

Análisis de la asociación entre riesgo de isquemia cardíaca, mutaciones de la hemocromatosis (HFE), metabolismo férrico y lipídico

M. Lucas^a, M. Lucas-Ramos^b, F. Solano^a y F. Fabiani^c

^aServicio de Biología Molecular. Hospital Virgen Macarena. Sevilla. ^bServicio de Urgencias y Cuidados Críticos. Hospital Virgen de Valme. Sevilla. ^cUnidad de Lípidos. Hospital Virgen Macarena. Sevilla. España.

Antecedentes. La hemocromatosis puede ser de causa hereditaria (HFE) o adquirida, y se ha relacionado con la susceptibilidad al desarrollo de enfermedad cardiovascular.

Objetivo. Analizar las frecuencias alélicas de diferentes fenotipos de HFE en pacientes con antecedentes de isquemia y en población control.

Resultados. La comparación de casos y controles de los genotipos del gen de la hemocromatosis hereditaria en pacientes de cardiopatía isquémica, varones y mujeres posmenopáusicas, no presentó asociación estadística con la enfermedad cardíaca. Las frecuencias alélicas variantes del gen *HFE* de la hemocromatosis en la población analizada fueron muy próximas al 21% para el fenotipo H63D y al 2,5% para el C282Y, tanto en los pacientes como en los controles. Se ha observado una diferencia significativa en los valores de colesterol total y ligado a lipoproteínas de alta densidad, así como en los de apolipoproteína A-I y marcadores enzimáticos de lesión hepática, entre el grupo control y los pacientes con isquemia. No obstante, hay que señalar que estas diferencias no están relacionadas con las variantes mutadas del gen *HFE*. Los parámetros de metabolismo del

hierro, la sideremia, la ferritina y la capacidad de fijación del hierro no estaban alterados en el grupo de pacientes ni tenían relación con el estado de portador de mutaciones del gen *HFE*.

Conclusión. Los datos observados sugieren la falta de asociación entre genotipos mutados de HFE y la enfermedad vascular isquémica. No obstante, la elevada frecuencia de portadores de variantes alélicas del gen *HFE* sugiere que no se puede excluir que dichas mutaciones se asocien a otros factores que potencien lesiones causantes de una enfermedad de penetrancia variable, incluida la afección.

Palabras clave:

Hemocromatosis. Hierro. Isquemia. Alelos HFE.

ASSOCIATIONS BETWEEN HEMOCHROMATOSIS (HFE) MUTATIONS, CARDIOVASCULAR RISK AND IRON AND LIPID METABOLISMS

Background. Hemochromatosis is a disease of hereditary (HFE) or acquired origin and has been related to cardiovascular disease (CVD) development.

Aim. To compare allelic frequencies of different HFE mutations in patients with ischemic diseases versus control population and to study possible associations between these mutations, CVD and iron and lipid metabolisms.

Results. No difference was observed in the HFE genotypic distribution between patients with CVD and controls, regardless of gender and menstrual status. Allelic variant frequencies in *HFE* gene were around 21% in the analyzed population for the H63D phenotype and 2,5% for the C282Y

Este trabajo ha recibido las siguientes ayudas: beca SEA/FEA otorgada por los Laboratorios Bristol Myers Squibb, correspondiente al año 2000. Ayuda de Consejería de Salud, expediente SAS 95/01.

Correspondencia: Dr. M. Lucas.
Servicio de Biología Molecular. Hospital Universitario Virgen Macarena.
Avda. Dr. Fedriani, s/n. 41009 Sevilla. España.
Correo electrónico: lucas@us.es

Recibido el 25 de febrero de 2003 y aceptado el 19 de junio de 2003.

phenotype both in patients and controls. Statistically-significant differences between total and HDL cholesterol and Apo AI and enzymatic hepatic damage markers were observed between controls and patients. However, these differences were not related to allelic variants of *HFE* gene. Metabolic iron parameters such as serum iron, ferritin and iron-binding capacity were not altered or related to HFE mutations in analyzed patients.

Conclusion. Current data suggest a lack of association between HFE genotype variations and CVD. However, the elevated proportion of HFE mutations detected suggests that these mutations could be associated with diseases of variable penetrance, including those related to vascular pathology.

Key words:

Hemochromatosis. Iron. Ischemia. HFE alleles.

