



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**  
**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

**Pesquisa de las Variantes No Usuales en los Genes**  
***HFE* y *HAMP* en Pacientes Chilenos con Fenotipo**  
**Clínico de Hemocromatosis Hereditaria**

Memoria para optar al Título de Bioquímico

**Roxana Carolina Ramírez Neira**

Profesor Patrocinante

Prof. María Antonieta Valenzuela P.

Laboratorio de Bioquímica

Departamento de Bioquímica y Biología

Molecular

Facultad de Ciencias Químicas y

Farmacéuticas.

Universidad de Chile

Director de Tesis

Prof. Mónica Acuña P.

Laboratorio de Epidemiología Genética

Programa de Genética Humana

Instituto de Ciencias Biomédicas (ICBM)

Facultad de Medicina.

Universidad de Chile

Santiago de Chile

2007

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi Directora de tesis Mónica Acuña, por su valiosa entrega de conocimientos, mi formación en el área genética, su disponibilidad, confianza y apoyo.

Al Dr. Humberto Reyes, por confiarnos valiosa información y las muestras de sus pacientes.

A mi Profesora Patrocinante María Antonieta Valenzuela, por su motivación y sugerencias para la estructuración de esta tesis.

Al Laboratorio de Epidemiología Genética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, por facilitar la infraestructura y materiales para desarrollar esta tesis.

A Hugo Jorquera de Genética y Tecnología, por su valiosa asesoría en la secuenciación del DNA.

A Robert Popa por sus oportunas sugerencias en la redacción castellana e inglesa de esta tesis.

A Elizabeth Quintanilla de Bioseguridad de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, por su amabilidad y paciencia en colaborar con la organización y estructuración de la tesis.

A mis compañeras del Laboratorio de Epidemiología Genética por la permanente disponibilidad y pertinentes sugerencias.

## DEDICATORIA

*Dedicado a mis Padres Doriana y Manuel,  
por su amor, apoyo incondicional y confianza.*

## TABLA DE CONTENIDOS

Agradecimientos	ii
Dedicatoria	iii
Indice de ilustraciones y tablas	vi
Resumen	vii
Summary	ix
Abreviaturas	xi
<b>Introducción</b>	
1. Metabolismo del hierro.	1
a. Propiedades bioquímicas del hierro.	1
b. Absorción y transporte de hierro.	2
c. Regulación de la absorción de hierro.	4
2. Aspecto clínico de la hemocromatosis hereditaria.	11
3. Base genética de la hemocromatosis hereditaria.	12
4. Hipótesis.	16
5. Objetivos.	16
<b>Materiales y Metodología</b>	18
1. Lista de Reactivos.	18
2. Procedimientos.	19
a. Pacientes	19
b. Extracción del DNA	19
c. Amplificación de los exones 2, 3 del gen <i>HAMP</i> y de los exones 2, 3, 4 del gen <i>HFE</i> mediante PCR.	20
d. Tipificación de las variantes H63D y C282Y del gen <i>HFE</i> mediante RFLP.	22
e. Tamiz de los exones 2, 3 y 4 del gen <i>HFE</i> y de los exones 2 y 3 del gen <i>HAMP</i> mediante SSCP.	23
f. Secuenciación y análisis de las secuencias en la base de datos.	26
<b>Resultados</b>	27

1. Tipificación por RFLP de las variantes H63D y C282Y del gen <i>HFE</i> .	27
2. Tamiz de los exones 2, 3 y 4 del gen <i>HFE</i> y de los exones 2 y 3 del gen <i>HAMP</i> mediante SSCP.	28
a. Gen <i>HFE</i> .	28
b. Gen <i>HAMP</i>	33
3. Resumen de los resultados.	34
<b>Discusión</b>	36
<b>Conclusión</b>	42
<b>Bibliografía</b>	43

## INDICE DE ILUSTRACIONES Y TABLAS

Figura 1:	Modelo de la absorción en el enterocito.	4
Figura 2:	Esquema de la función de la hepcidina en la homeostasis del hierro	6
Figura 3:	Mecanismo de regulación de la absorción de hierro en el hepatocito.	10
Figura 4:	Diagrama de la proteína Hfe y posiciones de sus variantes.	13
Figura 5:	Esquema de los genes <i>HAMP</i> y <i>HFE</i> .	21
Figura 6:	Diagrama del exón 2 y exón 4 del gen <i>HFE</i> y los respectivos sitios de restricción para las enzimas Bcl I y Rsa I.	23
Figura 7:	Identificación de los alelos H63D Y C282Y del gen <i>HFE</i> mediante RFLP.	27
Figura 8:	Análisis del exón 2 del gen <i>HFE</i> mediante SSCP	29
Figura 9:	Análisis del exón 4 del gen <i>HFE</i> mediante SSCP	29
Figura 10:	Patrón migratorio de la variante silvestre (wt) y C282Y del gen <i>HFE</i> en gel de poliacrilamida no denaturante.	31
Figura 11:	Cromatograma de los controles C282Y/wt y silvestre (wt/wt) del gen <i>HFE</i> .	32
Figura 12:	Análisis del exón 3 del gen <i>HAMP</i> mediante SSCP.	33
Tabla 1:	Reactivos para biología molecular	18
Tabla 2:	Reactivos generales.	18
Tabla 3:	Soluciones para la extracción de DNA.	20
Tabla 4:	Secuencias de los partidores usados para las PCRs.	21
Tabla 5:	Condiciones para las PCRs.	22
Tabla 6:	Solución tampón TBE 5 X para la electroforesis.	22
Tabla 7:	Soluciones para la electroforesis en poliacrilamida.	25
Tabla 8:	Resultados de la tipificación de las variantes H63D y C282Y del gen <i>HFE</i> por RFLP.	28
Tabla 9:	Resumen de los Resultados.	35

## RESUMEN

La hemocromatosis hereditaria (HH) es una enfermedad genética del metabolismo del hierro. Se caracteriza por un aumento de la absorción de hierro y por su acúmulo en el parénquima hepático. La mayoría de los pacientes con HH son homocigotos para el alelo C282Y y en menor proporción son heterocigotos compuestos para los alelos C282Y y H63D del gen *HFE*. Sin embargo, la penetrancia de estas variantes es incompleta. Al respecto se ha comprobado el efecto de ciertos modificadores genéticos sobre la expresión fenotípica de la HH. Existe evidencia que la HH puede resultar de una herencia digénica entre algunas variantes de los genes *HFE* y *HAMP*.

En un grupo de pacientes chilenos con fenotipo HH, las variantes C282Y y H63D no son preponderantes. Esta observación conduce a la hipótesis que estos pacientes con signos clínicos de HH podrían presentar otros alelos del gen *HFE* y del gen *HAMP*. Mediante la técnica SSCP (*Single Stranded Conformation Polymorphism*) se tamizó la presencia de variantes en los exones 2, 3 y 4 del gen *HFE* y 2 y 3 del gen *HAMP*. Por RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) y secuenciación se identificó el alelo presente. En 19 pacientes estudiados se encontró que un 26,3% y un 21,1% presentan los alelos H63D y C282Y, respectivamente. Otras variantes de los genes *HFE* y *HAMP* no fueron identificadas. Por lo tanto estos resultados no comprueban la

hipótesis. En tanto nada sugiere que otros alelos para los genes *HFE* y *HAMP* no puedan ser encontrados en otros pacientes chilenos con HH. Por otra parte los pacientes estudiados podrían presentar variantes explicativas de su enfermedad en otros genes que participan en el metabolismo del hierro, por ejemplo *TFR2* y *HJV*.



## SUMMARY

### SCREENING OF UNUSUAL VARIANTS ON THE *HFE* AND *HAMP* GENES IN CHILEAN PATIENTS WITH A CLINICAL PHENOTYPE OF HEREDITARY HEMOCHROMATOSIS

Hereditary hemochromatosis (HH) is a genetic disorder of iron metabolism. HH is characterized by an increased iron absorption and iron accumulation in the parenchymal cells of the liver. The disorder is mainly attributable to C282Y and H63D alleles of the *HFE* gene and most HH patients are homozygous for the C282Y allele. However, penetrance of these alleles is incomplete. It is demonstrated that other genetic factors may well affect the HH phenotype. It has been reported that HH results from a digenic inheritance of alleles *HFE* and *HAMP* genes.

In a group of Chilean patients with HH phenotype the alleles C282Y and H63D are not that frequent. This observation leads to the hypothesis that this group of patients with clinical signs of HH could present other alleles of the *HFE* and *HAMP* genes. A screening for mutations was completed on exons 2, 3, 4 of the *HFE* gene and exons 2, 3 *HAMP* gene through the SSCP (*Single Stranded Conformation Polymorphism*) technique. Using RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) and sequencing the alleles have been identified. A

research conducted on 19 patients found the H63D allele in 26.3% of the tested subjects, while 21.1% presented the C282Y allele. No other alleles of *HFE* and *HAMP* genes have been identified. Therefore, the results of this research do not confirm the hypothesis. However, nothing suggests that other alleles of *HFE* and *HAMP* genes could not be found in other Chilean patients with HH. The tested patients could also present other alleles in other genes of iron metabolism, such as *TFR2* and *HJV* that could explain their clinical phenotype.

## ABREVIATURAS

<b>DMT1</b>	<i>Divalent Metal Transporter 1</i>	Transportador de Metales Divalentes 1
<b>HAMP</b>	<i>Hepcidin Antimicrobial Peptide</i>	Péptido Antimicrobiano Hepcidina
<b>HH</b>	<i>Hereditary Hemochromatosis</i>	Hemocromatosis Hereditaria
<b>HJ</b>	Hemocromatosis juvenil	
<b>Hjv</b>	<i>Hemojuvelin</i>	Hemojuvelina
<b>IHH</b>	Índice de Hierro Hepático	
<b>IRE</b>	<i>Iron Regulatory Elements</i>	Elementos de Respuesta al Hierro
<b>IRP</b>	<i>Iron Regulatory Proteins</i>	Proteínas Reguladoras del Hierro
<b>MHC</b>	<i>Major Histocompatibility Complex</i>	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i>	Reacción en Cadena de la Polimerasa
<b>RFLP</b>	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>	Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción
<b>SSCP</b>	<i>Single Strand Conformation Polymorphism</i>	Polimorfismo de Conformación de la Hebra Simple
<b>Tf</b>	Transferrina	
<b>Tf-Fe<sub>2</sub></b>	Transferrina Diférrica	
<b>TfR1</b>	<i>Transferrin Receptor 1</i>	Receptor de la Transferina 1
<b>TfR2</b>	<i>Transferrin Receptor 2</i>	Receptor de la Transferina 2
<b>UTR</b>	<i>Untranslated Region</i>	Región no Traducida
<b>Wt</b>	<i>Wild Type</i>	Tipo Silvestre

## INTRODUCCIÓN

### 1. Metabolismo del hierro.

#### a. Propiedades Bioquímicas del Hierro.

El hierro (Fe), elemento fundamental para la mayoría de las formas de vida, juega un papel crucial en una variedad de procesos biológicos. El transporte de oxígeno, la producción de energía, la función de numerosas proteínas esenciales y la síntesis de DNA dependen de esta molécula (Arredondo y Nuñez, 2005). En la materia viva el hierro existe en dos estados de oxidación, ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) y férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ). En un medio acuoso como el líquido extracelular,  $\text{Fe}^{2+}$  es espontáneamente oxidado a  $\text{Fe}^{3+}$  formando  $\text{Fe}(\text{OH})_3$ . A pH 7 la máxima solubilidad de la forma férrica es muy baja ( $10^{-17}$  M) mientras que la solubilidad de la forma ferrosa es mayor ( $10^{-1}$  M) (Arredondo y Nuñez, 2005).

En los procesos biológicos, la esencialidad del hierro radica en su capacidad de aceptar o donar un electrón (Frazer y Anderson, 2005). Sin embargo, la actividad rédox del hierro genera radicales libres de oxígeno, moléculas muy reactivas e inicuas para las células (Gutteridge y Halliwell, 2000). Frente a esta paradoja se requiere que los niveles de hierro celulares se ajusten, satisfaciendo las necesidades de las células y reduciendo la toxicidad asociada a su exceso. Nuestro organismo carece de un mecanismo definido

para la excreción activa de hierro, por tanto su nivel debe ser regulado especialmente en la absorción intestinal (Frazer y Anderson, 2005).

b. Absorción y Transporte de Hierro.

