutr Rev.* 2009 Feb;67(2):100–4.
284. Moirand R, Mortaji AM, Loréal O, Paillard F, Brissot P, Deugnier Y. A new syndrome of liver iron overload with normal transferrin saturation. *Lancet (London, England).* 1997 Jan 11;349(9045):95–7.
285. Turlin B, Mendler MH, Moirand R, Guyader D, Guillygomarc'h A, Deugnier Y. Histologic features of the liver in insulin resistance-associated iron overload. A study of 139 patients. *Am J Clin Pathol.* 2001 Aug;116(2):263–70.
286. Dongiovanni P, Fracanzani AL, Fargion S, Valenti L. Iron in fatty liver and in the metabolic syndrome: a promising therapeutic target. *J Hepatol.* 2011 Oct;55(4):920–32.
287. Adams PC, Barton JC. A diagnostic approach to hyperferritinemia with a non-elevated transferrin saturation. *J Hepatol.* 2011 Aug;55(2):453–8.

288. Martinelli N, Traglia M, Campostrini N, Biino G, Corbella M, Sala C, et al. Increased Serum Hepcidin Levels in Subjects with the Metabolic Syndrome: A Population Study. *PLoS One*. 2012;7(10).
289. Fernández-Real JM, McClain D, Manco M. Mechanisms Linking Glucose Homeostasis and Iron Metabolism Toward the Onset and Progression of Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*. 2015 Nov 22;38(11):2169–76.
290. Wenzel BJ, Stults HB, Mayer J. Hypoferraemia in obese adolescents. *Lancet* (London, England). 1962 Aug 18;2(7251):327–8.
291. Seltzer CC, Mayer J. SERUM IRON AND IRON-BINDING CAPACITY IN ADOLESCENTS. II. COMPARISON OF OBESE AND NONOBESE SUBJECTS. *Am J Clin Nutr*. 1963 Dec;13:354–61.
292. Manios Y, Moschonis G, Chrousos GP, Lionis C, Mougios V, Kantilafi M, et al. The double burden of obesity and iron deficiency on children and adolescents in Greece: the Healthy Growth Study. *J Hum Nutr Diet*. 2013 Oct;26(5):470–8.
293. Nead KG, Halterman JS, Kaczorowski JM, Auinger P, Weitzman M. Overweight children and adolescents: a risk group for iron deficiency. *Pediatrics*. 2004 Jul;114(1):104–8.
294. Pinhas-Hamiel O, Newfield RS, Koren I, Agmon A, Lilos P, Phillip M. Greater prevalence of iron deficiency in overweight and obese children and adolescents. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2003 Mar;27(3):416–8.
295. Moayeri H, Bidad K, Zadhoush S, Gholami N, Anari S. Increasing prevalence of iron deficiency in overweight and obese children and adolescents (Tehran Adolescent Obesity Study). *Eur J Pediatr*. 2006 Nov 30;165(11):813–4.
296. Shi Z, Lien N, Kumar BN, Dalen I, Holmboe-Ottesen G. The sociodemographic correlates of nutritional status of school adolescents in Jiangsu Province, China. *J Adolesc Health*. 2005 Oct;37(4):313–22.
297. Tussing-Humphreys LM, Liang H, Nemeth E, Freels S, Braunschweig CA. Excess adiposity, inflammation, and iron-deficiency in female adolescents. *J Am Diet Assoc*. 2009 Feb;109(2):297–302.

298. Sanad M, Osman M, Gharib A. Obesity modulate serum hepcidin and treatment outcome of iron deficiency anemia in children: a case control study. *Ital J Pediatr.* 2011 Jul 19;37(1):34.
299. Aigner E, Hinz C, Steiner K, Rossmann B, Pflieger J, Hohla F, et al. Iron stores, liver transaminase levels and metabolic risk in healthy teenagers. *Eur J Clin Invest.* 2010 Feb;40(2):155–63.
300. Micozzi MS, Albanes D, Stevens RG. Relation of body size and composition to clinical biochemical and hematologic indices in US men and women. *Am J Clin Nutr.* 1989 Dec;50(6):1276–81.
301. Ozata M, Mergen M, Oktenli C, Aydin A, Sanisoglu SY, Bolu E, et al. Increased oxidative stress and hypozincemia in male obesity. *Clin Biochem.* 2002 Nov;35(8):627–31.
302. Lefebvre P, Letois F, Sultan A, Nocca D, Mura T, Galtier F. Nutrient deficiencies in patients with obesity considering bariatric surgery: a cross-sectional study. *Surg Obes Relat Dis.* 2014 May;10(3):540–6.
303. Cheng HL, Bryant C, Cook R, O'Connor H, Rooney K, Steinbeck K. The relationship between obesity and hypoferraemia in adults: a systematic review. *Obes Rev.* 2012 Feb;13(2):150–61.
304. Cepeda-Lopez AC, Osendarp SJ, Melse-Boonstra A, Aeberli I, Gonzalez-Salazar F, Feskens E, et al. Sharply higher rates of iron deficiency in obese Mexican women and children are predicted by obesity-related inflammation rather than by differences in dietary iron intake. *Am J Clin Nutr.* 2011 May 1;93(5):975–83.
305. Tussing-Humphreys LM, Nemeth E, Fantuzzi G, Freels S, Guzman G, Holterman A-XL, et al. Elevated systemic hepcidin and iron depletion in obese premenopausal females. *Obesity (Silver Spring).* 2010 Jul 8;18(7):1449–56.
306. Aigner E, Feldman A, Datz C. Obesity as an emerging risk factor for iron deficiency. *Nutrients.* 2014 Sep 11;6(9):3587–600.
307. Gong L, Yuan F, Teng J, Li X, Zheng S, Lin L, et al. Weight loss, inflammatory markers, and improvements of iron status in overweight and obese children. *J Pediatr.* 2014 Apr;164(4):795–800.e2.