Introducción

La hemocromatosis (HFE) es la lesión tisular causada por el depósito excesivo de hierro en células parenquimatosas. Puede heredarse genéticamente (hemocromatosis primaria) o ser adquirida (hemocromatosis secundaria); las más frecuentes son la primaria y la secundaria a anemias. El mecanismo de la lesión de los tejidos por el depósito de hierro está relacionado con el daño oxidativo en las organelas y las membranas celulares, y también con el estímulo de la fibrogenia. El hígado es el órgano que se afecta antes y con mayor constancia: se produce un aumento progresivo de la concentración hepática de hierro que conduce a la aparición, primero, de fibrosis y, finalmente, cirrosis. En el 80% de los casos se produce intolerancia hidrocarbonada, con diabetes franca en el 60% de los pacientes.

El diagnóstico se basa en la clínica, la historia familiar positiva y los datos de laboratorio indicativos de sobrecarga de hierro, como una sideremia superior a 170 µg/dl, una saturación de transferrina mayor del 60% y cifras de ferritina por encima de los valores normales. Es necesario realizar una biopsia hepática para valorar el estadio de la enfermedad y para la determinación de la concentración hepática de hierro. Ésta es de alrededor de 100 µg/100 mg de peso seco en individuos sanos, mientras que en pacientes con hemocromatosis idiopática suele ser superior a 1.000 µg/100 mg. En la actualidad, el diagnóstico implica la demostración por genética molecular de la mutación Cys282Tyr asociada o no a His63Asp.

Los radicales libres, que en los sistemas biológicos son fundamentalmente derivados del metabolismo del oxígeno, resultan lesivos para una gran variedad de tejidos y son causa de diferentes enfermedades^{1,2}. El hierro es un potente catalizador de la producción de radicales libres, y causa peroxidación de lípidos y depleción de antioxidantes. Esto sucede en enfermos de hemocromatosis³ y se asocia con un bajo contenido en vitamina E con relación a los lípidos plasmáticos⁴. No obstante, el efecto del exceso de hierro en el metabolismo de los lípidos es poco conocido. En animales de experimentación sometidos a una sobrecarga de hierro en la dieta se ha demostrado peroxidación lipídica con alteraciones en el transporte plasmático de lípidos y en el metabolismo hepático de los esteroides⁵.

Aunque hace años se describió que el hierro aumenta el riesgo de enfermedad coronaria asociada a hipercolesterolemia⁶, se desconoce la asociación fisiopatológica entre la enfermedad vascular y la sideremia. Es interesante señalar que hace unos años⁷ ya se describió la existencia de anomalías bioquímicas y clínicas en individuos heterocigotos para las variantes alélicas del gen de la hemocromatosis (*HFE*), y se sugirió una impronta genética por vía del cromosoma paterno. Posteriormente se sugirió que el gen *HFE* podía dar lugar a alteraciones que asociasen el metabolismo del hierro en individuos heterocigotos para las variantes alélicas del gen *HFE*, con el riesgo de enfermedad cardiovascular; lo que se ha descrito por 2 grupos independientes. Así, Roest et al⁸ han señalado el elevado riesgo de accidente cardiovascular en mujeres de 59-70 años heterocigotas para la mutación Cys282Tyr. Otro grupo⁹ ha observado que el riesgo de infarto de miocardio está significativamente elevado en varones heterocigotos para la mutación. Estos datos inducen a explicar la baja frecuencia de infartos en la mujer antes de la menopausia por la pérdida menstrual de hierro. Ambos estudios se llevaron a cabo con una amplia población y concluyeron que el hierro es un importante factor de riesgo para la enfermedad isquémica cardíaca en varones y mujeres.

La frecuencia estimada de portadores de mutación en el gen *HFE* es del 8% en sujetos caucásicos. La frecuencia real en población meridional y del sur de España es parcialmente conocida, y se sabe de la existencia de diferencias significativas en la genética de poblaciones del centro y el norte de Europa respecto al sur, así como el interés que esto tiene para el estudio de determinadas enfermedades de base hereditaria. Diferentes estudios

Tabla 1. Parámetros séricos de metabolismo del hierro en pacientes con isquemia cardíaca

	Mujeres (78)	Varones (65)	Test de la t de Student
Sideremia (mg/dl)	87 ± 35 (40-150)	110 ± (55-160)	p < 0,001
TIBC (mg/dl)	267 ± 65 (200-350)	298 ± 56 (200-400)	p < 0,01
Ferritina (mg/dl)	90 ± 47 (< 300)	110 ± 51 (< 350)	p < 0,01

Entre paréntesis está indicado el intervalo de referencia. Se excluyeron los datos de 2 mujeres y 2 varones (pacientes indicados en el texto), porque tenían una cifra muy elevada de ferritina, que se apartaba mucho de los intervalos de referencia.