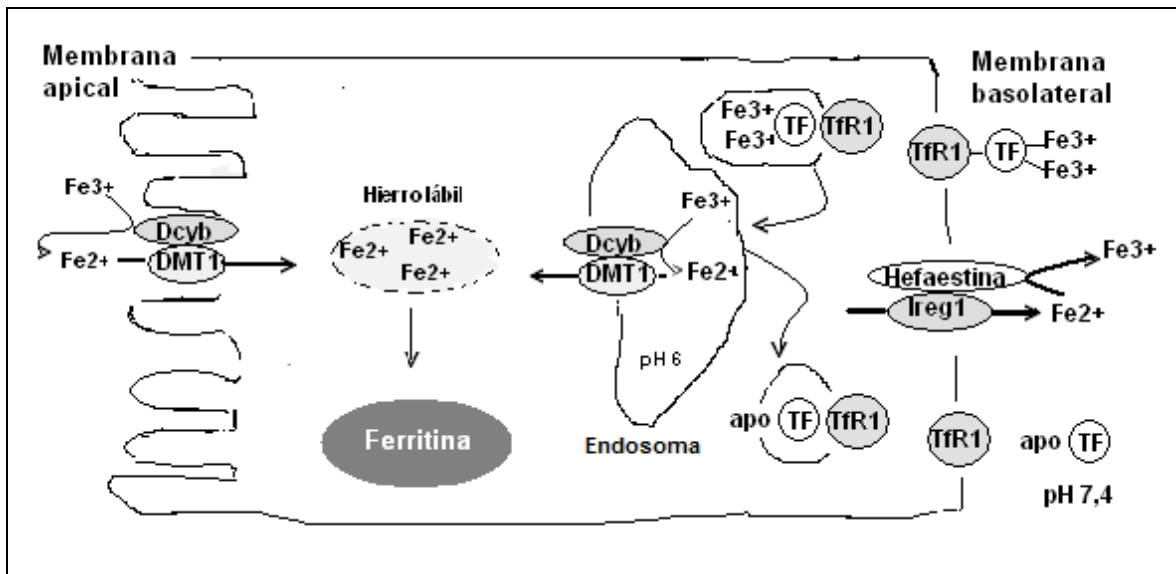
El hierro de la dieta, en la forma no hemo, es absorbido por los enterocitos de las vellosidades del duodeno y yeyuno proximal. En el lumen del intestino el hierro se encuentra en su forma férrica. Antes de ingresar al enterocito este hierro es reducido a  $Fe^{2+}$  por Dcytb, una reductasa férrica localizada en la membrana plasmática de la zona apical (Mckie *et al.*, 2001). El hierro en su forma ferrosa es transportado al interior del enterocito por un transportador de metales divalentes (DMT1) (Gunshin *et al.*, 1997). El tránsito de  $Fe^{2+}$  desde la zona apical a la basolateral no está del todo claro. Se ha sugerido que el hierro podría unirse a moléculas chaperonas para mantenerse soluble (Arredondo y Nuñez, 2005).

La salida de  $Fe^{2+}$  del enterocito es a través de su membrana basolateral. Este paso es mediado por la proteína transportadora de hierro, ferroportina 1 (Ireg 1), la cual también está involucrada en la exportación de hierro desde los macrófagos (Donovan *et al.*, 2005). Previo a su paso a la sangre,  $Fe^{2+}$  es oxidado a  $Fe^{3+}$  por la enzima hefaestina ferroxidasa (Frazer *et al.*, 2001).

En la sangre, el hierro requiere un vehículo para mantenerse termodinámicamente estable y a la vez cinéticamente disponible para los procesos biológicos. La proteína plasmática transferrina (Tf) cumple esta función. La Tf posee dos sitios de unión para  $\text{Fe}^{3+}$  (Aisen y Listwsky, 1980) y en el plasma circula en su forma apo, o unida a uno o a dos átomos de  $\text{Fe}^{3+}$  (Williams y Moreton, 1980).

En el enterocito y en todas las células, excepto las eritroides maduras, existe un receptor para la transferrina, TfR1. Este receptor es una glicoproteína de transmembrana que media la entrada de hierro por endocitosis de la transferrina diférrica (Tf- $\text{Fe}_2$ ). A pH ligeramente básico del fluido extracelular (~7.4) la afinidad de TfR1 por Tf- $\text{Fe}_2$  es alta (Dautry-Varsat *et al.*, 1983). El complejo formado entre TfR1 y Tf- $\text{Fe}_2$  en la membrana plasmática es endocitado por la célula. En el endosoma y por efecto del pH ácido, disminuye la afinidad de la transferrina por el hierro (Baldwin *et al.*, 1982). El hierro liberado ( $\text{Fe}^{3+}$ ) es reducido a  $\text{Fe}^{2+}$  por la reductasa férrica Dcytb de la membrana del endosoma. Este hierro ( $\text{Fe}^{2+}$ ) es transportado al citoplasma (Nuñez *et al.*, 1990), donde parte de él llega a un reservorio de hierro lábil (Epsztejn *et al.*, 1997). El exceso de hierro es almacenado por la ferritina, una proteína capaz de aceptar 4500 átomos de  $\text{Fe}^{3+}$  (Arredondo y Nuñez, 2005). Por otra parte la apo transferrina permanece unida a TfR1 en el endosoma y es

reciclada a la superficie celular. El pH básico de la sangre gatilla la disociación de TfR1 y la apo Tf (Figura 1) (Arredondo y Nuñez, 2000).



**Figura 1: Modelo de la absorción de hierro en el enterocito** (Arredondo y Nuñez, 2005).

### c. Regulación de la Absorción de Hierro.

La cantidad de hierro absorbido por los enterocitos depende de algunos factores, como las variaciones en el almacenaje de hierro en el cuerpo, los cambios en la velocidad de la eritropoiesis, la hipoxia, la inflamación y el embarazo. Como resultado se producen cambios en la expresión de los productos génicos de *DMT1*, *TFR1* y de los genes de L y H ferritina (*FTL* y *FTH*, respectivamente), entre otros. Estos cambios se controlan post transcripcionalmente por la actividad de las proteínas citoplasmáticas

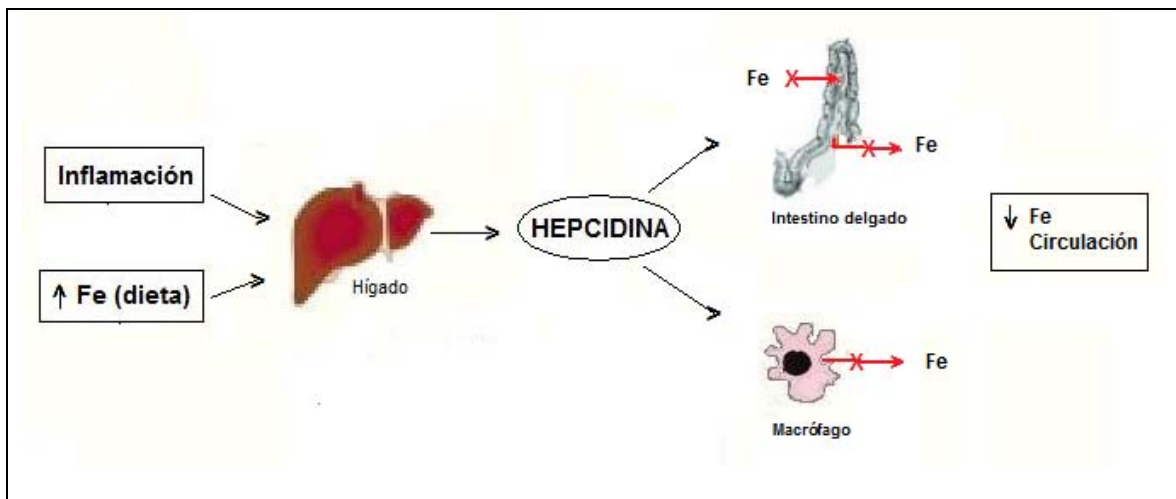
reguladoras del hierro, IRP. Las IRP se unen a los elementos de respuesta al hierro (IRE). Los IRE se encuentran en las regiones no traducidas (UTR) 5' o 3' de los RNAs de la mayoría de las proteínas que regulan la homeostasis del hierro. La interacción de las IRP con los IRE depende de la concentración celular de hierro (Rouault, 2006).

Tanto la principal isoforma de DMT1 expresada en los enterocitos (Hubert y Hentze, 2002) como TfR1, contienen un IRE en la región 3' UTR. La unión de las IRP a los IRE de estos RNAs, cuando los niveles de hierro son bajos, estabilizan al transcrito incrementando su vida media. De modo contrario, cuando se elevan los niveles de hierro, las IRP no se unen a los IRE y la zona de los IRE queda vulnerable a la acción de las endonucleasas. El RNA de la ferritina, en cambio, contiene IRE en la región 5' UTR y cuando los niveles de hierro citoplasmáticos son bajos, las IRP se unen a los IRE del RNA inhibiendo la traducción. El aumento de hierro deja a los IRE libres de las IRP permitiendo la traducción (Rouault, 2006).

La regulación sistémica de la absorción de hierro es pivotada por un pequeño péptido antimicrobiano sintetizado y secretado por el hepatocito, denominado hepcidina (Park *et al.*, 2001). La función hormonal de la hepcidina es inhibir la absorción de hierro y retener el hierro de los macrófagos y otros tipos celulares (Figura 2) (Frazer y Anderson, 2005). La producción de la



hepcidina disminuye por estímulos que incrementan la absorción de hierro (deficiencia de hierro, eritropoiesis aumentada) y aumenta en condiciones de absorción disminuida (la inflamación) (Nicolas *et al.*, 2002). Se ha demostrado en la línea celular HEK-293, que la hepcidina interactúa directamente con la ferroportina 1, conduciendo a su internalización y degradación (Nemeth *et al.*, 2004). Esto también ocurre en la membrana basolateral del enterocito y explica la inhibición de la transferencia de hierro al organismo por la reducción de la expresión de la ferroportina 1 en la membrana (Frazer y Anderson, 2005).



**Figura 2: Esquema de la función de la hepcidina en la homeostasis del hierro.** El hierro de la circulación disminuye por acción de la hepcidina. La hepcidina conduce a la internalización y degradación de la ferroportina 1 (no representada en el esquema) en enterocitos y macrófagos e inhibe el ingreso de Fe al enterocito (Frazer y Anderson, 2005).

El descubrimiento de la hepcidina y sus efectos sobre la absorción intestinal del hierro representa uno de los principales avances en el entendimiento de la homeostasis del hierro. Sin embargo, se mantiene la

pregunta cómo la expresión de la hepcidina responde a los requerimientos de hierro del organismo. Últimamente, el estudio de pacientes con enfermedades hereditarias de la carga de hierro permitió la identificación de tres moléculas fundamentales en esta vía de regulación: la Hfe, el receptor de la transferrina 2 (TfR2) y la hemojuvelina (Hjv) (Frazer y Anderson, 2005).

Hfe es una glicoproteína de transmembrana tipo MHC clase I no presentadora de antígenos (Feder *et al.*, 1996). Esta proteína se expresa en los hepatocitos (Zhang *et al.*, 2004) y en las células de la cripta duodenal (Griffiths y Cox, 2003). Hfe está alterada en la HH y los pacientes que la presentan tienen la absorción de hierro y el nivel de su almacenaje elevados. Se ha reportado que las variantes de la proteína Hfe conducen a una disminución inadecuada de los niveles de hepcidina tanto en humanos como en ratones, sugiriendo que la Hfe está involucrada en la regulación de la expresión de la hepcidina. La proteína Hfe es altamente expresada en los hepatocitos y se sugiere que es en estas células donde ejerce su efecto sobre la hepcidina (Bridle *et al.*, 2003).

TfR2, una proteína homóloga a TfR1 (Kawabata *et al.*, 1999), es altamente expresada en los hepatocitos (Fleming *et al.*, 2000) células hematopoyéticas y en células de la cripta duodenal (Griffiths y Cox, 2003). La afinidad de TfR2 por Tf - Fe<sub>2</sub> es 25 a 30 veces menor que la afinidad de TfR1 (West *et al.*, 2000). Algunas de las variantes del gen *TFR2* se relacionan con

una disminución en los niveles de hepcidina y una sobrecarga del hierro con signos clínicos similares a la hemocromatosis asociada al gen *HFE* (Camaschella *et al.*, 2000). Esto sugiere que Hfe y TfR2 son parte de la misma ruta reguladora (Nemeth *et al.*, 2005).

Aún no se conoce a cabalidad cómo estas moléculas monitorean los requerimientos de hierro corporal y cómo se regula directamente la expresión de la hepcidina. A través de alguna ruta de regulación los hepatocitos detectan la demanda de hierro del organismo. Algunos estudios realizados en ratas, demostraron una estrecha correlación entre los niveles de Tf-Fe<sub>2</sub> y la expresión de RNAm de hepcidina hepática. El nivel de Tf-Fe<sub>2</sub> en la sangre es un buen indicador de la demanda de hierro, porque la proteína es preferentemente tomada por las células que requieren hierro. Si la demanda de hierro aumenta los niveles de Tf-Fe<sub>2</sub> decrecen y viceversa (Frazer y Anderson, 2005).