308. Amato A, Santoro N, Calabrò P, Grandone A, Swinkels DW, Perrone L, et al. Effect of body mass index reduction on serum hepcidin levels and iron status in obese children. *Int J Obes (Lond)*. 2010 Dec 28;34(12):1772–4.
309. Di Toro A, Marotta A, Todisco N, Ponticiello E, Collini R, Di Lascio R, et al. Unchanged iron and copper and increased zinc in the blood of obese children after two hypocaloric diets. *Biol Trace Elem Res*. 1997 May;57(2):97–104.
310. Beard J, Borel M, Peterson FJ. Changes in iron status during weight loss with very-low-energy diets. *Am J Clin Nutr*. 1997 Jul;66(1):104–10.
311. Tussing-Humphreys LM, Nemeth E, Fantuzzi G, Freels S, Holterman AL, Galvani C, et al. Decreased serum hepcidin and improved functional iron status 6 months after restrictive bariatric surgery. *Obesity (Silver Spring)*. 2010 Oct;18(10):2010–6.
312. Guillygomarc'h A, Mendler MH, Moirand R, Lainé F, Quentin V, David V, et al. Venesection therapy of insulin resistance-associated hepatic iron overload. *J Hepatol*. 2001 Sep;35(3):344–9.
313. Glass CK, Olefsky JM. Inflammation and lipid signaling in the etiology of insulin resistance. *Cell Metab*. 2012 May 2;15(5):635–45.
314. Prieur X, Rószler T, Ricote M. Lipotoxicity in macrophages: evidence from diseases associated with the metabolic syndrome. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids*. 2010 Mar;1801(3):327–37.
315. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest*. 2003 Dec 15;112(12):1796–808.
316. Tilg H, Moschen AR. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol*. 2006 Oct 22;6(10):772–83.
317. Mather KJ, Goldberg RB. Clinical use of adiponectin as a marker of metabolic dysregulation. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2014 Jan;28(1):107–17.
318. DePaoli AM. 20 years of leptin: leptin in common obesity and associated disorders of metabolism. *J Endocrinol*. 2014 Oct 17;223(1):T71-81.

319. Flehmig G, Scholz M, Klöting N, Fasshauer M, Tönjes A, Stumvoll M, et al. Identification of adipokine clusters related to parameters of fat mass, insulin sensitivity and inflammation. Moro C, editor. *PLoS One*. 2014 Jun 26;9(6):e99785.
320. Wu LE, Samocha-Bonet D, Whitworth PT, Fazakerley DJ, Turner N, Biden TJ, et al. Identification of fatty acid binding protein 4 as an adipokine that regulates insulin secretion during obesity. *Mol Metab*. 2014 Jul;3(4):465–73.
321. Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest*. 2007 Jan 2;117(1):175–84.
322. Gregor MF, Hotamisligil GS. Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu Rev Immunol*. 2011 Apr 23;29(1):415–45.
323. Fisiogenómica y salud. Obesidad e inflamación [Internet]. 2016. Available from: <http://www.fisiogenomica.es/2016/06/obesidad-e-inflamacion.html>
324. Martín-Domínguez V, González-Casas R, Mendoza-Jiménez-Ridruejo J, García-Buey L, Moreno-Otero R. Pathogenesis, diagnosis and treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *Rev Esp Enferm Dig*. 2013 Aug;105(7):409–20.
325. Kowdley K V, Belt P, Wilson L a, Yeh MM, Neuschwander-Tetri B a, Chalasani N, et al. Serum ferritin is an independent predictor of histologic severity and advanced fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2012;55(1):77–85.
326. Sorrentino P, D'Angelo S, Ferbo U, Micheli P, Bracigliano A, Vecchione R. Liver iron excess in patients with hepatocellular carcinoma developed on non-alcoholic steato-hepatitis. *J Hepatol*. 2009 Feb;50(2):351–7.
327. Hernaez R, Yeung E, Clark JM, Kowdley K V, Brancati FL, Kao WHL. Hemochromatosis gene and nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis. *J Hepatol*. 2011 Nov;55(5):1079–85.
328. Nelson JE, Brunt EM, Kowdley K V, Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network. Lower serum hepcidin and greater parenchymal iron in nonalcoholic fatty liver disease patients with C282Y HFE mutations. *Hepatology*. 2012 Nov;56(5):1730–40.

### 13. Bibliografia

329. Adams LA, Lymp JF, St Sauver J, Sanderson SO, Lindor KD, Feldstein A, et al. The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: a population-based cohort study. *Gastroenterology*. 2005 Jul;129(1):113–21.
330. Chitturi S, Weltman M, Farrell GC, McDonald D, Kench J, Liddle C, et al. HFE mutations, hepatic iron, and fibrosis: ethnic-specific association of NASH with C282Y but not with fibrotic severity. *Hepatology*. 2002 Jul;36(1):142–9.
331. Jehn M, Clark JM, Guallar E. Serum ferritin and risk of the metabolic syndrome in U.S. adults. *Diabetes Care*. 2004 Oct;27(10):2422–8.
332. Fernández-Real JM, McClain D, Manco M. Mechanisms Linking Glucose Homeostasis and Iron Metabolism Toward the Onset and Progression of Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*. 2015 Nov 22;38(11):2169–76.
333. Ford ES, Cogswell ME. Diabetes and serum ferritin concentration among U.S. adults. *Diabetes Care*. 1999 Dec;22(12):1978–83.
334. Lao TT, Chan PL, Tam KF. Gestational diabetes mellitus in the last trimester - a feature of maternal iron excess? *Diabet Med*. 2001 Mar;18(3):218–23.
335. Jiang R, Manson JE, Meigs JB, Ma J, Rifai N, Hu FB. Body iron stores in relation to risk of type 2 diabetes in apparently healthy women. *JAMA*. 2004 Feb 11;291(6):711–7.
336. Buyschaert M, Paris I, Selvais P, Hermans MP. Clinical aspects of diabetes secondary to idiopathic haemochromatosis in French-speaking Belgium. *Diabetes Metab*. 1997 Sep;23(4):308–13.
337. Moirand R, Adams PC, Bicheler V, Brissot P, Deugnier Y. Clinical features of genetic hemochromatosis in women compared with men. *Ann Intern Med*. 1997 Jul 15;127(2):105–10.
338. Hatunic M, Finucane FM, Brennan AM, Norris S, Pacini G, Nolan JJ. Effect of iron overload on glucose metabolism in patients with hereditary hemochromatosis. *Metabolism*. 2010 Mar;59(3):380–4.
339. McClain DA, Abraham D, Rogers J, Brady R, Gault P, Ajioka R, et al. High prevalence of abnormal glucose homeostasis secondary to decreased insulin secretion in individuals with hereditary haemochromatosis. *Diabetologia*. 2006 Jul 15;49(7):1661–9.



