

Dipartimento di Medicina e Chirurgia

Dottorato di Ricerca in EMATOLOGIA SPERIMENTALE

XXVIII Ciclo

**VARIABILITA' FENOTIPICA NELL'EMOCROMATOSI:
STUDIO DI DUE POTENZIALI MODIFICATORI
GENETICI IN *PCSK7* E *GNPAT*.**

Tesi di Dottorato di

GRENI FEDERICO

Matricola 714145

Tutor: Prof. ALBERTO PIPERNO

Co-tutor: Dr.ssa SARA PELUCCHI

Coordinatore: Prof. CARLO GAMBACORTI-PASSERINI

ANNO ACCADEMICO 2016-2017

INDICE DELLE FIGURE	3
INDICE DELLE TABELLE.....	3
INTRODUZIONE	7
ASSORBIMENTO, DEPOSITO E TRASPORTO DEL FERRO	9
<i>Assorbimento.</i>	9
<i>Deposito.</i>	10
<i>Trasporto.</i>	10
OMEOSTASI DEL FERRO: I MECCANISMI DI REGOLAZIONE CELLULARE E SISTEMICA	12
<i>Regolazione cellulare.</i>	13
<i>Regolazione sistemica.</i>	14
REGOLATORI POSITIVI E NEGATIVI DELL'ESPRESSIONE DI EPCIDINA.....	15
<i>I regolatori positivi.</i>	15
<i>I regolatori negativi.....</i>	17
LA TOSSICITA' DEL FERRO	17
DEFINIZIONE E CLASSIFICAZIONE DELLE PATOLOGIE ASSOCIATE A SOVRACCARICO DI FERRO	18
L'EMOCROMATOSI DI TIPO 1	22
<i>Cenni storici.....</i>	22
<i>Frequenza e penetranza dell'HH.</i>	22
<i>Penetranza biochimica e clinica.</i>	23
<i>Diagnosi.</i>	23
<i>Terapia.</i>	26
<i>Complicazioni e danno d'organo.....</i>	26
<i>Fibrosi epatica.....</i>	27
EMOCROMATOSI DI TIPO-1: IL RUOLO DEI MODIFICATORI GENETICI ED ACQUISITI	28
<i>I fattori ambientali.</i>	28
<i>I fattori genetici.....</i>	30
SCOPO	34
MATERIALI E METODI.....	37
SELEZIONE DEI PAZIENTI.	38
CRITERI DI INCLUSIONE.....	38
CRITERI DI ESCLUSIONE.....	38
RACCOLTA DEI DATI BIOCHIMICO-CLINICI.	38
ESTRAZIONE DNA DA SANGUE INTERO.	38
ANALISI GENETICA.....	39
ANALISI STATISTICA.....	40
RISULTATI	42
ANALISI DEI POLIMORFISMI GENETICI.	45
<i>Rs11558492 in GNPAT.</i>	45
<i>Rs236918 in PCSK7.....</i>	49
DISCUSSIONE	53
REFERENZE.....	60

INDICE DELLE FIGURE

Figura 1. Il metabolismo del ferro	9
Figura 2. L'assorbimento del ferro: il ruolo dell'enterocita duodenale.....	10
Figura 3. Struttura della ferritina e meccanismo di deposito ed esportazione del ferro.....	11
Figura 4. Motivi strutturali e domini funzionali di <i>HFE</i>	12
Figura 5. La regolazione cellulare dell'omeostasi del ferro: il sistema IRE/IRP	14
Figura 6. Il ruolo di epcidina nella regolazione sistemica dell'omeostasi del ferro.....	15
Figura 7. Regolatori positivi e negativi dell'espressione di epcidina.....	17
Figura 8. Ferro-tossicità e meccanismi di difesa fisiologici.....	18
Figura 9. Penetranza ed espressione dell'emocromatosi: il ruolo dei modificatori.....	23
Figura 10. Algoritmo diagnostico-terapeutico dell'emocromatosi ereditaria	24
Figura 11. Cause e conseguenze del processo di fibrosi epatica.....	28
Figura 12. <i>GNPAT</i> : un potenziale modificatore genetico di sovraccarico di ferro	32
Figura 13. Analisi dei livelli di ferritina sierica in pazienti con emocromatosi e controlli divisi secondo il genotipo (AA vs AG+GG) dell'rs11558492 in <i>GNPAT</i>	46
Figura 14. Analisi della concentrazione di ferro epatico e dei livelli di ferro rimosso nei pazienti e nei soli maschi con emocromatosi divisi secondo il genotipo (AA vs AG+GG) dello SNP	47
Figura 15. Analisi di correlazione tra ferro rimosso, ferritina sierica e concentrazione di ferro epatico in pazienti con emocromatosi ereditaria	48
Figura 16. Distribuzione cumulativa dell'Ishak score in base al genotipo (GG vs GC+CC) dell'rs236918 in <i>PCSK7</i>	49
Figura 17. Analisi dei livelli di ferro rimosso, ferritina sierica e saturazione della transferrina in pazienti con emocromatosi divisi secondo il genotipo (GG vs GC+CC) dell'rs236918 in <i>PCSK7</i>	52
Figura 18. Analisi dell'effetto del ferro rimosso, della ferritina sierica e dell'rs236918 in <i>PCSK7</i> sulla fibrosi epatica grave/cirrosi in pazienti con emocromatosi ereditaria	52

INDICE DELLE TABELLE

Tabella 1. Malattie ereditarie del metabolismo del ferro	21
Tabella 2. Sequenza degli oligonucleotidi utilizzati per l'analisi genetica dei polimorfismi rs11558492 in <i>GNPAT</i> ed rs236918 in <i>PCSK7</i>	41
Tabella 3. Principali caratteristiche biochimico-cliniche di 298 pazienti con genotipo omozigote per la mutazione p.C282Y e 169 donatori di sangue	43
Tabella 4. Descrizione delle caratteristiche demografiche e cliniche dei 187 pazienti con istologia epatica disponibile	44
Tabella 5. Frequenze genotipiche ed alleliche dell'rs11558492 in <i>GNPAT</i> calcolate nell'intera coorte di pazienti e nei donatori di sangue.....	45
Tabella 6. Analisi delle frequenze alleliche e genotipiche in 2 sottogruppi di pazienti selezionati sulla base dell'entità del sovraccarico di ferro.....	47
Tabella 7. Distribuzione delle diverse caratteristiche cliniche in base all'Ishak score	50
Tabella 8. Analisi di regressione con il modello ad odds proporzionali	51

RIASSUNTO

Introduzione e scopo: L'emocromatosi (HH) è una malattia caratterizzata da un progressivo accumulo di ferro nell'organismo. Il difetto genetico prevalente è la mutazione p.C282Y in omozigosi nel gene *HFE*, responsabile di un'anomala produzione del principale regolatore dei livelli di ferro: epcidina. Diverse evidenze hanno dimostrato che l'omozigosi p.C282Y ha penetranza incompleta riconducibile all'azione combinata di modificatori genetici ed acquisiti. Recentemente, l'attenzione si è focalizzata sui polimorfismi rs11558492 in *GNPAT* ed rs236918 in *PCSK7*. Lo scopo della mia tesi è stato quello di analizzare il ruolo di questi potenziali modificatori genetici del fenotipo in una coorte di pazienti italiani omozigoti p.C282Y.

Materiali e metodi: Pazienti: 298 pazienti (205 maschi e 93 femmine) e 169 controlli. Criteri di esclusione: consumo di alcol >50 g/die negli uomini e >30 g/die nelle donne, epatiti croniche, stati infiammatori. Tipizzazione degli SNPs: ARMS-PCR o PCR-RFLP, sequenziamento diretto di campioni casuali. Le frequenze alleliche e genotipiche di pazienti e controlli sono state confrontate, paragonate con quelle del database EVS e messe in relazione con ferritina sierica (SF), concentrazione di ferro epatico (LIC) misurato con biopsia o risonanza magnetica, ferro rimosso (IR) ed il grado di fibrosi definito secondo lo score di Ishak (IS). Il test di Fisher, del chi-quadrato ed il t-test sono stati utilizzati per i confronti statistici tra gruppi e medie delle variabili considerate.

Risultati: Analisi dell'rs11558492 in *GNPAT*. I risultati hanno dimostrato che: a. le frequenze alleliche e genotipiche non sono diverse tra pazienti, controlli e i dati in EVS. Nessuna differenza è stata osservata anche confrontando 2 sottogruppi di pazienti di sesso maschile con fenotipi estremi (SF <1000 µg/L, IR <5 g e/o LIC <100 µmol/g vs SF >2000 µg/L, IR >10 g e/o LIC >250 µmol/g); b. non ci sono differenze tra frequenze alleliche e genotipiche in relazione agli indici del ferro considerati né tra i pazienti né (per quanto riguarda SF) tra i controlli; c. analogamente, non ci sono differenze tra le frequenze alleliche di pazienti con fibrosi assente/lieve e fibrosi grave/cirrosi (20.5% vs 25%). Analisi dell'rs236918 in *PCSK7*. Lo studio ha dimostrato che: a. la frequenza dell'allele minore (C) è più alta nei pazienti con fibrosi grave/cirrosi rispetto a quelli con fibrosi assente/lieve (21.9% vs 7.1%; p=0.003); b. i portatori dell'allele C hanno una maggiore probabilità di avere fibrosi grave/cirrosi rispetto a pazienti wild type (OR=2.77, p=0.0018; OR_{solo maschi}=2.56, p=0.0233). c. l'effetto del genotipo sullo sviluppo della fibrosi grave/cirrosi (OR=3.11, p=0.0157) è diretto, mentre quello indiretto mediato da SF e IR non raggiunge la significatività (analisi di mediazione: 22% e 28%, rispettivamente).

Conclusioni: I nostri risultati indicano che: a. l'rs11558492 in *GNPAT* non è un modificatore dello stato del ferro in pazienti e controlli e non è associato con fibrosi grave/cirrosi in pazienti con HH. b. l'allele C dell'rs236918 in *PCSK7* è un fattore di rischio per lo sviluppo di cirrosi in pazienti con HH di origine italiana.

Introduction and aim: Hereditary hemochromatosis (HH) is a genetic disease characterized by a progressive iron overload in different tissues. Homozygosity for the p.C282Y mutation is the most frequent genotype associated with the disease and it is directly responsible for an inappropriate production of hepcidin, the main regulator of iron homeostasis. Several evidences indicated that p.C282Y homozygous genotype has an incomplete penetrance due to the combined action of genetic and acquired modifier factors. Recently, the attention was focused on *GNPAT* rs11558492 and *PCSK7* rs236918 single nucleotide polymorphisms (SNPs). The aim of my thesis was to analyse the role of these potential genetic modifiers in an Italian cohort of p.C282Y homozygotes.

Materials and methods: Patients: 298 patients (205 males and 93 females) and 169 healthy controls. Exclusion criteria were: alcohol intake >50 g/day in men and >30 g/day in women, chronic hepatitis, inflammatory status. SNPs genotyping was performed by ARMS-PCR or PCR-RFLP. Random samples were confirmed by direct sequencing. Patients and controls allelic and genotypic frequencies were compared to EVS database and analysed according to serum ferritin levels (SF), liver iron concentration (LIC) measured by liver biopsy or magnetic resonance, iron removed (IR) and liver fibrosis histologically assessed by Ishak score (IS). Fisher's exact test, chi-squared test and t-test were used to perform statistical comparisons between groups and averages of considered variables.

Results: *GNPAT* rs11558492 analysis. Our results demonstrated that: a. allelic and genotypic frequencies were comparable among patients, controls and EVS data. No significant differences were found even considering two subgroups of males only with extreme phenotypes (SF <1000 µg/L, IR <5 g and/or LIC <100 µmol/g vs SF >2000 µg/L, IR >10 g and/or LIC > 50 µmol/g); b. according to iron indices, allelic and genotypic frequencies did not significantly differ neither among patients nor compared to controls, limited to SF; c. similarly, minor allele (G) frequency did not differ between patients with absent/mild fibrosis and patients with severe fibrosis/cirrhosis (20.5% vs 25%).

PCSK7 rs236918 analysis. Our study demonstrated that: a. minor allele (C) frequency was higher in patients with severe fibrosis/cirrhosis than in patients with absent/mild fibrosis (21.9% vs 7.1%; $p=0.003$); b. C-allele carriers were more likely to have worse liver staging scores than wild-type patients (OR=2.77, $p=0.0018$; OR_{male-only}=2.56, $p=0.0233$); c. *PCSK7* genotype has a direct effect on severe fibrosis/cirrhosis (OR=3.11, $p=0.0157$) and a mild nonsignificant indirect effect mediated through SF and IR (mediation analysis: 22% and 28%, respectively).

Conclusions: Our results demonstrated that: a. *GNPAT* rs11558492 is not a major modifier of iron status in HH patients and controls, and is not associated with severe fibrosis/cirrhosis in HH patients. b. *PCSK7* rs236918 C allele is a risk factor for cirrhosis development in Italian HH patients.

INTRODUZIONE

Il ferro è un elemento chiave per la sopravvivenza di ogni essere umano, poiché in grado di promuovere indispensabili reazioni metaboliche e fondamentali processi biochimici come il ciclo di Krebs e la respirazione cellulare [1]. In natura, il ferro esiste sotto forma di ione ferroso (Fe^{2+}) e ione ferrico (Fe^{3+}) ed è in grado di interagire attivamente con diversi composti organici come l'eme. Il Fe^{2+} è caratterizzato da un'elevata solubilità e reattività e solo grazie all'azione di specifiche proteine localizzate a livello intestinale viene convertito in Fe^{3+} . Lo ione ferrico, invece, è insolubile e può interagire con proteine o chelanti [2]. Il 65% del ferro totale è destinato alla sintesi di emoglobina e mioglobina, proteine necessarie al trasporto dell'ossigeno dal sangue ai tessuti ed ai muscoli, mentre il funzionamento di enzimi come l'aconitasi, la succinato deidrogenasi e la ribonucleotide reductasi richiedono meno del 5% del ferro totale [3].

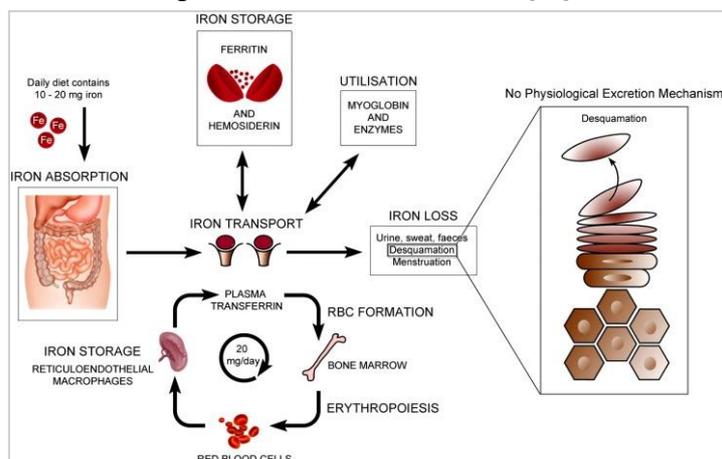
In un adulto sano di 70 kg di peso, la quantità di ferro presente nel corpo è stimata attorno ai 4 grammi ed è finemente regolata da una fitta rete di meccanismi intracellulari. La necessità di una così precisa regolazione scongiura la formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) potenzialmente in grado di causare danni irreversibili a organelli intracitoplasmatici, proteine e DNA. Le reazioni di Fenton ed Haber-Weiss sono i processi biochimici direttamente responsabili della formazione di radicali liberi all'interno della cellula [4].

Nei primi anni duemila, la scoperta di epcidina, il principale regolatore del metabolismo del ferro, ha permesso di fare luce su meccanismi molecolari sconosciuti sino a quel momento. Fisiologicamente, epcidina agisce come un sensore della quantità di ferro presente nell'organismo ed è in grado di interagire ed inibire l'azione di ferroportina (l'unico esportatore di ferro presente nel corpo umano) limitando il rilascio del metallo nel sangue dall'intestino e dal macrofago [5].

Il ferro è presente in tre diversi compartimenti (figura 1): a) funzionale, che promuove il trasporto dell'ossigeno a tutti i distretti corporei mediante emoglobina e mioglobina; b) di trasporto, che grazie alla transferrina circolante (*TF*) veicola il ferro nel torrente circolatorio in modo non tossico [6]; c) di deposito, necessario ad immagazzinare il metallo in ferritina ed emosiderina e renderlo disponibile in caso di necessità [7].

Ognuno di questi compartimenti è attivamente coinvolto in una specifica via metabolica. La via principale coinvolge il sistema eritroide favorendo la sintesi di oltre 100 miliardi di globuli rossi ogni giorno. Il ferro necessario alla sintesi di nuovi eritrociti è principalmente ottenuto dall'eliminazione delle emazie senescenti a livello del macrofago e solo una minima parte (2 mg su 20-25 mg totali) viene assorbita a livello intestinale scongiurando la formazione di radicali liberi [8]. La seconda via metabolica è quella che interessa la cellula epatica, capace di acquisire ferro mediante uno specifico recettore della transferrina (*TFR1*) ed incamerarne una quantità sufficiente a soddisfare le richieste intracellulari con ferritina ed emosiderina. Terza ed ultima via coinvolge il distretto intestinale, deputato all'assorbimento ed all'esportazione del metallo mediante l'azione sinergica di una ferro reductasi (*CYBRD1*), di un trasportatore (*DMT1*) e dell'esportatore ferroportina [5]. In questo modo, l'organismo riesce a controbilanciare le perdite fisiologiche di ferro dovute a micro lesioni degli epiteli a contatto con le sollecitazioni provenienti dall'ambiente esterno o al ciclo mestruale nella donna. Eventuali alterazioni dell'equilibrio assorbimento-eliminazione possono causare ferro-carenza o sovraccarico di ferro ed essere causa di anemia o danno d'organo [9].

Figura 1. Il metabolismo del ferro [10].



ASSORBIMENTO, DEPOSITO e TRASPORTO DEL FERRO

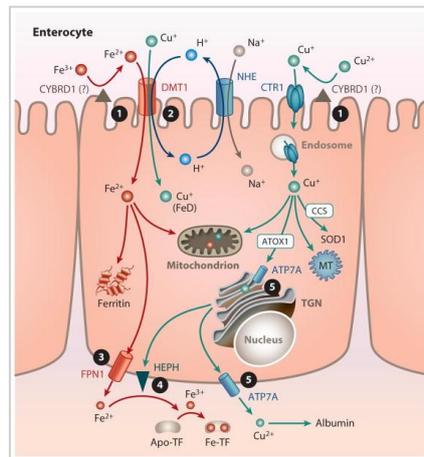
Assorbimento. L'assorbimento del ferro è un processo che interessa i primi due distretti dell'intestino tenue: il duodeno ed il digiuno [11]. A livello duodenale, le cellule attivamente coinvolte nel complesso iter di assorbimento del metallo sono gli enterociti (figura 2). E' qui che sono espresse le proteine responsabili dell'ingresso e della fuoriuscita dello ione nella cellula [12]. Il ferro assorbito dall'intestino viene quotidianamente assunto con la dieta ed è presente in due diverse forme: eme e non-eme [13]. Il ferro eme riesce ad essere assorbito grazie ad un attivo coinvolgimento di un *carrier* localizzato nella porzione apicale dell'enterocita duodenale: l'*heme carrier protein (HCP)*. L'interazione con il suo recettore promuove la formazione di una vescicola endosomiale in grado di veicolare il ferro stesso in prossimità del reticolo endoplasmico. E' qui che l'eme ossigenasi 1 (*HO1*) converte l'eme in biliverdina, monossido di carbonio e Fe^{2+} . Lo ione ferroso, presente a livello del citosol, viene subito sequestrato dalla ferritina evitando l'attivazione delle reazioni di Fenton ed Haber-Weiss e la formazione dei ROS. Al contrario dell'iter di assorbimento, i processi di secrezione e biodisponibilità di questa forma del metallo devono ancora essere compresi appieno [14].

L'assorbimento del ferro non-eme è un processo decisamente meglio conosciuto oltre che finemente regolato. A livello della parte più apicale dell'enterocita, il Fe^{3+} viene ridotto a ione ferroso dall'azione di un analogo del citocromo b561 con attività ferro reduttasica ed in grado di trasportare gli elettroni provenienti dal NADPH citoplasmatico: *CYBRD1* [15-17]. Diversi studi su topi *knockout* per il gene codificante per *CYBRD1* non hanno mostrato un particolare fenotipo legato al mancato assorbimento di ferro. Questo suggerisce che tale proteina non sia la sola dotata di attività ferro-reduttasica coinvolta nel processo di assorbimento del metallo [16]. Lo ione ferroso viene poi internalizzato dalla cellula duodenale grazie all'azione del trasportatore *DMT1* ed inglobato nella ferritina [18]. *DMT1* è altamente conservato in procarioti ed eucarioti ed è costituito da dodici domini transmembrana. Oltre all'internalizzazione dello ione ferro, questo trasportatore promuove l'ingresso nella cellula di altri metalli divalenti come lo zinco, il manganese e il piombo [15]. Topi

knockout per *DMT1* hanno mostrato una grave anemia ferro carenziale suggerendo come la sua azione sia necessaria ed esclusiva [16].

Diverse evidenze hanno dimostrato come il processo di assorbimento del ferro possa essere modulato positivamente da diversi cofattori come l'ascorbato (ottimo donatore di elettroni ed in grado di incrementare l'attività di *CYBRD1*) o significativamente inibito. In questo senso, l'azione di fitati, ossalati e polifenoli è determinante nel limitare l'azione dei trasportatori presenti a livello apicale dell'enterocita duodenale.

Figura 2. L'assorbimento del ferro: il ruolo dell'enterocita duodenale [19].

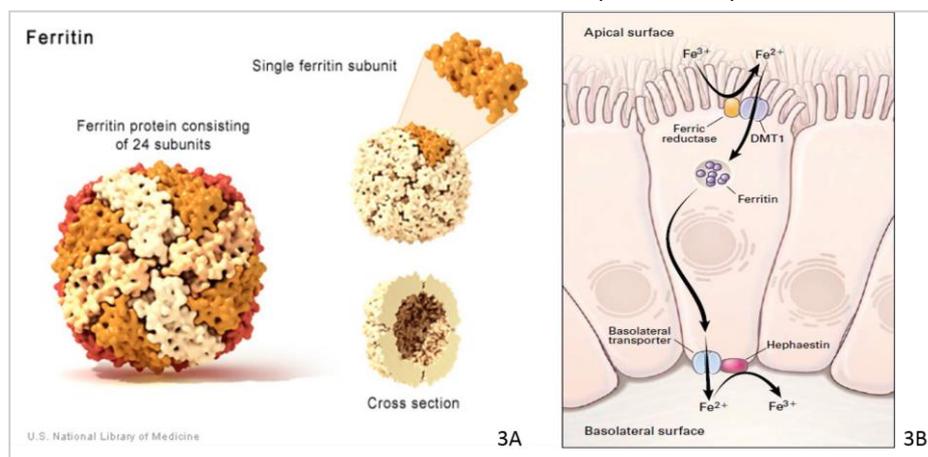


Deposito. Una volta internalizzato, il ferro citosolico può essere immagazzinato nella ferritina, proteina di deposito per eccellenza [20]. Dal punto di vista biologico, la ferritina è una proteina ubiquitaria costituita da una catena leggera con esclusiva funzione di deposito (ferritina L, 19 kDa) ed una catena pesante dotata di attività ferrossidasica (ferritina H, 21 kDa). Ferritina L ed H, unite in proporzioni diverse, formano l'apo-ferritina, una proteina costituita da 24 subunità che può accogliere fino a 4500 atomi di ferro e diventare olo-ferritina [21-23] (figura 3A). La sua degradazione permette di rilasciare e rendere disponibile il metallo per sintetizzare nuovi eritrociti o attivare specifiche vie metaboliche [24]. Piccole quantità di ferritina sono presenti nel sangue sotto forma di ferritina L, ferritina G (una forma di ferritina L glicosilata) [25-27] e ferritina H [28]. La ferritina presente nel siero deriva dalla secrezione da parte delle cellule epatiche e dei macrofagi di milza e fegato e, solo in minima parte, da cellule in necrosi. Diverse evidenze hanno dimostrato come l'espressione di ferritina sia regolata a livello trascrizionale e post-trascrizionale [29].