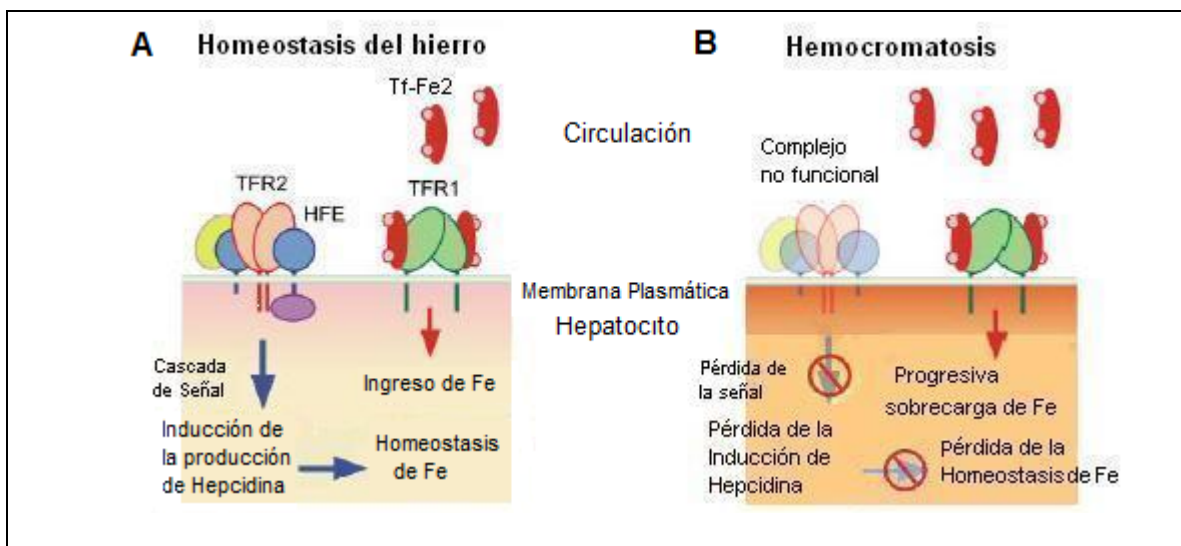
Frazer y Anderson (2003) han propuesto un mecanismo de regulación de la expresión de la hepcidina en el hepatocito. La proteína Hfe y la Tf-Fe<sub>2</sub> compiten por interaccionar con los sitios de unión de TfR1. Así la Tf-Fe<sub>2</sub> podría desplazar a Hfe de la unión con TfR1, de manera que altos niveles de Tf-Fe<sub>2</sub> conducirían a un incremento en la cantidad de Hfe libre en la superficie celular. Este Hfe libre sería capaz de estimular una señal de transducción para aumentar la expresión del gen de la hepcidina (*HAMP*) (Frazer y Anderson,

2003). La alta afinidad que se ha encontrado entre las proteínas Hfe y TfR1 sugiere que el complejo formado por ambas podría ser importante para la regulación de la homeostasis del hierro. Por otra parte, la proteína TfR2 jugaría un rol similar a Hfe en la regulación de la expresión génica de *HAMP*, en respuesta a la Tf-Fe<sub>2</sub> circulante. Existe evidencia que la proteína TfR2 se estabiliza por la unión de Tf-Fe<sub>2</sub> (Johnson y Enns, 2004), de esta forma si TfR2 produce una señal que incrementa la expresión génica de *HAMP*, su estabilización por Tf-Fe<sub>2</sub> podría mantenerla. La disminución de Tf-Fe<sub>2</sub> disminuiría esta señal reduciendo la expresión de la hepcidina e incrementando la absorción de hierro (Frazer y Anderson, 2005).

En algunos experimentos realizados *in vitro* no se detectó interacción entre las formas solubles de TfR2 y de Hfe (West *et al.*, 2000). Esto podría ser un indicio de la existencia de dos rutas paralelas en la regulación de la expresión de la hepcidina, una que involucra a Hfe y la otra a TfR2 (Frazer y Anderson, 2005).

Goswami y Andrews (2006) han propuesto otro mecanismo de regulación. Sus estudios realizados en ratones demostraron que Hfe y TfR2 interactúan en la superficie celular. Proponen que en un estado basal de saturación de la transferrina o en condiciones de bajo hierro sérico, TfR1 con Hfe existen como un complejo en la membrana plasmática. El aumento en los

niveles séricos de Tf-Fe<sub>2</sub> provocaría el desplazamiento de Hfe del complejo Hfe-TfR1. Además se elevaría la expresión de TfR2 por estabilización de su RNAm, concomitantemente con la reducción de la expresión de TfR1 en los hepatocitos (Robb y Wessling-Resnick, 2004). De esta manera la formación del complejo Hfe-TfR2 es favorecido por sobre el complejo Hfe-TfR1. La proteína Hfe actuaría como un sensor del estatus de hierro en el organismo y el complejo Hfe-TfR2 como un efector de la transducción de señal que induciría la expresión del gen *HAMP*. En la hemocromatosis, el complejo formado por Hfe y TfR2 se encontraría alterado y por consiguiente afectaría la inducción del gen *HAMP* (Figura 3) (Goswami y Andrews, 2006).



**Figura 3: Mecanismo de regulación de la absorción de hierro en el hepatocito.** A en la homeostasis y B en la hemocromatosis. (Goswami y Andrews, 2006).

Por otra parte, HJV es una proteína que pertenece a la familia de las glicosilfosfatidilinositol ancladas (RGM) (Niederkofer *et al.*, 2004). HJV se expresa en el hígado, particularmente en los hepatocitos de la región periportal. La función de la proteína HJV en el mecanismo de regulación aún no está dilucidada. Las evidencias apuntan a que HJV es un componente esencial de la regulación de la homeostasis del hierro. En ratones mutantes HJV <sup>-/-</sup> la producción de hepcidina, en respuesta al hierro de la dieta, se encuentra disminuida. Esto resulta en una severa sobrecarga de hierro (Niederkofer *et al.*, 2005). En humanos, cuando HJV está mutada conduce a una sobrecarga de hierro rápida y severa, denominada hemocromatosis juvenil (HJ). Los pacientes con HJ no producen niveles perceptibles de hepcidina a pesar de la alta carga de hierro. Se ha propuesto que HJV actuaría como un sensor del hierro proveniente especialmente de la dieta, en una ruta de regulación paralela a TfR2 y Hfe. De esta manera HJV estaría relacionada con una señal río abajo para la inducción del gen *HAMP* (Niederkofer *et al.*, 2005).

## **2. Aspecto Clínico de la Hemocromatosis Hereditaria.**

La hemocromatosis hereditaria es una patología del metabolismo del hierro, se caracteriza por un progresivo incremento de los niveles plasmáticos de hierro, que puede conllevar a una sobrecarga de este elemento principalmente en el parénquima hepático. El término hemocromatosis fue concebido por Von Recklinghausen (1889), para describir la asociación entre el anormal depósito de

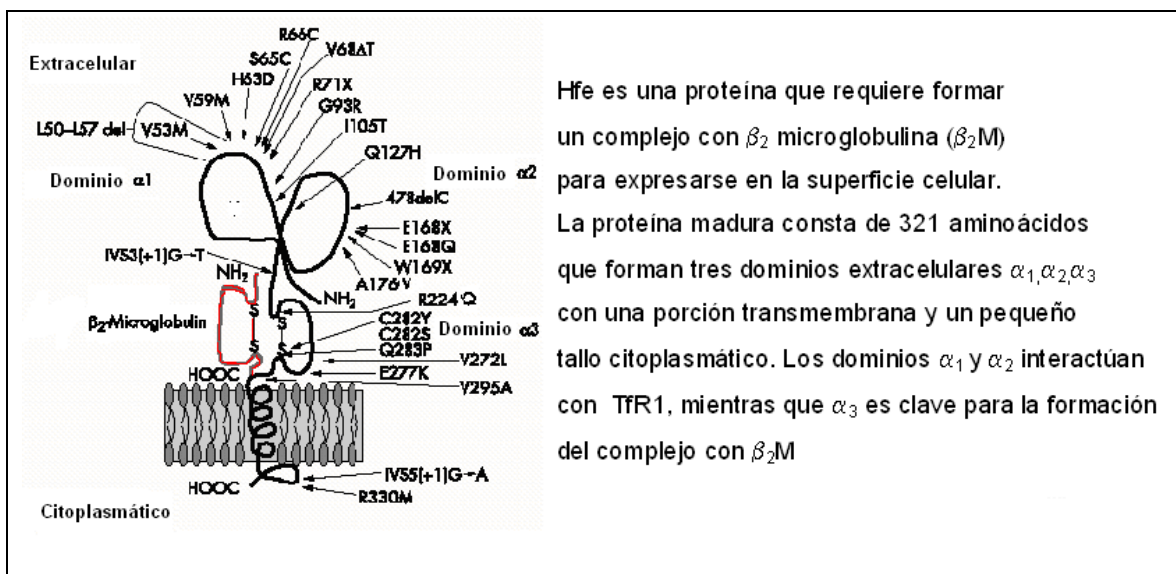
hierro en los tejidos y el síndrome clínico de cirrosis, diabetes mellitus y pigmentación de la piel, reportada por Trousseau en 1865.

La hemocromatosis hereditaria se expresa preponderantemente en los hombres y puede presentarse en estos después de los 35 años. En cambio, en el sexo femenino se presenta después de la menopausia. La primera manifestación fenotípica de la HH es la sobrecarga de Fe. Esta se observa por una elevación sostenida del porcentaje de saturación de la transferrina (> 45 %) y de la ferritina plasmática (> 1000 µg/L), trastornos que preceden al depósito de Fe en los tejidos. La prueba definitiva para el diagnóstico de la enfermedad es la biopsia hepática acompañada de la cuantificación tisular de Fe (en µg / g de peso seco) y el cálculo del índice de hierro hepático (IHH). El IHH es el cociente entre la concentración hepática de Fe y la edad en años del paciente. En personas normales el IHH es menor a 1.1 y en el 85% a 90% de los casos con HH es mayor a 1.9 (Wolff *et al.*, 2004).

### **3. Base Genética de la Hemocromatosis Hereditaria.**

En 1935, Sheldon sugirió que la hemocromatosis podría tener una base genética. Tras sus estudios clasificó la enfermedad como “un error innato del metabolismo”. Cuarenta años más tarde se determinó que la hemocromatosis es una patología autosómica recesiva (Saddi y Feingold, 1974). Simon *et al.* (1976) reportaron el ligamiento del *locus* de la hemocromatosis con el alelo HLA-A3 del sistema MHC clase I (*HLA*). En 1996 Feder *et al.* identificaron el

gen de la hemocromatosis *HFE*, junto con dos de sus variantes: una transición en el nucleótido 845 G>A codifica para el alelo C282Y y una transversión en el nucleótido 187 C>G codifica para el alelo H63D. Con posterioridad se han descrito otras variantes para el gen *HFE* (Figura 4) (Robson *et al.*, 2004).



**Figura 4: Diagrama de la proteína Hfe y de las posiciones de sus variantes (Robson *et al.*, 2004).**

Cuando existe el alelo C282Y desaparece el puente disulfuro del dominio  $\alpha_3$  de Hfe impidiendo la asociación normal con  $\beta_2M$ , de esta forma se reduce la expresión de la proteína en la superficie celular (ver Figura 4) (Feder *et al.*, 1997, Waheed *et al.*, 1997). El residuo involucrado en la variante H63D se localiza en un *loop* dentro del dominio  $\alpha_1$  de Hfe. Esta mutación puede alterar la estructura de la proteína localmente, por un reordenamiento del *loop*, evitando la yuxtaposición del aspartato sustituto con el aspartato de la posición 95, un



residuo con el cual la histidina 63 interactúa normalmente (Waheed *et al.*, 1997).

La interacción normal de Hfe con TfR1 reduce la afinidad de este receptor por la Tf-Fe<sub>2</sub>. La presencia de la variante C282Y implica la disminución de la expresión de Hfe en la superficie celular eliminando la interacción entre Hfe y TfR1. De esta manera, disminuye la señal involucrada en la inducción del gen *HAMP*. Aunque la variante H63D altera la capacidad de Hfe para reducir la afinidad de TfR1 por Tf-Fe<sub>2</sub>, la inducción de *HAMP* no es completamente afectada (Waheed *et al.*, 1997).

Feder *et al.* (1996) reportaron que más del 80% de los pacientes que presentan HH son homocigotos para la variante C282Y y entre el 4 y 7% son heterocigotos compuestos C282Y/H63D. Este alto porcentaje es observado principalmente en las poblaciones del norte de Europa, donde la frecuencia alélica de C282Y alcanza un 14% en la población irlandesa (Ryan *et al.*, 1998). La frecuencia de la variante C282Y decrece desde el norte al sur de Europa (Merryweather-Clarke *et al.*, 2000). En el sur de Europa, una gran proporción (35-45%) de individuos con fenotipo HH no presentan el genotipo C282Y/C282Y ni C282Y/H63D (Camaschella *et al.*, 2000). Esta dicotomía ha conducido a pensar que la penetrancia incompleta y el fenotipo variable de la HH están relacionados con la existencia de modificadores genéticos (Beutler, 2003).