340. Aregbesola AA, Voutilainen S, Virtanen JK, Aregbesola AA, Tuomainen T-P. Serum hepcidin concentrations and type 2 diabetes. *World J Diabetes*. Baishideng Publishing Group Inc; 2015 Jul 10;6(7):978–82.
341. Fernandez-Real JM, Equitani F, Moreno JM, Manco M, Ortega F, Ricart W. Study of circulating prohepcidin in association with insulin sensitivity and changing iron stores. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94(3):982–8.
342. Wang H, Li H, Jiang X, Shi W, Shen Z, Li M. Hepcidin is directly regulated by insulin and plays an important role in iron overload in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes*. 2014 May;63(5):1506–18.
343. Niederau C, Berger M, Stremmel W, Starke A, Strohmeyer G, Ebert R, et al. Hyperinsulinaemia in non-cirrhotic haemochromatosis: impaired hepatic insulin degradation? *Diabetologia*. 1984 Jun;26(6):441–4.
344. Davis RJ, Corvera S, Czech MP. Insulin stimulates cellular iron uptake and causes the redistribution of intracellular transferrin receptors to the plasma membrane. *J Biol Chem*. 1986 Jul 5;261(19):8708–11.
345. Jiang F, Sun ZZ, Tang YT, Xu C, Jiao XY. Hepcidin expression and iron parameters change in Type 2 diabetic patients. *Diabetes Res Clin Pract*. Elsevier Ireland Ltd; 2011;93(1):43–8.
346. Pihan-Le Bars F, Bonnet F, Loréal O, Le Loupp A-G, Ropert M, Letessier E, et al. Indicators of iron status are correlated with adiponectin expression in adipose tissue of patients with morbid obesity. *Diabetes Metab*. 2016 Apr;42(2):105–11.
347. Fernández-Real JM, Blasco G, Puig J, Moreno M, Xifra G, Sánchez-Gonzalez J, et al. Adipose tissue R2\* signal is increased in subjects with obesity: A preliminary MRI study. *Obesity (Silver Spring)*. 2016 Feb;24(2):352–8.
348. Moreno-Navarrete JM, Blasco G, Xifra G, Karczewska-Kupczewska M, Stefanowicz M, Matulewicz N, et al. Obesity Is Associated With Gene Expression and Imaging Markers of Iron Accumulation in Skeletal Muscle. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016 Mar;101(3):1282–9.
349. Green A, Basile R, Rumberger JM. Transferrin and iron induce insulin resistance of glucose transport in adipocytes. *Metabolism*. 2006 Aug;55(8):1042–5.

### 13. Bibliografia

350. Ku B-J, Kim S-Y, Lee T-Y, Park K-S. Serum ferritin is inversely correlated with serum adiponectin level: population-based cross-sectional study. *Dis Markers*. 2009 Jan;27(6):303–10.
351. Ellervik C, Marott JL, Tybjærg-Hansen A, Schnohr P, Nordestgaard BG. Total and cause-specific mortality by moderately and markedly increased ferritin concentrations: general population study and metaanalysis. *Clin Chem*. 2014 Nov 1;60(11):1419–28.
352. Fernández-Real JM, Moreno JM, Ricart W. Circulating retinol-binding protein-4 concentration might reflect insulin resistance-associated iron overload. *Diabetes*. 2008 Jul;57(7):1918–25.
353. Fernández-Real JM, Moreno JM, Chico B, López-Bermejo A, Ricart W. Circulating visfatin is associated with parameters of iron metabolism in subjects with altered glucose tolerance. *Diabetes Care*. 2007 Mar;30(3):616–21.
354. Chung B, Matak P, McKie AT, Sharp P. Leptin increases the expression of the iron regulatory hormone hepcidin in HuH7 human hepatoma cells. *J Nutr*. 2007 Nov;137(11):2366–70.
355. Kalra S, Gupta Y. Blood donation by persons with diabetes. *Diabet Med*. 2016 Dec 19;
356. Adams PC, Speechley M, Kertesz AE. Long-term survival analysis in hereditary hemochromatosis. *Gastroenterology*. 1991 Aug;101(2):368–72.
357. Niederau C, Fischer R, Pürschel A, Stremmel W, Häussinger D, Strohmeyer G. Long-term survival in patients with hereditary hemochromatosis. *Gastroenterology*. 1996 Apr;110(4):1107–19.
358. Falize L, Guillygomarc'h A, Perrin M, Lainé F, Guyader D, Brissot P, et al. Reversibility of hepatic fibrosis in treated genetic hemochromatosis: a study of 36 cases. *Hepatology*. 2006 Aug;44(2):472–7.
359. Dongiovanni P, Valenti L, Ludovica Fracanzani A, Gatti S, Cairo G, Fargion S. Iron depletion by deferoxamine up-regulates glucose uptake and insulin signaling in hepatoma cells and in rat liver. *Am J Pathol*. 2008 Mar;172(3):738–47.
360. Ashrafian H. Hepcidin: the missing link between hemochromatosis and infections. *Infect Immun*. 2003 Dec;71(12):6693–700.

361. Barton JC, Grindon AJ, Barton NH, Bertoli LF. Hemochromatosis probands as blood donors. *Transfusion*. 1999 Jun;39(6):578–85.
362. Li H, Rybicki AC, Suzuka SM, von Bonsdorff L, Breuer W, Hall CB, et al. Transferrin therapy ameliorates disease in beta-thalassemic mice. *Nat Med*. 2010 Feb 24;16(2):177–82.
363. Breda L, Gardenghi S, Guy E, Rachmilewitz EA, Weizer-Stern O, Adamsky K, et al. Exploring the role of hepcidin, an antimicrobial and iron regulatory peptide, in increased iron absorption in beta-thalassemia. *Ann N Y Acad Sci*. 2005 Nov;1054(1):417–22.
364. Rivera S, Nemeth E, Gabayan V, Lopez MA, Farshidi D, Ganz T. Synthetic hepcidin causes rapid dose-dependent hypoferrremia and is concentrated in ferroportin-containing organs. *Blood*. 2005 Sep 15;106(6):2196–9.
365. Parrow NL, Gardenghi S, Rivella S. Prospects for a hepcidin mimic to treat  $\beta$ -thalassemia and hemochromatosis. *Expert Rev Hematol*. 2011 Jun 10;4(3):233–5.
366. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2004 Jan 1;(Supplement\_1).
367. World Health Organization. Obesity: Preventing and Managing the Global Epidemic. 1998.
368. Salonen JT, Nyssönen K, Korpela H, Tuomilehto J, Seppänen R, Salonen R. High stored iron levels are associated with excess risk of myocardial infarction in eastern Finnish men. *Circulation*. 1992 Sep;86(3):803–11.
369. Klipstein-Grobusch K, Koster JF, Grobbee DE, Lindemans J, Boeing H, Hofman A, et al. Serum ferritin and risk of myocardial infarction in the elderly: the Rotterdam Study. *Am J Clin Nutr*. 1999 Jun;69(6):1231–6.
370. Turner RC, Holman RR, Matthews D, Hockaday TD, Peto J. Insulin deficiency and insulin resistance interaction in diabetes: estimation of their relative contribution by feedback analysis from basal plasma insulin and glucose concentrations. *Metabolism*. 1979 Nov;28(11):1086–96.