Trasporto. Il trasporto del ferro attraverso la membrana plasmatica è mediato dall'azione combinata di ferroportina ed efestina (nell'intestino) o ceruloplasmina [30, 31]. Ferroportina, codificata dal gene *SLC40A1* e costituita da 67 kDa è (ad oggi) l'unico esportatore dello ione ferro nei vertebrati. Dal punto di vista funzionale, la proteina è espressa sulla superficie baso laterale della membrana di enterociti, macrofagi ed epatociti [32, 33] ed ha la capacità di trasportare il Fe^{2+} nel torrente circolatorio. Perché questo avvenga è necessario che ceruloplasmina (o efestina) convertano il Fe^{2+} in Fe^{3+} [34, 35]. L'azione di ferroportina prescinde, quindi, dall'attività della ferrossidasi transmembrana. Se ceruloplasmina o efestina non agiscono (perché assenti o mutate), il ferro

rimane nel citoplasma sovraccaricando la cellula. Diverse evidenze hanno poi dimostrato come la funzionalità della ceruloplasmina dipenda dalla disponibilità di rame a livello intracellulare. La mancanza di una sufficiente quantità di questo metallo rende, infatti, la ceruloplasmina funzionalmente inattiva [15]. Oltre a favorire l'immissione del Fe^{3+} nel torrente circolatorio ed il suo legame con transferrina, l'ossidazione del ferro permette di rimuovere ioni ferrosi a livello citosolico e creare un gradiente di concentrazione determinante per sostenere l'efflusso di ferro mediato da ferroportina [15]. Una volta raggiunto il torrente circolatorio, il ferro interagisce con la transferrina, una glicoproteina di 80 kDa in grado di legare fino due atomi di Fe^{3+} (figura 3B). In condizioni fisiologiche, il 30-40% della transferrina sierica lega il ferro, mentre la restante parte circola liberamente evitando danni ad organi e tessuti. Il ruolo chiave di questa proteina di trasporto è quello di veicolare il ferro alle cellule così da permetter loro il completamento di importanti attività omeostatiche e di sintesi. In prossimità della cellula target, la transferrina interagisce con il recettore per la transferrina di tipo 1 (*TFR1*), presente sulla superficie di tutte cellule mitoticamente attive. Il *TFR1*, mediante acidificazione dell'ambiente interno alla vescicola, si dissocia dallo ione ferro e viene subito riesposto sulla superficie della cellula [36, 37]. In questo modo, una proteina appartenente alla famiglia delle STEAP può riconvertire il Fe^{2+} in Fe^{3+} che viene reimpresso nel citosol grazie all'azione di *DMT1* presente sulla membrana dell'endosoma. Il ferro, ora all'interno della cellula, può: a) essere utilizzato per l'ottimizzazione di reazioni metaboliche fondamentali; b) accumularsi nella ferritina; c) essere esportato dalla cellula grazie a ferroportina; d) essere veicolato al mitocondrio. Quest'ultimo, oltre a rappresentare la vera e propria centrale energetica della cellula, riveste un ruolo chiave nel metabolismo del ferro. E' qui, infatti, che viene sintetizzato l'eme. Più precisamente, per riuscire a superare il doppio strato fosfolipidico della membrana mitocondriale ed arrivare alla matrice, il ferro sfrutta l'azione della mitoferrina. Nonostante sia molto importante per la sintesi dell'eme, studi realizzati su topi *knockout* per mitoferrina hanno dimostrato l'esistenza di proteine con funzione ridondante. Gli animali, infatti, anche senza questo trasportatore mantenevano condizioni di vita ottimali [38].

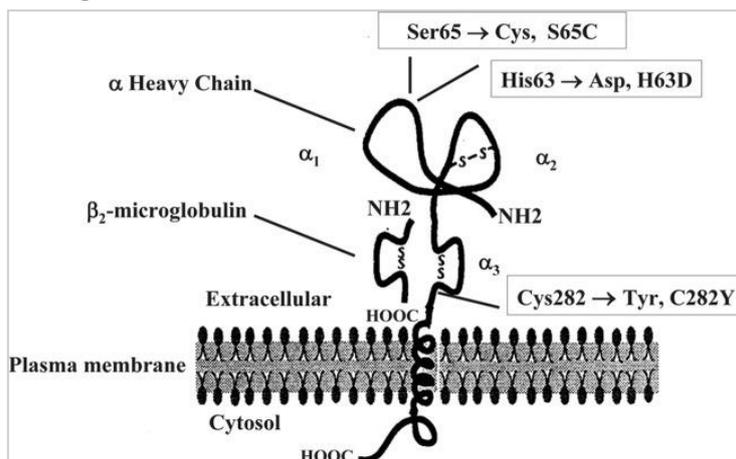
Figura 3 A e B. Struttura della ferritina e meccanismo di deposito ed esportazione del ferro [2].



Altre proteine con un ruolo chiave nel metabolismo del ferro sono il recettore della transferrina 2 (*TFR2*) ed *HFE*. Il *TFR2* ha il 45% di identità con il *TFR1*, ma un'affinità per la transferrina 25 volte inferiore e una regolazione indipendente dal sistema IRE/IRP (spiegato più avanti in dettaglio) [39]. In presenza di olo-transferrina, il *TFR2* si esprime stabilmente sulla superficie delle cellule che costituiscono il parenchima epatico e sulla membrana dei precursori eritroidi promuovendo l'attivazione di una delle vie di trasduzione del segnale responsabili dell'espressione dell'ormone epatico epcidina. I meccanismi molecolari alla base della regolazione dell'espressione di epcidina verranno dettagliatamente discussi nel paragrafo dedicato ai regolatori positivi e negativi dell'ormone [40].

Al pari di *TFR2* anche *HFE* riveste un ruolo chiave nell'espressione di epcidina [41, 42]. Scoperto nel 1996 da Feder et al. [43], questo gene presenta una significativa omologia con il complesso maggiore di istocompatibilità di tipo I. Strutturalmente, il gene codifica per una proteina dotata di tre differenti domini: alfa 1, alfa 2 ed alfa 3. Alfa 1 ed alfa 2 sono direttamente coinvolti nella formazione del complesso costituito da *TFR1* ed olo-transferrina. Alfa 3 permette una corretta interazione con β_2 microglobulina, in grado di stabilizzare *HFE* in membrana (figura 4). La presenza di diverse mutazioni (p.C282Y, p.H63D, p.S65C) a livello della sequenza del gene può alterare significativamente la funzionalità della proteina stessa determinando, in alcuni casi (omozigosi p.C282Y o, più raramente, eterozigosi composta p.H63D/p.C282Y), lo sviluppo di sovraccarico di ferro. Nello specifico, la sostituzione di una cisteina con una tirosina in posizione 282 impedisce la formazione del ponte disolfuro necessario all'interazione tra il dominio alfa 3 e β_2 microglobulina. Per contro, la sostituzione istidina-acido aspartico in posizione 63 limita la stabilità del dominio alfa 2 necessario all'interazione con la transferrina [44].

Figura 4. Motivi strutturali e domini funzionali di *HFE* [45].



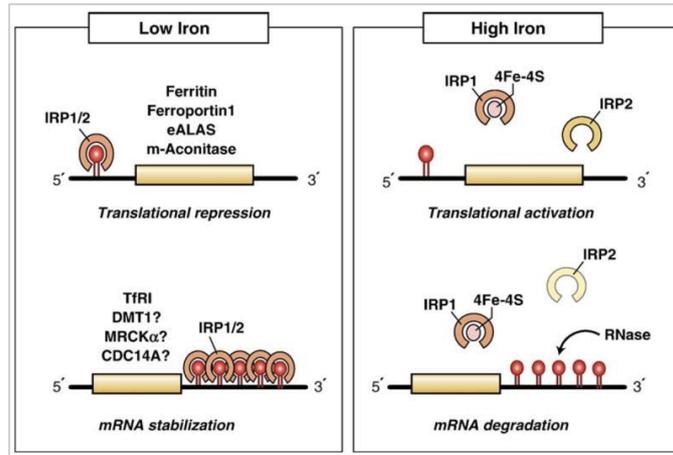
OMEOSTASI DEL FERRO: I MECCANISMI DI REGOLAZIONE CELLULARE E SISTEMICA

L'omeostasi può essere definita come quella condizione di stabilità che la cellula tende a mantenere in presenza di stimoli e sollecitazioni provenienti dall'ambiente esterno. Come già accennato, il ferro è un elemento indispensabile alla vita dell'individuo poiché parte attiva di numerose reazioni

metaboliche, processi di sintesi proteica e proliferazione cellulare. Allo stesso tempo, però, un eccesso del metallo può causare la formazione di specie reattive dell'ossigeno in grado di danneggiare le membrane degli organelli citoplasmatici, il DNA e le proteine. Proprio per questo motivo, una regolazione fine e precisa della quantità di ferro nell'organismo è necessaria ed attiva sia a livello cellulare sia sistemico.

Regolazione cellulare. A livello cellulare, l'assorbimento, l'utilizzo e il deposito del ferro sono regolati da specifici meccanismi post trascrizionali che coinvolgono il sistema IRE/IRP [46]. L'acronimo IRE definisce gli elementi responsivi al ferro (*Iron Responsive Element*) presenti a livello delle regioni non tradotte (*UnTranslated Region*: UTR) dell'mRNA di alcuni geni direttamente coinvolti nel metabolismo del ferro come *DMT1*, *TFR1* e ferritina. L'acronimo IRP, invece, caratterizza le proteine IRP1 ed IRP2 (*Iron Regulatory Protein*) che regolano attivamente i livelli di ferro nella cellula [47]. Quando le scorte di ferro diminuiscono, l'espressione di *TFR1* e *DMT1* a livello della membrana plasmatica aumenta significativamente permettendo di internalizzare una maggiore quantità di ferro legato alla transferrina o presente nella dieta. Al contrario, l'espressione della ferritina viene down-regolata così da avere a disposizione Fe^{2+} , che altrimenti rimarrebbe immagazzinato nella proteina di deposito. In presenza di sovraccarico di ferro, invece, l'espressione di *TFR1* e *DMT1* diminuisce drasticamente, mentre i livelli di ferritina subiscono un rapido aumento per sequestrare il ferro in eccesso (figura 5). Dal punto di vista molecolare, l'aumento delle scorte di ferro promuove l'interazione del metallo con un atomo di zolfo favorendo la formazione di specifici clusters ferro-zolfo ($4Fe-4S$) in grado di interagire con IRP1 limitandone l'interazione con le IRE presenti sull'RNA messaggero. IRP2, invece, viene degradata da una ubiquitina-ligasi in grado di percepire i livelli di ferro cellulari (*FBXL5*). In condizioni di ferro carenza, la mancata formazione dei *clusters* favorisce l'interazione IRE-IRP. L'interazione delle IRP con le IRE in 5'UTR blocca la traduzione del messaggero. Viceversa, l'interazione delle *iron responsive proteins* con le IRE all'estremità 3' stabilizza l'mRNA prevenendone la degradazione. Il sistema IRE/IRP, così funzionante, si è dimostrato essere fondamentale per la vita. Topi *knocked out* per entrambi i geni (*IRP1^{-/-}* e *IRP2^{-/-}*), infatti, muoiono durante la fase embrionale; al contrario, topi che presentano solo uno dei due geni mancanti, nascono vivi. I topi *IRP1^{-/-}* sono addirittura asintomatici nelle normali condizioni di laboratorio, mentre i topi *IRP2^{-/-}* sviluppano solo una anemia microcitica ipocromica [48]. Questo dimostra una forte ridondanza di funzioni tra le due proteine.

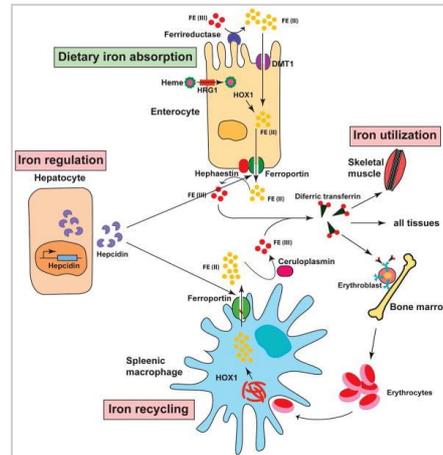
Figura 5. La regolazione cellulare dell'omeostasi del ferro: il sistema IRE/IRP [49].



Regolazione sistemica. L'ormone epatico epcidina rappresenta il fulcro del meccanismo di regolazione sistemica dell'omeostasi del ferro (figura 6) [15]. Questa molecola è stata scoperta per la prima volta nel 2000 come un peptide antimicrobico presente nel plasma ultra filtrato. L'anno seguente, nel 2001, è stata riscontrata anche in campioni di urina [50]. Il gene che la codifica (*HAMP*) è fortemente espresso nel fegato, ma è presente anche nel cuore, nel midollo spinale, nello stomaco, nell'intestino, nel tessuto adiposo e nei polmoni. Dal punto di vista strutturale, questo peptide viene sintetizzato in forma inattiva come pre-pro-peptide di 84 aminoacidi. Il taglio operato dalla proteasi PACE permette poi di ottenere un precursore (ancora inattivo) di 72 residui ed un peptide finale (attivo) di 25 aminoacidi con otto residui di cisteina che formano quattro legami disolfurici intramolecolari. La struttura dell'epcidina, nel corso dell'evoluzione, è stata fortemente conservata. Studi realizzati utilizzando animali modello privi o capaci di *over-esprimere* epcidina hanno dimostrato che questo peptide è un regolatore negativo dell'assorbimento e del rilascio di ferro dalle cellule. Questa evidenza è poi stata confermata da mutazioni difettive nel gene *HAMP*, responsabili di un precoce e severo sovraccarico di ferro conosciuto come emocromatosi giovanile. Biologicamente parlando, l'ormone epcidina appartiene alla famiglia delle defensine ed ha la capacità di contrastare l'azione di alcune specie di batteri siderofili (*N. Cinerea*, *S. Epidermidis*, *S. Aureus* e *Streptococcus* di tipo B) e di un'unica specie fungina (*C. Albicans*). In presenza di un'elevata concentrazione di ferro od in risposta a stimoli in grado di regolare positivamente l'espressione dell'ormone stesso, epcidina interagisce ed inibisce l'esportatore ferroportina. Più precisamente, questa interazione promuove l'attivazione della proteina-chinasi JAK2, capace di fosforilare ferroportina ed attivare dinamina ed epsina, responsabili dell'attivazione della cascata di ubiquitinazione e degradazione di ferroportina attivamente mediata dal proteasoma [5]. La degradazione di ferroportina comporta poi una diminuzione dell'assorbimento intestinale e una diminuzione del rilascio del ferro dai macrofagi, con conseguente diminuzione della sideremia. Diverse evidenze hanno dimostrato come l'aumento dell'espressione di epcidina porti anche alla diminuzione dell'espressione del trasportatore *DMT1* e del citocromo *CYBRD1*. Visto che questi elementi sono regolati dal sistema IRE/IRP. Si suppone che la relazione tra epcidina e i mediatori

dell'assorbimento intestinale sia indiretta e mediata dalle modifiche dei livelli intra-citoplasmatici di ferro indotte dall'epcidina stessa.

Figura 6. Il ruolo di epcidina nella regolazione sistemica dell'omeostasi del ferro [51].



REGOLATORI POSITIVI E NEGATIVI DELL'ESPRESSIONE DI EPCIDINA

L'espressione di epcidina è regolata da stimoli diversi per intensità ed effetto (figura 7). Tra i regolatori positivi più importanti si ricordano lo stato del ferro e l'infiammazione. Lo stimolo eritropoietico e l'ipossia, invece, spiccano tra quelli negativi [52].

I regolatori positivi. Il ferro circolante è considerato uno dei principali regolatori positivi di epcidina. Una volta assorbito dall'enterocita duodenale il ferro raggiunge il torrente circolatorio sfruttando l'azione dell'esportatore ferroportina e complessandosi con la transferrina. In presenza di una concentrazione fisiologica di ferro nel plasma (e da una normale saturazione della transferrina), la proteina di trasporto dello ione nel sangue interagisce con *TFR1* formando un complesso costituito anche da *HFE* e $\beta 2$ micro globulina a livello della membrana dell'epatocita. L'interazione recettore-ligando promuove la formazione di una vescicola endosomiale e la conseguente attivazione del ciclo della transferrina. Il ferro, presente ora a livello citosolico, viene immagazzinato nella ferritina e mobilizzato solo in caso di necessità. Diverso, invece, è quanto accade in presenza di sovraccarico di ferro e di una saturazione della transferrina superiore al 30%. In questa condizione, *HFE* si dissocia dal complesso costituito da *TFR1* e $\beta 2$ micro globulina andando ad interagire con *TFR2*. Questa interazione favorisce la (probabile) attivazione di una cascata chinasi responsabile della fosforilazione delle proteine citoplasmatiche *SMAD1*, *SMAD5* e *SMAD8* capaci poi di interagire con *SMAD4*. La traslocazione intranucleare di *SMAD4* ed il riconoscimento di elementi responsivi (due *BMP responsive elements*, *BMP-RE1* e *BMP-RE2*), situati rispettivamente nella parte prossimale e distale del promotore dell'epcidina promuove l'espressione del gene *HAMP*. E' probabile che questa via di trasduzione preveda un *pathway* chinasi ERK/MAP. Infatti, l'uso di inibitori specifici di ERK può impedire l'espressione dell'epcidina [53, 54].

Diverse evidenze hanno poi dimostrato come l'aumento delle riserve di ferro epatocitarie comporti l'attivazione della via di trasduzione del segnale delle BMPs (*Bone Morphogenetic Proteins*) tramite il rilascio dall'epatocita del *BMP6*. Questo, legandosi al *BMPRII*, promuove la formazione (con *BMPRI*

e HJV) di un complesso in grado di fosforilare le proteine citoplasmatiche SMAD1, SMAD5 e SMAD8 ed attivare la cascata intracellulare responsabile dell'attivazione del gene *HAMP*.

In questo sistema di controllo, un ruolo importante è svolto dall'emojuvelina di membrana (mHjv). Questa molecola, codificata dal gene *HFE2*, è un corecettore fondamentale per la formazione del complesso costituito dai recettori delle BMPs (BMPRI e BMPRII) ed è fisiologicamente espressa dagli epatociti e dalle cellule del muscolo scheletrico. mHjv può essere inattivata dal taglio proteolitico della matriptasi-2, una serin-proteasi codificata dal gene *TMPRSS6* la cui trascrizione sembra essere controllata da fattori come l'ipossia, BMP6 e la concentrazione di ferro. Pazienti con mutazione del gene *HFE2* mostrano una grave carenza di epcidina e sviluppano una forma giovanile di emocromatosi, indistinguibile clinicamente da quella causata da alterazioni del gene *HAMP*.

Nel plasma, esistono anche forme solubili di HJV (sHJV). Una di queste, generata dal taglio proteolitico ad opera della furina, potrebbe agire come inibitore della via di segnale BMP/SMAD. Alcuni studi dimostrano come l'attività della furina aumenti in ipossia e in ferro-carenza, entrambe condizioni che comportano un aumento dell'assorbimento del ferro e che quindi necessitano una diminuzione dell'espressione dell'epcidina. Si ipotizza che queste forme siano prodotte prevalentemente dal muscolo scheletrico, data l'abbondanza di HJV al suo interno e la sua capacità di rilasciare sHJV. Il rilascio di questa forma di HJV sembra essere inibito da neogenina. La rilevanza fisiologica di questa molecola è comunque dubbia, dato che topi con alterazione dell'Hjv muscolare, non dimostrano significative variazioni del metabolismo del ferro o dell'espressione dell'epcidina. Diverse evidenze *in vitro* hanno suggerito come le vie di trasduzione del segnale che coinvolgono attivamente ERK/MAP e BMP/SMAD possano avere un punto di contatto. Infatti, l'utilizzo di inibitori ERK specifici ha mostrato una mancata fosforilazione del complesso costituito dalle proteine SMAD (1/5/8). Studi *in vivo*, al contrario, sembrerebbero dimostrare l'esistenza di due *pathways* diversi e tra loro non collegati, uno dipendente dalla saturazione della transferrina e l'altro dalle riserve di ferro intra citoplasmatiche [55].

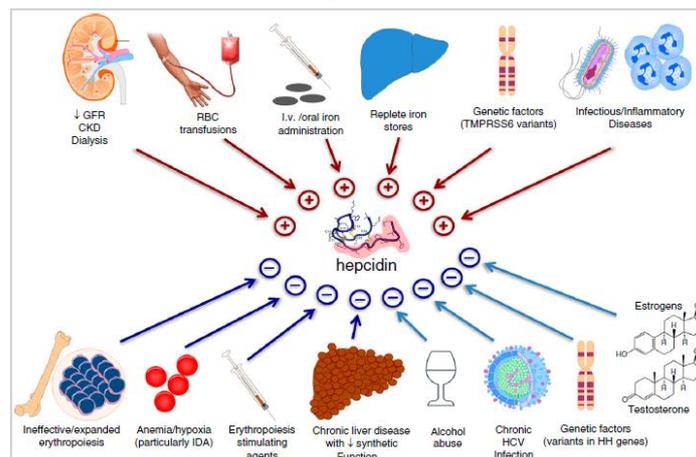
Al pari dello stato del ferro, anche lo stimolo infiammatorio è considerato un regolatore positivo dell'espressione di epcidina. I principali mediatori dell'infiammazione sono IL6, IL1, IL10, LPS, INF γ e TNFa. Queste citochine sono in grado di sequestrare il ferro all'interno del macrofago tramite numerosi meccanismi che determinano un aumento dell'*intake* o una riduzione dell'efflusso di ferro. Nello specifico, INF γ e LPS aumentano l'espressione di DMT1 sul macrofago favorendo l'*uptake* di Fe²⁺; IL10 aumenta l'espressione del recettore della transferrina di tipo 1 aumentando l'*uptake* del ferro transferrina-mediato nel monocita; TNFa, IL1, IL6 e IL10 aumentano l'espressione della ferritina nel macrofago favorendo l'accumulo del ferro; INF e LPS riducono l'espressione della ferroportina sul macrofago riducendo l'efflusso di ferro; IL6 e LPS stimolano la sintesi epatica di epcidina tramite l'attivazione della via di trasduzione del segnale che converge su STAT3 che, legandosi al promotore del gene *HAMP*, ne induce la trascrizione [56].

Questi meccanismi hanno come fine ultimo quello di proteggere l'organismo da possibili infezioni di microorganismi siderofili, in grado di sopravvivere e replicarsi solo in presenza di abbondanti quantità di ferro. Al contempo, però, la presenza di un'infiammazione duratura può limitare la biodisponibilità del minerale per le necessità eritropoietiche causando un'anemia cronica. Alcuni

esperimenti sui topi e ratti hanno messo in evidenza come l'assorbimento del ferro dato dall'attivazione dell'eritropoiesi possa antagonizzare la produzione di epcidina prodotta dall'infiammazione dimostrando l'esistenza di una gerarchia ben precisa degli stimoli in grado di perturbare l'omeostasi del ferro.

I regolatori negativi. Tra i regolatori negativi dell'espressione di epcidina figurano lo stimolo eritropoietico e l'ipossia. In presenza di un forte stimolo eritropoietico l'espressione di epcidina è significativamente down-regolata, così da permettere il rilascio di ferro dai macrofagi e la sintesi nuovi eritrociti. Studi degli ultimi anni hanno dimostrato come l'inibizione dell'epcidina sia correlata con i livelli di eritropoiesi e che fattori solubili, rilasciati dal sistema eritroide attivato, vadano ad esercitare un'azione inibitoria su epcidina a livello epatico. Tra i diversi mediatori proposti sono compresi GDF15, TWSG1 e, più recentemente l'Eritroferrone (ERFE) [57]. Studi successivi hanno in gran parte destituito GDF15 e TWGS1 dall'ipotetico ruolo di mediatori eritroidi di epcidina dando maggior rilievo al ruolo di ERFE. In ipossia, invece, un ruolo chiave è rivestito da una famiglia di proteine indotte dall'ipossia: le *hypoxia-inducible factors* (HIF). In normali condizioni, la fosforilazione di HIF da parte di una idrossilasi contenente ferro ne determina la degradazione; al contrario, in assenza di ossigeno o in presenza di uno stato ferro carenziale, la fosforilazione di HIF è impedita. In presenza di una limitata tensione di ossigeno, l'attivazione del midollo eritroide sembra essere eritropoietina-dipendente. Tuttavia, l'azione diretta di HIF non sembra possa essere escludibile in assoluto [58]. Come riportato in precedenza, anche in questo caso l'attivazione dell'eritropoiesi attiverebbe il rilascio di mediatori plasmatici. Tra questi, oltre al possibile ruolo di ERFE (ancora da dimostrare), è recentemente emerso quello del PDGF-b [59].

Figura 7. Regolatori positivi e negativi dell'espressione di epcidina [60].