Algunas pistas han surgido de las recientes investigaciones en pacientes con hemocromatosis y genotipo C282Y/wt. Se ha encontrado que algunos de estos pacientes son heterocigotos para algún alelo del gen *HAMP* (Biasiotto *et al.*, 2003, Merryweather-Clarke *et al.*, 2003). La variante Met50del IVS2+1(-G) del gen *HAMP* se relaciona con un cuadro severo de sobrecarga de hierro. Consiste en la delección de 4 nucleótidos ATGG en el terminal 3' del exón 2 la cual remueve un dinucleótido GT del sitio de consenso para el procesamiento creando uno nuevo sitio de procesamiento y conduciendo a dos marcos de lectura abiertos en el exón 3 (Merryweather-Clarke *et al.*, 2003). El exón 3 del gen *HAMP* codifica completamente al péptido maduro de hepcidina (Pigeon *et al.*, 2001). El genotipo Met50del IVS2+1(-G)/wt, C282Y/wt resulta en hemocromatosis juvenil. Tales pacientes presumiblemente tienen la mitad de los niveles de proteína Hfe y hepcidina funcional (Merryweather-Clarke *et al.*, 2003).

Se ha reportado otra variante del gen *HAMP*, G71D. Los dobles heterocigotos para C282Y del gen *HFE* y G71D del gen *HAMP* exhiben un fenotipo de sobrecarga de hierro suave, semejante a la hemocromatosis asociada al gen *HFE* (Biasiotto *et al.*, 2003, Merryweather-Clarke *et al.*, 2003, Jacolot *et al.*, 2004). Por lo tanto, el fenotipo clínico de HH de heterocigotos y homocigotos para C282Y puede ser modificado por la presencia de las variantes del gen *HAMP* (Biasiotto *et al.*, 2003).

#### **4. Hipótesis.**

Se ha observado en un grupo de pacientes chilenos con fenotipo clínico de HH, que un alto porcentaje no presentan el alelo C282Y ni H63D del gen *HFE*. Esta observación ha conducido a la hipótesis que:

“algunos pacientes chilenos con fenotipo clínico de HH podrían presentar otros alelos no usuales del gen *HFE* y del gen *HAMP*”.

#### **5. Objetivos.**

##### Objetivo General.

Pesquisar nuevas variantes genéticas en los genes *HFE* y *HAMP* en pacientes chilenos que presentan fenotipo clínico de HH.

##### Objetivos Específicos.

-. Tamizar la presencia de algunas variantes no usuales en los exones 2, 3 y 4 del gen *HFE*, 2 y 3 del gen *HAMP* incluyendo 40 a 80 pares de base (pb) de los intrones adyacentes a cada exón señalado. Para lograr este objetivo se utilizan las técnicas de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) y SSCP (*Single Strand Conformation Polymorphism*).

- Identificar los alelos correspondientes a las variaciones detectadas por SSCP, mediante las técnicas de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) y secuenciación automatizada.
- Asignar el genotipo identificado a cada paciente en estudio.

Cabe señalar que el gen *HFE* se encuentra en el cromosoma 6 y está constituido por seis exones que codifican para la proteína madura. El mayor porcentaje de variantes descritas a la fecha para este gen se concentran en los exones 2, 3 y 4. En tanto el gen *HAMP* se encuentra en el cromosoma 19 y está constituido por tres exones. El exón 3 de este gen codifica al péptido maduro de hepcidina (Biasiotto *et al.*, 2003).

## MATERIALES Y METODOLOGÍA

### 1. Lista de Reactivos.

**Tabla 1:** Reactivos para biología molecular.

Reactivo	Marca	Reactivo	Marca
Agua desionizada		Enzima de restricción Bcl I	NEB
dNTPs 10 mM	NEB	Enzima de restricción Rsa I	NEB
DNA polimerasa Taq	NEB	Tampón 10 X para la enzima Bcl I	NEB
100 pb DNA <i>ladder</i>	NEB	Tampón 10 X para la enzima Rsa I	NEB
Enzima proteinasa K	SIGMA	Tampón de PCR 10 X	NEB

NEB: New England Biolabs.

**Tabla 2:** Reactivos generales.

Reactivo	Marca	Reactivo	Marca
Ácido acético glacial	Vetec	formaldehído	Vetec
Ácido bórico	Vetec	Formamida	Vetec
ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)	Vetec	Glicerol	Sigma
Ácido nítrico	Vetec	Metilbisacrilamida	Vetec
Acrilamida	Vetec	Nitrato de plata	J.T.Baker
Agarosa	Fermelo	Persulfato de amonio	Merck
Azul de bromofenol	Sigma	Sacarosa	Merck
Bromuro de etidio	Sigma	Sodio dodecil sulfato (SDS)	Vetec
Carbonato de sodio	Merck	N', N',N',N'- tetrametilenetilendiamina	Vetec
Cloruro de magnesio	Sigma	TEMED	Vetec
Cloruro de sodio	Scharlau	Tris	Vetec
Etanol	Vetec	Tritón X-100	Sigma
		Xilen cianol	Sigma

## **2. Procedimientos.**

### **a. Pacientes.**

El estudio se realizó en 19 pacientes, 10 hombres y 9 mujeres, que presentan signos clínicos de HH. Estos pacientes fueron diagnosticados por el equipo médico del Dr. Humberto Reyes del Hospital Salvador. Las muestras de sangre de los 19 pacientes se obtuvieron después del consentimiento informado, para realizar un estudio genético de las variantes H63D y C282Y del gen *HFE*, en el Laboratorio de Epidemiología Genética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

### **b. Extracción de DNA.**

La extracción de DNA de las muestras sanguíneas se efectuó de acuerdo al método de Miller *et al.* (1988): A 5 ml de muestra sanguínea se agrega solución A (ver Tabla 3) hasta un volumen final de 35 ml. Se mezcla y se deja en hielo por 30 minutos. Se centrifuga (Centrífuga Kubota 5100) por 15 minutos a 1800 g. Luego se elimina el sobrenadante y se resuspende el precipitado con solución A hasta 35 ml, se coloca en hielo por 20 minutos. Se centrifuga por 15 minutos a 1800 g. Posteriormente se elimina el sobrenadante y se resuspende el precipitado con 1,5 ml de solución B (ver Tabla 3). Se agrega 50 µl de SDS 20% y 300 µl de solución de proteinasa K (2 mg/ml en SDS al 1%). Se incuba a 37 °C por toda la noche agitando ocasionalmente durante la primera hora en el baño.

Se agrega 0,5 ml de NaCl saturado (~ 5 M) y se agita vigorosamente durante 15 segundos. Se centrifuga por 15 minutos a 1800 g. Después se transfiere el sobrenadante a un nuevo tubo de 15 ml evitando remover las proteínas precipitadas. Al sobrenadante se agrega 2 volúmenes de etanol 95% (v/v) y se invierte varias veces para lograr que precipite el DNA. El DNA precipitado se centrifuga por 5 minutos a 1800 g. Se elimina el sobrenadante y el DNA se lava de con etanol 70% (v/v). Se centrifuga y se elimina el sobrenadante. El precipitado final se deja secar al aire. Una vez seco, el precipitado se resuspende en 300 µl de solución TE (Tabla 3).

**Tabla 3:** Soluciones para la extracción de DNA.

<b>Solución A</b>		<b>Solución B</b>		<b>TE</b>	
Sacarosa	0,32 M	Tris	10 mM pH 7,5	Tris	10 mM pH 8
Tris	10 mM pH 7,5	NaCl	0,4 M	EDTA	0,1 mM pH 8
MgCl <sub>2</sub>	5 mM	EDTA	2 mM pH 8		
Triton X-100	1%				

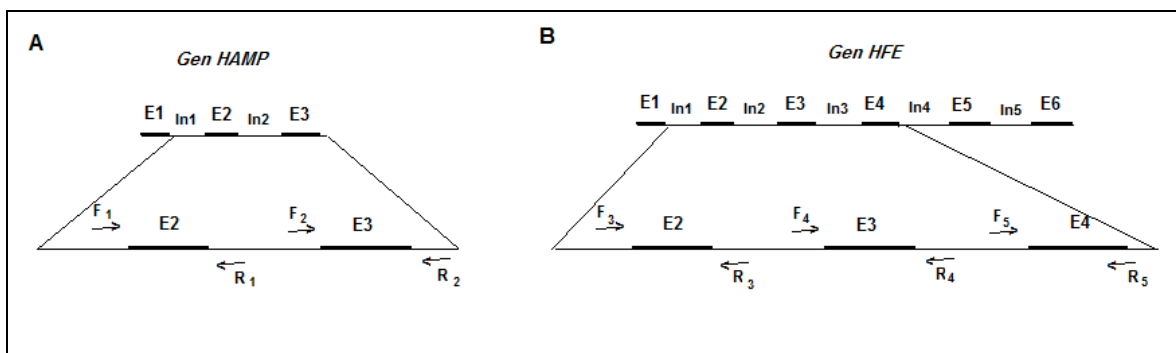
c. Amplificación de los exones 2, 3 del gen *HAMP* y de los exones 2, 3, 4 del gen *HFE* mediante PCR.

Para amplificar los exones 2, 3 del gen *HAMP* y de los exones 2, 3, 4 del gen *HFE* se utiliza la técnica PCR. Cada reacción de PCR se realiza en 25

μl de volumen total que contiene 100 ηg de los partidores definidos para cada exón y zonas adyacentes (Tabla 4 y Figura 5), tampón de PCR 1 X, 200 μM de cada dNTP, 50 ηg de DNA y 0,5 U de DNA polimerasa Taq. Las condiciones de la PCR se detallan en la tabla 5.

**Tabla 4:** Secuencias de los partidores usados para las PCRs.

Gen	Exón	Partidor 5'→3'	Amplificado (pb)	Referencia	Sintetizado en:
<i>HAMP</i>	2	F <sub>1</sub> : CAGTCTCAGAGGTCCACT R <sub>1</sub> : AATGTGAGCAGGGACCC	192	Roetto <i>et al.</i> , 2004	GENYTEC
<i>HAMP</i>	3	F <sub>2</sub> : CAGTGATGCCTTTCCTAGC R <sub>2</sub> : AAGGCAGGGTCAGGACAA	352	Roetto <i>et al.</i> , 2004.	FERMELO
<i>HFE</i>	2	F <sub>3</sub> : ACTGGTTAAGGCCTGTTGC R <sub>3</sub> : GCCACATCTGGCTTCAAATT	208	Lynas, 1997	FERMELO
<i>HFE</i>	3	F <sub>4</sub> : GGACCTATTCTTTGGTTGCA R <sub>4</sub> : TCCACTCTGCCACTAGAGTA	371	Biasiotto <i>et al.</i> , 2003	GENYTEC
<i>HFE</i>	4	F <sub>5</sub> : TGGCAAGGGTAAACAGATCC R <sub>5</sub> : CTCAGGCACTCCTCTCAACC	390	Lynas, 1997	FERMELO



**Figura 5: Esquema de los genes *HAMP* y *HFE*.** A-. Exones (E) e intrones (In) del gen *HAMP*, la zona aumentada corresponde a los exones 2 y 3 del gen *HAMP* y a los intrones adyacentes. B-. Exones (E) e intrones (In) del gen *HFE*, la zona en aumento corresponde a los exones 2, 3 y 4 del gen *HFE* y a los intrones adyacentes. En A y en B están representados los partidores utilizados para las PCRs de la tabla 4: F partidor *Forward* y R partidor *Reverse*.



**Tabla 5:** Condiciones para las PCRs.

Gen / Exón	Ciclos	Denaturación °C (tiempo)	Alineamiento °C (tiempo)	Extensión °C (tiempo)	Referencia
<i>HAMP</i> / 2 y 3	32	94 (30 s)	62 (30 s)	72 (45 s)	Roetto <i>et al.</i> , 2004
<i>HFE</i> / 2 y 4	35	94 (1 min.)	62 (1 min.)	72 (1 min.)	Lynas, 1997
<i>HFE</i> / 3	35	94 (30 s)	59 (45 s)	72 (45 s)	Biasiotto <i>et al.</i> , 2003

Los productos de PCR se separan mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% p/v en tampón TBE 0,5 X (Tabla 6) y se tiñen con bromuro de etidio (concentración final 0,5 µg/ml).