371. Juncà S, Guillén M, Aragay JM, Brugulat P C, C, Séculi E et al. Aspectos metodológicos de la evaluación de los objetivos de salud y disminución de riesgo del Plan de Salud de Cataluña para el año 2000. *Med Clin*. 2003;121(Supl 1):10–9.
372. Altés A, Ruiz MA, Castell C, Roure E, Tresserras R. [Iron deficiency and iron overload in an adult population in Catalonia, Spain]. *Med Clin (Barc)*. 2004 Jun 26;123(4):131–3.
373. Fleming DJ, Jacques PF, Tucker KL, Massaro JM, D'Agostino RB, Wilson PW, et al. Iron status of the free-living, elderly Framingham Heart Study cohort: an iron-replete population with a high prevalence of elevated iron stores. *Am J Clin Nutr*. 2001 Mar;73(3):638–46.
374. Milman N, Byg K-E, Ovesen L, Kirchhoff M, Jørgensen KS-L. Iron status in Danish men 1984-94: a cohort comparison of changes in iron stores and the prevalence of iron deficiency and iron overload. *Eur J Haematol*. 2002 Jun;68(6):332–40.
375. Milman N, Byg K-E, Ovesen L, Kirchhoff M, Jørgensen KS-L. Iron status in Danish women, 1984-1994: a cohort comparison of changes in iron stores and the prevalence of iron deficiency and iron overload. *Eur J Haematol*. 2003 Jul;71(1):51–61.
376. Tavill AS, American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, American Gastroenterological Association. Diagnosis and management of hemochromatosis. *Hepatology*. 2001 May;33(5):1321–8.
377. Bassett ML, Halliday JW, Ferris RA, Powell LW. Diagnosis of hemochromatosis in young subjects: predictive accuracy of biochemical screening tests. *Gastroenterology*. 1984 Sep;87(3):628–33.
378. Pietrangelo A. Hemochromatosis: An endocrine liver disease. *Hepatology*. 2007 Oct;46(4):1291–301.
379. Bacon BR, Olynyk JK, Brunt EM, Britton RS, Wolff RK. HFE genotype in patients with hemochromatosis and other liver diseases. *Ann Intern Med*. 1999 Jun 15;130(12):953–62.
380. Qaseem A, Aronson M, Fitterman N, Snow V, Weiss KB, Owens DK, et al. Screening for hereditary hemochromatosis: a clinical practice guideline from the American College of Physicians. *Ann Intern Med*. 2005 Oct 4;143(7):517–21.

381. Simcox JA, McClain DA. Iron and diabetes risk. *Cell Metab.* 2013 Mar 5;17(3):329–41.
382. Baiget M, Barceló MJ, Gimferrer E. Frequency of the HFE C282Y and H63D mutations in distinct ethnic groups living in Spain. *J Med Genet.* 1998 Aug;35(8):701.
383. Aguilar-Martinez P, Picot MC, Becker F, Boulot P, Montoya F, Mares P, et al. Prevalence of HFE mutations in people from North Africa living in southern France. *Br J Haematol.* 2001 Sep;114(4):914–6.
384. Cimburova M, Putova I, Provaznikova H, Horak J. Hereditary hemochromatosis: detection of C282Y and H63D mutations in HFE gene by means of Guthrie cards in population of Czech Republic. *Genet Epidemiol.* 2002 Oct;23(3):260–3.
385. Salvioni A, Mariani R, Oberkanins C, Moritz A, Mauri V, Pelucchi S, et al. Prevalence of C282Y and E168X HFE mutations in an Italian population of Northern European ancestry. *Haematologica.* 2003 Mar;88(3):250–5.
386. Remacha AF, Barceló MJ, Sardà MP, Blesa I, Altés A, Baiget M. The S65C mutation in Spain. Implications for iron overload screening. *Haematologica.* 2000 Dec;85(12):1324–5.
387. Waalen J, Felitti VJ, Gelbart T, Beutler E. Screening for hemochromatosis by measuring ferritin levels: a more effective approach. *Blood.* 2008 Apr 1;111(7):3373–6.
388. Levi S, Girelli D, Perrone F, Pasti M, Beaumont C, Corrocher R, et al. Analysis of ferritins in lymphoblastoid cell lines and in the lens of subjects with hereditary hyperferritinemia-cataract syndrome. *Blood.* 1998 Jun 1;91(11):4180–7.
389. Yamashita C, Adams PC. Natural history of the C282Y homozygote for the hemochromatosis gene (HFE) with a normal serum ferritin level. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2003 Sep;1(5):388–91.
390. Soriguer F, Goday A, Bosch-Comas A, Bordiú E, Calle-Pascual A, Carmena R, et al. Prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose regulation in Spain: the Di@bet.es Study. *Diabetologia.* 2012 Jan 11;55(1):88–93.

391. Alegría E, Cordero A, Laclaustra M, Grima A, León M, Casasnovas JA, et al. [Prevalence of metabolic syndrome in the Spanish working population: MESYAS registry]. *Rev Esp Cardiol*. 2005 Jul;58(7):797–806.
392. Bérez V, Camps J, Arija V, Aranda N, Fernández-Ballart J, Vilella E, et al. Soluble transferrin receptor and mutations in hemochromatosis and transferrin genes in a general Catalan population. *Clin Chim Acta*. 2005 Mar;353(1–2):205–8.
393. Cook JD. Defining optimal body iron. *Proc Nutr Soc*. 1999 May;58(2):489–95.
394. Beguin Y. Soluble transferrin receptor for the evaluation of erythropoiesis and iron status. *Clin Chim Acta*. 2003 Mar;329(1–2):9–22.
395. Chambers EC, Heshka S, Gallagher D, Wang J, Pi-Sunyer FX, Pierson RN. Serum iron and body fat distribution in a multiethnic cohort of adults living in New York City. *J Am Diet Assoc*. 2006 May;106(5):680–4.
396. Menzie CM, Yanoff LB, Denkinger BI, McHugh T, Sebring NG, Calis KA, et al. Obesity-related hypoferrremia is not explained by differences in reported intake of heme and nonheme iron or intake of dietary factors that can affect iron absorption. *J Am Diet Assoc*. 2008 Jan;108(1):145–8.
397. Baynes RD. Assessment of iron status. *Clin Biochem*. 1996 Jun;29(3):209–15.
398. Borel MJ, Smith SM, Derr J, Beard JL. Day-to-day variation in iron-status indices in healthy men and women. *Am J Clin Nutr*. 1991 Oct;54(4):729–35.
399. Lecube A, Carrera A, Losada E, Hernández C, Simó R, Mesa J. Iron deficiency in obese postmenopausal women. *Obesity (Silver Spring)*. 2006 Oct;14(10):1724–30.
400. Yanoff LB, Menzie CM, Denkinger B, Sebring NG, McHugh T, Remaley AT, et al. Inflammation and iron deficiency in the hypoferrremia of obesity. *Int J Obes (Lond)*. 2007 Sep 17;31(9):1412–9.
401. Camaschella C. Understanding iron homeostasis through genetic analysis of hemochromatosis and related disorders. *Blood*. 2005;106(12):3710–7.
402. Ferrante AW. Obesity-induced inflammation: a metabolic dialogue in the language of inflammation. *J Intern Med*. 2007 Oct;262(4):408–14.