LA TOSSICITA' DEL FERRO

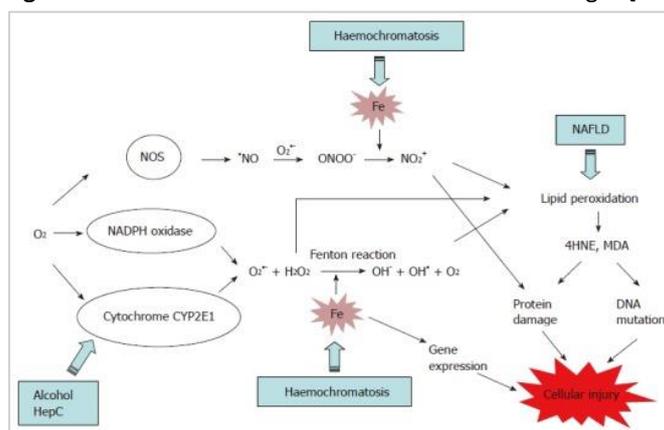
Il ferro è protagonista di molti processi biologici spesso fondamentali alla sopravvivenza della cellula. Proprio perché riveste un ruolo chiave nell'organismo, la quantità di ferro quotidianamente assorbito, utilizzato ed eliminato viene finemente regolata sia a livello cellulare sia sistemico. Un'eccessiva disponibilità del metallo, infatti, può essere tossica e compromettere irreversibilmente la sopravvivenza delle cellule dell'organismo [61]. Il ferro in eccesso può essere presente in due

forme differenti ed ugualmente tossiche: il *non transferrin bound iron* (NTBI), cioè tutto quel ferro circolante non legato a transferrina, o come *labile iron pool* (LIP), presente a livello intracellulare. L'NTBI è considerato il principale responsabile dei danni provocati al parenchima della maggior parte degli organi. Il LIP, invece, causa perossidazione lipidica delle membrane degli organelli citoplasmatici, danni a proteine ed acidi nucleici [62].

Tra tutti gli organelli presenti, i lisosomi ed i mitocondri (responsabili di eliminare i prodotti di scarto della cellula e di produrre energia, rispettivamente) sono quelli principalmente interessati dall'azione dei radicali liberi solitamente prodotti dalle reazioni chimiche di Fenton ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^\bullet + \text{OH}^-$) ed Haber-Weiss ($\text{O}_2^- + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{OH}^- + \text{OH}^\bullet + \text{O}_2$) [63]. Nello specifico, il radicale ossidrile induce la rottura degli acidi grassi che costituiscono la membrana plasmatica delle cellule promuovendo la formazione di malon-di-aldeide, tiobarbiturici e 4-idrossi-2-nonenale [64]. Quest'ultima molecola, una volta metabolizzata in epossido, può interagire covalentemente con il DNA formando composti esociclici. E' chiaro, quindi, come l'azione dei ROS interessi anche gli acidi nucleici inducendo danni strutturali o alterazioni (mutazioni) della doppia elica con effetti diversi ed opposti. In alcuni casi, le mutazioni possono attivare o limitare (nel caso in cui siano *gain of function* o *loss of function*, rispettivamente) l'espressione di geni responsabili dello sviluppo di neoplasie o determinanti nel limitare la sopravvivenza della cellula tumorale (oncogeni ed oncosoppressori, rispettivamente) (figura 8).

I meccanismi di difesa utilizzati fisiologicamente dalla cellula sono diversi e distinguibili tra enzimatici e non enzimatici. Tra quelli enzimatici figurano la superossidodismutasi, che riduce O_2^- in H_2O_2 , la catalasi, la glutationeperossidasi e perossiredossine, che detossificano le cellule dai perossidi, e proteine come le tioredossine e le glutaredossine. I meccanismi non enzimatici, invece, annoverano le vitamine E e C, l'acido alfa lipoico, la melatonina, i carotenoidi ed i flavonoidi [65].

Figura 8. Ferro-tossicità e meccanismi di difesa fisiologici [63].



DEFINIZIONE E CLASSIFICAZIONE DELLE PATOLOGIE ASSOCIATE A SOVRACCARICO DI FERRO

I disordini del metabolismo del ferro sono un gruppo eterogeneo di malattie geneticamente o non-geneticamente determinate, caratterizzate da carenza o da sovraccarico del metallo.

Tra queste, la patologia genetica più diffusa è l'emocromatosi, causata da difetti nei meccanismi di regolazione del metabolismo del ferro che conducono al progressivo accumulo di metallo nell'organismo. La forma genetica è caratterizzata da cinque distinte tipologie: quattro con ereditarietà autosomica recessiva e una a trasmissione dominante. L'emocromatosi ("classica") di tipo 1 (HH), è causata da specifiche mutazioni a livello del gene *HFE*. Le forme 2A e 2B (entrambe ad esordio giovanile) sono determinate da alterazioni nelle sequenze del gene *HFE2* o *HAMP*. L'emocromatosi di tipo 3 (HH3) è dovuta a mutazioni nel *TFR2*, mentre quella di tipo 4 (HH4) ad anomalie genetiche nella sequenza dell'*SLC40A1* [66]. L'HH 2A e 2B, 3 e 4 sono dette forme non-*HFE* [67] (tabella 1).

L'HH verrà dettagliatamente descritta nelle pagine successive con l'intento di analizzare cause, conseguenze e principali approcci diagnostico-terapeutici della malattia. Di seguito, viene presentato un rapido *excursus* sulle forme ben più rare di emocromatosi non-*HFE*.

L'HH di tipo 2 (A e B) è una forma di sovraccarico di ferro molto rara caratterizzata da esordio giovanile (tra la prima e la terza decade di vita), fenotipo grave e complicanze severe. Entrambe le forme di malattia interessano i maschi e le femmine con uguale frequenza. Come la forma classica, il tipo 2 ha ereditarietà autosomica recessiva e caratteristiche cliniche come l'ipogonadismo ipogonadotropo, la cirrosi epatica e la cardiomiopatia. La cardiomiopatia è la principale causa di morte dell'HH2, che si contraddistingue per avere un decorso molto severo. Le mutazioni principalmente responsabili dell'insorgenza della patologia sono diffuse in gran parte del mondo (con rari cluster in Italia e Grecia) ed interessano i geni *HFE2* ed *HAMP*, codificanti per emogiuvulina ed epcidina, rispettivamente. Emogiuvulina è il co-recettore della via di trasduzione del segnale che coinvolge le BMPs ed è direttamente responsabile della sintesi di epcidina. Alterazioni della sequenza di DNA codificante per questo gene inattivano la via e sono direttamente responsabili di bassi livelli di epcidina. La variante genetica più comune è la p.G320V, ritrovata nel 60% di pazienti, perlopiù di origine greca. Al pari della forma 2A, anche la forma 2B è caratterizzata da bassi livelli di epcidina. Le mutazioni funzionali e responsabili dell'insorgenza della malattia interessano il gene codificante per epcidina (*HAMP*) [68]. Varianti genetiche in eterozigosi o casi di eterozigosi composta causano un fenotipo meno severo e caratterizzato da una progressione di malattia più lenta rispetto a quello di pazienti con mutazioni in omozigosi [42, 69]. In alcuni soggetti, la ferritina può raggiungere i 7000 ng/ μ L, mentre la saturazione della transferrina può avvicinare il 100%. Il salasso (mono settimanale o quindicinale) può essere sostituito dalla terapia ferro chelante in presenza di anemia o disfunzioni cardiache. In pazienti asintomatici, la flebotomia può prevenire l'insorgenza di severi danni d'organo.

L'HH3 è una forma di sovraccarico di ferro che conta meno di 30 casi in tutto il mondo distribuiti per lo più in Italia, Portogallo, Francia e Giappone. In Italia, la mutazione più frequente è la p.Y250X nel gene *TFR2*, ma anche altre otto mutazioni sono causali della malattia (p.E60X, p.R105X, p.M172K, p.Q317X, p.L490R, p.V561X, AVAQ621-624del, p.Q690P). Cinque di queste introducono un codone di stop prematuro responsabile della formazione di una proteina tronca, mentre le restanti tre sono causa di anomalie strutturali che impediscono al *TFR2* di funzionare correttamente. Più del 50% dei casi sono dovuti alle mutazioni p.E60X, p.M172K, p.Y250X e AVAQ621-624del. L'esordio della

patologia è precoce rispetto all'HH e la sua progressione più lenta delle forme giovanili precedentemente descritte. Affaticamento generale, dolori addominali e perdita della libido sono le principali caratteristiche cliniche, mentre cirrosi, ipogonadismo e artropatia sono le complicazioni più diffuse. Il fenotipo è intermedio tra l'HH e l'HH2. La presenza di sovraccarico di ferro senza mutazioni a livello del gene *HFE* suggerisce la presenza di un caso di emocromatosi di tipo 3. Le variazioni genetiche finora note sono distribuite lungo tutta la sequenza del gene. Pazienti con questa forma di malattia hanno bassi livelli di epcidina, a causa della mancata funzionalità della via di trasduzione che coinvolge il complesso *TFR1-HFE-TFR2*. L'approccio terapeutico standard prevede flebotomie settimanali in pazienti con livelli di ferritina superiori all'intervallo di normalità [70].

L'HH4 è stata descritta per la prima volta nel 1999 in una famiglia italiana ed è l'unica forma di emocromatosi con ereditarietà autosomica dominante. Fibrosi, impotenza, diabete ed aritmie cardiache sono spesso conseguenza di sovraccarico ed accumulo di ferro all'interno delle cellule del sistema reticolo-endoteliale. I difetti genetici che interessano la sequenza codificante di *SLC40A1* possono incrementare (*gain-of-function*) o diminuire (*loss-of-function*) la funzionalità dell'esportatore stesso. L'aumento della sua funzionalità promuove un incremento della saturazione della transferrina e dei livelli di ferritina sierica ed è perlopiù causata dalle mutazioni p.N144 o p.C326Y. Viceversa, le mutazioni *loss-of-function* limitano l'azione di ferroportina causando sovraccarico intracellulare a livello di milza, fegato e rene. P.A77D, p.V162 e p.G490D sono varianti che impediscono il corretto *trafficking* di ferroportina, mentre p.Y64N, p.N144D, p.N144H, p.Q248H e p.C326S ne limitano l'espressione in membrana. Per quanto attiene il fenotipo, i pazienti con una limitata funzionalità di ferroportina hanno elevata ferritina sierica, normali livelli di saturazione della transferrina e rischiano di sviluppare anemia che preclude loro la possibilità di essere sottoposti a salasso. In questo caso, il paziente viene trattato con chelanti del ferro così da evitare irreversibili danni d'organo. Al contrario, chi ha mutazioni *gain-of-function* presenta un'elevata saturazione della transferrina e sovraccarico di ferro a livello parenchimale. Il fenotipo avvicina quello di pazienti con la forma classica di sovraccarico [71].

Tabella 1. Malattie ereditarie del metabolismo del ferro.

1. Emocromatosi Ereditaria	Gene implicato	Prodotto genico	Ereditarietà	Età d'esordio
Tipo 1	<i>HFE</i> , 6p21.3	HFE	AR	3-5° decade
Tipo 2 A	<i>HJV</i> , 1q21	Emojuvelina	AR	2-3° decade
Tipo 2 B	<i>HAMP</i> , 19q13.1	Epcidina	AR	2-3° decade
Tipo 3	<i>TFR2</i> , 7q22	TfR2	AR	2-5° decade
Tipo 4 (A e B)	<i>SLC40A1</i> , 2q32	Ferroportina	AD	4-5° decade
Emocromatosi non determinata	-	-	-	-
2. Iperferritinemia-cataratta ereditaria	L-ferritina (regione IRE)	-	AD	1-5° decade
3. Iperferritinemia benigna	L-ferritina Altri geni?	Ferritina	AD	?
4. Neuroferritinopatie	L-ferritina	Ferritina	AD	4-6° decade
5. Deficit di DMT1	<i>DMT1</i>	DMT1	AR	1-2° decade
6. Anemia sideropenica refrattaria al trattamento con ferro (IRIDA)	<i>TMPRSS6</i>	Matriptasi2	AR	1-5° decade

Esistono poi altre forme di sovraccarico di ferro geneticamente determinate come la sindrome dismetabolica associata a sovraccarico di ferro (DIOS), l'iperferritinemia e l'anemia sideropenica ferro refrattaria (IRIDA). A queste si aggiungono l'ipotransferrinemia ereditaria (caratterizzata da anemia microcitica e con esordio nella prima infanzia), l'aceruloplasminemia (con esordio in età adulta, accumulo di ferro a livello encefalico, retinico, epatico, splenico ed in grado di causare demenza ed atassia), la talassemia (causata da mutazioni nei geni delle globine alfa e/o beta, anemia e sovraccarico di ferro perlopiù a livello di fegato e milza), l'anemia sideroblastica congenita (che come tratto ematologico peculiare ha sideroblasti ad anello ed eritrociti ipocromici) e l'anemia diseritropoietica ereditaria (con eritropoiesi tardiva ed anemia).

Il sovraccarico di ferro secondario, invece, può essere causato da trasfusioni o somministrazione di ferro parenterale, essere conseguenza di malattie con anemia con eritropoiesi inefficace (es: talassemia) od anemia emolitica (es: deficit della piruvato chinasi o sferocitosi) o dovuto ad epatopatie croniche causate da infezioni di HBV o HCV, eccessivo consumo di alcool, cirrosi [72].

L'EMOCROMATOSI DI TIPO 1

Cenni storici. Il termine "emocromatosi" fu coniato nel 1889 dal patologo tedesco Friedrich Daniel Von Recklinghausen, il primo a studiare approfonditamente la malattia già definita nel 1865 da Trosseau "diabete bronzino".

Questo neologismo, però, venne definitivamente accettato dalla comunità scientifica solo nel 1935 con la pubblicazione di una monografia del gerontologo Sheldon incentrata sulla descrizione di una forma di emocromatosi idiopatica a trasmissione autosomica recessiva correlata con l'allele HLAA3 del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) [73]. Questa monografia verrà poi ridiscussa dal medico/ricercatore francese Marcel Simon tra il 1975 ed il 1980 confermando, di fatto, quanto scoperto da Sheldon [74].

Nel 1996, Feder ed i suoi collaboratori utilizzano di tecniche di *linkage* per identificare il gene direttamente responsabile dello sviluppo della malattia: *HFE* (nome che deriva da *Haemochromatosis* e ferro). Inizialmente, questo viene denominato HH (da *Hereditary Hemochromatosis*) e successivamente rinominato HLAH, data la struttura simile ad un gene del complesso MHC di classe I [43]. Nei primi anni 2000 si ha un'ulteriore svolta nel metabolismo del ferro. E' in questo periodo, infatti, che tre gruppi di ricerca identificano simultaneamente il gene *HAMP* codificante per epcidina e vengono individuate le principali mutazioni nel gene *HFE*. La più comune tra queste è la p.C282Y, definita da molti come la mutazione "classica" dell'emocromatosi ereditaria di tipo 1, ma responsabile della malattia solo in una parte dei soggetti che ne sono portatori. Attualmente, numerosi gruppi di ricerca stanno focalizzando l'attenzione sulla correlazione tra genotipo e fenotipo emocromatosico nel tentativo di comprendere quali fattori ambientali e genetici possano giustificare l'eterogeneità fenotipica della malattia.

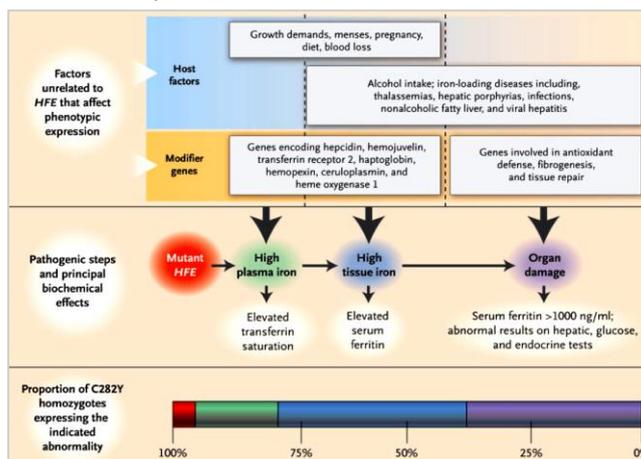
Frequenza e penetranza dell'HH. L'emocromatosi è una patologia che colpisce prevalentemente il sesso maschile. L'accumulo di ferro a livelli patologici è più difficile nelle donne, data la quantità di sangue persa mensilmente con il flusso mestruale e quella relativa ad eventuali gravidanze.

Nelle popolazioni caucasiche la mutazione più frequente del gene *HFE* è l'omozigosi p.C282Y, con un gradiente nord-sud sia in Europa sia in Italia [75]. Più precisamente, la frequenza della mutazione è di 1/3 soggetti ogni 1000 di origine caucasica, 1:100 in Irlanda, 1:500 nel nord Italia (ma inferiore ad 1: 2000 nel sud della penisola) e 1:400 in Francia [43, 72]. Il gradiente nord-sud è facilmente spiegabile dal fatto che si tratti di una patologia insorta nel Nord Europa all'interno della popolazione celtica o di quella vichinga. Di conseguenza, nel Nord Europa la prevalenza della malattia è maggiore, mentre diminuisce nel Sud Europa dove è giunta tramite le ondate migratorie. Data la frequenza delle mutazioni del gene *HFE* all'interno della popolazione generale e le gravi conseguenze della malattia (se non opportunamente trattata) e la semplicità della terapia, sempre più studi hanno cercato di capire l'effettiva penetranza di questo disturbo. La penetranza di una malattia può essere definita in due modi: penetranza biochimica e penetranza clinica. Nel caso dell'emocromatosi, per valutare la penetranza biochimica si considerano gli indici plasmatici del ferro come la ferritina e la saturazione della transferrina, mentre per la penetranza clinica le manifestazioni tipiche della malattia.

Penetranza biochimica e clinica. In riferimento alla penetranza biochimica, tra il 73 e l'89% dei maschi omozigoti per la mutazione p.C282Y i livelli di saturazione della transferrina e di ferritina sierica superano il 50% ed 250 µg/L, rispettivamente. Nel 40% delle donne la saturazione della transferrina supera il 50% e nel 69.2% supera il 45%. Più del 54%, invece, ha livelli di ferritina superiori a 200 µg/L. In soggetti eterozigoti composti per le mutazioni p.C282Y e p.H63D, la saturazione della transferrina è oltre i livelli fisiologici nel 10-23% degli uomini e nell'8.5-31% delle donne. La ferritina, invece, è oltre la soglia di riferimento in una percentuale di uomini compresa tra il 27% ed il 42% e tra il 10% ed il 12% delle donne. Solo il 9% ha entrambe questi indici del ferro al di sopra del *range* di normalità. Nei pazienti omozigoti per la mutazione p.H63D, solo il 15% ed il 19% hanno elevata saturazione della transferrina e ferritina, rispettivamente. Il 5.4% ha entrambe gli indici sopra la soglia di normalità. In conclusione, è possibile constatare come la percentuale di saturazione della transferrina sia elevata nell'82.7% di omozigoti p.C282Y, nel 16.7% di eterozigoti composti p.C282Y/p.H63D e nel 13.2% di omozigoti p.H63D. Elevati livelli di ferritina sierica, invece, sono presenti nell'85.2% di omozigoti p.C282Y e nel 19% di eterozigoti composti p.C282Y/p.H63D [67, 76].

Per quel che riguarda la penetranza clinica della malattia, questa può variare dall'1% al 50% in virtù dei diversi criteri di diagnosi utilizzati. In uno studio che ha coinvolto più di 30.000 soggetti, solo il 28.4% degli uomini e l'1.2% delle donne omozigoti per la mutazione p.C282Y ha mostrato almeno una manifestazione clinica della malattia come fibrosi, cirrosi, carcinoma epatocellulare, artropatia o transaminasi alte [77]. In pazienti eterozigoti composti p.C282Y/p.H63D e nei soggetti omozigoti p.H63D che solo occasionalmente sviluppano sovraccarico di ferro, la penetranza è ancora più bassa (figura 9).

Figura 9. Penetranza ed espressione dell'emocromatosi: il ruolo dei modificatori [78].

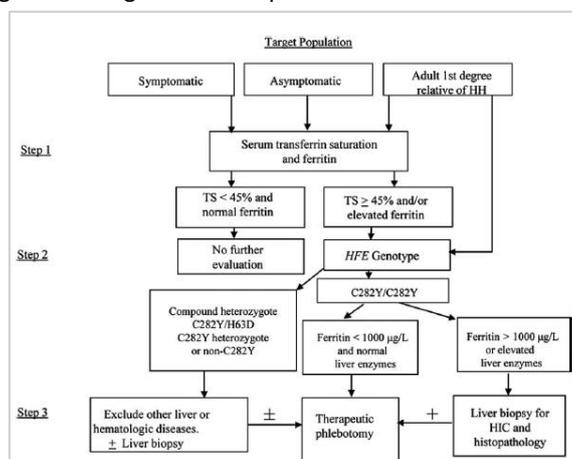


Diagnosi. I test biochimici e genetici sono gli approcci diagnostici principalmente utilizzati per l'emocromatosi ereditaria. Il test biochimico si basa sull'analisi di due indici dello stato del ferro: la percentuale di saturazione della transferrina ed i livelli di ferritina sierica. La saturazione della transferrina è l'esame di primo livello per l'HH, l'HH2 e l'HH3. E' semplice, economico e sensibile. Il *cut-off* scelto sulla base dei dati pubblicati in letteratura è del 45%. Valori di saturazione della

transferrina superiori al 45% sono indice di sovraccarico nell'organismo. La ferritina sierica indica la gravità del sovraccarico di ferro (figura 10). Nell'adulto, i valori fisiologici sono di 200 µg/L nella donna e 300 µg/L nell'uomo. Questo *cut-off*, però, varia in base ad età e sesso. A differenza della saturazione della transferrina, la ferritina è sensibile alla presenza infezioni, infiammazione acuta o cronica, neoplasie, eccessivo consumo di alcool e necrosi di tessuti. Valori superiori a 1000 µg/L possono essere predittivi di danno epatico e indice di un alto rischio di fibrosi e cirrosi. In presenza di elevati livelli di saturazione della transferrina e ferritina sierica si decide di procedere con un'indagine di secondo livello che prevede l'analisi molecolare del gene *HFE*. Nel caso dell'HH, la mutazione p.C282Y nel gene *HFE* è la prima ad essere ricercata, poiché presente in più dell'80% dei pazienti con emocromatosi di origine nord europea e nel 65% degli italiani [67].

Nei casi geneticamente non determinati o per definire la gravità di fibrosi o cirrosi, i pazienti con ferritina superiore a 1000 µg/L e transaminasi alterate vengono sottoposti a biopsia epatica, cioè al prelievo di un frustolo di tessuto epatico. La biopsia epatica rimane il *gold standard* per la quantificazione del ferro epatico (*Liver Iron Concentration, LIC*): un LIC >100 µmol/g di peso secco indica un sovraccarico moderato, un LIC >250 µmol/g indica un accumulo severo [79, 80]. In passato veniva usato anche un altro indice per distinguere l'emocromatosi dalle forme di sovraccarico secondario a epatopatie croniche: l'*Hepatic Iron Index (HII)* dato dal rapporto tra il LIC e l'età del paziente che, se maggiore di 1.1 era fortemente a favore della diagnosi di emocromatosi.

Figura 10. Algoritmo diagnostico-terapeutico dell'emocromatosi ereditaria [45].



Per la valutazione istologica sono stati proposti alcuni sistemi di *scoring* che permettono al patologo di fornire una descrizione del quadro istologico in grado di sintetizzare informazioni sia quantitative (entità del deposito) sia qualitative (sede).

- Il sistema di Scheuer (1962), nelle versioni modificate da Rowe (1977) o da Searle (1999) è stato ampiamente utilizzato in virtù della sua semplicità, seppur in mancanza di una soddisfacente validazione. Questo metodo prevede 4 stadi di fibrosi: 0 = fibrosi assente; 1 = tratti portali allargati e fibrotici; 2 = setti peri portali o porto-portali ma architettura

parenchimale intatta; 3 = fibrosi con distorsione dell'architettura ma non cirrosi franca; 4 = cirrosi [81].

- Il sistema Knodell (*Histology activity index*, HAI o Knodell score del 1981) descrive in modo oggettivo, semi quantitativo e riproducibile le lesioni morfologiche dell'epatite cronica. Il modello prevede 4 punteggi separati per ogni componente della lesione: da 0 a 10 per la necrosi periportale con o senza necrosi a ponte; da 0 a 4 per la degenerazione intra lobulare e necrosi focale; da 0 a 4 per l'infiammazione portale; da 0 a 4 per la fibrosi. Le prime tre categorie definiscono l'intensità dell'attività infiammatoria (*grading*), mentre la quarta indica il grado di fibrosi e l'alterazione della cito architettura epatica (*staging*). Più precisamente, la fibrosi è così classificata: 0 = assente; 1 = espansione fibrosa portale; 3 = fibrosi a ponte (porto-portale o porto-centrale); 4 = cirrosi [82].
- Il metodo semi quantitativo proposto da Deugnier (1992) è stato invece validato in popolazioni di soggetti con sovraccarico di ferro primario e secondario. La relativa complessità di questo sistema lo ha reso però poco idoneo alla pratica medica e l'utilizzo è limitato ad ambiti specialistici o di ricerca. Il sistema valuta l'accumulo di ferro con tre punteggi: il punteggio di ferro epatocitario (HIS; 0-36), quello sinusoidale (SIS; 0-12) e portale (PIS; 0-12). Il punteggio di ferro totale (TIS) corrisponde alla somma dei tre e va da 0 a 60 [83].
- Il metodo di Ishak (1995) utilizza una scala continua di valori per descrivere il grado di attività e lo stadio di fibrosi come due parametri separati. Questo sistema attribuisce un punteggio massimo di 18 per definire la componente necro-infiammatoria ed una scala che va da 0 a 6 per valutare il grado di fibrosi. Nell'Ishak score, la fibrosi è classificata come segue: 0 = assente; 1 = espansione fibrosa di alcune aree portali, con o senza brevi setti fibrosi; 2 = espansione fibrosa della maggior parte delle aree portali, con o senza brevi setti fibrosi; 3 = espansione fibrosa della maggior parte delle aree portali con occasionali ponti porto-portali; 4 = espansione fibrosa delle aree portali con marcata fibrosi a ponte (porto-portale o porto-centrale); 5 = marcata fibrosi a ponte (porto-portale e/o porto-centrale) con noduli occasionali (cirrosi incompleta); 6 = cirrosi [84].
- Il Metavir score (1996) prevede due punteggi separati per la valutazione dell'attività istologica e per lo stadio di fibrosi. L'attività va da A0 ad A3 (da assenza di attività ad attività severa). La fibrosi è classificata in 4 stadi: F0 = no fibrosi F1 = allargamento del tratto portale senza setti F2 = allargamento del tratto portale con formazione di rari setti F3 = numerosi setti senza cirrosi F4 = cirrosi [85].