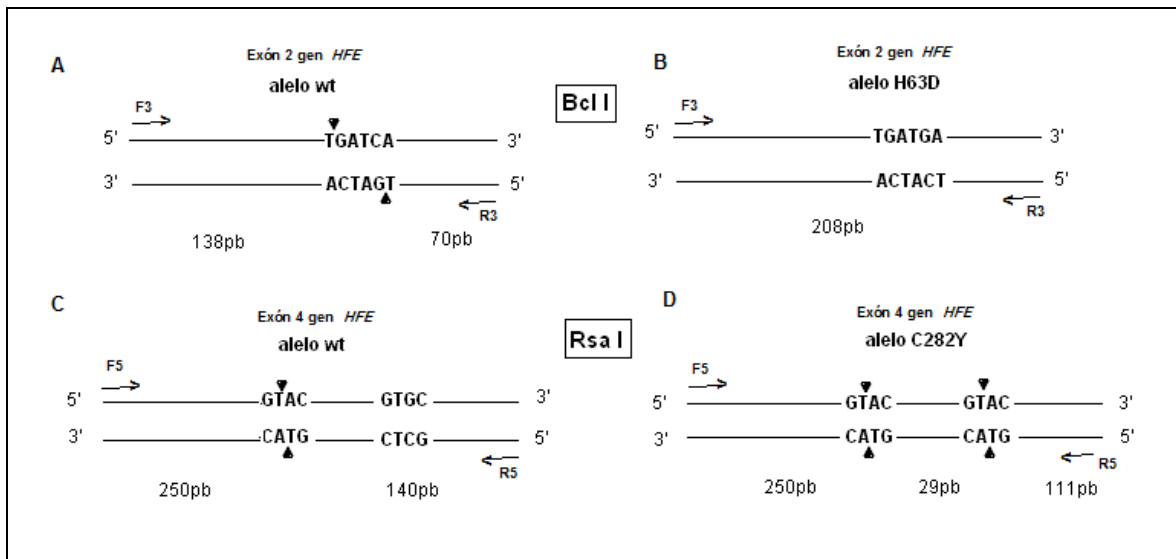
**Tabla 6:** Solución tampón TBE 5 X para la electroforesis.

Solución	Reactivos		Referencia
Tampón TBE 5 X	Tris base Ácido bórico EDTA 0,5 M (pH 8)	54 g 27,5 g 20 ml	Sambrook <i>et al.</i> , 1989

d. Tipificación de las variantes H63D y C282Y del gen *HFE* mediante RFLP.

Para identificar las variantes H63D del exón 2 y C282Y del exón 4 del gen *HFE* se utilizan las enzimas de restricción *Bcl* I y *Rsa* I, respectivamente (Figura 6). La digestión enzimática se realiza en 20 µl de reacción, que contiene H<sub>2</sub>O c.s.p, 10 µl de producto de PCR correspondiente, tampón de reacción 1 X

(NEBuffer 3 para Bcl I y NEBuffer 1 para Rsa I) y 2 U de la enzima de restricción, Bcl I o Rsa I. Se incuban por 3 horas a 37°C (Lynas, 1997). Los productos de la digestión se separan en un gel de agarosa al 3%.



**Figura 6: Diagrama del exón 2 (A y B) y exón 4 (C y D) del gen HFE y los respectivos sitios de restricción para las enzimas Bcl I y Rsa I.** Las puntas de flecha indican los sitios de corte de las enzimas Bcl I (A y B) y Rsa I (C y D). **A-** El alelo wt tiene un sitio de restricción para Bcl I que genera fragmentos de 138 y 70 pb. **B-** El alelo H63D pierde el sitio de restricción por el cambio de base C>G (fragmento de 208 pb). **C-** El alelo wt tiene un sitio de restricción para Rsa I que genera fragmentos de 250 y 140 pb. **D-** El alelo C282Y presenta dos sitios de restricción, el segundo sitio es producido por el cambio de base G>A que genera fragmentos de 250, 111 y 29 pb. En las figuras están representados los partidores utilizados para las PCRs indicados en la tabla 4. F partidor *Forward* y R partidor *Reverse*.

e. Tamiz de los exones 2, 3 y 4 del gen HFE y de los exones 2 y 3 del gen HAMP mediante SSCP.

Técnica SSCP: En condiciones apropiadas de temperatura (4°- 20°C) y en una matriz no denaturante, las hebras de DNA simple se pliegan en estructuras dependientes de sus secuencias. Bajo un campo eléctrico estas

hebras simples de DNA migran a través del gel no denaturante de acuerdo a la forma que adoptan (Sunnucks *et al.*, 2000).

Preparación del gel de poliacrilamida no denaturante para SSCP: La solución de poliacrilamida a utilizar se prepara a partir de la solución *stock* de poliacrilamida 30 % (Tabla 7). La concentración final de la solución para el gel SSCP contiene poliacrilamida 8%, glicerol 5%, tampón TBE 0,5X. Antes de verter el gel en el molde de placas de vidrio, se requiere agregar 25 µl de TEMED y 210 µl de persulfato de amonio al 10% para 30 ml de solución de poliacrilamida no denaturante (Sambrook *et al.*, 1989).

Preparación de las muestras: 2,5 µl de producto de PCR más 2,5 µl de tampón de carga para SSCP (Tabla 7) se denaturan a 95°C por 5 minutos, inmediatamente se colocan las muestras en hielo para evitar la renaturación. Las muestras se cargan en el gel y se someten a una electroforesis a 4 watts por 15 horas o bien a 15 watts por 4 horas con tampón TBE 0,5X, a temperatura ambiente (Sunnucks *et al.*, 2000).

**Tabla 7:** Soluciones para la electroforesis en poliacrilamida.

<b>Solución</b>	<b>Reactivos</b>		<b>Referencia</b>
Poliacrilamida 30 % ( <i>stock</i> )	Acrilamida	29 g	Sambrook <i>et al.</i> , 1989
	Metilenbisacrilamida	1 g	
	H <sub>2</sub> O	c.s.p 100 ml	
Tampón de carga para gel de poliacrilamida (SSCP)	Formamida	95 %	Sunnucks <i>et al.</i> , 2000
	TBE 5 X	3 %	
	Azul de bromofenol	0,1 %	
	Xilen cianol	0,1 %	
Tampón TBE 5 X (ver Tabla 6)			

c.s.p: cantidad suficiente para

Tinción y Revelado: El gel se deja en etanol 10% por 10 minutos, luego se elimina el etanol y se fija con HNO<sub>3</sub> 1% por 3 minutos. Se desecha el HNO<sub>3</sub> y se lava con agua dos veces durante 5 minutos. Se deja 20 minutos con la solución de tinción de AgNO<sub>3</sub> 0,2% p/v en oscuridad. A continuación se realiza un lavado de 1 minuto con agua, seguido se revela con la solución de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,28 M y formaldehído 0,5 % v/v. Finalmente se detiene la reacción de revelado con ácido acético 10% por 10 minutos, más un lavado con agua para eliminar restos de ácido acético (Sambrook *et al.*, 1989).

Purificación de los productos de PCR: Previo a la secuenciación es requerido purificar los productos de PCR, para eliminar de la solución dNTPs,

oligonucleotidos, DNA genómico y MgCl<sub>2</sub>. Se utilizó un sistema comercial de purificación, *Microcon® Centrifugal Filter* de Millipore.

f. Secuenciación y análisis de las secuencias en la base de datos.

Los productos de PCR que son seleccionados por SSCP se enviaron a secuenciar a GENYTEC. En esta empresa utiliza el secuenciador automatizado Applied Biosystem 310, que se basa en el método de secuenciación de Sanger. Los cromatogramas obtenidos de la secuenciación se analizan en base a la información existente en la base de datos Gen Bank del NCBI. A la información sobre las secuencias de los genes *HFE* y *HAMP* se accede con los números Z92910 y NM\_021175, respectivamente.

## RESULTADOS

### 1. Tipificación por RFLP de las variantes H63D y C282Y del gen *HFE*.

Para identificar el alelo H63D del gen *HFE*, los amplificados obtenidos para el exón 2 de este gen se digirieron con la enzima de restricción *Bcl* I. Para identificar la variante C282Y, los amplificados correspondientes al exón 4 del gen *HFE* se digirieron con la enzima de restricción *Rsa* I. En la figura 7 se observan los patrones de cortes visualizados en un gel de agarosa al 3 %.

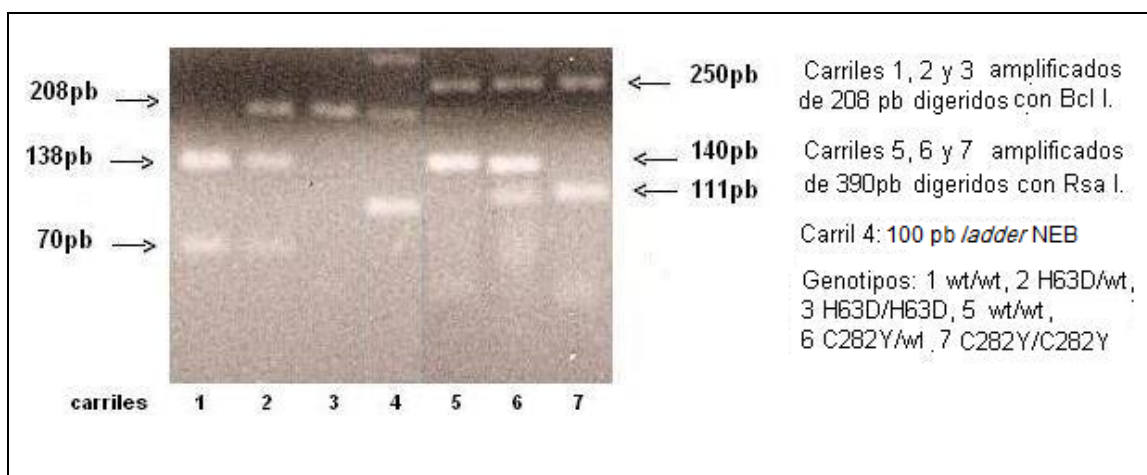


Figura 7: Identificación de los alelos H63D y C282Y del gen *HFE* mediante RFLP.

Por RFLP se identificó los siguientes genotipos: cinco heterocigotos H63D/wt (pacientes 5, 9, 11, 15 y 17), tres heterocigotos C282Y/wt (pacientes 3, 5, 7) y un homocigoto C282Y/C282Y (paciente 8). De los pacientes estudiados, 11 no presentan las variantes H63D y C282Y. En tanto el paciente 5 es heterocigoto compuesto para las dos variantes (H63D / wt, C282Y / wt). En la

tabla 8 se muestran los resultados obtenidos, se excluyen los pacientes que no presentan las variantes H63D y C282Y.

**Tabla 8:** Resultados de la Tipificación de las variantes H63D y C282Y del gen *HFE* por RFLP.

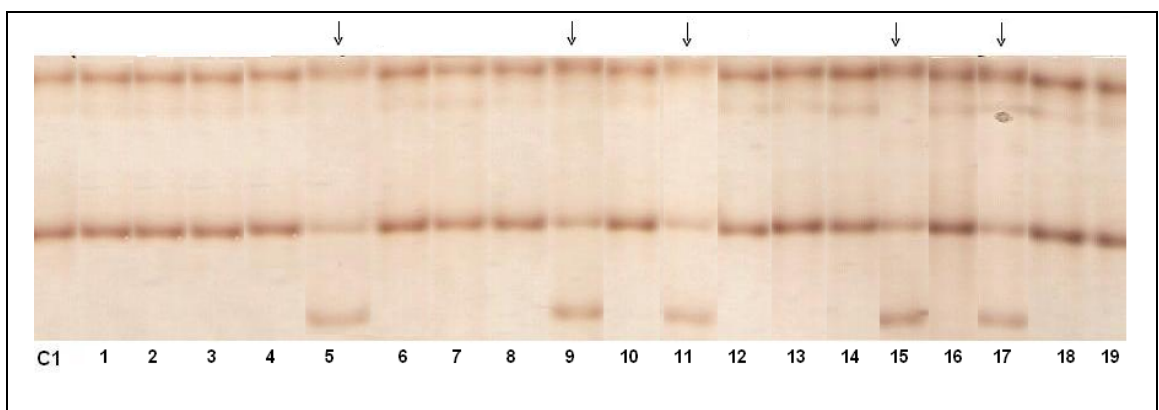
<b>Paciente (código)</b>	<b>Exón 2 gen <i>HFE</i> Variante H63D</b>	<b>Exón 4 gen <i>HFE</i> Variante C282Y</b>
3	wt / wt	C282Y / wt
5	H63D / wt	C282Y / wt
7	wt / wt	C282Y / wt
8	wt / wt	C282Y / C282Y
9	H63D / wt	wt / wt
11	H63D / wt	wt / wt
15	H63D / wt	wt / wt
17	H63D / wt	wt / wt

**2. Tamiz de los exones 2, 3 y 4 del gen *HFE* y de los exones 2 y 3 del gen *HAMP* mediante SSCP.**

Con el fin de detectar las variantes en las secuencias de DNA, los amplificados de cada uno de los exones en estudio fueron sometidos a una electroforesis en gel de poliacrilamida no denaturante, de acuerdo a la técnica SSCP (descrita en Materiales y Metodología).

a. Gen *HFE*.