403. Testa U, Petrini M, Quaranta MT, Pelosi-Testa E, Mastroberardino G, Camagna A, et al. Iron up-modulates the expression of transferrin receptors during monocyte-macrophage maturation. *J Biol Chem*. 1989 Aug 5;264(22):13181–7.
404. Ganz T. Heparin in iron metabolism. *Curr Opin Hematol*. 2004 Jul;11(4):251–4.
405. Lok CN, Ponka P. Identification of a hypoxia response element in the transferrin receptor gene. *J Biol Chem*. 1999 Aug 20;274(34):24147–52.
406. Fernández-Real JM, Moreno JM, López-Bermejo A, Chico B, Vendrell J, Ricart W. Circulating soluble transferrin receptor according to glucose tolerance status and insulin sensitivity. *Diabetes Care*. 2007 Mar 1;30(3):604–8.
407. Feelders RA, Kuiper-Kramer EP, van Eijk HG. Structure, function and clinical significance of transferrin receptors. *Clin Chem Lab Med*. 1999 Jan 1;37(1):1–10.
408. Komolova M, Bourque SL, Nakatsu K, Adams MA. Sedentariness and increased visceral adiposity in adult perinatally iron-deficient rats. *Int J Obes (Lond)*. 2008 Sep 8;32(9):1441–4.
409. Fernández-Real JM, López-Bermejo A, Ricart W. Cross-talk between iron metabolism and diabetes. *Diabetes*. 2002 Aug;51(8):2348–54.
410. Cutler P. Deferoxamine therapy in high-ferritin diabetes. *Diabetes*. 1989 Oct;38(10):1207–10.
411. Gabrielsen JS, Gao Y, Simcox JA, Huang J, Thorup D, Jones D, et al. Adipocyte iron regulates adiponectin and insulin sensitivity. *J Clin Invest*. 2012 Oct 1;122(10):3529–40.
412. Mainous AG, Tanner RJ, Coates TD, Baker R. Prediabetes, elevated iron and all-cause mortality: a cohort study. *BMJ Open*. 2014 Dec 11;4(12):e006491.
413. Mascitelli L, Pezzetta F. Reduction of body iron stores and the prevention of type 2 diabetes. *Am J Med*. 2007 Jan;120(1):e13; author reply e15.
414. Zheng X, Jiang T, Wu H, Zhu D, Wang L, Qi R, et al. Hepatic iron stores are increased as assessed by magnetic resonance imaging in a Chinese population with altered glucose homeostasis. *Am J Clin Nutr*. 2011 Oct 1;94(4):1012–9.





## **14. ANNEXES**

---



## 14.1. ANNEX 1

Recomanacions de l'*American Association for the Study of Liver Diseases* (AASLD) 2011

1. En els pacients amb estudis anormals del ferro es recomana que caldria avaluar-los com a pacients amb hemocromatosi, inclús en absència de símptomes (evidència 1A).
2. En tots els pacients amb evidència de malaltia hepàtica caldria fer l'avaluació de l'hemocromatosi (evidència 1B).
3. En pacients amb símptomes suggestius, troballes físiques o història familiar, la combinació d'IST i de ferritina hauria de ser millor que confiar en una única de les dues proves (evidència 1B). Si qualsevol de les dues fos anormal (IST  $\geq$  45 % o ferritina per sobre del límit normal), llavors caldria realitzar l'anàlisi de la mutació del gen *HFE* (evidència 1B).
4. Les estratègies de diagnòstic que utilitzen els marcadors de ferro en sèrum s'haurien d'adreçar a grups d'alt risc en els quals trobem una història familiar d'HH o en els que sospitem una afectació d'òrgans (evidència 1B).
5. El cribratge (estudi dels paràmetres del metabolisme del ferro i l'anàlisi de la mutació *HFE*) està recomanat en els familiars de primer grau dels pacients amb HH relacionada amb l'*HFE* per detectar la malaltia en una fase inicial i poder prevenir les complicacions (evidència 1A).
6. La biòpsia hepàtica es recomana per estudiar l'estudi del grau de la malaltia hepàtica en els homozigots C282Y o en els heterozigots compostos si els enzims hepàtics (ALT i AST) estan elevats o si la ferritina és  $> 1000 \mu\text{g/L}$  (evidència 1B).

7. La biòpsia hepàtica es recomana pel diagnòstic i el pronòstic en els pacients amb marcadors fenotípics de sobrecàrrega fèrrica que no són homozigots C282Y o heterozigots compostos (evidència 2C).
8. En els pacients amb HH no relacionada amb l'*HFE* es recomana que es puguin utilitzar les dades sobre la concentració hepàtica de ferro, juntament amb la tinció histopatològica, per determinar el grau i la distribució cel·lular de la càrrega de ferro present (evidència 2C).
9. Els pacients amb hemocromatosi i sobrecàrrega fèrrica s'haurien de sotmetre a una flebotomia setmanal (si la toleren) (evidència 1A). L'objectiu hauria de ser uns nivells de ferritina de 50-100 µg/L (evidència 1B).
10. En absència d'indicadors suggestius de malaltia hepàtica (elevació de l'ALT, l'AST), els homozigots C282Y que tenen la ferritina elevada (però < 1000 µg/L) haurien de procedir a una flebotomia sense una biòpsia hepàtica prèvia (evidència 1B).
11. Els pacients amb lesió dels òrgans diana deguda a la sobrecàrrega fèrrica haurien de procedir a la flebotomia regular amb els mateixos objectius que els indicats a dalt (evidència 1A).
12. Durant el tractament per l'HH no són necessaris els ajustaments dietètics. Els suplementes de vitamina C i els suplementes de ferro haurien d'estar prohibits (evidència 1C).
13. Els pacients amb hemocromatosi i amb sobrecàrrega fèrrica s'haurien de monitoritzar per evitar l'acumulació de ferro i ser sotmesos a un manteniment amb flebotomies (evidència 1A). L'objectiu de la flebotomia hauria de ser aconseguir un nivell de ferritina de 50-100 µg/L (evidència 1B).

14. Es recomana el tractament amb flebotomia en els pacients amb sobrecàrrega fèrrica no relacionada amb l'*HFE* que tenen una elevada concentració hepàtica de ferro (evidència 1B).
  
15. Els quelants del ferro (deferoxamina o deferasirox) es recomanen en els pacients amb sobrecàrrega fèrrica i amb síndromes diseritropoiètiques o amb anèmia hemolítica crònica (evidència 1A).
  
