

DIAGNOSTICO MOLECULAR DEL GEN HFE DE LA HEMOCROMATOSIS HEREDITARIA

MOLECULAR DIAGNOSIS OF THE HAEREDITARY HEMOCHROMATOSIS GEN (HFE)

HERENTZIAZKO HEMOKROMATOSIAREN HFE GENEAREN DIAGNOSTIKO MOLEKULARRA

A. San-Miguel, N. Alonso, B. Calvo, R. Iglesias, R. San-Miguel, FJ Martín-Gil.

Servicio de Análisis Clínicos. Hospital Universitario Rio Hortega. Valladolid. España UE.

RESUMEN

La hemocromatosis hereditaria (HH) es una enfermedad metabólica resultante de una acumulación excesiva de hierro en la sangre, el hígado, corazón y otros órganos. Está causada por mutaciones en el gen HFE. Las personas con HH llevan casi siempre dos copias de la mutación Cys282Tyr del gen HFE, o una copia de esa mutación y otra de la mutación His63Asp del mismo gen. Las personas con dos copias de la mutación His63Asp y las personas portadoras de una sola copia de cualquiera de las dos mutaciones no tienen un riesgo mayor de sufrir hemocromatosis que la población normal. Una de cada 9 personas es portadora de alguna de estas mutaciones: lleva una copia del gen normal y otra con la mutación. Las personas con la enfermedad han recibido una copia mutante de cada uno de sus dos progenitores que, frecuentemente, son individuos portadores de la mutación que no presentan hemocromatosis.

A pesar de la alta incidencia de esta enfermedad (0,3%), la mayoría de los casos permanecen sin diagnosticar. Afortunadamente, la HH está entre las pocas enfermedades que tienen un tratamiento simple y efectivo si se diagnostica tempranamente. Bajo tratamiento, la esperanza de vida del paciente es normal.

La prueba de ADN permite la detección inequívoca tanto de personas portadoras de una copia de la mutación, con riesgo de tener hijos con la enfermedad, como de personas con dos copias de la mutación que ya presenta la enfermedad o que la desarrollarán con una altísima probabilidad en el futuro.

Los objetivos del diagnóstico de HH consisten en el estudio molecular de las mutaciones del gen HFE y en el consejo genético. Se debe realizar consejo genético para informar al paciente y a la familia de la forma de herencia, las implicaciones de la enfermedad, riesgo genético. Se debe realizar la historia familiar, árbol genealógico y los test genéticos para clarificar el estado de los miembros de la familia.

Palabras clave: Hemocromatosis hereditaria, análisis de mutaciones.

Correspondencia:

Dr. A. San Miguel-Hernández

Laboratorio de Análisis Clínicos. Hospital Universitario Rio Hortega.

Avda Cardenal Torquemada s/n. 47010. Valladolid. España UE.

Correo electrónico: asanmiguel@hispavista.com

Enviado: 07/02/07 Aceptado: 21/01/08

SUMMARY

Hereditary hemochromatosis (HH), also known as iron overload disease, is an inherited disorder in which iron accumulates in blood (because too much is absorbed by the intestines), liver, heart, pancreas, pituitary gland, joints and other tissues. HH is most often caused by a faulty gene on chromosome 6 named HFE. Most of affected individuals have two copies of the Cys282Tyr mutation of the HFE gene while only a low percentage of individuals have either one or two copies of the second mutation, which is called His63Asp. The individuals having two copies of His63Asp mutation and those having a only copy of any of both mutations have not more risk for hemochromatosis than that the normal people. One of each 9 people is carrier of some of these mutations: they have a copy of the normal gene and another one of the mutation. The people with the disease have received a mutant copy of each one of their two parents who, frequently, are individual carriers of the mutation which they do not display hemochromatosis. In spite of the high incidence of this disease (0.3%), most of the cases remain without diagnose. Luckily, HH is between the few diseases that with an earlier diagnosis have a simple and effective treatment. Under treatment, the life expectancy of the patient is normal. The HH DNA test for screening of the general population lead to an unequivocal detection of either the carrying people having a copy of the mutation (with risk of having children with the disease) or the people with two copies of the mutation (those that displays the disease or that will with a highest probability develop it in the future).