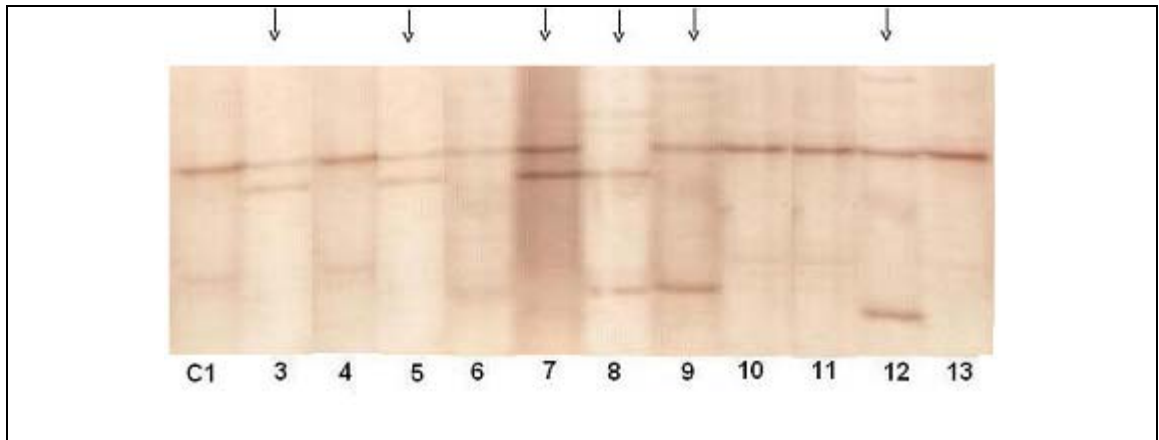
Mediante la técnica SSCP se encontró diferencias migratorias en los amplificados de los exones 2 y 4 de este gen que se observan en las figuras 8 y 9. En cambio, los amplificados del exón 3 no exhibieron diferencias en la migración respecto al control silvestre (gel no mostrado). Para el exón 2, las diferencias migratorias se observan en los amplificados 5, 9, 11, 15 y 17 coincidiendo con los tipificados H63D/wt, por RFLP. Cabe destacar que todos los heterocigotos H63D exhiben el mismo patrón migratorio (Figura 8). El resto de los amplificados del exon 2 no difieren respecto al control silvestre.



**Figura 8: Análisis del exón 2 del gen *HFE* mediante SSCP.** C1 control silvestre. De 1 a 19 corresponden a los amplificados de los pacientes con fenotipo clínico de HH. Las flechas indican las muestras con un patrón migratorio distinto al control silvestre.

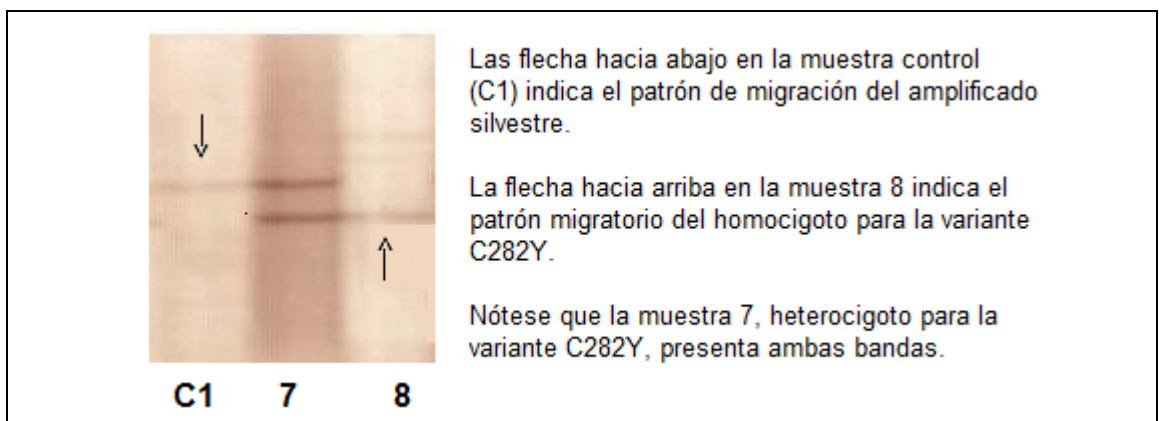
Se observan diferencias migratorias respecto al control en los amplificados del exón 4 del gen *HFE*, correspondientes a las muestras 3, 5, 7, 8, 9 y 12 (Figura 9). Las tres muestras tipificadas, por RFLP, C282Y/wt exhiben el mismo patrón migratorio.





**Figuras 9: Análisis del exón 4 del gen *HFE* mediante SSCP.** C1 control silvestre. Los amplificados 3 a 13 corresponden a los pacientes con fenotipo HH. Las flechas indican los amplificados variantes respecto al control (C1). Pacientes 1, 2 y 14-19 (no mostrados) presentan patrón migratorio idéntico al control silvestre C1.

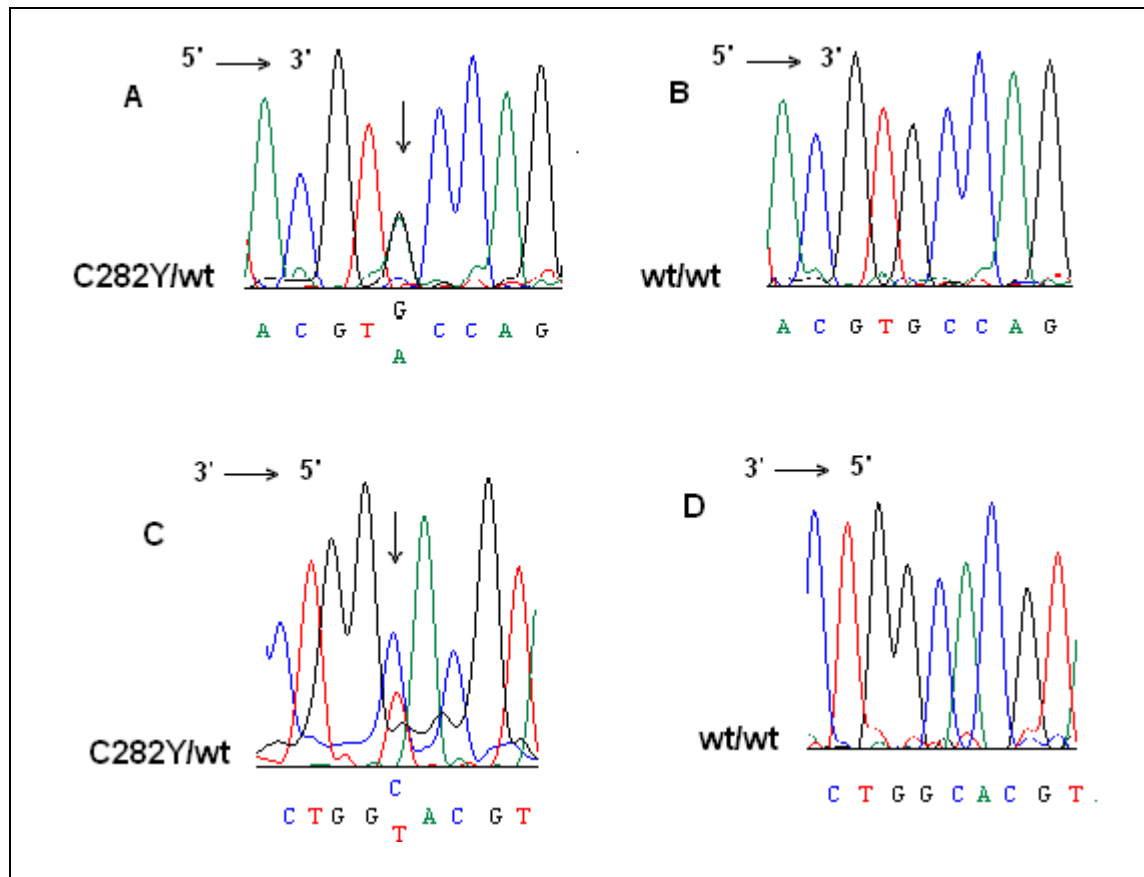
Las dos bandas de los heterocigotos coinciden con la banda silvestre (wt) del control y con la banda correspondiente al homocigoto C282Y/C282Y de la muestra 8 (Figura 10).



**Figura 10: Patrón migratorio de la variante silvestre (wt) y de la variante C282Y del gen *HFE* en gel de poliácridamida no denaturante.** C1 control homocigoto silvestre. Muestra 7 heterocigoto C282Y/wt. Muestra 8 homocigoto C282Y/C282Y.

El amplificado 7 (C2822/wt) se secuenció para tener un control de secuenciación de un heterocigoto. En el cromatograma (Figura 11) se observa la secuencia parcial del exón 4 del gen *HFE* que incluye al codón 282. El cambio de base se produce en el nucleótido 845 de la secuencia codificante. El codón silvestre es TGC y codifica para cisteína, mientras que el codón mutante TAC codifica para aspartato.

Los cromatogramas se pueden visualizar, modificar y obtener utilizando el programa de Chromas Pro disponible en el sitio *web*:  
<http://www.technelysium.com.au/ChromasPro.html>

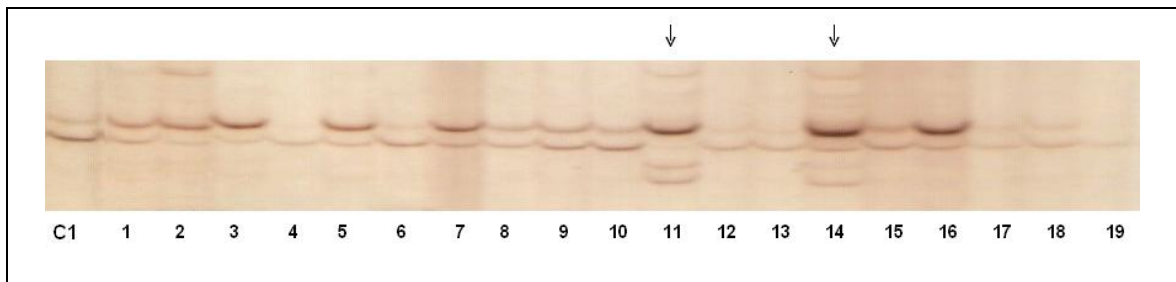


**Figura 11: Cromatograma de los controles C282Y/wt y silvestre (wt/wt) del exón 4 del gen *HFE*.** **A.-** Muestra la hebra 5 → 3' del heterocigoto C282Y/wt, la flecha indica la posición del cambio de base G>A; se observa que el *peak* de la base A se superpone con el *peak* de la base G. **B.-** Hebra 5 → 3' de la misma zona secuenciada en A para el homocigoto wt/wt. **C.-** Muestra la hebra 3' → 5' del heterocigoto C282Y, la flecha indica la posición del cambio de base C>T. **D.-** Hebra 3' → 5' de la misma zona secuenciada en C para el homocigoto wt/wt. Las secuencias mostradas en A y en C son complementarias al igual que la secuencia B con la D.

Las muestras 9 y 12 se secuenciaron para determinar si existe alguna variante. El resultado de la secuenciación fue negativo y es muy probable que las bandas disímiles observadas en estas dos muestras sean artefactos de la amplificación.

b. Gen *HAMP*.

No se observó diferencias en la migración de los 19 productos amplificados del exón 2 (gel no mostrado). Se encontró dos variantes en los amplificados del exón 3 del gen *HAMP* con respecto a la muestra control silvestre. Estos amplificados variantes corresponden a los pacientes 11 y 14 (Figura 12).



**Figura 12: Análisis del exón 3 del gen *HAMP* mediante SSCP.** Las flechas indican los amplificados variantes (11 y 14) respecto al control silvestre (C1). 1-19 amplificados de los pacientes con fenotipo HH.

Los amplificados de las muestras 11 y 14 fueron secuenciados para identificar los alelos implicados en las diferencias migratorias, visualizadas en el gel de poliacrilamida (SSCP). En este caso los resultados de la secuenciación no fueron suficientemente claros para poder asignar los alelos. Cabe la posibilidad que las diferencias migratorias de estos productos (11 y 14) se deban a algunos artefactos producidos en la amplificación.

Los resultados obtenidos por RFLP, SSCP y secuenciación se resumen a continuación (Tabla 9).