Nel caso in cui non sia possibile eseguire la biopsia, è possibile ricorrere a metodiche non invasive per la misurazione del ferro epatico e della fibrosi. Per la quantificazione del ferro nel fegato è ormai invalso l'uso della risonanza magnetica che sfrutta le proprietà paramagnetiche della ferritina e dell'emosiderina. L'immagine ottenuta fornisce informazioni affidabili del sovraccarico di ferro di tipo quantitativo, attraverso la misurazione di un indicatore (T2* o R2*) che può essere poi trasformato in concentrazione di ferro epatico (LIC) mediante equazioni di riferimento validate presso alcuni centri. Un'altra metodica non invasiva è la biosusciometria magnetica con la SQUID

(*superconductive quantum interference device*). Questa tecnica sfrutta le proprietà magnetiche delle proteine di deposito ferritina ed emosiderina e permette di valutare l'accumulo di ferro in un'area 10.000 volte superiore a quella analizzata con la biopsia. Purtroppo però, i centri che dispongono dello strumento sono molto pochi (uno solo in Italia, a Torino) e l'elevato costo e l'*expertise* necessario al funzionamento dello strumento rendono difficile e sporadico il suo utilizzo. Per quanto riguarda la fibrosi, un metodo non invasivo entrato nell'uso clinico è l'elastografia (Fibroscan®) che tuttavia non è validato per tutte le forme di epatopatia cronica.

Terapia. Per quanto riguarda la terapia, l'emocromatosi viene trattata mediante salasso in due diverse fasi: quella iniziale e di mantenimento. Nella fase iniziale, che solitamente ha inizio quando i valori di ferritina superano i 300-350 µg/L nell'uomo ed i 200 µg/L nella donna, viene rimossa settimanalmente un'unità di sangue equivalente a 400 mL nell'uomo e 350 mL nella donna. Ogni mL contiene 0.5 mg di ferro. Per evitare lo sviluppo dell'anemia i valori di entrambe gli indici del ferro vengono periodicamente controllati (ogni 4/8 salassi). La ferro deplezione viene considerata raggiunta con livelli di ferritina <50 µg/L e di saturazione della transferrina <45% [86]. Nella fase di mantenimento, il salasso viene proposto con frequenza bimestrale o trimestrale. Cardiopatia, cirrosi ed anemia sono gli unici casi in cui è possibile sostituire la salassoterapia con la terapia ferro chelante.

Complicazioni e danno d'organo. Nei pazienti con emocromatosi ereditaria, la principale conseguenza del costante accumulo di ferro nel corpo è il danno d'organo. Il distretto principalmente interessato dall'accumulo marziale è il fegato, sede della sintesi di epcidina. Il ferro, una volta assorbito dall'intestino, raggiunge il fegato utilizzando il circolo portale. Negli epatociti, l'accumulo del metallo segue un gradiente che dalla zona periportale raggiunge quella centrale e, nei pazienti con fenotipo severo, anche i macrofagi. Valori di ferritina sierica superiori a 1000 µg/L rappresentano il valore oltre il quale aumenta significativamente la probabilità di sviluppare danno epatico. Lo sviluppo di fibrosi è il primo (reversibile) *step* del danno epatico e può successivamente evolvere irreversibilmente in cirrosi ed epatocarcinoma. Il paragrafo successivo spiega nel dettaglio l'eziopatogenesi del processo fibrotico.

Il progressivo ed incontrollato accumulo marziale può però interessare anche altri distretti corporei come le articolazioni (metacarpo-falangea e interfalangee prossimali su tutte), il cuore e l'asse ipotalamo-ipofisi. L'accumulo marziale a livello del cuore determina lo sviluppo di una cardiomiopatia restrittiva capace di condurre il paziente verso uno scompenso cardiaco molto severo. L'eccessiva quantità di ferro causa una sensibile riduzione del numero di cardiomiociti alterando la contrattilità del tessuto cardiaco. Come per il danno epatico, anche il tessuto cardiaco è interessato dalla formazione dei radicali liberi (come la maloniladeide) e la ferro deplezione rappresenta un approccio molto valido, in grado di migliorare sensibilmente il fenotipo del paziente [87, 88].

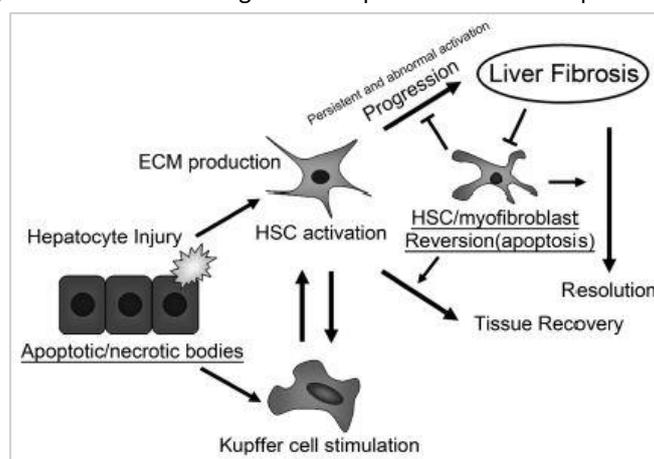
Un altro distretto sensibilmente danneggiato dall'accumulo di ferro è l'asse ipotalamo-ipofisi. Diverse evidenze hanno dimostrato come il metallo vada ad accumularsi a livello delle cellule gonadotrope e lattotrope causando una significativa riduzione dei livelli di testosterone, FSH e LH. Nei pazienti con emocromatosi, l'ipogonadismo si manifesta con una perdita della libido e

determina l'insorgenza di ipogonadismo ipogonadotropo che negli uomini causa impotenza e nelle donne amenorrea. In presenza di sovraccarico lieve, la ferro deplezione limita lo sviluppo di gravi conseguenze a livello cerebrale, mentre (al momento) nei casi di sovraccarico severo la terapia sostitutiva è l'unico valido approccio [89, 90].

Fibrosi epatica. La fibrosi epatica è un processo caratterizzato dalla deposizione incontrollata di matrice extracellulare (ECM) che porta ad una significativa variazione della cito architettura del parenchima epatico. In condizioni fisiologiche esiste uno stretto equilibrio tra sintesi e degradazione della matrice extracellulare: la sintesi della matrice è opera delle cellule stellate, mentre la degradazione avviene ad opera delle metallo proteinasi (MMPs). L'azione di una *noxa patogena* può alterare il sottile equilibrio tra deposizione e degradazione dell'ECM causando una variazione quantitativa e qualitativa (aumento dell'espressione di collagene di tipo I, III, IV, fibronectina, laminina ed elastina) della deposizione di collagene.

I meccanismi tramite cui il ferro in eccesso danneggia il fegato e porta alla fibrosi sono molteplici. In condizioni fisiologiche, il ferro all'interno della cellula si trova per la maggior parte sotto forma di deposito (all'interno della ferritina) oppure all'interno dei precipitati di idrossido di ferro. Solo una piccola parte definita LIP (*labile iron pool*) è libera e partecipa alle reazioni di ossido riduzione che comportano la creazione di radicali liberi dell'ossigeno. I radicali liberi vengono quindi prodotti in piccole quantità e possono essere tamponati da agenti anti-ossidanti. Quando il ferro all'interno della cellula aumenta, anche il LIP aumenta e i radicali liberi vengono prodotti in una tale quantità da non permetterne più il controllo da parte degli agenti antiossidanti. I danni più gravi interessano la membrana cellulare e quelle degli organelli, come i lisosomi e i mitocondri. La rottura della membrana mitocondriale provoca una significativa alterazione della sua permeabilità causando la fuoriuscita del citocromo C, che dà il via a un segnale proapoptotico. I fenomeni lipoperossidativi causano poi forti danni a proteine e DNA. All'interno dell'epatocita, il ferro in eccesso è in grado di attivare le vie che conducono all'apoptosi (tramite NFKb) o alla necrosi cellulare (tramite AP1). Questo processo può essere mediato dallo stress ossidativo o attivato direttamente dal ferro. NFKb stimola infatti la sintesi di fattori pro-infiammatori quali TNFb, IL6 e MIP1, responsabili dell'attivazione delle cellule stellate che svolgono un ruolo chiave nella genesi della fibrosi epatica [91-93]. AP1, invece, ha un ulteriore ruolo nel controllo dell'espressione del pro collagene I e quindi sempre nella genesi della fibrosi epatica [61, 94]. Il rilascio di mediatori dell'infiammazione da parte degli epatociti (IGF1, TNFa, EGF) e successivamente anche dalle cellule di Kupffer (PDGF, TGFb1) determinano la trans differenziazione delle cellule stellate verso un fenotipo miofibroblastico con capacità contrattile, proliferativa e infiammatoria [95]. Le cellule stellate, così attivate, rilasciano a loro volta TGFb1 e PDGF-BB, che determinano un automantenimento dello stimolo transdifferenziativo. Le cellule con fenotipo miofibroblastico sono responsabili della deposizione di collagene e dell'instaurarsi del danno fibrotico. Il ferro, quindi, porta alla fibrosi con un meccanismo che viene definito indiretto. L'ipotesi che vi sia un modalità di attivazione diretta del ferro sulle cellule stellate non è, al momento, confermata [64, 96, 97].

Figura 11. Cause e conseguenze del processo di fibrosi epatica [98].



La fibrosi così causata si mantiene fin tanto che il fattore scatenante non viene eliminato, l'attività dei miofibroblasti continua e la fibrosi interessa aree sempre più estese di fegato. Questo impedisce la rigenerazione degli epatociti compromettendo la funzionalità epatica [99]. È altrettanto vero, però, che la fibrosi sia un evento reversibile qualora venga rimossa la causa scatenante prima dello sviluppo di una cirrosi consolidata (figura 11). È fondamentale, quindi, una diagnosi precoce per prevenire lo sviluppo della cirrosi epatica e le sue conseguenze. La coesistenza di altri fattori di danno epatico quali alcool, infezioni virali, steatosi e steatoepatite non alcolica possono facilitare e accelerare lo sviluppo della fibrosi epatica nei pazienti con emocromatosi.

EMOCROMATOSI DI TIPO-1: IL RUOLO DEI MODIFICATORI GENETICI ED ACQUISITI

L'HH è la malattia da sovraccarico di ferro più comune nelle popolazioni caucasiche. Il difetto genetico prevalente è la mutazione p.C282Y (rs1800562, c.G845A) in omozigosi. Questa variante riduce la funzionalità di *HFE*, causa un'inadeguata produzione di epcidina e lo sviluppo di sovraccarico di ferro. Sorprendentemente, però, non tutti i pazienti omozigoti per questa mutazione presentano lo stesso fenotipo. Diversi studi hanno dimostrato che solo il 30% degli uomini ed il 5% delle donne hanno un grave sovraccarico di ferro, danno d'organo ed un'alterazione degli indici sierici del ferro suggerendo come la malattia abbia penetranza incompleta ed espressione variabile. I fattori in grado di modificare il fenotipo della malattia si dividono in acquisiti (o ambientali) e genetici [77].

I fattori ambientali. La dieta, l'eccessivo consumo di alcool, la coesistenza con altre malattie ereditarie (talassemia e anemia sideroblastica) o acquisite (steatosi, sindrome metabolica ed epatite B o C), le perdite di sangue fisiologiche (donazioni di sangue e ciclo mestruale) o patologiche (ferite o microlesioni da microtraumi) e l'utilizzo di farmaci sono i principali fattori ambientali in grado di modulare il fenotipo malattia.

Per quanto riguarda la dieta, i dati attualmente in possesso suggeriscono come l'assunzione mediante l'alimentazione di fattori come l'acido ascorbico, la cisteina, la vitamina A, gli ioni calcio, il rame ed il molibdeno sembra possa favorire l'assorbimento intestinale di ferro. Per contro, tannini (contenuti in tè e caffè), fitati, ossalati e polifenoli (questi ultimi presenti nel vino rosso) sembrano

avere effetto opposto [100]. Una possibile relazione tra un'alimentazione ricca di carne e un maggior sovraccarico di ferro nei pazienti con emocromatosi resta, al momento, solo un'ipotesi [101]. All'eccessivo consumo di alcool, diversi studi hanno dimostrato come l'etanolo sia in grado di: a) inibire l'epidina mediante attivazione del fattore di trascrizione *HIF1A*, a sua volta responsabile dell'inibizione di *CEBP* alfa e *CREBH*, due fattori di trascrizione solitamente responsabili dell'attivazione di epidina; b) inibire la via di trasduzione del segnale che coinvolge le BMPs ed il fattore di trascrizione *SMAD4*, direttamente coinvolto nell'attivazione dell'ormone epatico; c) attivare la cascata citochinica responsabile della produzione di diverse specie reattive dell'ossigeno in grado di danneggiare la cellula stessa e limitare il funzionamento degli enzimi deputati alla detossificazione dei ROS. Diverse evidenze hanno anche dimostrato come l'introito alcolico correli positivamente con lo sviluppo di cirrosi nei portatori della malattia essendo, al pari del ferro, una epatotossina capace di innescare stress ossidativo e fibrosi. Un *cut-off* importante sarebbe rappresentato dai 60 g/die di alcool [102].

Un altro modulatore acquisito del fenotipo malattia è rappresentato dalla sindrome metabolica. Uno studio del 2006 ha dimostrato come questa non sia in grado di modificare il grado di fibrosi nei soggetti omozigoti per la mutazione p.C282Y, nemmeno considerando i singoli fattori della sindrome. Negli eterozigoti composti (p.C282Y/p.H63D), che solitamente presentano un sovraccarico marziale minore, si è osservata una correlazione tra intolleranza glucidica e grado di fibrosi, lo stesso valeva anche per la NASH e il grado di fibrosi. Si può dedurre, quindi, che intolleranza glucidica e NASH siano due modificatori del fenotipo e che la loro influenza sia tanto maggiore quanto minore è l'accumulo di ferro [103].

Uno studio pubblicato nel 2005 sembra confermare come anche la steatosi possa essere ragionevolmente considerata un modificatore del fenotipo emocromatosico. In 214 pazienti con emocromatosi prima della salassoterapia, si è visto che la percentuale di steatosi alla biopsie correlava positivamente con età, sesso maschile, obesità e introito alcolico. Inoltre i pazienti che presentavano steatosi avevano livelli più elevati di ferritina sierica e ALT [104, 105]. Il sesso maschile, l'introito alcolico, il sovraccarico di ferro e la steatosi erano le uniche variabili che correlavano positivamente e indipendentemente con la fibrosi. Si è inoltre osservato, come già era stato evidenziato in altri studi, che la prevalenza di steatosi diminuiva al progredire della NASH verso la cirrosi [106]. L'osservazione che la steatosi correli positivamente con la fibrosi, a prescindere dal contributo dell'introito alcolico o della steatoepatite, ha fatto propendere per l'ipotesi che questa possa avere un ruolo indipendente e sinergico con il ferro nel danneggiare il fegato.

Come per l'eccessivo introito alcolico, anche i virus HBV ed HCV sembrano in grado di limitare l'espressione dell'ormone epatico epidina modulando la via di trasduzione del segnale delle BMPs. A questo si aggiunge l'effetto epatotossico del virus che facilita lo sviluppo della fibrosi/cirrosi epatica per livelli sovraccarico di ferro non particolarmente elevati [90, 107].

Altri fattori acquisiti in grado di modulare il fenotipo della malattia sono rappresentati da alcune malattie ereditarie che talvolta coesistono con l'emocromatosi. Nella talassemia, ad esempio, l'eritropoiesi inefficace determina l'emolisi di un elevato numero di emazie responsabili di un

significativo incremento dei livelli di ferro circolante capace poi di accumularsi a livello del parenchima degli organi e danneggiarli irrimediabilmente [108].

Ultimo modulatore acquisito considerato è rappresentato dai farmaci. Più precisamente, le classi di farmaci che interagiscono con il metabolismo del ferro sono gli inibitori della pompa protonica e i bloccanti dei canali del calcio L-type, come la nifedipina. La somministrazione di inibitori della pompa protonica comporta una diminuzione della frequenza dei salassi in pazienti omozigoti per la mutazione p.C282Y [109]. Questo è dovuto all'aumento del pH gastrico e al conseguente minor assorbimento intestinale. La nifedipina, invece, agisce su *DMT1* determinando la mobilizzazione del ferro dal fegato e l'aumento della sua escrezione urinaria. Per questo motivo la nifedipina è stata proposta come possibile trattamento del sovraccarico di ferro.

I fattori genetici. La maggior parte di pazienti omozigoti per la mutazione p.C282Y presenta alterazioni biochimiche dello stato del ferro, ma solo una parte sviluppa almeno una manifestazione clinica della patologia. Oltre ai modulatori ambientali precedentemente discussi, molti fattori genetici come le mutazioni ed i polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs) sono stati proposti come potenziali modificatori dell'espressione fenotipica dell'emocromatosi ereditaria.

I primi studi hanno evidenziato la tendenza a riprodurre all'interno della stessa famiglia gradi simili di severità di penetranza ed espressione [110, 111] e successivamente che i portatori dell'aplotipo "ancestrale", cioè di una specifica combinazione di alleli nei loci adiacenti al gene *HFE*, esprimessero delle manifestazioni cliniche più severe rispetto a pazienti con un diverso assetto allelico [112].

Successivamente, in uno studio condotto da Bulaj et al sui familiari di primo grado di 291 pazienti con HH con un'elevata saturazione della transferrina o con manifestazioni cliniche legate al sovraccarico di ferro, sono stati individuati 214 omozigoti per la mutazione p.C282Y [113]. Le manifestazioni cliniche dei familiari sono risultate ben più frequenti nei familiari dei probandi che manifestavano clinicamente la malattia, rispetto ai familiari dei probandi che presentavano solo alterazioni biochimiche. La differenza tra i due gruppi è risultata significativa solo per il sesso maschile, nonostante sia stata riscontrata in entrambi i sessi. La stessa concordanza è stata rinvenuta anche analizzando la fibrosi: i familiari di probandi con fibrosi erano più a rischio di presentare a loro volta alterazioni epatiche.

Nel 2002, uno studio realizzato su un'ampia popolazione di gemelli australiani ha dimostrato come lo stato del ferro fosse influenzato oltre che da fattori quali età, sesso e BMI, anche da fattori genetici quali l'eterozigosi per p.C282Y e p.H63D e in maggior misura da fattori genetici ancora non definiti, suggerendo che l'assetto marziale individuale sia il risultato di una complessa interazione tra background genetico e fattori ambientali [114].

I dati ottenuti sino ai primi anni 2000 hanno progressivamente focalizzato l'attenzione sull'azione dei modulatori genetici dell'HH. Da quel momento, infatti, sono stati realizzati sempre più studi incentrati sulla ricerca di mutazioni e polimorfismi nei geni coinvolti direttamente ed indirettamente con il metabolismo del ferro.

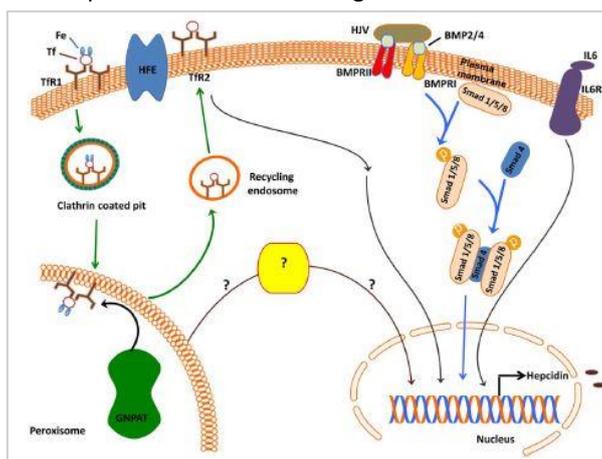
Parlare di Polimorfismo a Singolo Nucleotide (SNP) significa riferirsi ad una variante genetica che interessa un solo nucleotide. Più precisamente, la variazione può essere una sostituzione di una purina con una purina o di una pirimidina con una pirimidina (transizione), una sostituzione purina-

pirimidina o viceversa (trasversione), una delezione di una singola base o una sua inserzione. Tutte queste variazioni possono interessare sequenze codificanti o non codificanti del gene. I polimorfismi presenti nelle regioni codificanti possono portare alla formazione dello stesso aminoacido (polimorfismi di non sostituzione) o di un aminoacido differente (polimorfismi di sostituzione). Gli SNPs in posizioni non codificanti interessano le regioni non trascritte o non tradotte in 5' e 3', le regioni introniche o inter geniche. Alcuni polimorfismi possono alterare la struttura primaria della proteina, modificare il meccanismo di controllo trascrizionale o traduzionale, causare alterazioni dello splicing o modificare la stabilità dell'mRNA. Un locus genetico viene considerato polimorfo se l'allele più comune ha una frequenza all'interno della popolazione < 0.95 , e quindi se l'allele mutato polimorfico è presente in più del 5% de soggetti ($MAF \geq 0.05$).

L'interesse nato e cresciuto nel corso del tempo per i polimorfismi a singolo nucleotide è dovuto al fatto che queste varianti genetiche siano una delle fonti maggiori di variabilità genetica tra gli individui. A tal proposito, la realizzazione del progetto HapMap ha dato modo di catalogare tutti i polimorfismi presenti nel genoma umano e constatare come il *linkage disequilibrium*, cioè la probabilità che due alleli appartenenti a due o più loci siano associati, sia distribuito in blocchi ben definiti all'interno del DNA. In tutto il genoma è possibile osservare aree con diversa frequenza di ricombinazione. Dal punto di vista pratico questa scoperta ha permesso di sfruttare alcuni SNPs come marcatori di un determinato aplotipo con il quale sono in *linkage disequilibrium*. Negli ultimi dieci anni studi su singoli geni e diversi studi di associazione su tutto il genoma (*Genome Wide Association Study*, GWAS) sono stati realizzati da diversi gruppi di ricerca con l'intento di individuare modificatori genetici comuni o rari dell'omozigosi p.C282Y. Diversi studi hanno identificato specifiche varianti in geni direttamente o indirettamente correlati con il metabolismo del ferro, come *HJV*, *TFR2*, *HAMP* [115], aptoglobina [76], *TF* [116], *TfR1* [117], *TNFA* [118], *BMP2* e *BMP4* [119], risultati peraltro solo in parte confermati oppure in grado di spiegare solo una piccola parte della variabilità fenotipica dell'emocromatosi *HFE*. Nei primi anni 2000, l'utilizzo di topi *knockout* per *HFE* e doppi *knockout* per *HFE* e *DMT1* ha permesso di studiare approfonditamente i meccanismi di assorbimento del ferro a livello intestinale suggerendo come alcune delle varianti nei geni codificanti per *CYBRD1* e *DMT1* fossero in grado di modulare il fenotipo dell'emocromatosi. A questi studi *in vivo* hanno poi fatto seguito diversi studi *in vitro* e di associazione. Un esempio è rappresentato da quello condotto nel 2012 nel nostro laboratorio di ricerca in cui è stata dimostrata un'associazione tra 17 SNPs in geni coinvolti nella regolazione del metabolismo del ferro (*TFR1*, *BMP2*, 4 e 9, *DMT1*, *HIF2A*, *CP*, *CYBRD1* e *TMPRSS6*) e tre marcatori fenotipici (saturazione della transferrina, ferritina e ferro rimosso). In particolare, è stato dimostrato come lo SNP rs3806562, localizzato a livello del 5'UTR del gene *CYBRD1* ed appartenente allo stesso blocco aplotipico dell'rs884409 (già associato ai livelli di ferritina in pazienti con HH) fosse associato ad un'elevata saturazione della transferrina [120]. Un ulteriore esempio di come i modulatori genetici possano influenzare il fenotipo malattia è rappresentato da un recente studio condotto su diverse popolazioni europee. 11 loci, di cui 5 nuovi (*ABO*, *ARNTL*, *FADS2*, *NAT2*, *TEX14*), sono stati identificati sui geni codificanti per transferrina o ferritina. Tutti questi *novel loci* influenzano significativamente il fenotipo malattia modulando attivamente il metabolismo del ferro [121].