TIBC: capacidad de fijación plasmática del hierro.

han estimado las frecuencias de portadores de Cys282Tyr y His63Asp en la población española¹⁰⁻¹², y éstas son próximas al 5 y el 35% para las mutaciones Cys282Tyr y His63Asp, respectivamente, en la población sana.

La asociación entre las alteraciones del metabolismo de lipoproteínas, las mutaciones del gen *HFE*, el metabolismo del hierro y la isquemia cardíaca no está bien documentada y es el objetivo fundamental del presente estudio.

Pacientes y métodos

Se estudió a un total de 120 varones y 104 mujeres con una media ± desviación estándar (DE) de 57 ± 11 y de 63 ± 14 años, respectivamente, con antecedentes personales de infarto de miocardio o isquemia crónica claramente establecida. El 89% de mujeres eran mayores de 53 años. En el estudio se describe (no a efectos de cálculo de edad del grupo) a una mujer de 29 años, con amenorrea primaria, cardiopatía y homocigosis para H63D. No se pudo conocer si todas las mujeres eran posmenopáusicas, aunque la estimación, entre consulta directa y por la edad, es que al menos el 93% lo eran. Paralelamente, se obtuvieron muestras en sujetos (un total de 282) sin antecedentes de cardiopatía isquémica, y constituyen el grupo control, que es equiparable en edad y extracción poblacional (edad media, 55 ± 9 años).

De cada individuo se extrajo sangre para procesamiento de ADN y suero para llevar a cabo estudios metabólicos. Para esto último se descartó a los pacientes en los que no se pudo conseguir una muestra de sangre en ayunas de al menos 12 h. El fraccionamiento y la cuantificación de lipoproteínas (lipoproteínas de alta densidad [HDL]: precipitación con fosfotungstíco; lipoproteínas de baja densidad [LDL], y lipoproteínas de muy baja densidad [VLDL]: ultracentrifugación), colesterol

(CHOD-PAP), triglicéridos (GPO-PAP), apolipoproteínas (Apo) A-I y B-100 (RA-Systems, kit de Technicon) y lipoproteína(a) (técnica de inmunoprecipitación, SPQ, kit de INCSTAR, Co.). El resto de parámetros bioquímicos se realizó con técnicas automatizadas convencionales.

Para el estudio de las mutaciones del gen *HFE* se extrajo el ADN de leucocitos de sangre periférica. La amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se llevó a cabo con cebadores específicos y marcado interno con [³²P]dCTP, de los exones 2 y 4 del gen *HFE* del cromosoma 6, seguido de análisis de mutaciones por restricciones específicas: RsaI en el exón 4 para la mutación C282Y y MboI en el exón 2 para la mutación H63D. Finalmente, se llevó a cabo una autorradiografía del gel y el análisis de resultados; de forma alternativa, se realizó sin radiactividad y con bromuro de etidio. La secuencia de los cebadores utilizados fue: C282YR-5' CTC AGG CAC TCC TCT CAA CC; C282YF -5' TGG CAA GGG TAA ACA GAT CC; H63DF-5' ACA TGG TTA AGG CCT GTT GC; H63DR-5' CTT GCT GTG GTT GTG ATT TTC C. La temperatura de alineamiento fue de 56 °C. La amplificación se hizo con un total de 28 ciclos a 94, 56 y 72 °C de temperaturas de fusión, alineamiento y extensión, respectivamente.

El estudio de parámetros del metabolismo del hierro (sideremia, capacidad de fijación plasmática del hierro [TIBC] y ferritina) se hizo con técnicas automatizadas convencionales. Los intervalos de referencia se indican en la tabla 1. Las frecuencias absolutas de los genotipos se compararon mediante el test de la χ^2 con el programa Epi Info-6 (OMS, Ginebra). Las variables continuas de los datos bioquímicos se compararon entre los diferentes genotipos y grupos mediante la prueba de la t de Student. Se estableció como significativo un valor de p igual o inferior a 0,05 para la prueba bilateral.