### **3. Resumen de los Resultados.**

En los geles de poliacrilamida (SSCP), de los 5 exones estudiados en total, se observó que 13 amplificados exhibieron un patrón de migración distinto al control silvestre. En 4 de estos 13 amplificados no se identificó la variante. De esta manera un 31 % de los positivos para SSCP podrían ser artefactos de la amplificación. En tanto un 69 % de los positivos para SSCP se corresponden con las variantes identificadas (Tabla 9).

Las variantes identificadas por RFLP fueron H63D y C282Y. De los pacientes estudiados un 26,3 % presentan la variante H63D y un 21,1 % presentan la variante C282Y. El paciente 5 es heterocigoto compuesto para H63D y C282Y (H63D/wt, C282Y/wt) y el paciente 8 es homocigoto para C282Y (C282Y/C282Y). El genotipo de estos dos pacientes puede explicar el fenotipo clínico de HH que ambos presentan. En cambio un 89,5 % de los pacientes estudiados no presentan variantes en los genes *HFE* y *HAMP* que permitan explicar su fenotipo clínico.

**Tabla 9:** Resumen de los Resultados.

Paciente	SSCP Gen ( exón )			Variante identificada		Gen ( exón )
	HAMP( 3 )	HFE ( 2 )	HFE ( 4 )	HAMP( 3 )	HFE ( 2 )	HFE ( 4 )
3	-	-	+			C282Y
5	-	+	+		H63D	C282Y
7	-	-	+			C282Y
8	-	-	+			C282Y
9	-	+	+		H63D	NI
11	+	+	-	NI	H63D	
12	-	-	+			NI
14	+	-	-	NI		
15	-	+	-		H63D	
17	-	+	-		H63D	

En la tabla 9 se muestran aquellos amplificados que exhibieron un patrón de migración distinto al control por SSCP (+). Se señalan los alelos identificados H63D y C282Y. NI alelos no identificados. En tanto 9 de los 19 pacientes estudiados fueron silvestres (wt) para las variantes analizadas (no mostrados en la tabla). No se encontró variantes en los 19 pacientes en los exones 3 del gen *HFE* y 2 del gen *HAMP* (datos no mostrados en la tabla).

## DISCUSIÓN

Desde los estudios de Feder *et al.* (1996) en pacientes caucásicos, la hemocromatosis hereditaria ha sido asociada principalmente al genotipo C282Y/C282Y y en menor proporción al genotipo C282Y/H63D. Algunos estudios relacionados encontraron pacientes con el fenotipo clínico de HH que no presentan la variante C282Y o H63D como describió Feder. De ciertos estudios genéticos ha surgido una dicotomía: por una parte existen individuos homocigotos para C282Y sin signos de sobrecarga de hierro y por otra, ciertos pacientes heterocigotos para las variantes del gen *HFE* manifiestan un inusual fenotipo severo de HH.

Los últimos estudios en HH han demostrado que la presencia de los alelos del gen *HFE* no es una condición suficiente para el desarrollo de la enfermedad. Al respecto estudios comparativos en ratones que pierden *Hfe* proveen evidencia sobre la existencia de otros factores contribuyentes a la sobrecarga de hierro (Fleming *et al.*, 2001). De acuerdo a Beutler (2003), uno de los aspectos potenciales para explicar la penetrancia incompleta de la HH, es precisamente la existencia de los modificadores genéticos: aquellos genes que por interacción afectan la expresión fenotípica de genes de otros *loci* (Bridges, 1919). Por ejemplo, se ha demostrado que algunas variantes de los

genes *HAMP* y *HJV* contribuyen al fenotipo heterogéneo de pacientes homocigotos y heterocigotos para C282Y (Biasiotto *et al.*, 2004).

Recientemente Babitt *et al.* (2006) comprobaron que la expresión de la hepcidina es inducida por la vía de señalización de la proteína morfogénica del hueso (BMP). Esta ruta involucra a las proteínas BMP2, BMP4 y a HJV (correceptor de las BMP). Los estudios de Milet *et al.* (2007) encontraron una asociación significativa entre los niveles de ferritina y una variante común del gen *BMP2*. Sus resultados sugieren que la expresión de la HH asociada al gen *HFE*, está ligada a la expresión alterada de la hepcidina, no solo a través de la función de Hfe sino también por medio de la modulación de la ruta BMP.

Por otra parte, algunos estudios genéticos de la HH realizados en el sur de Italia y Japón (Camaschella *et al.*, 2000, Hayashi *et al.*, 2006), demuestran que esta enfermedad está también asociada al gen *TFR2*. Al respecto las variantes no usuales del gen *TFR2* (Camaschella *et al.*, 2000 y Roetto *et al.*, 2001) se relacionan con la manifestación de la HH en pacientes que presentan alguna variante no usual del gen *HFE* (Beutler, 2003) o del gen *HAMP* (Roetto *et al.*, 2003).

Otro de los aspectos para entender el fenotipo variable de la HH está referido a los factores ambientales. La ingesta excesiva de alcohol, la existencia



de hepatitis viral, el suplemento de Fe y las transfusiones de sangre repetidas, pueden exacerban el síndrome de sobrecarga de hierro (Beutler, 2003). Por todo esto el diagnóstico de la hemocromatosis no es simple. Las pruebas bioquímicas de la saturación de la transferrina y de la concentración de la ferritina no son determinantes para el diagnóstico de la enfermedad. Al respecto se precisa el diagnóstico de la HH con el cálculo del IHH, mediante la biopsia hepática.

La biopsia es un procedimiento invasivo de alto costo y que se realiza cuando la enfermedad está manifiesta. Por esto las pruebas genéticas permitirían un diagnóstico temprano de la HH y no invasivo. Sin embargo, aún no es del todo factible el diagnóstico genético de la HH, porque los factores que definen la penetrancia exacta de las variantes implicadas en la expresión de la enfermedad, permanecen ignotos. Entonces, el desafío de los próximos estudios genéticos consistirá en entender las diferencias en la expresión de la enfermedad a través de una mejor comprensión de los factores genéticos que la modifican.

Para realizar el estudio genético de la HH fueron necesarias algunas técnicas de biología molecular como SSCP, RFLP y secuenciación. SSCP permite tamizar la presencia de variaciones en las secuencias y disminuir los costos de tipificación, sobre todo cuando se trabaja con un gran número de

muestras o genes. Los resultados obtenidos por medio de esta técnica deben realizarse en conjunto con la secuenciación y RFLP, para así determinar la variante genética. SSCP también se puede utilizar para identificar una variante conocida, esto porque las hebras de DNA de una determinada secuencia tienen el mismo patrón de migración.

La implementación de la técnica SSCP resultó relativamente simple y accesible. En poliacrilamida al 8% se logró una buena resolución, la que puede ser mejorada. Está claro que se requiere tener amplificadores específicos y con baja concentración de DNA genómico, para evitar las interferencias del DNA no deseado. Para mejorar la técnica, una posibilidad es estandarizar la concentración de glicerol que lleva la solución de gel de poliacrilamida. La sensibilidad de SSCP es afectada por el alto pH (~8) del tampón TBE. Al respecto, Kukita et al. (1997) encontraron que incluir glicerol en la poliacrilamida baja el pH de la electroforesis. Esto permite optimizar la detección cuando existen amplificadores sobre los 400 pares de base.

De acuerdo a la literatura entre un 80 y 90% de los cambios de bases son detectables con la técnica SSCP, siempre que las condiciones sean óptimas en cuanto a temperatura baja y voltaje estable. Al respecto, se desconoce la sensibilidad lograda para esta técnica en este estudio. Es posible que existan falsos negativos, debidos por una parte a que ciertas hebras de

DNA variante adopten la misma conformación que las hebras de DNA silvestres y por otra, a que la resolución obtenida con la poliacrilamida no sea óptima. Por esto, no se descarta no haber detectado la presencia de alguna variante en los exones de los genes estudiados.

Posiblemente el 31 % de los amplificadores, detectados como positivos en SSCP y de los cuales no se identificó alelo, sean falsos positivos por efecto de algún artefacto de la técnica. A diferencia de tener falsos negativos, por los cuales se pierde información, la existencia de falsos positivos, sólo implica un costo extra de tipificación. Los falsos positivos pueden disminuir con una buena resolución.

Por otra parte, se pudo constatar que los resultados de secuenciación algunas veces no son fáciles de interpretar, especialmente cuando existen heterocigotos. La muestra 7, C282Y/wt, se secuenció como control de secuenciación de un heterocigoto. En el cromatograma de la figura 11-A se visualiza la presencia de las dos bases G y A superpuestas. En cambio en el cromatograma de la figura 11-C el *peak* correspondiente al cambio de base está en la base de ruido. Muchos artefactos producidos en la secuenciación pueden ser confundidos con una mutación y viceversa. Por esto es necesario secuenciar ambas hebras y repetir la secuenciación o comprobar el resultado por medio de RFLP cuando los resultados no son claros.

Los estudios genéticos que se han realizado en pacientes chilenos con HH, han sido enfocados principalmente en la tipificación de las variantes H63D y C282Y. Teniendo en cuenta los antecedentes genéticos que han aportado las recientes investigaciones en otros genes del metabolismo del hierro, el trabajo aquí iniciado es el primer paso para elucidar la etiología genética de la HH en pacientes chilenos. Entonces, una mejor comprensión de la enfermedad permitirá optimizar su diagnóstico y tratamiento.

## CONCLUSIÓN

En este estudio en pacientes chilenos con fenotipo clínico de HH, se encontró un 26% y un 21,1% que presentan la variante H63D y C282Y del gen *HFE*, respectivamente.

No se identificaron otras variantes en los genes *HFE* y *HAMP*.

Con los resultados obtenidos no se demuestra la hipótesis. Sin embargo, restan ser estudiados algunos exones de los genes *HFE* y *HAMP*. No se descarta la identificación de variantes para estos genes en otros pacientes que exhiban el fenotipo clínico de HH.

Considerando los antecedentes expuestos y discutidos, la expresión fenotípica de la HH depende de la expresión de varios genes. Los pacientes objeto de este estudio podrían presentar variantes explicativas de su enfermedad en otros genes involucrados en el metabolismo del hierro, como *TFR2*, *HJV* entre otros.

La información que se obtenga del entorno genético de la HH contribuirá a un diagnóstico más certero en los pacientes que la padecen.

## BIBLIOGRAFÍA

- Arredondo**, M., Nuñez, T., 2005. Iron and copper metabolism. *Mol. Aspects Med.* 26, 313-327.
- Aisen**, P., Listwsky, I., 1980. Iron transport and storage proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 49, 357-393.
- Babitt**, J., Huang, F., Wrighting, D., Xia, Y., Sidis, Y., Samad, T., Campagna, J., Chung, R., Schneyer, A., Woolf, C., Andrews, N., Lin, H., 2006. Bone morphogenetic protein signaling by hemojuvelin regulates hepcidin expression. *Nat. Genet.* 38, 531–539.
- Baldwin**, D.A., De Sousa, D.M., Von Wandruszka, R.M., 1982. The effect of pH on the kinetics of iron release from human transferrin. *Biochim. Biophys. Acta.* 719, 140-146.
- Biasiotto**, G., Belloli, S., Ruggeri, G., Zanella, I., Gerardi, G., Corrado, M., Gobbi, E., Albertini, A., Arosio, P., 2003. Identification of new mutations of the *HFE*, hepcidin, and transferrin receptor 2 genes by denaturing HPLC analysis of individuals with biochemical indications of iron overload. *Clin. Chem.* 49, 1981–1988.
- Biasiotto**, G., Roetto, A., Daraio, F., Polotti, A., Gerardo, G., Girelli, D., Cremonesi, L., Arosio, P., Camaschella, C., 2004. Identification of new mutations of hepcidin and hemojuvelin in patients with *HFE* C282Y allele. *Blood Cells Mol. Dis.* 33, 338-343.
- Beutler**, E., 2003. Penetrance in hereditary hemochromatosis: the *HFE* Cys282Tyr mutation as a necessary but not sufficient cause of clinical hereditary hemochromatosis. *Blood.* 101, 3347- 3350.
- Bridges**, C., 1919. Specific modifiers of eosin eye color in *Drosophila melanogaster*. *J. Exp. Zool.* 28, 337-384.
- Bridle**, K.R., Frazer, D.M., Wilkins, S.J., Dixon, J.L., Purdie, D.M., Crawford, D.H.G., Subramaniam, V.N., Powell, L.W., Anderson, G.J., Ramm, G.A., 2003. Disrupted hepcidin regulation in HFE-associated haemochromatosis and the liver as a regulator of body iron homeostasis. *Lancet.* 361, 669–673.
- Camaschella**, C., Roetto, A., Cali, A., De Gobbi, M., Garozzo, G., Carella, M., Majorano, N., Totaro, A., Gasparini, P., 2000. The gene TFR2 is mutated in a new type of haemochromatosis mapping to 7q22. *Nat. Genet.* 25, 14 –15.
- Dautry- Varsat**, A., Ciechanover, A., Lodish, H.F., 1983. PH and the recycling of transferrin during receptor-mediated endocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80, 2258-2262.