Un ulteriore passo avanti è stato compiuto con l'avvento di diverse tecniche di sequenziamento del DNA di ultima generazione. Studi sull'intero genoma (ed esoma) hanno permesso di identificare modificatori genetici rari o comuni di sovraccarico di ferro in pazienti con emocromatosi *HFE*. Due esempi sono quelli rappresentati dall'*rs236918* nel gene *PCSK7* e dall'*rs11558492* in *GNPAT*.

Figura 12. *GNPAT*: un potenziale modificatore genetico di sovraccarico di ferro [122].



Più precisamente, nel 2014, Stickel et al. hanno dimostrato come il polimorfismo *rs236918* in *PCSK7* fosse associato allo sviluppo di fibrosi epatica avanzata in pazienti omozigoti per la mutazione *p.C282Y* originari del centro-nord Europa (Germania, Austria e Svizzera) [123]. Fisiologicamente, *PCSK7* codifica per una proteina convertasi subtilisina/kexina di tipo 7 appartenente alla famiglia delle proteasi convertasi. Oltre ad essere espressa in modo ubiquitario, è la convertasi più conservata tra quelle conosciute finora e viene sintetizzata come pre-pro-proteina, cioè sotto forma di precursore inattivo. Dopo aver subito modificazioni post traduzionali (N-glicosilazione) a livello del reticolo endoplasmico, la proteina viene trasportata ed esposta in membrana mediante una vescicola endosomiale. A livello della superficie cellulare questa proteasi interagisce con il target e cliva la sequenza bersaglio a livello di specifici residui basici. Diverse evidenze su zebrafish hanno messo in luce come questa proteasi favorisca un significativo incremento dell'RNA messaggero di TGF β [124]. Il successivo cleavage, mediato proprio da *PCSK7*, sembra determinare la sua attivazione e capacità di agire come citochina profibrinogenica su cellule stellate e miofibroblasti portalari responsabili di sintesi ed accumulo di collagene. Un secondo studio ha poi dimostrato come l'*rs236918* fosse associato ad un significativo incremento dei livelli plasmatici di TFR solubile suggerendo una diretta influenza di *PCSK7* sull'omeostasi del ferro [125].

Per quanto attiene l'*rs11558492* (A>G; *p.D519G*) in *GNPAT*, fisiologicamente, il gene codifica per un enzima (gliceronefosfato O-acetiltransferasi) attivo a livello del perossisoma e responsabile del primo passaggio di sintesi di uno dei più importanti glicerofosfolipidi di membrana: il plasmalogeno. In condizioni di equilibrio, l'enzima assicura il mantenimento della fluidità del doppio strato fosfolipidico, difende dallo stress ossidativo, promuove eventuali interazioni intercellulari e favorisce un corretto *trafficking* mediato dalle vescicole di clatrina (figura 12).

Il polimorfismo è stato recentemente proposto da alcuni gruppi di ricerca come modificatore genetico del fenotipo emocromatosico [126, 127]. Altri studi, invece, hanno confutato il suo ruolo prognostico accendendo un forte dibattito [128-131].

SCOPO

L'emocromatosi ereditaria è una malattia genetica causata da un'inadeguata produzione dell'ormone epatico epcidina o da un'alterata interazione con il suo recettore ferroportina. Ad oggi sono note cinque diverse forme della patologia. Quattro hanno ereditarietà autosomica recessiva e sono dovute a specifiche varianti genetiche presenti a livello delle sequenze codificanti per *HFE*, *HFE2*, *HAMP* e *TFR2*. Una sola, invece, ha ereditarietà autosomica dominante ed è causata da mutazioni (*gain/loss of function*) nel gene *SLC40A1* che codifica per ferroportina, l'unico esportatore di ferro dei vertebrati [132].

Tra le cinque diverse forme di malattia quella più diffusa è l'emocromatosi di tipo 1 (HH), causata in più dell'80% dei pazienti dalla mutazione p.C282Y (rs1800562, c.G845A) in omozigosi nel gene *HFE*. Dal punto di vista molecolare, la variante limita la stabilizzazione di *HFE* a livello della membrana plasmatica e l'attivazione della via di trasduzione del segnale BMP/SMAD in grado di promuovere l'espressione di epcidina [67].

La ridotta produzione di epcidina si traduce in un aumento dell'assorbimento di ferro a livello del piccolo intestino e del suo rilascio dalle cellule macrofagiche. Questo determina un aumento della saturazione della transferrina, la comparsa di ferro libero (*non-transferrin bound iron*, NTBI) e l'accumulo di ferro nei tessuti responsabile del progressivo incremento dei valori di ferritina. Se la malattia non viene identificata per tempo e trattata adeguatamente, l'accumulo del metallo a livello epatico, cardiaco ed endocrino può provocare danni irreversibili al paziente e, nel peggiore dei casi, causarne la morte. Ad oggi, cirrosi epatica ed epatocarcinoma rimangono le principali cause di mortalità dei pazienti emocromatosici con diagnosi tardiva [133, 134].

Malgrado l'emocromatosi *HFE* sia nella stragrande maggioranza dei casi determinata dallo stesso assetto genetico (omozigosi p.C282Y), è ormai riconosciuta l'ampia variabilità fenotipica della malattia. In uno studio durato 12 anni, Allen et al. [77] ha dimostrato come solo il 28% degli uomini e l'1.2% delle donne omozigoti per la mutazione p.C282Y avesse almeno una manifestazione clinica dell'HH suggerendo come la penetranza incompleta e l'espressione variabile fossero due caratteristiche della patologia.

Per spiegare l'eterogeneità fenotipica e la bassa penetranza che contraddistinguono l'HH, diversi studi realizzati nel corso degli ultimi 10 anni hanno focalizzato l'attenzione sui modificatori acquisiti del fenotipo come il sesso, il consumo di alcool, l'obesità, la steatosi epatica, l'età, la coesistenza di epatiti croniche virali e del tratto b-talassemico [106, 135, 136]. Parallelamente, studi effettuati su modelli animali di *HFE*-HH hanno dimostrato come il *background* genetico influenzi significativamente il sovraccarico di ferro epatico suggerendo la presenza di modificatori genetici quali mutazioni e/o polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs) [137].

Più di recente, l'avvento di tecnologie di sequenziamento del DNA di ultima generazione ha facilitato la ricerca e l'identificazione di modificatori rari o comuni del sovraccarico di ferro in pazienti omozigoti per la mutazione p.C282Y. Un certo interesse si è focalizzato su due SNPs in altrettanti

geni non direttamente coinvolti con l'omeostasi del ferro: l'rs236918 in *PCSK7* e l'rs11558492 in *GNPAT* [123, 126]. Per quanto riguarda *PCSK7*, Stickel et al. [123] hanno osservato come l'rs236918 fosse associato allo sviluppo di fibrosi epatica avanzata in pazienti omozigoti per la mutazione p.C282Y originari del centro-nord Europa. Un secondo studio ha poi dimostrato come questo SNP fosse associato ad un significativo incremento dei livelli plasmatici di TFR solubile suggerendo una diretta influenza di *PCSK7* sull'omeostasi del ferro. L'rs11558492 in *GNPAT*, invece, è stato recentemente proposto da alcuni gruppi di ricerca come modificatore genetico del fenotipo emocromatosico in pazienti omozigoti per la mutazione p.C282Y originari del Nord America ed in un sottogruppo di maschi di origine francese con sovraccarico severo [126, 127]. Altri studi, invece, hanno confutato il suo ruolo prognostico accendendo un forte dibattito [127, 128, 130, 131].

Lo scopo della mia tesi è stato quello di valutare il ruolo di questi due polimorfismi in una popolazione di 298 pazienti di origine italiana omozigoti per la mutazione p.C282Y. Più precisamente, il nostro (duplice) intento è stato quello di: a) valutare se l'rs236918 in *PCSK7* fosse significativamente associato allo sviluppo di fibrosi epatica; b) capire se l'rs11558492 in *GNPAT* potesse essere considerato un modulatore dello stato del ferro.

Abbiamo ritenuto importante analizzare queste varianti genetiche in una popolazione di origine italiana che si caratterizza per essere geneticamente molto eterogenea [138]. Inoltre, negli studi di associazione è fondamentale confermare questi risultati in altre popolazioni, per ribadire la validità del polimorfismo identificato ed esaminarne approfonditamente il potenziale ruolo prognostico. Infatti, identificare modificatori genetici in grado di influenzare l'entità del sovraccarico di ferro e lo sviluppo della fibrosi epatica è di estrema importanza per diagnosticare la malattia in tempo e migliorare l'aspettativa di vita dei pazienti.

MATERIALI E METODI

Selezione dei pazienti. Dai registri clinici di tre centri di riferimento per lo studio del metabolismo del ferro (ASST di Monza dell'Ospedale San Gerardo, Fondazione IRCCS Ca' Granda di Milano e Policlinico GB Rossi di Verona) sono stati selezionati 298 pazienti (205 maschi e 93 femmine) non imparentati fra loro, con genotipo omozigote per la mutazione p.C282Y del gene *HFE*. Tutti i pazienti, seguiti fin dal 1990, hanno dato il loro consenso libero ed informato per l'utilizzo del DNA per l'analisi genetica dei polimorfismi rs11558492 in *GNPAT* ed rs236918 in *PCSK7*.

Criteri di inclusione. (i) disponibilità di informazioni cliniche al momento della diagnosi relative ad età, sesso, consumo alcolico giornaliero, indici dello stato del ferro (sideremia, saturazione della transferrina [%TS] e ferritina sierica [SF]) e di funzionalità epatica (alanina aminotransferasi [ALT]), (ii) campioni istologici adeguati per la valutazione della fibrosi epatica, (iii) campioni di DNA di buona qualità (conservati a -80° C).

Criteri di esclusione. I pazienti affetti da patologie epatiche croniche come l'epatite autoimmune, l'epatite (B o C) virale cronica o il deficit di alfa-1 anti tripsina e con un consumo alcolico >50 g/die negli uomini e >30 g/die nelle donne sono stati esclusi dallo studio.

Raccolta dei dati biochimico-clinici. Sono stati raccolti i seguenti dati biochimico-clinici disponibili al momento della diagnosi della malattia:

- Parametri anamnestici: età (anni), sesso e consumo alcolico giornaliero (etanolo g/die).
- Indici dello stato del ferro: gli indici biochimici del ferro sono stati misurati usando metodi standard. La %TS è stata calcolata con la seguente formula: $\{[\text{sideremia}/(\text{transferrina} \times 1.42)] \times 100\}$. Ogni paziente è stato sottoposto a terapia ferro depletiva attraverso salassi settimanali o quindicinali fino al raggiungimento della ferro deplezione (definita da livelli di ferritina sierica $\leq 50 \mu\text{g/L}$ e da saturazione della transferrina <50%). La quantità di ferro rimosso (IR) è stata determinata considerando il numero ed il volume di ogni salasso (400 mL nell'uomo, 350 mL nella donna) fino al raggiungimento della ferro deplezione (1 mL di sangue = 0.5 mg di ferro).
- Indici di funzionalità epatica: livelli di ALT (U/L) sono stati misurati utilizzando metodi standard.
- Danno d'organo epatico: La valutazione del danno epatico è stata effettuata mediante biopsia epatica. La fibrosi è stata valutata secondo lo score di Ishak [84]. La biopsia era presente in 187 pazienti (148 maschi e 39 femmine). La concentrazione di ferro epatico (LIC) è stata determinata su campioni biopsici freschi o deparaffinati, mediante spettrofotometria ad assorbimento atomico (Perkin-Elmer S2380, Norwalk, CT) [112].

Estrazione DNA da sangue intero. Il DNA è stato estratto da linfociti di sangue periferico ottenuto da un prelievo venoso contenente EDTA. Per l'estrazione si è utilizzato il Kit *Wizard® genomic DNA purification* (Promega, Madison, WI, USA) seguendo il protocollo fornito dalla ditta produttrice.

Analisi genetica.

- Rs11558492 in *GNPAT*. Il polimorfismo rs11558492 (p.D519G; A>G), localizzato a livello dell'esone 11 del gene *GNPAT* sul cromosoma 1, è stato studiato in 298 pazienti di origine italiana con genotipo omozigote per la mutazione p.C282Y. La tecnica di *Amplification Refractory Mutation System Polymerase Chain Reaction* (ARMS PCR) è stata utilizzata per tipizzare lo SNP nella popolazione. Più precisamente, l'ARMS PCR prevede una singola reazione di PCR per ogni campione con quattro diversi *primers* (tabella 2). Gli oligonucleotidi più esterni (*outer primers*) amplificano la regione di 309 paia di basi (pb) che comprende lo SNP, mentre i più interni (*forward* e *reverse inner*) hanno la base in 3' e 5' allele-specifica. I pazienti omozigoti per l'allele A (il più frequente) hanno mostrato una banda a 209 pb (il risultato dell'amplificazione del frammento di DNA compreso tra il *forward outer* ed il *reverse inner*). I pazienti omozigoti per l'allele G, invece, presentavano una banda a 145 pb (prodotta dall'amplificazione del *forward inner* e del *reverse outer*). Sia gli omozigoti per l'allele più frequente, sia quelli per l'allele G hanno mostrato anche la banda relativa al frammento amplificato con gli *outer primers*. I prodotti di PCR sono stati verificati su gel di agarosio all'1.5% con bromuro di etidio. Campioni casuali di DNA sono stati sequenziati con sequenziamento diretto per confermare i risultati ottenuti.

Come gruppo di controllo per lo studio del polimorfismo, sono stati selezionati 169 donatori di sangue di sesso maschile, di età compresa nel range del nostro campione e di origine italiana appartenenti ad una coorte precedentemente studiata per definire la prevalenza delle mutazioni nel gene *HFE* [139]. La selezione è stata effettuata sulla base del genotipo *HFE* (*wild type* o eterozigoti per la mutazione p.H63D), del sesso (le femmine sono state escluse) e della disponibilità dei dati di ferritina (alla prima donazione di sangue).

- Rs236918 in *PCSK7*. Il sottogruppo di 187 pazienti con HH omozigoti per la mutazione p.C282Y di cui era disponibile la biopsia epatica è stato oggetto di studio per il polimorfismo rs236918 (G>C), localizzato a livello dell'introne 9 del gene *PCSK7* sul cromosoma 11. Lo SNP è stato genotipizzato con la tecnica di *Polymerase Chain Reaction Restriction Fragment Length Polymorphism* (PCR RFLP). La sequenza di DNA di 588 pb contenente il polimorfismo è stata amplificata con PCR *End Point*. La PCR è stata eseguita in 25 µL di volume finale contenente 100 ng di DNA, 100 µM di dNTPs, 1.5 mM di MgCl₂, 1 U di DNA polimerasi (Promega), e 15 pmoli di ogni *primer* (*forward* e *reverse*, tabella 2). Le condizioni di amplificazione sono state: 95°C per 5 minuti (1 ciclo); 95°C per 1 min, °T *annealing* per 1 min, 72°C per 1 min, per un totale di 30 cicli; e 72°C per 5 minuti (1 ciclo). Al termine della reazione di PCR, allo scopo di verificare la presenza della banda target di DNA, i prodotti di amplificazione sono stati separati mediante elettroforesi su gel di agarosio all'1.5% colorato con bromuro di etidio, un agente che intercalandosi al DNA rende fluorescenti le bande così visualizzabili al transilluminatore. I prodotti di PCR sono stati digeriti con l'enzima di restrizione *HhaI* (sito di taglio 5'- GCG/C - 3') per 3 ore a 37°C e verificati con elettroforesi su gel d'agarosio all'1.5%. Gli omozigoti per l'allele G (il più frequente) hanno mostrato un

banda a 243 e una a 345 pb, quelli per l'allele C (il meno frequente e capace di abolire la sequenza riconosciuta dall'enzima di restrizione) un frammento di 588 pb.

Analisi Statistica. Percentuali, medie (con deviazioni standard) e mediane (con I-III quartile) sono state utilizzate per fini descrittivi, a seconda della natura della variabile. I confronti tra 2 o più gruppi di variabili continue sono stati eseguiti sia con test parametrico (t-test e ANOVA) sia con test non parametrico (Wilcoxon-rank test Sum e Kruskal-Wallis), a seconda della natura della distribuzione analizzata. L'equilibrio di Hardy-Weinberg è stato esaminato con il test del chi-quadro.

Per valutare il ruolo prognostico dell'rs11558492 in *GNPAT*, la distribuzione dei valori di saturazione della transferrina, ferritina sierica, concentrazione di ferro epatico e ferro rimosso è stata analizzata, nei pazienti, sulla base del genotipo dello SNP. Nei controlli, i livelli di ferritina sierica di soggetti *wild type* per il polimorfismo sono stati comparati con quelli dei portatori dell'allele minore A. Il grado di associazione lineare tra: (1) IR vs ferritina sierica, (2) LIC vs ferritina sierica e (3) IR vs LIC è stato determinato tramite il coefficiente di correlazione di Pearson.

L'associazione tra diversi fattori (età, sesso, consumo alcolico giornaliero e il genotipo di *PCSK7*) e i singoli stadi della fibrosi, definiti secondo l'Ishak score, sono stati valutati mediante il test del chi-quadro. Il loro impatto congiunto è stato calcolato con il modello ad odds proporzionali tenendo conto dell'ordinamento delle categorie. I risultati di questo modello sono stati espressi in termini di Odds Ratio (OR) e relativi intervalli di confidenza al 95% [140].

Per valutare se l'associazione tra il genotipo *PCSK7* e la fibrosi/cirrosi fosse diretta o ferro-mediata è stata realizzata un'analisi di mediazione [141]. La regressione lineare è stata adottata per studiare il ruolo del ferro, mentre la regressione logistica per l'evoluzione della cirrosi epatica. Le covariate incluse nel primo modello erano genotipo, sesso, età, mentre il secondo modello comprendeva anche il rapporto IR/ferritina sierica.

Per entrambi i polimorfismi, i confronti delle frequenze alleliche e genotipiche sono state realizzate con il test esatto di Fisher.

Tutti i test sono stati realizzati a 2 code con un livello di significatività del 5%. Le analisi sono state realizzate con SAS 9.3 (SAS Institute, Cary, NC, USA), R 3.2 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) e GraphPad Prism, versione 4.0 (San Diego, CA, USA).

Tabella 2. Sequenza degli oligonucleotidi utilizzati per l'analisi genetica dei polimorfismi rs11558492 in *GNPAT* ed rs236918 in *PCSK7* in pazienti di origine italiana omozigoti per la mutazione p.C282Y.

Gene e polimorfismo	Sequenza degli oligonucleotidi	Tecnica utilizzata
<i>GNPAT</i> rs11558492 (A>G)	F <i>Outer</i> : 5'-TTAATTTAgCTTCCTCAggggACTTA-3'	ARMS PCR
	R <i>Outer</i> : 5'-ACATCTgTgAATTCACCCCTAACATT-3'	
	F <i>Inner</i> : 5'-gTgCTTTCgCTTCCTACgTgA-3'	
	R <i>Inner</i> : 5'-gATgAACTCATCTgCAAAAACAT-3'	
<i>PCSK7</i> rs236918 (C>G)	F: 5'-AgAAgAgAAgTTTggAAgAAAg-3'	PCR RFLP (E.R. <i>HhaI</i>)
	R: 5'-CgATTTTTgCTCCTAATATTCTT-3'	

RISULTATI

Il nostro studio ha coinvolto 298 pazienti (205 uomini e 93 donne) con emocromatosi di tipo 1 omozigoti per la mutazione p.C282Y nel gene *HFE*. 187 di questi (63%, 148 uomini e 39 donne), avevano disponibile un'adeguata biopsia epatica grazie alla quale è stato possibile valutare il grado di fibrosi.

La tabella 3 mostra le principali caratteristiche biochimico-cliniche dei 298 pazienti e della popolazione di controllo, costituita da 169 donatori di sangue di sesso maschile. I principali indici che sono stati valutati (saturazione della transferrina, ferritina sierica, ferro rimosso e concentrazione intra epatica di ferro) definiscono con precisione lo stato del ferro. Il dato relativo al ferro rimosso era disponibile in 234 pazienti sui 298 totali (78.5%). La concentrazione intra-epatica di ferro (LIC) è stata valutata nel 63% dei pazienti (187 su 298 totali). Il valore delle ALT è stato utilizzato per definire (in modo indiretto) lo stato di sofferenza del fegato in presenza di sovraccarico di ferro in tutti i pazienti arruolati.

Tabella 3. Principali caratteristiche biochimico-cliniche di 298 pazienti con genotipo omozigote per la mutazione p.C282Y e 169 donatori di sangue. I dati sono espressi come mediana e (I-III quartile).

Variabile (unità di misura)	Pazienti con HH (N=298)	Donatori di sangue (N=169)
Maschi/Femmine	205/93	169/0
Età (anni)	48 (36-57)	37 (31-48)
Saturazione della transferrina - %TS (%)	86 (71-95.5)	ND
Ferritina sierica - SF (µg/L)	1000 (571-1828.5)	79 (54-116)
Ferro rimosso† - IR (g)	6.6 (4-10)	-
Concentrazione di ferro epatico†† - LIC (µmol/g)	218.6 (167.2-341.8)	-
Alanina Aminotransferasi - ALT (U/L)	40 (23-65)	ND

Legenda:

† il dato relativo al ferro rimosso era disponibile in 234 pazienti sui 298 totali (78.5%).

†† il dato relativo alla concentrazione di ferro epatico era disponibile in 187 pazienti sui 298 totali (63%).

ND: non disponibile.

La tabella 4 riporta le caratteristiche demografiche e cliniche dei 187 pazienti (di cui 39 donne, 20.9%) di cui era disponibile l'istologia epatica. Per l'analisi dei dati, i soggetti sono stati valutati in base ai singoli punteggi di fibrosi o raggruppati come segue: fibrosi assente/lieve (Ishak score 0-2), fibrosi moderata (Ishak score 3-4) e fibrosi grave/cirrosi (Ishak score 5-6). Di questi, 91 pazienti (il 48.7%) presentavano fibrosi assente/lieve (Ishak score 0-1-2), 55 (il 29.4%) avevano fibrosi moderata (Ishak score 3-4), mentre i restanti 41 (il 21.9%) presentavano fibrosi grave/cirrosi (Ishak score 5-6).

Come atteso, i livelli di ferritina sierica e ferro rimosso aumentano significativamente con l'aumentare del grado di fibrosi epatica. Lo stesso trend è stato osservato anche per quanto riguarda l'età. In questo caso, l'associazione osservata è ai limiti della significatività statistica. Inoltre, la proporzione di uomini, le mediane della saturazione della transferrina e la media delle ALT sono risultate più elevate nei pazienti con fibrosi moderata e fibrosi grave o cirrosi, rispetto ai pazienti

con fibrosi assente/lieve. L'introito alcolico non è significativamente diverso tra i tre gruppi considerati.

Tabella 4. Descrizione delle caratteristiche demografiche e cliniche dei 187 pazienti con istologia epatica disponibile (maschi e femmine insieme e divisi per Ishak score). I dati sono riportati come numero (%), media (deviazione standard) o mediana (I-III quartile).

Variabile (unità di misura)	Ishak score						Maschi e femmine	p
	0-2		3-4		5-6			
Genere (maschi)	63	(69.2%)	49	(89.1%)	36	(87.8%)	148 (79.1%)	0.005
Età alla biopsia (anni)	44.5	(12.9)	48.1	(11.2)	49.6	(10.4)	46.7 (12.1)	0.046
Consumo di alcool (g/die)	10	(0-20)	10	(0-30)	10	(0-20)	10 (0-20)	0.373
Alanina Aminotransferasi - ALT (U/L)	44.0	(32.2)	73.6	(28.5)	72.0	(36.1)	57.5 (35.2)	<0.0001
Saturazione della transferrina - %TS (%)	84	(70-91)	91	(85-100)	92.0	(82-99)	88 (78-97)	<0.0001
Ferritina sierica - SF (µg/L)	920	(553-1400)	2076	(1170-3219)	3000	(1804-4800)	1432 (801- 721)	<0.0001
Ferro rimosso - IR (g)	5.5	(3.9-8.2)	9.8	(8.0-12.7)	13.5	(10.0-21.9)	8.2 (5.0- 12.0)	<0.0001

ANALISI DEI POLIMORFISMI GENETICI.