Resultados

Los genotipos de la población control y del grupo de pacientes con isquemia cardíaca se presen-

Tabla 2. Genotipo HFE de las poblaciones, control y pacientes

Genotipo	Controles	Isquemia cardíaca		
		Varón	Mujer	Total
N/N	163 (57,8)	68 (56,7)	62 (59,6)	130 (58,0)
H63D/N	92 (32,6)	40 (33,3)	29 (27,9)	69 (30,8)
H63D/H63D	12 (4,3)	7 (5,8)	8 (7,7)	15 (6,7)
C282Y/N	13 (4,6)	5 (4,2)	4 (3,8)	9 (4,0)
C282Y/C282Y	0	0	0	0
C282Y/H63D	2 (0,7)	0	1 (1,0)	1 (0,4)
Total	282 (100)	120 (100)	104 (100)	224

La comparación de las frecuencias de los genotipos en los diferentes grupos no fue estadísticamente significativa (test de la χ^2). Se presentan las frecuencias absolutas dentro de cada grupo, así como las frecuencias relativas en porcentaje, entre paréntesis.

Tabla 3. Frecuencias relativas de las variantes alélicas del gen *HFE*

Alelos	Controles	Isquemia
H63D	0,21	0,22
C282Y	0,027	0,022

Valores deducidos de los genotipos de la tabla 1 y expresados en tanto por uno.

tan en la tabla 2, de la que se han calculado las frecuencias alélicas indicadas en la tabla 3. En la comparación de frecuencias absolutas de los genotipos definidos por las variantes alélicas del gen *HFE* se demostró que no existían diferencias significativas entre el grupo control (0,21 para H63D y 0,027 para C282Y) y el de pacientes con antecedentes de isquemia cardíaca (0,22 para H63D y 0,022 para C282Y) (tabla 3). Tanto en la población de control como en los pacientes, las variantes alélicas del gen *HFE* están en equilibrio Hardy-Weinberg.

La baja frecuencia de heterocigotos C282Y no permitió una agrupación significativa de portadores para el estudio comparado de parámetros del metabolismo de hierro y el de lípidos. Los parámetros lipídicos en los portadores de H63D no fueron estadísticamente diferentes respecto a los que no lo eran, en el grupo control ni en el de pacientes con cardiopatía isquémica (datos no expuestos).

Respecto a la población control los pacientes con isquemia cardíaca presentaron unas concentraciones séricas más altas de colesterol total (223 frente a 209 mg/dl), mientras que la concentración de HDL fue significativamente más baja (37 frente

Tabla 4. Colesterol total y fraccionamiento de lípidos en suero

	Control	Isquemia	Test de la t de Student
Colesterol total (mg/dl)	209 ± 37	223 ± 41	p < 0,03
cHDL (mg/dl)	41 ± 12	37 ± 9	p < 0,02
cLDL (mg/dl)	141 ± 36	151 ± 37	NS
cVLDL (mg/dl)	22 ± 21	27 ± 15	NS
Triglicéridos (mg/dl)	159 ± 67	170 ± 53	NS
Lp(a) (mg/dl)	23 ± 18	25 ± 17	NS
Apo A-I (mg/dl)	102 ± 22	91 ± 16	p < 0,03
Apo B-100 (mg/dl)	93 ± 21	98 ± 17	NS

Los datos indican el promedio y la desviación estándar. El número de individuos estudiados fue de 68 controles y 76 pacientes con isquemia. Para Apo A-I y Apo B-100 se recogió a 48 controles y 53 pacientes con isquemia.

NS: no significativo; cHDL: colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidad; cLDL: colesterol ligado a lipoproteínas de baja densidad; cVLDL: colesterol ligado a lipoproteínas de muy baja densidad; Lp(a): lipoproteína(a); Apo: apolipoproteína.

Tabla 5. Parámetros bioquímicos de posible alteración de funcionalidad hepática

	Control (61)	Isquemia (78)	Test de la t de Student
Glucosa (mg/dl)	112 ± 30	125 ± 33	p < 0,017
AST (U/l)	24 ± 12	30 ± 11	p < 0,04
ALT (U/l)	30 ± 15	43 ± 13	p < 0,03
Fosfatasa alcalina (U/l)	65 ± 17	74 ± 21	NS
GGTP (U/l)	55 ± 41	51 ± 37	NS

Entre paréntesis se indica el número de individuos de cada grupo. NS: no significativo.

a 41 mg/dl) en los casos de cardiopatía isquémica, lo que también se observó para las concentraciones de Apo A-I (tabla 4).