16. No es recomana el cribratge poblacional de l'*HH* en les poblacions de risc (evidència 1B).



## 14.2. ANNEX 2

En aquest apartat s'exposa un article que, tot i no formar part del cos principal de la tesi doctoral, es va desenvolupar dins la línia d'investigació del grup de recerca.

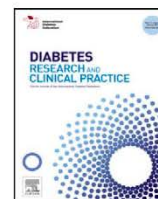
Freixenet N, Vilardell C, Llauro G, Giménez-Palop O, Berlanga E, Gutiérrez C, Caixàs A, Vendrell J, González-Clemente JM. *Men with hyperferritinemia and diabetes in the Mediterranean area do not have a higher iron overload than those without diabetes*. Diabetes Res Clin Pract. 2011 Feb;91(2): e33-e36.







Contents lists available at ScienceDirect

Diabetes Research  
and Clinical Practicejournal homepage: [www.elsevier.com/locate/diabres](http://www.elsevier.com/locate/diabres)International  
Diabetes  
Federation

## Brief report

## Men with hyperferritinemia and diabetes in the Mediterranean area do not have a higher iron overload than those without diabetes

Núria Freixenet<sup>a,\*</sup>, Carme Vilardell<sup>a</sup>, Gemma Llauradó<sup>a</sup>, Olga Giménez-Palop<sup>a</sup>, Eugenio Berlanga<sup>b</sup>, Cristina Gutiérrez<sup>c</sup>, Assumpta Caixàs<sup>a</sup>, Joan Vendrell<sup>c</sup>, José Miguel González-Clemente<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Hospital of Sabadell, Corporació Sanitària i Institut Universitari Parc Taulí (UAB), Sabadell, Spain

<sup>b</sup>UDIAT, Corporació Sanitària i Institut Universitari Parc Taulí (UAB), Sabadell, Spain

<sup>c</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y enfermedades metabólicas asociadas (CIBERDEM), University Hospital of Tarragona Joan XXIII, Pere Virgili Institute, Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, Spain

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 22 May 2010

Received in revised form

27 September 2010

Accepted 4 October 2010

Published on line 4 November 2010

## Keywords:

Iron overload

Type 2 diabetes

Insulin secretion

Insulin sensitivity

Metabolic syndrome

## ABSTRACT

**Aim:** To assess the role of iron overload in type 2 diabetic men with hyperferritinemia.

**Methods:** 150 men were recruited from a genetic screening programme for hereditary hemochromatosis (HH) and were tested for type 2 diabetes, other components of the metabolic syndrome, beta cell function (BCF), insulin sensitivity, high-sensitivity C-reactive protein and iron overload.

**Results:** Fifty-one men had type 2 diabetes. They were older ( $p = 0.017$ ) and 99 had lower BCF ( $p < 0.001$ ) than non-diabetic men. None of the iron overload indexes was associated with diabetes.

**Conclusions:** Our findings dispute a role of iron overload in the pathogenesis of type 2 diabetes.

© 2010 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

An increase in type 2 diabetes, its complications, or other metabolic syndrome components was reported in diverse conditions of iron overload, such as hereditary hemochromatosis (HH) [1,2]. Moreover, a reduction in iron load

through either phlebotomy or iron chelation therapy improves glycemic control in hyperferritinemic subjects with type 2 diabetes [3], suggesting iron overload involvement in the pathogenesis of type 2 diabetes. Three mechanisms have been suggested: (1) insulin deficiency, (2) insulin resistance, and (3) hepatic dysfunction [1]. Iron

\* Corresponding author at: Department of Diabetes, Endocrinology and Nutrition, Hospital de Sabadell, Hospital de Sabadell, Parc Taulí s/n, 08208 Sabadell, Spain. Tel.: +34 93 745 84 12; fax: +34 93 716 06 46.

E-mail address: [nuriafreixenet@hotmail.com](mailto:nuriafreixenet@hotmail.com) (N. Freixenet).

0168-8227/\$ – see front matter © 2010 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

doi:10.1016/j.diabres.2010.10.003

overload is usually assessed through serum ferritin (SF) concentrations. However, SF is influenced by inflammatory mechanisms and some data do not support a role of iron overload in the pathogenesis of type 2 diabetes [4,5] or other components of the metabolic syndrome, such as obesity [6]. Hyperferritinemia is common in clinical practice [7,8], especially in men. Few subjects have HH or other common iron-overload conditions and could be included in the insulin-resistance hepatic iron overload (IR-HIO) syndrome. Subjects with this syndrome are usually middle-aged men with mild to moderate increases in SF concentrations, normal or slightly increased transferrin saturation index (TSI) and an increased prevalence of metabolic syndrome components [9]. This study assesses the role of iron overload in type 2 diabetes in men with hyperferritinemia, detected through a HH genetic screening programme, in which HH and other common conditions associated with hyperferritinemia had previously been excluded.

## 2. Subjects, materials and methods

A 1-year, three-step genetic screening programme for HH involving 4006 Caucasian subjects (2494 women, 1512 men) was carried out in a primary care centre. In step one ( $n = 4006$ ), SF was determined in all attending subjects through routine blood analysis. In the second step, if the previous SF reading was  $>200 \mu\text{g/L}$ , a second one ( $n = 181$ ) was performed 1 month later. This limit of  $200 \mu\text{g/L}$  was chosen due to its prior use in studies evaluating the role of iron overload in cardiovascular disease [10,11] and vascular dysfunction in diabetes [12]. In step three ( $n = 150$ , exclusions were: 17-enolism, 6-hepatopathy, 5-HH and 3-other causes). If the second SF level was also  $>200 \mu\text{g/L}$ , the following were done:

- (1) Anamnesis and physical examination to determine age, sex, alcohol intake, smoking habits, body weight and height to calculate BMI, WC, blood pressure, diabetes mellitus history and drug intake. Obesity was defined according to the WHO definition as a BMI of at least  $30 \text{ kg/m}^2$  [12]. Blood pressure was measured using a mercury sphygmomanometer (mean of three readings in a sitting position after resting for at least 5 min). Alcohol intake was confirmed by at least one family member. Diabetes mellitus was defined according to American Diabetes Association criteria [14].
- (2) Blood samples were taken by venipuncture in the fasting state (10–12 h) to determine: red and white cell counts and indices (including reticulocyte counts), SF, TSI (calculated as  $\text{serum iron} \times 70.9/\text{transferrin}$ ), serum sTfR, plasma glucose, lipid profile (total cholesterol, triglycerides, HDL-cholesterol), insulinemia, high-sensitivity C-reactive protein -hs-CRP-, hepatic enzymes (aspartate aminotransferase – ASAT, alanine aminotransferase – ALAT, gamma glutamil transpeptidase – GGT). All were determined using standard techniques. Anti-hepatitis B core antigen, hepatitis B surface-antigen and antihepatitis C virus were tested through a fully automated microparticle enzyme immunoassay (Abbot GmbH, Wiesbaden-Delkenheim, Germany) and serum insulin concentrations through

ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Insulin resistance was calculated using the homeostatic metabolic assessment insulin resistance index (HOMA-IR) as previously described [15]. Plasma high-sensitive CRP was determined through a highly sensitive immunonephelometry kit (Dade Behring, Marburg, Germany). Ferritin was measured by a turbidimetric fixed rate method (Olympus System Reagent (OSR), Olympus Diagnostica GmbH, Wendenstrabe, Hamburg), transferrin by a turbidimetric end point method (OSR, Olympus Diagnostica GmbH) and serum iron by a photometric colour test for clinical chemistry analysers (OSR, Olympus Diagnostica GmbH). The evaluation of sTfR was done by a commercial immunoassay (QUANTIKINE™, transferrin receptor ELISA kit, R&D Systems, Minneapolis, USA), with intra-assay coefficients of variation of 0.6–3%, and inter-assay coefficients of 2–3% [16]. TSI (calculated as  $\text{serum iron} \times 70.9/\text{transferrin}$ ). C282Y, H63D and S65C HFE mutations were checked following peripheral leukocyte genomic DNA extraction [17].

Samples of plasma, serum and DNA were immediately separated after blood extractions and were frozen at  $-80^\circ\text{C}$  until tests were carried out.

All women were excluded. Exclusion criteria for men were: (1) haemoglobin  $<130 \text{ g/L}$ , (2) mean corpuscular volume  $>98 \text{ fl}$  and/or reticulocyte counts  $>2.5\%$  red cells, (3) inflammatory or infectious diseases during the previous 3 months, (4) neoplastic disease, (5) main known causes of iron overload: alcohol intake  $>20 \text{ g/day}$ , HH (homozygosity for the C282Y HFE mutation), hemolytic anemias, chronic hepatopathy or liver enzymes twice or more times the normal upper limit, (6) serum creatinine concentrations  $>115 \mu\text{mol/L}$ , (7) acute cardiovascular events in the previous 3 months, (8) iron, aspirin or glucocorticoid treatment during the previous year, (9) blood donation during the previous 6 months, (10) active smoking in the previous 6 months, (11) type 1 or 2 diabetes receiving insulin and (12) a variation of more than 3% of body weight in the preceding 3 months or use of drugs that affected body weight. Diabetes mellitus was defined according to American Diabetes Association criteria [14], and those subjects with either impaired fasting glucose or impaired glucose tolerance were included in the non-diabetic group. Signed informed-consent was obtained from all participants. The study was approved by the Ethics Committee and conducted according to the Declaration of Helsinki.

Following screening, men were classified into diabetics (not taking insulin) and non-diabetics. Data are presented as percentages, mean  $\pm$  SD for normally distributed variables or as a median (interquartile range) for those variables not normally distributed (Kolmogorov–Smirnov test). To improve skewness and kurtosis, logarithmic transformation before analysis was used when variables were not normally distributed. These variables were tested for significance on this log scale and then back-transformed to their natural units for illustration in the table. Two study groups were compared using Student's *t*-tests for continuous variables and the  $\chi^2$  test for categorical variables. To adjust for potential confounders between groups we used several logistic regression models with the variable diabetes (yes or no) as the dependent variable



**Table 1 – Comparison between hyperferritinemic men with or without type 2 diabetes.**

	Men without diabetes (n = 99)	Men with diabetes (n = 51)	p
Age (years)	53 (49–66)	60 (54–64)	0.017
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	28.9 ± 3.6	28.8 ± 23.2	0.957
Waist circumference (m)	1.00 ± 0.09	1.00 ± 0.08	0.867
Waist circumference > 1.02 m	28 (28.3)	19 (37.3)	0.296
Systolic blood pressure (mm Hg)	141 ± 17	138 ± 15	0.429
Diastolic blood pressure (mm Hg)	82 ± 11	81 ± 9	0.686
Blood pressure ≥ 130/85 mm Hg or on treatment	81 (81.8)	41 (80.4)	0.791
Fasting plasma glucose (mmol/L)	5.3 ± 0.6	8.9 ± 3.2	<0.001
High-density lipoprotein-cholesterol (mmol/L)	1.37 ± 0.36	1.35 ± 0.34	0.641
TG (mmol/L)	2.05 ± 2.87	1.92 ± 1.32	0.745
TG ≥ 1.69 mmol/L or HDL < 1.03 mmol/L or on treatment	51 (51.5)	28 (54.9)	0.840
HOMA-%B	96 (68–141)	49 (23–78)	<0.001
HOMA-%S	106 ± 71	85 ± 62	0.209
High-sensitivity C-reactive protein (mg/L)	3.0 ± 4.1	4.3 ± 6.2	0.112
Serum ferritin (μg/L)	585 ± 214	576 ± 185	0.213
Transferrin saturation index (%)	36.6 ± 8.4	35.5 ± 12.2	0.624
Soluble transferrin receptors (mg/L)	2.7 ± 1.1	2.4 ± 0.7	0.256
HFE gene mutations			
C282Y	9 (9.1)	4 (7.8)	0.476
H63D	55 (55.6)	18 (35.3)	0.053
S65C	8 (8.1)	2 (3.9)	0.217

Data are expressed as mean ± standard deviation, percentage, or median (interquartile range). TG, triglycerides; HOMA-%B, Homeostasis Model Assessment for beta-cell function; HOMA-%S, Homeostasis Model Assessment for insulin sensitivity.

and other variables as the independents. The latter were those significant in the univariate analysis (except for fasting plasma glucose) and those related to iron metabolism (including HFE test). Study size was calculated to provide a power of 80% to detect a mean difference of 100 μg/L in SF between groups (ratio controls to cases of 2:1;  $\alpha = 0.05$ ). The SPSS statistical programme (v.16.0.1 for Mac; Chicago, IL, USA) was used for all calculations. All p values were 2-sided and a p value <0.05 was considered statistically significant.

### 3. Results

One hundred and fifty non-related men were evaluated consecutively, 51 with type 2 diabetes without insulin and 99 without diabetes (Table 1). Subjects with diabetes were older, had higher fasting plasma glucose and lower BCF (-HOMA-%B-) than subjects without diabetes (Table 1). No significant differences were found between groups regarding other components of the metabolic syndrome, insulin-sensitivity (-HOMA-%S-), hs-CRP, iron overload serum parameters (SF, TSI, sTfR) and HFE gene mutations. No patient had hs-CRP >10 mg/L. A multiple logistic regression analysis with type 2 diabetes as the dependent variable, adjusted for age, WC, hs-CRP, SF, sTfR and the HFE gene H63D mutation confirmed the independent association between a lower BCF and diabetes (OR for HOMA-%B: 0.966 (0.947–0.984);  $p < 0.001$ ).