**Donovan**, A., Lima, C., Pinkus, J., Pinkus, G., Zon, L., Robine, S., Andrews, N., 2005. The iron exporter ferroportin/Slc40a1 is essential for iron homeostasis. *Cell. Metab.* 1, 191-200.

**Epsztejn**, S., Kakhlon, O., Glickstein, H., Beuer, W., Cabantchik, I., 1997. Fluorescence analysis of the labile iron pool of mammalian cells. *Anal. Biochem.* 248, 31- 40.

**Feder**, J., Gnirke, A., Thomas, W., Tsuchihashi, Z., Ruddy, D., Basava, A., Dormishian, F., Domingo, Jr. R., Ellis, M., Fullan, A., Hinton, L., Jones, N., Kimmel, B., Kronmal, G., Lauer, P., Lee, V., Loeb, D., Mapa, F., McClelland, E., Meyer, N., Mintier, G., Moeller, N., Moore, T., Morikang, E., Prass, C., Quintana, L., Starnes, S., Schatzman, R., Brunkem K., Drayna, D., Risch, N., Bacon, B., Wolff, R., 1996. A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nat. Genet.* 13, 399–408.

**Feder**, J., Tsuchihashi, Z., Irrinki, A., Lee, V., Mapa, F., Morikang, E., Prass, C., Starnes, S., Wolff, R., Parkkila, S., Sly, W., Schatzman, R., 1997. The hemochromatosis founder mutation in HLA-H disrupts B<sub>2</sub>-microglobulin interaction and cell surface expression. *J. Biol. Chem.* 272, 14025-14028.

**Fleming**, R., Migas, M., Holden, C., Waheed, A., Britton, R., Tomatsu, S., Bacon, B., Sly, W., 2000. Transferrin receptor 2: continued expression in mouse liver in the face of iron overload and in gene in patients with iron overload. *Blood Cells Mol. Dis.* 27, 285–289.

**Fleming**, R., Holden, C., Tomatsu, S., Waheed, A., Brunt, E., Britton, R., Bacon, B., Roopenian, D. and Sly, W., 2001. Mouse strain differences determine severity of iron accumulation in Hfe knockout model of hereditary hemochromatosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98, 2707–2711.

**Frazer**, D., Vulpe, C., Mackie, A., Wilkins, S., Trinder, D., Cleghorn, G., Anderson, G., 2001. Cloning and gastrointestinal expression of rat hephaestin: relationship to other iron transport proteins. *Am. J. Gastrointest. Liver Physiol.* 281, G931-G939.

**Frazer**, D., Anderson, G., 2003. The orchestration of body iron intake: how and where do enterocytes receive their cues?. *Blood Cell Mol. Dis.* 30,288-297.

**Frazer**, D., Anderson, G., 2005. Iron Imports. Intestinal iron absorption and its regulation. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 289, G631-G635.

**Goswami**, T., Andrews, N. 2006. Hereditary hemochromatosis protein, *HFE*, interaction with transferrin receptor 2 suggests a molecular mechanism for mammalian iron sensing. *J. Biol. Chem.* 281, 28494-28498.

- Griffiths**, W., Cox, T., 2003. Co-localization of the mammalian hemochromatosis gene product (HFE) and a newly identified transferrin receptor (TfR2) in intestinal tissue and cells. *J. Histochem. Cytochem.* 51, 613-624.
- Gunshin**, H., Mackenzie, B., Berger, U., Gunshin, Y., Romero, M., Boron, W., Nussberger, S., Gollan, J., Hediger, M., 1997. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature.* 388 (6641), 482-488.
- Gutteridge**, J.M., Halliwell, B., 2000. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann. NY.Acad. Sci.* 899, 136- 147.
- Hayashi**, H., Wakusawa, S., Motonishi, S., Miyamoto, K., Okada, H., Inagaki, Y., Ikeda, T., 2006. Genetic background of primary iron overload syndromes in Japan. *Intern. Med.* 45, 1107-1111.
- Hubert**, N., Hentze, M., 2002. Previously uncharacterized isoforms of divalent metal transporter (DMT)-1: implications for regulation and cellular function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99, 12345-12350.
- Jacolot**, S., Le Gac, G., Scotet, V., Quere, I., Mura, C., Ferec, C., 2004. *HAMP* as a modifier gene that increase the phenotypic expression of the *HFE* p.C282Y homozygous genotype. *Blood.* 103, 2835– 2840.
- Johnson**, M., Enns, C., 2004. Diferric transferrin regulates transferrin receptor 2 protein stability. *Blood.* 104, 4287–4293.
- Kawabata**, H., Yang, R., Hiramata, T., Vuong, P., Kawano, S., Gombart, A., Koefer, H., 1999. Molecular cloning of transferrin receptor 2. A new member of the transferrin receptor-like family. *J. Biol. Chem.* 274, 20826– 20832.
- Kukita**, Y., Tahira, T., Sommer, S.S., Hayashi, K., 1997. SSCP analysis of long DNA fragments in low pH gel. *Hum. Mut.* 10, 400–4007.
- Lynas**, C., 1997. A cheaper and more rapid polymerase Chain reaction-restriction fragment length polymorphism method for detection of the HLA-H gene mutations occurring in hereditary hemochromatosis. *Blood.* 90, 4235– 4236.
- Mckie**, A., Barrow, D., Latunde-Dada, G., Rolfs, A., Sager, G., Mudaly, E., Mudaly, M., Richardson, C., Barlow, D., Bomford, A., Peters, T., Raja, K., Shirali, S., Hediger, M., Farzaneh, F., Simpson, R., 2001. An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron. *Science.* 291, 1755–1759.
- Merryweather-Clarke**, A., Pointon, J., Jouanolle, A., Rochette, J., Robson, K., 2000. Geography of *HFE* C282Y and H63D mutations. *Genet. Test.* 4, 183 –198.
- Merryweather-Clarke**, A., Cadet, E., Bomford, A., Capron, D., Viprakasit, V., Miller, A., McHugh, P., Chapman, R., Pointon, J., Wilmhurst, V., Livesey, K., Tanphaichitr, V.,



Rochette, J., Robson, K., 2003. Digenic inheritance of mutations in *HAMP* and *HFE* results in different types of haemochromatosis. *Hum. Mol. Genet.* 12, 2241–2247.

**Milet**, J., Déhais, V., Bourgain, C., Jauanolle, A., Mosser, A., Perrin, M., Morcet, J., Brissot, P., David, V., Deugnier, Y., Mosser, J., 2007. Common variants in the *BMP2*, *BMP4* and *HJV* genes of the hepcidin regulation pathway modulate *HFE* hemochromatosis penetrance. *Am. J. Hum. Genet.* 81, 799-807.

**Miller**, S., Dykes, D., Polesky, H., 1988. Simple salting out procedure for extracting DNA human nucleated cells. *Nucl. Ac. Res.* 16, 1215-1216.

**Nemeth**, E., Tuttle, M.S., Powelson, J., Vaughn, M.B., Donovan, A., McVey Ward, D., Ganz, T., Kaplan, J., 2004. Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science.* 306, 2090–2093.

**Nemeth**, E., Roetto, A., Garozzo, G., Ganz, T., Camaschella, C., 2005. Hepcidin is decreased in *TFR2* hemochromatosis. *Blood.* 105, 1803–1806.

**Nicolas**, G., Chauvet, C., Viatte, L., Danan, J., Bigard, X., Devaux, I., Beaumont, C., Kahn, A., Vaulont, S., 2002. The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. *J. Clin. Invest.* 110, 1037–1044.

**Niederkofler**, V., Salie, R., Sigrist, M., Arber, S., 2004. Repulsive guidance molecule (RGM) gene function is required for neural tube closure but not retinal topography in the mouse visual system. *J. Neurosci.* 24, 808–818.

**Niederkofler**, V., Salie, R., Arber, S., 2005. Hemojuvelin is essential for dietary iron sensing, and its mutation leads to severe iron overload. *J. Clin. Invest.* 115, 2180-2186.

**Núñez**, M., Gaet, V., Watkins, J., Glass, J., 1990. Mobilization of iron from endocytic vesicles. The effects of acidification and reduction. *J. Biol. Chem.* 265, 6688-6692.

**Park**, C., Valore, E., Waring, A., Ganz, T., 2001. Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J. Biol. Chem.* 276, 7896–910.

**Pigeon**, C., Ilyin, G., Courselaud, B., Leroyer, P., Turlin, B., Brissot, P., Lore´al, O., 2001. A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. *J. Biol. Chem.* 276, 7811–7819.

**Robb**, A., Wessling-Resnick, M., 2004. Regulation of transferrin receptor 2 protein levels by transferrin. *Blood.* 104, 4294–4299.

**Robson**, K., Merryweather-Clarke, A., Cadet, E., Viprakasit, V., Zaahl, M., Ponton, J., Weatherall, D., Rochette, J., 2004. Recent advances in understanding haemochromatosis: a transition state. *J. Med. Genet.* 41, 721–730.

**Roetto**, A., Totaro, A., Piperno, A., Piga, A., Longo, F., Garozzo, G., Cali, A., De Gobbi, M., Gasparini, P., Camaschella, C., 2001. New mutations inactivating transferrin receptor 2 in hemochromatosis type 3. *Blood*. 97, 2555–2560.

**Roetto**, A., Papanikolaou, G., Politou, M., Alberti, F., Girelli, D., Christakis, J., Loukopoulos, D., Camaschella, C., 2003. Mutant antimicrobial peptide hepcidin is associated with severe juvenile hemochromatosis. *Nat. Genet.* 33, 21–22.

**Roetto**, A., Danato, F., Porporato, P., Caruso, R., Cox, T.M., Cazzota, M., Gasparini, P., Piperno, A., Camaschella, C., 2004. Screening hepcidin for mutations in juvenile hemochromatosis: identification of a new mutation (C70R). *Blood*. 103, 2407- 2409.

**Rouault**, T.A., 2006. The role of iron regulatory proteins in mammalian iron homeostasis and disease. *Nat. Chem. Biol.* 2, 406-414.

**Ryan**, E., O’Keane, C., Growe, J., 1998. Hemochromatosis in Ireland and *HFE*. *Blood Cells Mol. Dis.* 24, 428– 432.

**Saddi**, R., Feingold, J., 1974. Idiopathic haemochromatosis: an autosomal recessive disease. *Clin. Genet.* 5, 234–241.

**Sambrook**, J., Fritchs, E., Maniatis, T., 1989. *Molecular cloning a laboratory manual*. 2<sup>da</sup> Ed. USA, Cold Spring Harbor Laboratory.

**Sheldon**, J.H., 1935. *Haemochromatosis*. Oxford University Press.

**Simon**, M., Bourel, M., Fauchet, R., Genetet, B., 1976. Association of HLA-A3 and HLA-B14 antigens with idiopathic haemochromatosis. *Gut*. 17, 332-334.

**Sunnucks**, P., Wilson, A., Beheregaray, L., Zenger, K., French, J., Taylor, A., 2000. SSCP is not so difficult: the application and utility of single-stranded conformation polymorphism in evolutionary biology and molecular ecology. *Mol. Ecol.* 9, 1699-1710.

**Trosseau**, A., 1865. Glycosurie, diabète sucré. *Clin. Méd. L’Hôtel Dieu de Paris*. 2, 663-698.

**Von Recklinghausen**, F., 1889. Über hämochromatose. *Berl. Klin. Wochenschr.* 26, 925.

**Waheed**, A., Parkkila, S., Zhou, X., Tomatsu, S., Tsuchihashi, Z., Feder, J., Schatzman, R., Britton, R., Bacon B., Sly, W., 1997. Hereditary hemochromatosis: effects of C282Y and H63D mutations on association with B<sub>2</sub>-microglobulin, intracellular processing, and cell surface expression of the HFE protein in COS-7 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 94, 12384-12389.

**West**, A., Bennett, M., Sellers, V., Andrews, N., Enns, C., Bjorkman, P., 2000. Comparison of the interactions of transferrin receptor and transferrin receptor 2 with

transferrin and the hereditary hemochromatosis protein HFE. *J. Biol. Chem.* 275, 38135–38138.

**Williams**, J., Moreton, K., 1980. The distribution of iron between the metal-binding sites of transferrin in human serum. *Biochem. J.* 185, 483–488.

**Wolff**, C., Carreño, N., Armas, R., Carvallo, V., 2004. Hemocromatosis hereditaria. Complicaciones reumatológicas. *Rev. Chil. Reuma.* 20, 139-148.

**Zhang**, A., Xiong, S., Tsukamoto, H., Enns, C.A., 2004. Localization of iron metabolism-related mRNAs in rat liver indicates that HFE is expressed predominantly in hepatocytes. *Blood.* 103, 1509–1514.