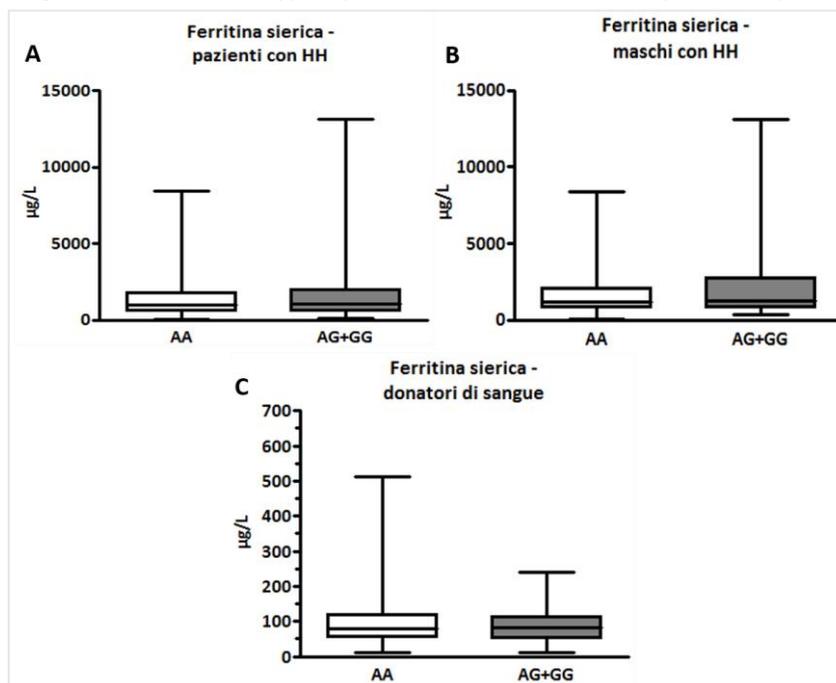
Rs11558492 in GNPAT. Le distribuzioni dei genotipi dell'rs11558492 in *GNPAT* sono in equilibrio secondo la legge di Hardy-Weinberg sia nei 298 pazienti omozigoti per la mutazione p.C282Y sia nel gruppo di controllo costituito dai 169 donatori di sangue. La tabella 5 mostra le frequenze genotipiche ed alleliche del polimorfismo nelle diverse coorti. I dati ottenuti mostrano come non vi siano differenze statisticamente significative tra pazienti e controlli. Più precisamente, non sono state osservate differenze genotipiche ed alleliche paragonando i donatori di sangue né con l'intera coorte di pazienti con HH né con il sottogruppo di pazienti di sesso maschile. Anche i dati relativi al polimorfismo riportati nell'*Exome Variant Server* (EVS) (genotipi: AA=63%; AG=33%; GG=4%; alleli: A=79.4% e G=20.6%) sono paragonabili a quelli dell'intera coorte di pazienti con HH, al gruppo dei soli maschi con HH e dei donatori di sangue.

Tabella 5. Frequenze genotipiche ed alleliche espresse come numeri e (percentuali) dell'rs11558492 in *GNPAT* calcolate nell'intera coorte di pazienti con HH, nel gruppo dei soli maschi con HH e nei donatori di sangue.

	Pazienti con HH (N=298)	Pazienti con HH: solo maschi (N=205)	Donatori di sangue (N=169)
Genotipi			
AA	191 (64)	128 (62.4)	117 (69.2)
AG	93 (31.2)	67 (32.6)	46 (27.2)
GG	14 (4.8)	10 (5.0)	6 (3.6)
Alleli			
A	475 (79.7)	323 (78.7)	280 (82.8)
G	121 (20.3)	87 (21.3)	58 (17.2)

La figura 13 A-C mostra i valori di ferritina sierica espressi come mediana e *range* interquartile relativi all'intera coorte di pazienti con HH [AA: 1000 µg/L (552-1815.5); AG+GG: 1061 µg/L (610.5-1946.5)], al solo gruppo dei maschi [AA: 1145 µg/L (801-2019); AG+GG: 1245 µg/L (771-2721)] ed ai controlli [AA: 78.0 µg/L (55.5-117.5); AG+GG: 83.0 µg/L (53-110)] divisi secondo il genotipo dell'rs11558492 in *GNPAT*. In nessun confronto statistico i livelli di ferritina sierica sono risultati significativamente diversi tra *wild type* per l'rs11558492 in *GNPAT* ed i portatori dell'allele minore (in eterozigosi [AG] od omozigosi [GG]) in tutti i gruppi considerati.

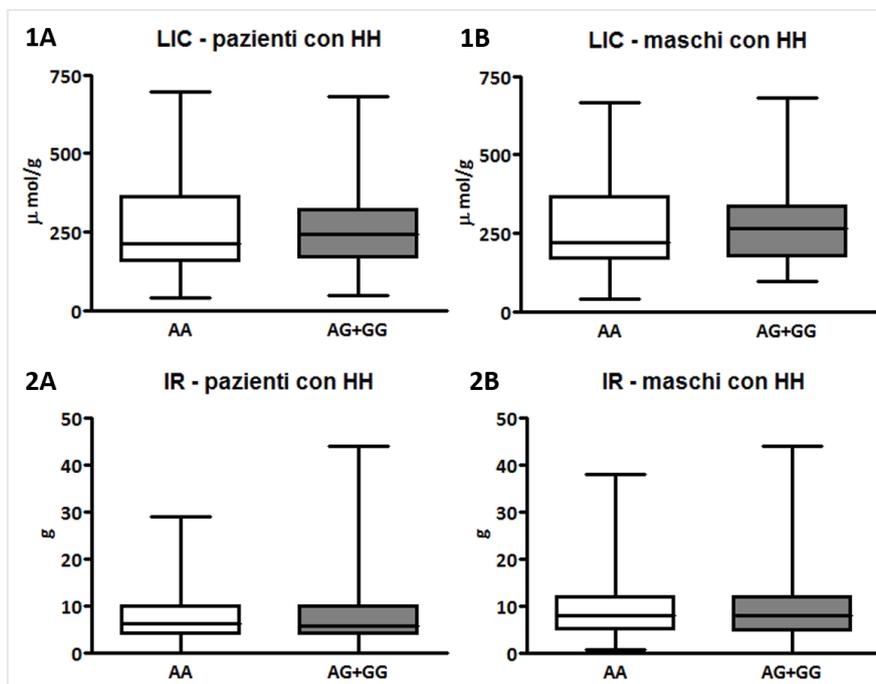
Figura 13. Analisi dei livelli di ferritina sierica nell'intera coorte di pazienti con HH (A), nel gruppo dei soli maschi con HH (B) e nei donatori di sangue (C) divisi tra *wild type* e portatori dell'allele meno frequente (G) per l'rs11558492 in *GNPAT*.



La figura 14 (1A-1B e 2A-2B) mostra i valori relativi alla concentrazione di ferro epatico ed al ferro rimosso dei pazienti con HH divisi secondo il genotipo dello SNP. L'analisi statistica non ha mostrato differenze statisticamente significative né considerando l'intera coorte di 298 pazienti [LIC: AA: 214.2 µmol/g (158.7-361.2); AG+GG: 242.6 µmol/g (167.2-310.2); IR: AA: 6.25 g (4.0-9.9); AG+GG: 5.5 g (3.5-10.0)], né il sottogruppo dei soli maschi con HH [LIC: AA: 220 µmol/g (167.2-365.1); AG+GG: 263.1 µmol/g (179.4-320); IR: AA: 8 g (5-12); AG+GG: 8 g (4.7-11.7)].

Allo stesso modo, anche valutando la percentuale di saturazione della transferrina [maschi e femmine: AA: 85% (72-91.6); AG+GG: 90% (76.7-97.5); solo maschi: AA: 84% (72-93); AG+GG: 87.5% (68-96.7)] e le ALT [maschi e femmine: AA: 39 (22-67); AG+GG: 42 (26-58); solo maschi: AA: 58.5 (39.2-102.7); AG+GG: 56 (48-70.5)] non sono state osservate differenze significative tra pazienti *wild type* ed i portatori dell'allele minore (G) dell'rs11558492.

Figura 14. Analisi della concentrazione di ferro epatico (LIC, Figure 1A e 1B) e dei livelli di ferro rimosso (IR, Figure 2A e 2B) nell'intera coorte di pazienti con HH (1A e 2A) e nei soli maschi con HH (1B e 2B) divisi secondo il genotipo dell'rs11558492 in *GNPAT*.



Le frequenze alleliche e genotipiche della variante considerata sono state analizzate anche in due sottogruppi di pazienti con sovraccarico di ferro grave (ferritina sierica >2000 $\mu\text{g/L}$, IR >10 g e LIC >250 $\mu\text{mol/g}$; N=30) e lieve (ferritina sierica <1000 $\mu\text{g/L}$, IR <5 g e LIC <100 $\mu\text{mol/g}$; N=38). Come mostrato in tabella 6, il confronto tra le frequenze alleliche e genotipiche non ha mostrato differenze tra i due sottogruppi. Nemmeno considerando un *cut-off* di ferritina >1000 $\mu\text{g/L}$ (N=67 maschi con un introito alcolico <30 g/die; frequenza dell'allele minore: 23.1%) o confrontando i dati relativi ad ogni sottogruppo con quelli riportati in EVS sono state osservate significative differenze.

Tabella 6. Analisi delle frequenze alleliche e genotipiche in 2 sottogruppi di pazienti con HH selezionati sulla base dell'entità del sovraccarico di ferro. I dati sono espressi come numeri e (percentuali).

	Alleli		Genotipi		
	A	G	AA	AG	GG
Sovraccarico di ferro severo* (N=30)	48 (80.0)	12 (20.0)	20 (66.6)	8 (26.6)	2 (6.8)
Sovraccarico di ferro lieve** (N=38)	59 (76.6)	17 (22.4)	21 (55.2)	17 (44.8)	-
Totale	107	29	41	25	2

Legenda:

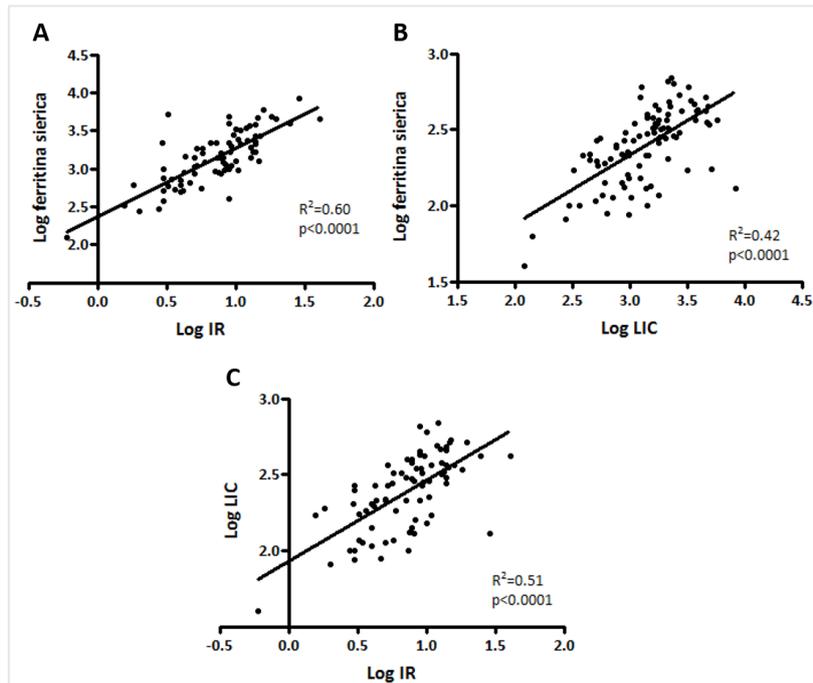
*Sovraccarico di ferro severo: ferritina sierica >2000 $\mu\text{g/L}$, IR >10 g e/o LIC >250 $\mu\text{mol/g}$, consumo di alcool <30 g/die.

**Sovraccarico di ferro lieve: ferritina sierica <1000 $\mu\text{g/L}$, IR <5 g e/o LIC <100 $\mu\text{mol/g}$, consumo di alcool <30 g/die.

La figura 15 A-C mostra il risultato dell'analisi di correlazione realizzata considerando i dati di ferro rimosso, ferritina sierica e concentrazione di ferro epatico nell'intera coorte di pazienti. Una

correlazione statisticamente significativa è stata osservata tra: a) IR vs ferritina sierica ($R^2=0.60$; $p<0.0001$); b) LIC vs ferritina sierica ($R^2=0.42$; $p<0.0001$); c) IR vs LIC ($R^2=0.51$; $p<0.0001$).

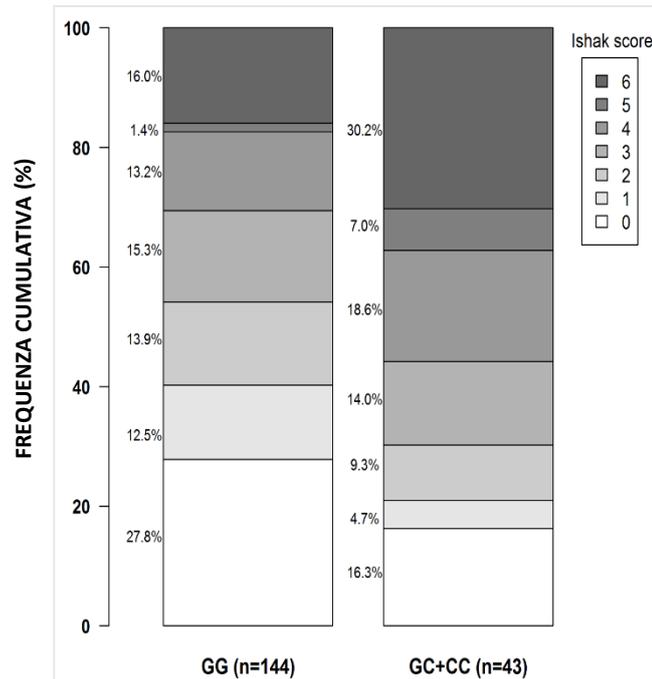
Figura 15. Analisi di correlazione tra IR vs ferritina sierica (A), LIC vs ferritina sierica (B), IR vs LIC (C) nell'intera popolazione di pazienti con HH.



Infine, sono stati considerati 41 pazienti con fibrosi grave/cirrosi. In questo gruppo, la frequenza dell'allele minore è risultata leggermente più alta rispetto a quelli con fibrosi assente/lieve (25% vs 20.5%). La differenza, però, non è statisticamente significativa ($p=0.36$). Analogamente, nel sottogruppo degli uomini con assunzione quotidiana di alcool <30 g/die, la frequenza allelica è stata del 25% rispetto al 19.1% ($p=0.31$).

Rs236918 in PCSK7. Le frequenze genotipiche dell'rs236918 in *PCSK7* sono in equilibrio secondo la legge di Hardy-Weinberg. Suddivisa la popolazione in base al genere, l'analisi delle frequenze alleliche e genotipiche non ha mostrato differenze statisticamente significative. Al contrario, la frequenza dell'allele minore C (MAF) è progressivamente aumentata a partire da pazienti con fibrosi assente/lieve, passando per quelli con fibrosi moderata e fino ad arrivare a soggetti con fibrosi grave/cirrosi (7.1%, 13.6%, 21.9%; $p=0.003$). Anche stratificandoli secondo i criteri già utilizzati da Stickel et al. [123] (assenza di fibrosi, Ishak score 0-4 vs fibrosi grave/cirrosi, Ishak score 5-6) è stata osservata una significativa differenza nella MAF (10.3% vs 21.9%, rispettivamente; $p=0.0042$). In tutta la popolazione, sono stati identificati solo 3 omozigoti per l'allele minore C, 1 con fibrosi moderata (Ishak score 4) e 2 con fibrosi grave/cirrosi (Ishak score 5-6). Poiché troppo pochi per poter essere considerati come gruppo a sé stante ed essere inseriti in una successiva analisi statistica, abbiamo deciso di formare un unico gruppo costituito da omozigoti ed eterozigoti (modello genetico dominante: GG vs GC+CC). La distribuzione dei genotipi in base alla fase di sviluppo della fibrosi (*staging*) ha mostrato una frequenza cumulativa ben più alta in pazienti portatori dell'allele C con Ishak 4-6 rispetto a quelli con il genotipo *wild type* (55.8% vs 30.6%) (figura 16).

Figura 16. Distribuzione cumulativa dell'Ishak score in base al genotipo dell'rs236918 in *PCSK7*.



La tabella 7 mostra le variabili biochimico-cliniche ed il genotipo dell'rs236918 in *PCSK7* studiati in funzione dell'Ishak score.

Tabella 7. Distribuzione delle diverse caratteristiche cliniche, incluso il genotipo dell'rs236918 in *PCSK7*, in base all'Ishak score. I risultati sono riportati come numero (e percentuale).

Variabile (unità di misura)	Ishak score						Maschi e femmine		p
	0-2		3-4		5-6		N	(%)	
	N	(%)	N	(%)	N	(%)			
Maschi e femmine	91	(48.7)	55	(29.4)	41	(21.9)			
Genotipo di <i>PCSK7</i>									
GG	78	(54.2)	41	(28.5)	25	(17.4)	144	(77.0)	0.0066
GC+CC	13	(30.2)	14	(32.6)	16	(37.2)	43	(23.0)	
Genere									
Maschi	63	(42.6)	49	(33.1)	36	(24.3)	148	(79.1)	0.0050
Femmine	28	(71.8)	6	(15.4)	5	(12.8)	39	(20.9)	
Età alla biopsia (anni)									
<50	57	(55.3)	28	(27.2)	18	(17.5)	103	(55.1)	0.1024
≥50	34	(40.5)	27	(32.1)	23	(27.4)	84	(44.9)	
Consumo di alcool (g/die)									
0	35	(50.7)	19	(27.5)	15	(21.7)	69	(37.3)	0.9248
>0	56	(48.3)	35	(30.2)	25	(21.6)	116	(62.7)	
Alanina Aminotransferasi - ALT (U/L)									
<40	50	(83.3)	4	(6.7)	6	(10.0)	60	(37.5)	<0.0001
≥40	35	(35.0)	34	(34.0)	31	(31.0)	100	(62.5)	
Saturazione della transferrina - %TS (%)									
<75	31	(83.8)	2	(5.4)	4	(10.8)	37	(19.9)	<0.0001
≥75	59	(31.3)	53	(37.5)	37	(31.3)	149	(80.1)	
Ferritina sierica - SF (µg/L)									
<1000	51	(86.4)	7	(11.9)	1	(1.7)	59	(31.6)	<0.0001
≥1000	40	(39.6)	48	(35.6)	40	(24.8)	128	(68.5)	
Ferro rimosso* - IR (g)									
<5	35	(87.5)	4	(10.0)	1	(2.5)	40	(24.8)	<0.0001
≥5	47	(38.8)	43	(35.5)	31	(25.6)	121	(75.2)	

Legenda:

*26 valori mancanti.

Un'associazione statisticamente significativa è stata osservata tra il genotipo di *PCSK7* e la fibrosi epatica (p=0.0066). La tabella 7 mostra come il genotipo *wild type* sia più frequente nel gruppo di pazienti con fibrosi lieve (54.2%). Solo il 17% dei pazienti *wild type* per la variante genetica analizzata

hanno Ishak 5-6, mentre il 37% con fibrosi grave/cirrosi è portatore dell'allele minore in eterozigosi o in omozigosi. Analizzando gli altri dati ottenuti, è emerso come un numero significativamente più alto di donne con fibrosi assente/lieve avesse valori di ALT normali (dati non mostrati).

Per quanto riguarda gli indici del ferro, abbiamo diviso i pazienti sulla base di *cut-off* comunemente usati per classificare i pazienti con fenotipo grave e/o aumentato rischio di danno epatico (ferritina sierica <1000 µg/L vs ferritina sierica ≥1000 µg/L; %TS <75% vs %TS ≥75; IR <5 g vs IR ≥5 g; ALT <40 U/L vs ALT ≥40 U/L). Di conseguenza, l'86.4% dei pazienti con ferritina sierica inferiore a 1000 µg/L, l'83.8% con %TS <75%, l'87.5% con IR <5 g e l'83.3% con ALT <40 U/L aveva fibrosi assente o lieve.

Tabella 8. Analisi di regressione con il modello ad odds proporzionali. I risultati sono espressi come Odds Ratio (OR) e corrispondente intervallo di confidenza al 95% (IC).

Variabile (unità di misura)	Maschi e femmine (N=161)			Maschi (N=125)		
	OR	95% IC	p	OR	95% IC	p
Genotipo PCSK7						
GG	1			1		
GC+CC	2.37	1.13-4.95	0.0218	2.56	1.14-5.77	0.0233
Ferro rimosso* - IR (g)	1.18	1.10-1.25	<0.0001	1.17	1.10-1.25	<0.0001
Età alla biopsia (anni)	1.04	1.01-1.08	0.0046	1.03	0.99-1.06	0.0782
Genere						
Maschi	1					
Femmine	0.45	0.18-1.10	0.0787			

Legenda:

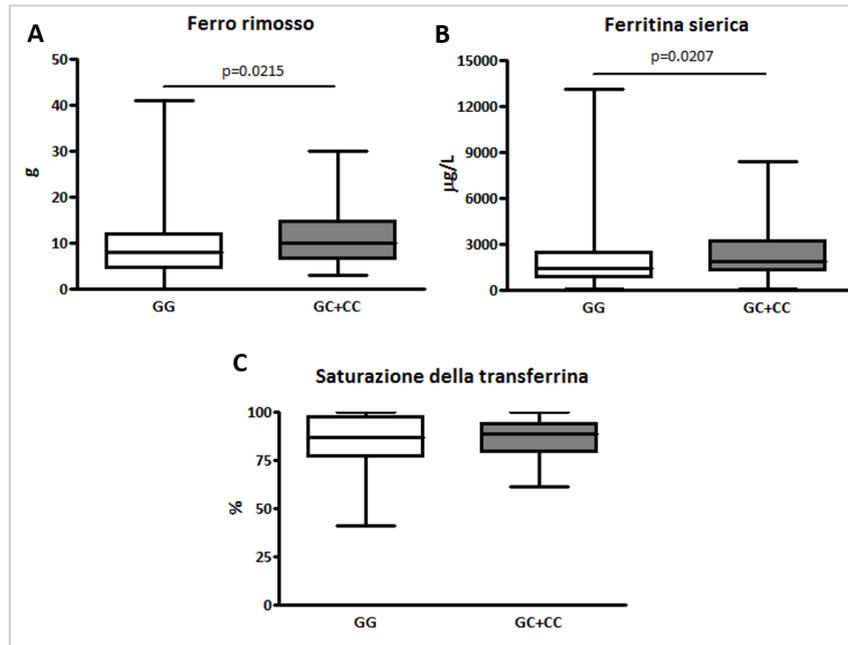
OR=Odds Ratio, IC=Intervallo di confidenza.

*26 valori mancanti.

I risultati del modello ad odds proporzionali dimostrano come i pazienti con genotipi GC+CC abbiano 2.77 volte (95% IC=1.46-5.30, p=0.0018) più probabilità di avere un Ishak score peggiore rispetto ai pazienti *wild type* per l'rs236918 in PCSK7 (dato non presente in tabella 8). Questo risultato è stato confermato anche a conclusione di un'analisi più stringente che ha considerato solo i 161 pazienti (125 maschi e 36 femmine) omozigoti per la mutazione p.C282Y in omozigosi di cui era disponibile il dato relativo al ferro rimosso (OR=2.37, p=0.0218). Quando l'analisi è stata ristretta ai soli maschi, l'OR ottenuto è stato di 2.56 (tabella 8). Il p-value di 0.0233 conferma la significatività statistica già osservata considerando maschi e femmine insieme.

Come mostrato nella figura 17 A-C, il genotipo di PCSK7 influenza in modo significativo il livello di ferro mediante il ferro rimosso (GG vs GC+CC: 8 g vs 10 g; p=0.0215) e la ferritina sierica (GG vs GC+CC: 1279 µg/L vs 1900 µg/L; p=0.0207), ma non attraverso la saturazione della transferrina (GG vs GC+CC: 87% vs 89%; p=0.7854).

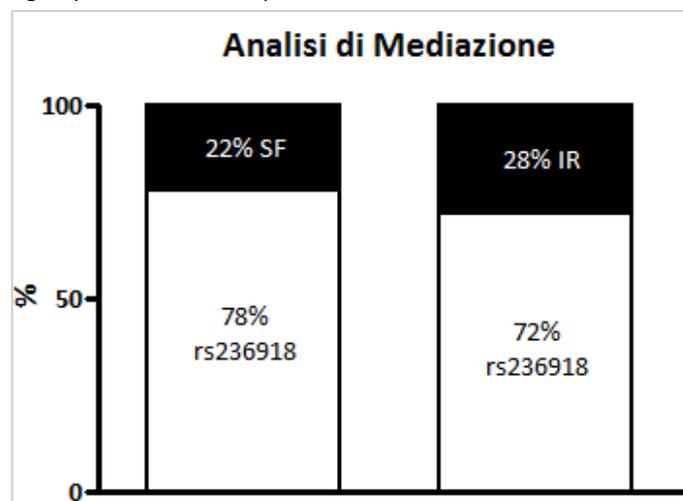
Figura 17. Analisi dei livelli di ferro rimosso, ferritina sierica e saturazione della transferrina in 187 pazienti con HH divisi secondo il genotipo (GG vs GC+CC) dell'rs236918 in *PCSK7*.