### 4. Discussion

This study indicates that in hyperferritinemic men without common causes of iron overload, type 2 diabetes subjects do not have higher iron overload (measured through SF, TSI and sTfR) than subjects without diabetes, at least in the Mediter-

anean area. Furthermore, they have a lower BCF (HOMA-%B) but no differences in insulin sensitivity (HOMA-%S), inflammation (hs-CRP) or the other components of the metabolic syndrome were found between groups.

Previous studies using SF for iron overload evaluation concluded that this overload could play a role in type 2 diabetes and its physiopathological complications [1]. However, other authors do not agree [5]. Furthermore, it is well-known that HFE gene mutations in HH are much more frequent in northern Europe than in the Mediterranean area where our study was done. We used several biochemical parameters to assess iron overload in subjects with hyperferritinemia with or without diabetes, after excluding common iron-overload causes. Our results would not support a pathogenic role for iron-overload in type 2 diabetes. Finally, our finding that BCF rather than insulin sensitivity is the main determinant of diabetes is not surprising, considering the role of both BCF and insulin sensitivity in type 2 diabetes pathogenesis [18].

Despite the limitations of the current cross-sectional case-control study, our results dispute a pathogenic role of iron overload in type 2 diabetes [4]. Similar interpretations for central obesity [6] and cardiovascular disease [19], suggest that the role of iron may be more complex than previously thought.

### Acknowledgements

Financial support: Ministerior de Sanidad y Consumo, Instituto de Salud Carlos III (FIS PI050631, PI030459; 2008 Intensification Grant to José Miguel González Clemente); Spain. Associació Catalana de Diabetis (Research Grant).

### Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

## REFERENCES

- [1] Swaminathan S, Fonseca VA, Alam MG, Shah SV. The role of iron in diabetes and its complications. *Diabetes Care* 2007;30:1926–33.
- [2] Fernández-Real JM, López-Bermejo A, Ricart W. Cross-talk between iron metabolism and diabetes. *Diabetes* 2002;51:2348–54.
- [3] Fernández-Real JM, Peñarroja G, Castro A, García-Bragado F, Hernández-Aguado I, Ricart W. Blood letting in high-ferritin type 2 diabetes: effects on insulin sensitivity and beta-cell function. *Diabetes* 2002;51:1000–4.
- [4] Hernández C, Lecube A, Carrera A, Simó R. Soluble transferrin receptors and ferritin in Type 2 diabetic patients. *Diabetic Med* 2005;22:97–101.
- [5] Eshed I, Elis A, Lishner M. Plasma ferritin and type 2 diabetes mellitus: a critical review. *Endocr Res* 2001;27:91–7.
- [6] Freixenet N, Remacha A, Berlanga E, Caixàs A, Giménez-Palop O, Blanco-Vaca F, et al. Serum soluble transferrin receptor concentrations are increased in central obesity. Results from a screening programme for hereditary hemochromatosis in men with hyperferritinemia. *Clin Chim Acta* 2008;400:111–6.
- [7] Beard J. Iron status of free-living elderly individuals. *Am J Clin Nutr* 2001;73:503–4.
- [8] Fleming DJ, Jacques PF, Tucker KL, Massaro JM, D'Agostino RB, Wilson PW, et al. Iron status of the free-living, elderly Framingham Heart Study cohort: an iron-replete population with a high prevalence of elevated iron stores. *Am J Clin Nutr* 2001;73:638–46.
- [9] Bozzini C, Girelli D, Olivieri O, Martinelli N, Bassi A, De Matteis G, et al. Prevalence of body iron excess in the metabolic syndrome. *Diabetes Care* 2005;28:2061–3.
- [10] Salonen JT, Nyyssönen K, Korpela H, Tuomilehto J, Seppänen R, Salonen R. High stored iron levels are associated with excess risk of myocardial infarction in eastern Finnish men. *Circulation* 1992;86:803–11.
- [11] Klipstein-Grobusch K, Koster JF, Grobbee DE, et al. Serum ferritin and risk of myocardial infarction in the elderly: the Rotterdam Study. *Am J Clin Nutr* 1999;69:1231–6.
- [12] Fernández-Real JM, Peñarroja G, Castro A, García-Bragado F, López-Bermejo A, Ricart W. Blood letting in high-ferritin type 2 diabetes: effects on vascular reactivity. *Diabetes Care* 2002;25:2249–55.
- [14] American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2008;31(Suppl. 1):S55–60.
- [15] Wallace TM, Levy JC, Matthews DR. Use and abuse of HOMA modeling. *Diabetes Care* 2004;27:1487–95.
- [16] Remacha AF, Sarda MP, Parellada M, Ubeda J, Manteiga R. The role of serum transferrin receptor in the diagnosis of iron deficiency. *Haematologica* 1998;83:963–6.
- [17] Altés A, Ruiz A, Barceló MJ, et al. Prevalence of the C282Y, H63D, and S65C mutations of the HFE gene in 1,146 newborns from a region of Northern Spain. *Genet Test* 2004;8:407–10.
- [18] Prentki M, Nolan CJ. Islet beta cell failure in type 2 diabetes. *J Clin Invest* 2006;116:1802–12.
- [19] Hu FB. The iron-heart hypothesis: search for the ironclad evidence. *JAMA* 2007;297:639–41.

### 14.1. ANNEX 3

Aquests treballs han estat realitzats amb el suport dels següents ajuts:

- Projecte FIS PI030459 (*Ministerio de Sanidad y Consumo; Instituto de Salud Carlos III*) a J. Félez, 2003-2005. “Identificació precoç d’hemocromatosi hereditària a l’àrea mediterrània des d’atenció primària: Establiment d’un programa de prevenció primària i secundària”.
- Projecte FIS PI050631 (*Ministerio de Sanidad y Consumo; Instituto de Salud Carlos III*) a J.M. González Clemente, 2005-2007. “Inflamació, resistència a la insulina i síndrome metabòlica en subjectes amb sobrecàrrega fèrrica detectats durant un programa d’escrutini d’hemocromatosi a atenció primària. Paper de l’hepcidina”.
- Premi de Recerca de l’Associació Catalana de Diabetis a J.M. González Clemente, 2005. “Sobrecàrrega fèrrica en la patogènia de la síndrome metabòlica”. José Miguel González-Clemente, Núria Freixenet, Gabriel Giménez-Pérez, Vanessa Bach, Montserrat Baiget, Assumpta Caixàs, Àngels Ruiz, Albert Altés, Jordi Félez.
- Ajut d’Intensificació de l’activitat investigadora (*Instituto de Salud Carlos III*) a J.M. González Clemente, 2008.