El grupo de pacientes con isquemia cardíaca presentó unas cifras más elevadas de glucemia (125 frente a 112 mg/dl), así como de AST (30 frente a 24 U/l) y ALT (43 frente a 30 U/l), que el grupo control (tabla 5). Tampoco aquí se encontró una asociación entre las concentraciones de glucosa y las de enzimas hepáticas con las variantes alélicas de *HFE* (datos no expuestos).

No se observaron diferencias significativas en los parámetros del metabolismo del hierro entre los diferentes genotipos *HFE* en los grupos control y con cardiopatía isquémica (datos no expuestos), con la excepción de que 2 mujeres con cardiopatía isquémica tenían unas cifras de ferritina patológicas de 1.156 y 1.300 ng/ml. Ambas tenían un genotipo H63D/H63D; una de ellas era posmenopáusica y la otra (de 29 años) tenía una amenorrea primaria. En el grupo control de pacientes sin antecedentes de cardiopatía, 2 varones tenían una cifra de ferritina de 1.029 y 878 ng/ml. Uno de ellos era homocigoto H63D y el otro heterocigoto C282Y. Sí se observaron diferencias significativas (p < 0,01 a p < 0,001) en los valores de sideremia, capacidad de transporte de hierro y ferritina entre los varones y las mujeres afectados de enfermedad isquémica (tabla 1).

Discusión

La elevada frecuencia de la mutación del gen *HFE* y el hecho de que el hierro sea un potente catalizador de reacciones productoras de metabolitos reactivos del oxígeno plantea la consideración de que la variante fenotípica de la proteína codificada por dicho gen, incluso en heterocigosis, podría actuar como factor de riesgo cardiovascular^{8,9}. Es posible que la asociación de hipercolesterolemia con hemocromatosis subclínica (heterocigosis) aumente la sensibilidad a la enfermedad isquémica. Es

importante considerar que en la lesión ateromatosa concurren los macrófagos, que son fuertes productores de metabolitos reactivos del oxígeno.

Los presentes resultados no confirman los hallazgos previos de asociación entre isquemia cardíaca y variantes alélicas del gen *HFE*^{8,9} que sostenían la interesante hipótesis de riesgo cardíaco asociado al metabolismo del hierro y, en concreto, al hecho de ser portador de mutaciones del gen *HFE*. En un grupo de más de 400 cromosomas de pacientes con isquemia cardíaca no se ha observado una mayor frecuencia de los alelos H63D o C282Y, lo que podría tener más interés en nuestra población en que la frecuencia de H63D es bastante elevada, cercana al 20%. Sí se observó una diferencia significativa en los valores de colesterol total y ligado a HDL así como en la Apo A-I y los marcadores enzimáticos de lesión hepática entre el grupo control y los pacientes con isquemia. No obstante, hay que señalar que estas diferencias no están relacionadas con las variantes mutadas del gen *HFE*.

Estudios más recientes concuerdan con el nuestro. Así, Hetet et al¹³, en una amplia serie de análisis de casos y controles (estudios AXA, ECTIM y GENIC), no encuentran diferencias significativas en las frecuencias alélicas de C282Y y H63D, y rechazan la hipótesis de que las mutaciones del gen *HFE* incrementan el riesgo de enfermedad cardiovascular. En el mismo sentido, Njajou et al¹⁴ observan que las mutaciones del gen *HFE* no están asociadas a aterosclerosis o accidentes vasculares.

El fenotipo clásico y la penetrancia de las mutaciones de *HFE* en la hemocromatosis hereditaria está siendo cuestionado seriamente por los rastreos masivos de los genotipos *HFE* y su asociación a hemocromatosis hereditaria¹⁵⁻¹⁷. El punto de discusión es que para el estudio de la penetrancia de dichas mutaciones se comparan inespecíficamente la población general donde las enfermedades hepática, cardíaca, endocrina u otras pueden ser tan prevalentes, por otra patogenia, con la población de individuos con mutaciones del gen *HFE*. La penetrancia bioquímica de la sobrecarga de hierro, la saturación de transferrina, la ferritina y la sideremia también podrían considerarse variables, sin que eso excluyese otros mecanismos bioquímicos causados por pequeñas elevaciones de hierro intracelular en la enfermedad celular, aunque esto último todavía no se ha estudiado.