Con l'intento di capire se la relazione tra *PCSK7* e fibrosi epatica fosse solo diretta o anche ferro-mediata, abbiamo condotto un'analisi esplorativa (figura 18).

I risultati hanno dimostrato un effetto diretto del genotipo sullo sviluppo della fibrosi grave/cirrosi (Ishak score 5-6) (OR=3.11 con 95% IC=1.24-7.82, $p=0.0157$) e suggerito un effetto indiretto non significativo mediato dal ferro rimosso (con una proporzione mediata del 28%). Quando al posto del ferro rimosso è stata utilizzata la ferritina sierica, l'effetto ottenuto è stato ancora più basso (proporzione mediata del 22%).

Figura 18. Analisi dell'effetto del ferro rimosso, della ferritina e dell'rs236918 in *PCSK7* sulla fibrosi epatica grave/cirrosi in 187 pazienti con HH omozigoti per la mutazione p.C282Y.



DISCUSSIONE

In questa tesi ci siamo proposti di analizzare il ruolo di due polimorfismi a singolo nucleotide, l'rs236918 in *PCSK7* e l'rs11558492 in *GNPAT*, già individuati come possibili modificatori genetici del fenotipo malattia in pazienti con emocromatosi di tipo 1 (*HFE*-correlata) originari del nord Europa [123, 126].

L'emocromatosi di tipo 1 è la malattia ereditaria più diffusa nelle popolazioni di origine caucasica e può provocare gravi danni a livello del fegato, del pancreas, del cuore e delle articolazioni causando cirrosi, diabete, cardiopatia ed artropatia, rispettivamente. In più dell'80% dei pazienti questa forma di malattia è causata dalla mutazione p.C282Y in omozigosi nel gene *HFE*. Sorprendentemente, però, solo il 30% degli uomini e l'1.2% delle donne omozigoti per questa variante genetica presentano almeno una manifestazione clinica della malattia [77]. Questo suggerisce come l'omozigosi p.C282Y abbia penetranza incompleta ed espressione variabile riconducibili, molto probabilmente, ad una complessa interazione tra genetica ed ambiente [67, 76]. La dieta, l'eccessivo consumo di alcool, la coesistenza con altre malattie ereditarie (talassemia e anemia sideroblastica) o acquisite (steatosi, sindrome metabolica ed epatite B o C), le perdite di sangue fisiologiche (donazioni di sangue e ciclo mestruale) o patologiche (ferite o microlesioni da microtraumi) e l'utilizzo di farmaci figurano tra i principali modificatori acquisiti dell'emocromatosi di tipo 1 [106, 135, 136, 142]. Mutazioni e polimorfismi a singolo nucleotide, invece, vengono considerati i principali modulatori genetici della malattia [137].

Negli ultimi dieci anni, l'avvento di tecniche di sequenziamento del DNA di ultima generazione (NEXT-GEN) e la realizzazione di studi di associazione su tutto il genoma (GWAS) hanno avuto un ruolo chiave nella scoperta di nuove varianti polimorfiche e geni potenzialmente responsabili della modulazione del fenotipo malattia. Tuttavia, i risultati ottenuti nell'uomo sono stati più deludenti rispetto a quanto osservato nel modello animale in cui è apparso chiaro l'impatto del *background* genetico sulla penetranza ed espressione della malattia [137] e la possibilità di definire delle regioni genetiche associate al fenotipo malattia [143]. Viceversa, nell'uomo, vuoi perché la potenza degli studi non era del tutto adeguata, vuoi per una non adeguata correzione dei dati in relazione ai fattori acquisiti, i risultati ottenuti non hanno permesso fino ad ora di identificare delle varianti polimorfiche consistenti in termini di rischio clinico. Negli anni passati abbiamo raccolto la casistica di pazienti italiani con emocromatosi *HFE*, definito il fenotipo sulla base degli indici del ferro e dell'entità del danno clinico ed eseguito alcuni studi di associazione in collaborazione con altri centri italiani ed europei [119, 144, 145]. Su questo database abbiamo voluto verificare il valore di due nuovi polimorfismi identificati altrove attraverso studi di GWAS (rs236918 in *PCSK7* e rs11558492 in *GNPAT*).

Nel corso di questo percorso di dottorato, entrambi i polimorfismi sono stati tipizzati in una coorte di pazienti di origine italiana omozigoti per la mutazione p.C282Y. I nostri risultati hanno dimostrato una significativa associazione tra il polimorfismo rs236918 nel gene *PCSK7* ed il rischio di fibrosi e cirrosi. Al contrario, lo studio dello SNP rs11558492 in *GNPAT* non ha dimostrato alcuna influenza sull'entità del sovraccarico di ferro o lo sviluppo di fibrosi epatica.

Per quanto riguarda l'rs236918 in *PCSK7*, abbiamo analizzato le frequenze alleliche e genotipiche sia considerando i singoli stadi della fibrosi sia suddividendo i 187 pazienti di cui si disponeva della biopsia epatica come segue: pazienti con fibrosi assente/lieve (Ishak score 0-2), pazienti con fibrosi moderata (Ishak score 3-4) e pazienti con fibrosi grave/cirrosi (Ishak score 5-6). Come ulteriore analisi, i pazienti cirrotici (Ishak score 5-6) sono stati confrontati con quelli non cirrotici (Ishak score 0-4) secondo i criteri già utilizzati da Stickel et al. [123]. La frequenza dell'allele minore è risultata molto simile tra i due studi: 19.6% e 21.9% nei pazienti cirrotici, 7.9% e 10.3% nei pazienti non cirrotici considerando, rispettivamente, lo studio di Stickel ed il nostro. Questo dato indica chiaramente come la diversa origine dei pazienti non influenzi in modo sostanziale l'effetto del polimorfismo.

E' bene ricordare, però, come per studiare il processo di fibrosi epatica sia stato utilizzato un sistema di misurazione "a punteggio", che però non rappresenta al meglio un fenomeno continuo nel tempo come quello fibrotico. Inoltre, i punteggi utilizzati, benché riconosciuti come molto accurati, presentano una componente soggettiva legata all'osservatore [146]. Tra i sistemi di uso comune abbiamo deciso di utilizzare l'Ishak score, poiché, con i suoi sei diversi stadi è considerato il più sensibile tra quelli disponibili e può essere tradotto in altri punteggi. Il criterio usato per suddividere i pazienti in tre gruppi in base all'Ishak score (0-2; 3-4; 5-6) è, a nostro giudizio, un buon compromesso tra la necessità di rappresentare la progressione del danno epatico in modo più efficiente di una mera suddivisione in pazienti cirrotici e non cirrotici e quella di ottenere un sufficiente numero di pazienti in ciascuna classe per un'adeguata analisi statistica. Infatti, gli stadi 3 e 4 non possono essere facilmente raggruppati con gli stadi 0 e 2, poiché caratterizzati dall'estensione dei setti fibrosi in grado di formare ponti tra le strutture vascolari adiacenti (sia porto-portali sia porto-centrali), occasionali (fase 3) o non occasionali (fase 4). Inoltre, l'Ishak di fase 4 si traduce in fase F3 del punteggio METAVIR che include la cirrosi nella sua fase iniziale [147].

Nel nostro studio abbiamo poi dimostrato come le frequenze alleliche e genotipiche cambino progressivamente nei tre gruppi (0-2; 3-4; 5-6) e abbiamo osservato una frequenza significativamente più alta degli score più severi (da 4 a 6) nei pazienti portatori dell'allele C (55.8%) rispetto ai pazienti con genotipo *wild type* (30.6%). Complessivamente, questi risultati supportano l'associazione tra l'rs236918 in *PCSK7* e la fibrosi epatica in pazienti con emocromatosi ereditaria di tipo 1.

Uno dei fattori in grado di modulare negativamente l'evoluzione della fibrosi epatica ed interferire quando si analizza l'effetto dei modificatori genetici sul fenotipo emocromatosico è l'alcool. Per ovviare a questo problema sono stati esclusi dallo studio i pazienti con elevata assunzione di alcool, sulla base dei risultati di Powell et al. [106] che hanno dimostrato come il livello di consumo di alcool indipendentemente associato a fibrosi nei pazienti emocromatosici sia superiore ai 50 g/die nell'uomo ed ai 40 g/die nella donna (nel nostro studio abbiamo scelto un livello leggermente inferiore nelle donne (30 g/die)). Nella casistica così selezionata non abbiamo osservato significative differenze nei livelli di introito alcolico giornaliero in base alla fibrosi epatica. Questo dimostra di aver ottenuto un ragionevole controllo dell'effetto dell'alcool nella coorte dei pazienti considerata. Per maggiore precisione, abbiamo rivalutato il ruolo del polimorfismo selezionando pazienti in base

a diversi *cut-off* di consumo di alcool paragonando i maschi che consumavano 30 g/die con quelli che consumavano 40 g/die o 50 g/die. L'OR che abbiamo ottenuto a conclusione dell'analisi aggiustata non ha mostrato sostanziali cambiamenti confermando il ruolo prognostico dello SNP (30 g/die: OR=2.521, 95% IC=1.104-5.757, $p=0.0282$; 40 g/die: OR=2.162, 95% IC=1.020-4.582, $p=0.0442$; 50 g/die: OR=2.369, 95% IC=1.134-4.951, $p=0.0218$).

In precedenza, l'unico altro polimorfismo per il quale si era trovata un'associazione con lo sviluppo di fibrosi epatica in pazienti emocromatosici omozigoti per la mutazione p.C282Y, era stato I148M in *PNPLA3*. Tuttavia, questo dato non è stato confermato in studi successivi [148].

Nel processo di sviluppo della fibrosi, la quantità di ferro accumulato e la durata dell'esposizione al metallo sono elementi implicati nello sviluppo del danno epatico. Infatti, come mostrato in tabella 7, ferritina sierica e ferro rimosso hanno mostrato un progressivo aumento con il progredire della fibrosi. Tuttavia, non si può escludere come la diversa capacità di far fronte a danni ferro-legati o la variabile attivazione della cascata citochinica possano essere implicati nello sviluppo del danno epatico. Quindi, l'effetto dello SNP sulla fibrosi epatica potrebbe essere diretto o ferro-mediato. Per valutare questa ipotesi, abbiamo effettuato un'analisi di mediazione che ha dimostrato un rapporto diretto tra l'rs236918 e la fibrosi epatica ed un lieve e non significativo effetto ferro-mediato. Per realizzare questa analisi abbiamo scelto di utilizzare il ferro rimosso, poiché l'indice più accurato di sovraccarico di ferro. Tuttavia, vi sono due limitazioni all'uso di questo parametro: a. non era disponibile in tutti i pazienti; b. poiché è calcolato sulla base del ferro rimosso mediante salassoterapia risulta essere un indice assoluto di sovraccarico di ferro fino a quel dato momento e non un indicatore di progressione dell'accumulo di ferro. Nel tentativo di superare almeno in parte questo limite metodologico, i dati sono stati rianalizzati in base al rapporto IR/età (indice di sovraccarico di ferro nel corpo) nella sola popolazione maschile. Tale indice, seppure retrospettivamente, da un'idea della velocità di accumulo del ferro nell'organismo e può quindi rappresentare più fedelmente la severità della malattia nel singolo individuo affetto. Nonostante l'ulteriore riduzione del campione (i maschi sono solo 125) i risultati sono molto simili e mostrano una proporzione ferro-mediata del 28%. È bene ricordare che i dati riportati sono preliminari. Ulteriori indagini dovrebbero essere svolte su un campione più ampio, considerando *pathway* più complessi che includano anche altri polimorfismi e altri fattori che influenzano sia l'accumulo di ferro sia la fibrosi e che per il momento sono stati esclusi (ad esempio: anomalie metaboliche, steatosi epatica, introito alcolico, epatite B e C). Anche se il meccanismo molecolare con cui l'rs236918 in *PCSK7* influisce sulla fibrosi epatica nei pazienti con emocromatosi omozigoti per la mutazione p.C282Y non è noto, diversi studi suggeriscono che *PCSK7* potrebbe essere implicato nei processi di omeostasi del ferro e fibrogenesi [149]. *PCSK7* è una protein-convertasi molto simile a furina (*PCSK3*), che ha un ruolo attivo nel processo di *shedding* del *TFR1*, ma non sembra essere coinvolto né nella regolazione di epcidina (tramite HJV solubile) né nel *cleavage* del *TFR2*. Questo è in accordo con uno studio *genome wide* che ha dimostrato come l'rs236918 correli positivamente con una maggiore circolazione di *TFR1* solubile [125]. Inoltre, la deplezione di ferro in cellule di epatoma, determina la riduzione dei livelli di mRNA e della proteina di *PCSK7* con un meccanismo ancora da definire, mentre i livelli di *TFR1* solubile sono aumentati suggerendo che la ridotta

scissione di *TFR1* mediata da *PCSK7* migliori l'*uptake* di ferro nella cellula. Brandao et al. [150], studiando il rapporto tra la saturazione della transferrina e il *TFR1* solubile in soggetti normali e pazienti con emocromatosi *HFE*-correlata, hanno dimostrato che il ferro disponibile per l'eritropoiesi è alterato nell'emocromatosi, comportandosi in condizioni di sovraccarico come se fosse in uno stato di ferro carenza. E' stato ipotizzato che, oltre alla saturazione della transferrina (che riflette la disponibilità di ferro sistemica), il *TFR1* solubile (che riflette l'attività eritroide) potrebbe essere un candidato come segnale per *HFE* in questo modello. Anche se questa scoperta potrebbe aprire alcune prospettive sul rapporto tra *PCSK7*, *TFR1* solubile e sovraccarico di ferro nell'emocromatosi *HFE*-correlata, ha bisogno di ulteriori conferme ed evidenze sperimentali. Tuttavia, i nostri risultati preliminari indicano che l'effetto di *PCSK7* sulla fibrosi epatica sia solo marginalmente mediato dal sovraccarico di ferro. Dall'altra parte, studi su *zebrafish* hanno dimostrato che *PCSK7* contribuisce all'aumento dell'mRNA ed al taglio proteolitico di TGF β 1, che svolge un ruolo centrale nella fibrosi epatica mediante un *cross-talk* tra componente parenchimale ed infiammatoria in cellule che sintetizzano il collagene [124, 151]. Nonostante ciò, l'effetto di *PCSK7* sull'attivazione del TGF β 1 e sulla fibrogenesi deve ancora essere accertata.

Per quanto riguarda il polimorfismo rs11558492 di *GNPAT*, abbiamo analizzato: a. la distribuzione dei valori relativi ai marcatori dello stato del ferro (ferritina sierica, concentrazione di ferro epatico, ferro rimosso e saturazione della transferrina) sulla base del genotipo dello SNP in una coorte di omozigoti per la mutazione p.C282Y di origine italiana ed in un gruppo di controllo costituito da 169 donatori di sangue; b. eventuali differenze tra frequenze alleliche e genotipiche confrontando il gruppo degli omozigoti per la mutazione p.C282Y con quello composto da soli maschi e quello dei donatori di sangue. L'intento è stato quello di valutare se nei pazienti con emocromatosi vi fosse una selezione di una delle due varianti alleliche o dei genotipi di rs11558492 di *GNPAT*.

McLaren et al. [126] aveva precedentemente identificato il polimorfismo rs11558492 di *GNPAT* come fattore di rischio di sovraccarico di ferro severo ($p=3 \times 10^{-6}$; $p=0.033$ dopo l'analisi di regressione multipla), a partire da un'analisi di *exome sequencing* che ha identificato 82.068 SNPs in 10.337 geni applicata a 35 pazienti con emocromatosi *HFE*-correlata e fenotipo estremo. Nello stesso studio, utilizzando un modello *in vitro* di cellule di epatoma HepG2/C3A, gli autori hanno anche dimostrato come il silenziamento di *GNPAT* fosse responsabile di una significativa down-regolazione dell'espressione del gene *HAMP* suggerendo una diretta regolazione. Fisiologicamente, il gene codifica per un enzima (gliceronofosfato O-acetiltransferasi) attivo a livello del perossisoma e responsabile del primo passaggio di sintesi di uno dei più importanti glicerofosfolipidi di membrana: il plasmalogeno. In condizioni di equilibrio, l'enzima assicura il mantenimento della fluidità del doppio strato fosfolipidico, difende dallo stress ossidativo, promuove eventuali interazioni intercellulari e favorisce un corretto *trafficking* mediato dalle vescicole di clatrina. Non ci sono al momento dati che suggeriscano una relazione tra questa via metabolica e il sistema ferro. I risultati osservati nel nostro studio non hanno mostrato significative differenze tra le frequenze degli alleli e dei genotipi dei pazienti rispetto a quella dei donatori di sangue e a quelle riportate nel database EVS su 6503 soggetti. Le frequenze alleliche sono risultate leggermente inferiori a quelle

riportate in altre serie di pazienti con emocromatosi provenienti dall'Europa occidentale, ma simili anche a quelle degli europei-americani riportate nel database EVS.

Inoltre, non è stata osservata alcuna associazione significativa tra alleli e genotipi dei pazienti e ferritina sierica, concentrazione di ferro epatico, ferro rimosso e saturazione della transferrina escludendo una significativa correlazione tra il polimorfismo e la variabilità del ferro corporeo sia nei pazienti sia nel gruppo dei donatori di sangue. Questi risultati differiscono da quelli di McLaren et al. [126] relativi a pazienti omozigoti per la mutazione p.C282Y nord americani ed Australia, ma sono in accordo con quelli ottenuti in pazienti francesi, irlandesi e canadesi [128-131]. Inoltre, non sono state osservate differenze confrontando le frequenze alleliche e genotipiche in un sottogruppo di pazienti con fenotipo estremo lieve e severo. A tale scopo, abbiamo utilizzato criteri più restrittivi per definire il fenotipo come grave (ferritina sierica >2000 µg/L, ferro rimosso >10 g e/o LIC >250 µmol/g) e lieve (ferritina sierica <1000 µg/L, ferro rimosso <5 g e/o LIC <100 µmol/g) senza osservare alcuna differenza. Anche usando il *cut-off* di 1000 µg/L per la ferritina sierica (notoriamente associato ad un maggior rischio di sviluppo di fibrosi epatica) e di 10 g per il ferro rimosso in 67 uomini con l'assunzione di alcool <30 g/die) la frequenza dell'allele minore (23.1%) non ha mostrato significative differenze rispetto ai soggetti sani ed ai dati depositati nel database EVS.

I nostri risultati indicano che l'rs11558492 in *GNPAT* non è un importante modificatore dello stato del ferro in pazienti di origine italiana con emocromatosi e genotipo omozigote per la mutazione p.C282Y, anche se non possiamo escludere che possa essere parte di un meccanismo ben più complesso che include più di un modificatore genetico. Inoltre, non abbiamo identificato alcuna relazione tra lo SNP e lo stato del ferro nella popolazione dei donatori di sangue. Questo nostro risultato contrasta con i dati pubblicati da Hsiao et al. [152] che ha dimostrato una significativa associazione tra il ferro sierico e l'allele meno frequente in 83 giovani donne sane sia a digiuno sia dopo somministrazione di ferro. Analogamente, Rаметта et al. [153] hanno dimostrato come i portatori dell'allele G di *GNPAT* e *wild type* per la mutazione p.C282Y o eterozigoti p.H63D avessero il ferro sierico aumentato 8 ore dopo la somministrazione di solfato ferroso. Tuttavia, entrambe gli studi non hanno dimostrato una significativa associazione tra l'rs11558492 e la ferritina sierica (il miglior marcatore dello stato del ferro in soggetti sani), sollevando ulteriori domande sulla rilevanza clinica di *GNPAT* come modificatore dello stato del ferro. Inoltre, l'rs11558492 non è stato trovato in associazione con fibrosi grave/cirrosi, confermando i risultati precedentemente ottenuti da Bardou-Jacquet et al. [129].

Il nostro studio, quindi, confermando l'associazione dell'rs236918 con la fibrosi epatica in una coorte di pazienti di origine italiana omozigoti per la mutazione p.C282Y, sostiene con forza il ruolo di questo polimorfismo come fattore di rischio per la progressione della fibrosi in pazienti con emocromatosi ereditaria di tipo 1. Ulteriori studi sono necessari per chiarire il meccanismo fisiopatologico che collega *PCSK7* alla fibrosi epatica nell'emocromatosi ereditaria. Tuttavia, questo risultato potrebbe permettere di identificare un sottogruppo di pazienti con emocromatosi ereditaria omozigoti per la mutazione p.C282Y con un aumentato rischio di fibrosi epatica favorendo l'adozione di un migliore approccio clinico e la definizione di un corretto *follow up*. Dal punto di vista

diagnostico, studi di sequenziamento dell'esoma o dell'intero genoma con tecnologie di ultima generazione potrebbero permettere di identificare varianti genetiche potenzialmente in grado di modulare il fenotipo malattia in pazienti con emocromatosi *HFE*-correlata, così da far luce sulle basi molecolari dell'eterogeneità fenotipica della malattia e suggerire (nuove) possibili strategie terapeutiche.

REFERENZE

- [1] Hentze MW, Muckenthaler MU, Galy B, Camaschella C. Two to tango: regulation of Mammalian iron metabolism. *Cell* 2010;142:24-38.
- [2] Andrews NC. Disorders of iron metabolism. *N Engl J Med* 1999;341:1986-1995.
- [3] Ganz T, Nemeth E. Regulation of iron acquisition and iron distribution in mammals. *Biochim Biophys Acta* 2006;1763:690-699.
- [4] Babitt JL, Lin HY. The molecular pathogenesis of hereditary hemochromatosis. *Semin Liver Dis* 2011;31:280-292.
- [5] Ganz T, Nemeth E. Hepcidin and iron homeostasis. *Biochim Biophys Acta* 2012;1823:1434-1443.
- [6] Gkouvatsos K, Papanikolaou G, Pantopoulos K. Regulation of iron transport and the role of transferrin. *Biochim Biophys Acta* 2012;1820:188-202.
- [7] Lynch S. Case studies: iron. *Am J Clin Nutr* 2011;94:673S-678S.
- [8] Winter WE, Bazydlo LA, Harris NS. The molecular biology of human iron metabolism. *Lab Med* 2014;45:92-102.
- [9] Dunn LL, Suryo Rahmanto Y, Richardson DR. Iron uptake and metabolism in the new millennium. *Trends Cell Biol* 2007;17:93-100.
- [10] Wright JA, Richards T, Srai SK. The role of iron in the skin and cutaneous wound healing. *Front Pharmacol* 2014;5:156.
- [11] Sharp P, Srai SK. Molecular mechanisms involved in intestinal iron absorption. *World J Gastroenterol* 2007;13:4716-4724.
- [12] Fuqua BK, Vulpe CD, Anderson GJ. Intestinal iron absorption. *J Trace Elem Med Biol* 2012;26:115-119.
- [13] Anderson GJ, Frazer DM, McLaren GD. Iron absorption and metabolism. *Curr Opin Gastroenterol* 2009;25:129-135.
- [14] Kemna EH, Tjalsma H, Willems HL, Swinkels DW. Hepcidin: from discovery to differential diagnosis. *Haematologica* 2008;93:90-97.
- [15] De Domenico I, McVey Ward D, Kaplan J. Regulation of iron acquisition and storage: consequences for iron-linked disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008;9:72-81.
- [16] Gunshin H, Starr CN, Drenth C, Fleming MD, Jin J, Greer EL, et al. Cybrd1 (duodenal cytochrome b) is not necessary for dietary iron absorption in mice. *Blood* 2005;106:2879-2883.
- [17] Wyman S, Simpson RJ, McKie AT, Sharp PA. Dcytb (Cybrd1) functions as both a ferric and a cupric reductase in vitro. *FEBS Lett* 2008;582:1901-1906.
- [18] Garrick MD. Human iron transporters. *Genes Nutr* 2011;6:45-54.
- [19] Gulec S, Anderson GJ, Collins JF. Mechanistic and regulatory aspects of intestinal iron absorption. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2014;307:G397-409.
- [20] Andrews NC. Forging a field: the golden age of iron biology. *Blood* 2008;112:219-230.
- [21] Knovich MA, Storey JA, Coffman LG, Torti SV, Torti FM. Ferritin for the clinician. *Blood Rev* 2009;23:95-104.
- [22] Torti FM, Torti SV. Regulation of ferritin genes and protein. *Blood* 2002;99:3505-3516.