En conclusión, nuestros datos excluyen una asociación entre genotipos mutados de *HFE* y enfermedad vascular isquémica. La elevada frecuencia de portadores de variantes alélicas del gen *HFE* sugiere que no se puede excluir que dichas mutaciones se asocien a otros factores que potencien lesiones causantes de una afección variable, incluida la pared vascular.

Bibliografía

- Halliwel B, Gutteridge JMC. Oxygen radicals and the nervous system. *Trends Neurosci* 1985;79:22-6.
- Knight JA. Diseases related to oxygen derived free radicals. *Ann Clin Lab Sci* 1995;25:111-21.
- Young IS, Trouton TG, Torney JJ, McMaster D, Callender ME, Trimble ER. Antioxidant status and lipid peroxidation in hereditary haemochromatosis. *Free Radic Biol Med* 1994;16:393-7.
- Von Herbay A, De Groot H, Hegi U, Stremmel W, Strohmeyer G, Sies H. Low vitamin E content in plasma of patients with alcoholic liver disease, hemochromatosis and Wilson's disease. *J Hepatol* 1994;20:41-6.
- Brunet S, Thibault L, Delvin E, Yotov W, Bendayan M, Levy E. Dietary iron overload and induced lipid peroxidation are associated with impaired plasma lipid transport and hepatic sterol metabolism in rats. *Hepatology* 1999;29:1809-17.
- Herbert V. Iron worsens high-cholesterol-related coronary artery disease. *Am J Clin Nutr* 1994;60:299-300.
- Bulaj ZJ, Griffen LM, Jorde LB, et al. Clinical and biochemical abnormalities in people heterozygous for hemochromatosis. *N Engl J Med* 1996;335:1799-805.
- Roest M, Van der Schouw YT, De Valk B, et al. Heterozygosity for a hereditary hemochromatosis gene is associated with cardiovascular death in women. *Circulation* 1999;100:1260-3.
- Toumainen TP, Kpntula K, Nyyssönen K, Lakka TA, Helio T, Salonen JT. Increased risk of myocardial infarction in carriers of the hemochromatosis gene Cys282Tyr mutation: a prospective cohort study in men in eastern Finland. *Circulation* 1999;100:1274-79.
- Baiget M, Barcelo MJ, Gimferrer E. Frequency of the C282Y and H63D mutations in distinct groups living in Spain. *J Med Genet* 1998;35:701.
- Fabrega E, Castro B, Sánchez-Castro L, Benito A, Fernandez-Luna JL, Pons Romero F. Prevalencia de la mutación Cys 282Tyr en el gen de la hemocromatosis en Cantabria en pacientes con hemocromatosis hereditaria. *Med Clin (Barc)* 1999;112:451-3.
- Sánchez M, Bruguera M, Bosch J, Rodes J, Ballesta F, Oliva R. Prevalence of the Cys282Tyr and His62Asp *HFE* gene mutations in Spanish patients with hereditary hemochromatosis and in controls. *J Hepatol* 1998;29:725-8.
- Hetet G, Elbaz A, Garipey J, et al. Association studies between hemochromatosis gene mutations and the risk of cardiovascular diseases. *Eur J Clin Invest* 2001;31:382-8.
- Njajou OT, Hollander M, Koudstaal PJ, et al. Mutations in the hemochromatosis gene and stroke. *Stroke* 2002;33:2363-6.
- Beutler E, Felitti VJ, Koziol JA, Ho NJ, Gelbart T. Penetrance of 845G-A (C282Y) *HFE* hereditary haemochromatosis mutation in the USA. *Lancet* 2002;359:211-8.
- Asberg A, Hveem K, Kruger O, Bjerve KS. Persons with screening-detected haemochromatosis: as healthy as the general population? *Scand J Gastroenterol* 2002;37:719-24.
- Phatak PD, Ryan DH, Capuccio J, et al. Prevalence and penetrance of *HFE* mutations in 4865 unselected primary care patients. *Blood Cells Mol Dis* 2002;29:41-7.