- [23] Finazzi D, Arosio P. Biology of ferritin in mammals: an update on iron storage, oxidative damage and neurodegeneration. *Arch Toxicol* 2014;88:1787-1802.
- [24] Arosio P, Levi S. Cytosolic and mitochondrial ferritins in the regulation of cellular iron homeostasis and oxidative damage. *Biochim Biophys Acta* 2010;1800:783-792.
- [25] Santambrogio P, Cozzi A, Levi S, Arosio P. Human serum ferritin G-peptide is recognized by anti-L ferritin subunit antibodies and concanavalin-A. *Br J Haematol* 1987;65:235-237.
- [26] Cragg SJ, Wagstaff M, Worwood M. Sialic acid and the microheterogeneity of human serum ferritin. *Clin Sci (Lond)* 1980;58:259-262.
- [27] Cragg SJ, Wagstaff M, Worwood M. Detection of a glycosylated subunit in human serum ferritin. *Biochem J* 1981;199:565-571.
- [28] Worwood M, Dawkins S, Wagstaff M, Jacobs A. The purification and properties of ferritin from human serum. *Biochem J* 1976;157:97-103.
- [29] Wang J, Pantopoulos K. Regulation of cellular iron metabolism. *Biochem J* 2011;434:365-381.
- [30] De Domenico I, Ward DM, Kaplan J. Heparin and ferroportin: the new players in iron metabolism. *Semin Liver Dis* 2011;31:272-279.
- [31] Ganz T, Nemeth E. The hepcidin-ferroportin system as a therapeutic target in anemias and iron overload disorders. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2011;2011:538-542.
- [32] Liu XB, Yang F, Haile DJ. Functional consequences of ferroportin 1 mutations. *Blood Cells Mol Dis* 2005;35:33-46.
- [33] De Domenico I, Ward DM, di Patti MC, Jeong SY, David S, Musci G, et al. Ferroxidase activity is required for the stability of cell surface ferroportin in cells expressing GPI-ceruloplasmin. *EMBO J* 2007;26:2823-2831.
- [34] 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;21:195-199.
- [35] Wessling-Resnick M. Iron imports. III. Transfer of iron from the mucosa into circulation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006;290:G1-6.
- [36] Barisani D, Conte D. Transferrin receptor 1 (TfR1) and putative stimulator of Fe transport (SFT) expression in iron deficiency and overload: an overview. *Blood Cells Mol Dis* 2002;29:498-505.
- [37] Aisen P. Transferrin receptor 1. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36:2137-2143.
- [38] Rouault TA. Mitochondrial iron overload: causes and consequences. *Curr Opin Genet Dev* 2016;38:31-37.
- [39] West AP, Bennett MJ, Sellers VM, Andrews NC, Enns CA, Bjorkman PJ. Comparison of the interactions of transferrin receptor and transferrin receptor 2 with transferrin and the hereditary hemochromatosis protein HFE. *J Biol Chem* 2000;275:38135-38138.
- [40] Kawabata H, Germain RS, Vuong PT, Nakamaki T, Said JW, Koeffler HP. Transferrin receptor 2-alpha supports cell growth both in iron-chelated cultured cells and in vivo. *J Biol Chem* 2000;275:16618-16625.
- [41] Gan EK, Powell LW, Olynyk JK. Natural history and management of HFE-hemochromatosis. *Semin Liver Dis* 2011;31:293-301.

- [42] Sebastiani G, Walker AP. HFE gene in primary and secondary hepatic iron overload. *World J Gastroenterol* 2007;13:4673-4689.
- [43] Feder JN, Gnirke A, Thomas W, Tsuchihashi Z, Ruddy DA, Basava A, et al. A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nat Genet* 1996;13:399-408.
- [44] Muckenthaler MU, Rodrigues P, Macedo MG, Minana B, Brennan K, Cardoso EM, et al. Molecular analysis of iron overload in beta2-microglobulin-deficient mice. *Blood Cells Mol Dis* 2004;33:125-131.
- [45] Bacon BR, Adams PC, Kowdley KV, Powell LW, Tavill AS, Diseases AAftSoL. Diagnosis and management of hemochromatosis: 2011 practice guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology* 2011;54:328-343.
- [46] Chua AC, Graham RM, Trinder D, Olynyk JK. The regulation of cellular iron metabolism. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2007;44:413-459.
- [47] Muckenthaler MU, Galy B, Hentze MW. Systemic iron homeostasis and the iron-responsive element/iron-regulatory protein (IRE/IRP) regulatory network. *Annu Rev Nutr* 2008;28:197-213.
- [48] Wilkinson N, Pantopoulos K. The IRP/IRE system in vivo: insights from mouse models. *Front Pharmacol* 2014;5:176.
- [49] Wallander ML, Leibold EA, Eisenstein RS. Molecular control of vertebrate iron homeostasis by iron regulatory proteins. *Biochim Biophys Acta* 2006;1763:668-689.
- [50] Darshan D, Anderson GJ. Interacting signals in the control of hepcidin expression. *Biometals* 2009;22:77-87.
- [51] Pantopoulos K, Porwal SK, Tartakoff A, Devireddy L. Mechanisms of mammalian iron homeostasis. *Biochemistry* 2012;51:5705-5724.
- [52] Muckenthaler MU. Fine tuning of hepcidin expression by positive and negative regulators. *Cell Metab* 2008;8:1-3.
- [53] Lee PL, Beutler E. Regulation of hepcidin and iron-overload disease. *Annu Rev Pathol* 2009;4:489-515.
- [54] Lin L, Valore EV, Nemeth E, Goodnough JB, Gabayan V, Ganz T. Iron transferrin regulates hepcidin synthesis in primary hepatocyte culture through hemojuvelin and BMP2/4. *Blood* 2007;110:2182-2189.
- [55] Pietrangelo A. Hepcidin in human iron disorders: therapeutic implications. *J Hepatol* 2011;54:173-181.
- [56] Huang H, Constante M, Layoun A, Santos MM. Contribution of STAT3 and SMAD4 pathways to the regulation of hepcidin by opposing stimuli. *Blood* 2009;113:3593-3599.
- [57] Kautz L, Jung G, Valore EV, Rivella S, Nemeth E, Ganz T. Identification of erythroferrone as an erythroid regulator of iron metabolism. *Nat Genet* 2014;46:678-684.
- [58] Han AP, Fleming MD, Chen JJ. Heme-regulated eIF2alpha kinase modifies the phenotypic severity of murine models of erythropoietic protoporphyria and beta-thalassemia. *J Clin Invest* 2005;115:1562-1570.

- [59] Sonnweber T, Nachbaur D, Schroll A, Nairz M, Seifert M, Demetz E, et al. Hypoxia induced downregulation of hepcidin is mediated by platelet derived growth factor BB. *Gut* 2014;63:1951-1959.
- [60] Girelli D, Nemeth E, Swinkels DW. Hepcidin in the diagnosis of iron disorders. *Blood* 2016;127:2809-2813.
- [61] Meneghini R. Iron homeostasis, oxidative stress, and DNA damage. *Free Radic Biol Med* 1997;23:783-792.
- [62] Brissot P, Loréal O. Role of non-transferrin-bound iron in the pathogenesis of iron overload and toxicity. *Adv Exp Med Biol* 2002;509:45-53.
- [63] Philippe MA, Ruddell RG, Ramm GA. Role of iron in hepatic fibrosis: one piece in the puzzle. *World J Gastroenterol* 2007;13:4746-4754.
- [64] Kew MC. Hepatic iron overload and hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett* 2009;286:38-43.
- [65] Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 2006;160:1-40.
- [66] Brissot P, Loréal O. Iron metabolism and related genetic diseases: A cleared land, keeping mysteries. *J Hepatol* 2016;64:505-515.
- [67] Piperno A. Molecular diagnosis of hemochromatosis. *Expert Opin Med Diagn* 2013;7:161-177.
- [68] Camaschella C, Roetto A, De Gobbi M. Juvenile hemochromatosis. *Semin Hematol* 2002;39:242-248.
- [69] Merryweather-Clarke AT, Cadet E, Bomford A, Capron D, Viprakasit V, Miller A, et al. Digenic inheritance of mutations in HAMP and HFE results in different types of haemochromatosis. *Hum Mol Genet* 2003;12:2241-2247.
- [70] Chen J, Enns CA. Hereditary hemochromatosis and transferrin receptor 2. *Biochim Biophys Acta* 2012;1820:256-263.
- [71] Pietrangelo A. The ferroportin disease. *Blood Cells Mol Dis* 2004;32:131-138.
- [72] Piperno A. Classification and diagnosis of iron overload. *Haematologica* 1998;83:447-455.
- [73] Bacon BR, Joseph H, Sheldon and hereditary hemochromatosis: historical highlights. *J Lab Clin Med* 1989;113:761-762.
- [74] Simon M, Bourel M, Genetet B, Fauchet R. Idiopathic hemochromatosis. Demonstration of recessive transmission and early detection by family HLA typing. *N Engl J Med* 1977;297:1017-1021.
- [75] Adams PC, Reboussin DM, Barton JC, McLaren CE, Eckfeldt JH, McLaren GD, et al. Hemochromatosis and iron-overload screening in a racially diverse population. *N Engl J Med* 2005;352:1769-1778.
- [76] Beutler E, Felitti VJ, Koziol JA, Ho NJ, Gelbart T. Penetrance of 845G--> A (C282Y) HFE hereditary haemochromatosis mutation in the USA. *Lancet* 2002;359:211-218.
- [77] Allen KJ, Gurrin LC, Constantine CC, Osborne NJ, Delatycki MB, Nicoll AJ, et al. Iron-overload-related disease in HFE hereditary hemochromatosis. *N Engl J Med* 2008;358:221-230.
- [78] Pietrangelo A. Hereditary hemochromatosis--a new look at an old disease. *N Engl J Med* 2004;350:2383-2397.

- [79] Bassett ML, Halliday JW, Powell LW. Value of hepatic iron measurements in early hemochromatosis and determination of the critical iron level associated with fibrosis. *Hepatology* 1986;6:24-29.
- [80] Deugnier Y, Jouanolle AM, Chaperon J, Moirand R, Pithois C, Meyer JF, et al. Gender-specific phenotypic expression and screening strategies in C282Y-linked haemochromatosis: a study of 9396 French people. *Br J Haematol* 2002;118:1170-1178.
- [81] Scheuer PJ. Classification of chronic viral hepatitis: a need for reassessment. *J Hepatol* 1991;13:372-374.
- [82] Knodell RG, Ishak KG, Black WC, Chen TS, Craig R, Kaplowitz N, et al. Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. *Hepatology* 1981;1:431-435.
- [83] Deugnier YM, Loréal O, Turlin B, Guyader D, Jouanolle H, Moirand R, et al. Liver pathology in genetic hemochromatosis: a review of 135 homozygous cases and their bioclinical correlations. *Gastroenterology* 1992;102:2050-2059.
- [84] Ishak K, Baptista A, Bianchi L, Callea F, De Groote J, Gudat F, et al. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol* 1995;22:696-699.
- [85] Bedossa P, Poynard T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology* 1996;24:289-293.
- [86] Husar-Memmer E, Stadlmayr A, Datz C, Zwerina J. HFE-related hemochromatosis: an update for the rheumatologist. *Curr Rheumatol Rep* 2014;16:393.
- [87] Valenti L, Fracanzani AL, Rossi V, Rampini C, Pulixi E, Varenna M, et al. The hand arthropathy of hereditary hemochromatosis is strongly associated with iron overload. *J Rheumatol* 2008;35:153-158.
- [88] Gulati V, Harikrishnan P, Palaniswamy C, Aronow WS, Jain D, Frishman WH. Cardiac involvement in hemochromatosis. *Cardiol Rev* 2014;22:56-68.
- [89] McDermott JH, Walsh CH. Hypogonadism in hereditary hemochromatosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:2451-2455.
- [90] Piperno A, Fargion S, D'Alba R, Roffi L, Fracanzani AL, Vecchi L, et al. Liver damage in Italian patients with hereditary hemochromatosis is highly influenced by hepatitis B and C virus infection. *J Hepatol* 1992;16:364-368.
- [91] Czaja MJ. Induction and regulation of hepatocyte apoptosis by oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 2002;4:759-767.
- [92] Cao Q, Mak KM, Lieber CS. Cytochrome P450E1 primes macrophages to increase TNF-alpha production in response to lipopolysaccharide. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005;289:G95-107.
- [93] Parola M, Robino G. Oxidative stress-related molecules and liver fibrosis. *J Hepatol* 2001;35:297-306.
- [94] Recalcati S, Locati M, Gammella E, Invernizzi P, Cairo G. Iron levels in polarized macrophages: regulation of immunity and autoimmunity. *Autoimmun Rev* 2012;11:883-889.

- [95] Ramm GA, Ruddell RG. Hepatotoxicity of iron overload: mechanisms of iron-induced hepatic fibrogenesis. *Semin Liver Dis* 2005;25:433-449.
- [96] Poli G, Leonarduzzi G, Biasi F, Chiarpotto E. Oxidative stress and cell signalling. *Curr Med Chem* 2004;11:1163-1182.
- [97] Marrogi AJ, Khan MA, van Gijssel HE, Welsh JA, Rahim H, Demetris AJ, et al. Oxidative stress and p53 mutations in the carcinogenesis of iron overload-associated hepatocellular carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2001;93:1652-1655.
- [98] Hayashi H, Sakai T. Animal models for the study of liver fibrosis: new insights from knockout mouse models. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2011;300:G729-738.
- [99] Zhao M, Antunes F, Eaton JW, Brunk UT. Lysosomal enzymes promote mitochondrial oxidant production, cytochrome c release and apoptosis. *Eur J Biochem* 2003;270:3778-3786.
- [100] Kaltwasser JP, Werner E, Schalk K, Hansen C, Gottschalk R, Seidl C. Clinical trial on the effect of regular tea drinking on iron accumulation in genetic haemochromatosis. *Gut* 1998;43:699-704.
- [101] Cade JE, Moreton JA, O'Hara B, Greenwood DC, Moor J, Burley VJ, et al. Diet and genetic factors associated with iron status in middle-aged women. *Am J Clin Nutr* 2005;82:813-820.
- [102] Fletcher LM, Powell LW. Hemochromatosis and alcoholic liver disease. *Alcohol* 2003;30:131-136.
- [103] Adams LA, Angulo P, Abraham SC, Torgerson H, Brandhagen D. The effect of the metabolic syndrome, hepatic steatosis and steatohepatitis on liver fibrosis in hereditary hemochromatosis. *Liver Int* 2006;26:298-304.
- [104] Naveau S, Giraud V, Borotto E, Aubert A, Capron F, Chaput JC. Excess weight risk factor for alcoholic liver disease. *Hepatology* 1997;25:108-111.
- [105] Iturriaga H, Bunout D, Hirsch S, Ugarte G. Overweight as a risk factor or a predictive sign of histological liver damage in alcoholics. *Am J Clin Nutr* 1988;47:235-238.
- [106] Powell EE, Ali A, Clouston AD, Dixon JL, Lincoln DJ, Purdie DM, et al. Steatosis is a cofactor in liver injury in hemochromatosis. *Gastroenterology* 2005;129:1937-1943.
- [107] Diwakaran HH, Befeler AS, Britton RS, Brunt EM, Bacon BR. Accelerated hepatic fibrosis in patients with combined hereditary hemochromatosis and chronic hepatitis C infection. *J Hepatol* 2002;36:687-691.
- [108] Mariani R, Trombini P, Pozzi M, Piperno A. Iron metabolism in thalassemia and sickle cell disease. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2009;1:e2009006.
- [109] Hutchinson C, Geissler CA, Powell JJ, Bomford A. Proton pump inhibitors suppress absorption of dietary non-haem iron in hereditary haemochromatosis. *Gut* 2007;56:1291-1295.
- [110] Whiting PW, Fletcher LM, Dixon JK, Gochee P, Powell LW, Crawford DH. Concordance of iron indices in homozygote and heterozygote sibling pairs in hemochromatosis families: implications for family screening. *J Hepatol* 2002;37:309-314.
- [111] Barton JC, Edwards, Corwin Q. Hemochromatosis. *Genetics, Pathophysiology, Diagnosis and Treatment.*; 2011.

- [112] Piperno A, Arosio C, Fargion S, Roetto A, Nicoli C, Girelli D, et al. The ancestral hemochromatosis haplotype is associated with a severe phenotype expression in Italian patients. *Hepatology* 1996;24:43-46.
- [113] Bulaj ZJ, Ajioka RS, Phillips JD, LaSalle BA, Jorde LB, Griffen LM, et al. Disease-related conditions in relatives of patients with hemochromatosis. *N Engl J Med* 2000;343:1529-1535.
- [114] Whitfield JB, Cullen LM, Jazwinska EC, Powell LW, Heath AC, Zhu G, et al. Effects of HFE C282Y and H63D polymorphisms and polygenic background on iron stores in a large community sample of twins. *Am J Hum Genet* 2000;66:1246-1258.
- [115] Wallace DF, Dixon JL, Ramm GA, Anderson GJ, Powell LW, Subramaniam N. Hemojuvelin (HJV)-associated hemochromatosis: analysis of HJV and HFE mutations and iron overload in three families. *Haematologica* 2005;90:254-255.
- [116] Lee PL, Ho NJ, Olson R, Beutler E. The effect of transferrin polymorphisms on iron metabolism. *Blood Cells Mol Dis* 1999;25:374-379.
- [117] Lee PL, Gelbart T, West C, Halloran C, Felitti V, Beutler E. 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.
- [118] Krayenbuehl PA, Maly FE, Hersberger M, Wiesli P, Himmelmann A, Eid K, et al. Tumor necrosis factor-alpha -308G>A allelic variant modulates iron accumulation in patients with hereditary hemochromatosis. *Clin Chem* 2006;52:1552-1558.
- [119] Milet J, Dehais V, Bourgain C, Jouanolle AM, Mosser A, Perrin M, 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.
- [120] Pelucchi S, Mariani R, Calza S, Fracanzani AL, Modignani GL, Bertola F, et al. CYBRD1 as a modifier gene that modulates iron phenotype in HFE p.C282Y homozygous patients. *Haematologica* 2012;97:1818-1825.
- [121] Benyamin B, Esko T, Ried JS, Radhakrishnan A, Vermeulen SH, Traglia M, et al. Novel loci affecting iron homeostasis and their effects in individuals at risk for hemochromatosis. *Nat Commun* 2014;5:4926.
- [122] Handa P, Kowdley KV. Glyceronephosphate O-acyltransferase as a hemochromatosis modifier gene: Another iron in the fire? *Hepatology* 2015;62:337-339.
- [123] Stickel F, Buch S, Zoller H, Hultcrantz R, Gallati S, Österreicher C, et al. Evaluation of genome-wide loci of iron metabolism in hereditary hemochromatosis identifies PCSK7 as a host risk factor of liver cirrhosis. *Hum Mol Genet* 2014;23:3883-3890.
- [124] Turpeinen H, Oksanen A, Kivinen V, Kukkurainen S, Uusimäki A, Rämetsä M, et al. Proprotein convertase subtilisin/kexin type 7 (PCSK7) is essential for the zebrafish development and bioavailability of transforming growth factor β 1a (TGF β 1a). *J Biol Chem* 2013;288:36610-36623.
- [125] Oexle K, Ried JS, Hicks AA, Tanaka T, Hayward C, Bruegel M, et al. Novel association to the proprotein convertase PCSK7 gene locus revealed by analysing soluble transferrin receptor (sTfR) levels. *Hum Mol Genet* 2011;20:1042-1047.

- [126] McLaren CE, Emond MJ, Subramaniam VN, Phatak PD, Barton JC, Adams PC, et al. Exome sequencing in HFE C282Y homozygous men with extreme phenotypes identifies a GNPAT variant associated with severe iron overload. *Hepatology* 2015;62:429-439.
- [127] Besson-Fournier C, Martinez M, Vinel JP, Aguilar-Martinez P, Coppin H, Roth MP. Further support for the association of GNPAT variant rs11558492 with severe iron overload in hemochromatosis. *Hepatology* 2016;63:2054-2055.
- [128] Ryan E, Russell J, Ryan JD, Crowe J, Stewart S. GNPAT variant is not associated with severe iron overload in Irish C282Y homozygotes. *Hepatology* 2016;63:2055-2056.
- [129] Bardou-Jacquet E, de Tairac M, Mosser J, Deugnier Y. GNPAT Variant associated with severe iron overload in HFE hemochromatosis. *Hepatology* 2015;62:1917-1918.
- [130] Tchernitchko D, Scotet V, Lefebvre T, L'Hostis C, Gourlaouen I, Merour MC, et al. GNPAT polymorphism rs11558492 is not associated with increased severity in a large cohort of HFE p.Cys282Tyr homozygous patients. *Hepatology* 2016.
- [131] Levstik A, Stuart A, Adams PC. GNPAT variant (D519G) is not associated with an elevated serum ferritin or iron removed by phlebotomy in patients referred for C282Y-linked hemochromatosis. *Ann Hepatol* 2016;15:907-910.
- [132] Barton JC. Hemochromatosis and iron overload: from bench to clinic. *Am J Med Sci* 2013;346:403-412.
- [133] Fracanzani AL, Piperno A, Valenti L, Fraquelli M, Coletti S, Maraschi A, et al. Hemochromatosis in Italy in the last 30 years: role of genetic and acquired factors. *Hepatology* 2010;51:501-510.
- [134] Niederau C, Fischer R, Pürschel A, Stremmel W, Häussinger D, Strohmeyer G. Long-term survival in patients with hereditary hemochromatosis. *Gastroenterology* 1996;110:1107-1119.
- [135] Adams PC, Agnew S. Alcoholism in hereditary hemochromatosis revisited: prevalence and clinical consequences among homozygous siblings. *Hepatology* 1996;23:724-727.
- [136] Lainé F, Jouannolle AM, Morcet J, Brigand A, Pouchard M, Lafraisse B, et al. Phenotypic expression in detected C282Y homozygous women depends on body mass index. *J Hepatol* 2005;43:1055-1059.
- [137] Fleming RE, Feng Q, Britton RS. Knockout mouse models of iron homeostasis. *Annu Rev Nutr* 2011;31:117-137.
- [138] Piazza A, Cappello N, Olivetti E, Rendine S. A genetic history of Italy. *Ann Hum Genet* 1988;52:203-213.
- [139] 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;88:250-255.
- [140] A. A. *Analysis of Ordinal Categorical Data*, 2nd ed; 2010.
- [141] Valeri, L. and VanderWeele TJ. Mediation analysis allowing for exposure-mediator interactions and causal interpretation: theoretical assumptions and implementation with SAS and SPSS macros. *Psychological Methods*; 2013. p. 137-150.

- [142] Piperno A, Mariani R, Arosio C, Vergani A, Bosio S, Fargion S, et al. Haemochromatosis in patients with beta-thalassaemia trait. *Br J Haematol* 2000;111:908-914.
- [143] Bensaïd M, Fruchon S, Mazères C, Bahram S, Roth MP, Coppin H. Multigenic control of hepatic iron loading in a murine model of hemochromatosis. *Gastroenterology* 2004;126:1400-1408.
- [144] Jacolot S, Le Gac G, Scotet V, Quere I, Mura C, Ferec C. HAMP as a modifier gene that increases the phenotypic expression of the HFE pC282Y homozygous genotype. *Blood* 2004;103:2835-2840.
- [145] Le Gac G, Scotet V, Ka C, Gourlaouen I, Bryckaert L, Jacolot S, 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.
- [146] Goodman ZD. Grading and staging systems for inflammation and fibrosis in chronic liver diseases. *J Hepatol* 2007;47:598-607.
- [147] Shiha G, Zalata K. Ishak versus METAVIR: Terminology, Convertibility and Correlation with Laboratory Changes in Chronic Hepatitis C, Liver Biopsy. 2011 [cited; Available from: <http://www.intechopen.com/books/liver-biopsy/ishak-versus-metavir-terminology-convertibility-and-correlation-with-laboratory-changes-in-chronic-h>]
- [148] Valenti L, Fracanzani AL, Rametta R, Fraquelli M, Soverini G, Pelusi S, et al. Effect of the A736V TMPRSS6 polymorphism on the penetrance and clinical expression of hereditary hemochromatosis. *J Hepatol* 2012;57:1319-1325.
- [149] Guillemot J, Canuel M, Essalmani R, Prat A, Seidah NG. Implication of the proprotein convertases in iron homeostasis: proprotein convertase 7 sheds human transferrin receptor 1 and furin activates hepcidin. *Hepatology* 2013;57:2514-2524.
- [150] Brandão M, Oliveira JC, Bravo F, Reis J, Garrido I, Porto G. The soluble transferrin receptor as a marker of iron homeostasis in normal subjects and in HFE-related hemochromatosis. *Haematologica* 2005;90:31-37.
- [151] Kisseleva T, Brenner DA. Role of hepatic stellate cells in fibrogenesis and the reversal of fibrosis. *J Gastroenterol Hepatol* 2007;22 Suppl 1:S73-78.
- [152] Hsiao SC, Lee CT, Pei SN. GNPAT variant is associated with iron phenotype in healthy Taiwanese women: A population without the HFE C282Y mutation. *Hepatology* 2016.
- [153] Rametta R, Dongiovanni P, Fargion S, Valenti L. GNPAT p.D519G variant and iron metabolism during oral iron tolerance test. *Hepatology* 2016.