Primary objectives in HH diagnosis are: to examine HFE mutations and to increase individual information on genetic risk. Genetic advice should be carried out to the patient and their family on the inheritance form, the implications of the disease and the genetic risk. Genealogical familiar history, genetic tree and genetic test should be realised to clarify the family situation.

Key words: Hereditary hemochromatosis, mutations analysis

LABURPENA

Herentziako hemokromatosia (HH) odolean, gibelean, bihotzean eta beste organo batzuetan burdin gehiegi metatzetik sortzen den gaixotasun metabolikoa da. HFE genearen mutazioek eragiten dute. HH duten pertsonak HFE genearen Cys282Tyr mutazioaren bi kopia daramatzate ia beti, baita gene beraren His63Asp mutazioaren beste bat ere. His63Asp mutazioaren bi kopia dituzten pertsonak eta bi mutazioen zeinahiren kopia bakarra duten pertsona eramaileak ez dute biztanleria normalak baino arrisku handiagoa hemokromatosia sufritzeko. 9 lagun bakoitzetik bat mutazio horietakoren baten eramailea da: gene normalaren kopia bat dute eta beste bat, mutazioduna. Gaixotasuna duten pertsonak guraso bakoitzetik kopia mutante bat jaso dute eta, sarritan, hemokromatosia ez duten mutazioaren eramaileak dira.

Gaixotasun honen intzidentzia handia izan arren (% 0,3), kasu gehienak ez dira diagnostikatzen.

Zorionez, HH goiz diagnostikatuz gero, tratamendu bakun eta eraginkorra duen gaixotasun gutxienetakoan artean dago. Tratamendu pean, gaixoaren bizi-itxaropena normala da.

ADN probak mutazioaren kopia baten eramaileak diren eta gaixotasuna garatuko duten seme-alabak izateko arriskua duten pertsonak huts egin gabe antzematen laguntzen du, baita jadanik gaixotasuna duten mutazioaren bi kopiak dituzten pertsonak edo etorkizunean probabilitate oso handiarekin garatuko dutenak ere.

HH diagnostikoaren helburuak HFE genearen mutazioen azterlan molekularrean eta aholku genetikoan oinarritzen dira. Aholku genetikoa egin behar da gaixoari eta familiari herentzia motaren, gaixotasunaren inplikazioen eta arrisku genetikoaren berri emateko. Familiaren historia, zuhaitz genealogikoa eta test genetikoak egin behar dira familiako kideen egoera argitzeko.

Gako-hitzak: Herentziako hemokromatosia, mutazioen analisisia.

INTRODUCCION

La hemocromatosis hereditaria (HH) es la enfermedad congénita de mayor frecuencia en la raza blanca. Estudios de población, basados en ensayos fenotípicos utilizando la sobrecarga férrica como marcador, muestran cómo en la población caucásica parece afectar a 1 de cada 200 a 400 individuos (1-5).

Su herencia es autosómica recesiva y está caracterizada por el incremento de los depósitos de hierro en hígado, páncreas, corazón, articulaciones y otros órganos, como consecuencia de la pérdida de la regulación de la absorción de este metal (4-7).

La evolución de la enfermedad puede ser frenada mediante sangrías periódicas, lo que justifica que se intente realizar un diagnóstico precoz, antes de que se produzca el daño irreversible (cirrosis, hepatocarcinoma, miocardiopatía, diabetes mellitus, impotencia, artritis), consiguiéndose que la esperanza de vida de estos pacientes sea equiparable a la de la población normal (8-10).

DATOS ANALITICOS DE LABORATORIO Y PREVALENCIA DE LA ENFERMEDAD

La HH es una alteración hereditaria autosómica recesiva que afecta a la absorción de hierro en el intestino. La enfermedad tiene una prevalencia de, aproximadamente, 0,3-0,5 % entre los caucásicos, y es, en consecuencia, la enfermedad hereditaria más común en Europa (1).

La incremento en la absorción de hierro hace que se deposite en diversos órganos. Esto puede, entre otros efectos, desembocar en una cirrosis hepática, diabetes mellitus, hipogonadismo y fallos cardiacos.

En 1996, las investigaciones de Feder y cols, pudieron establecer por primera vez una conexión entre las mutaciones en un gen de la hemocromatosis y la hemocromatosis hereditaria (3). El gen HFE codifica una proteína que tiene una estructura similar a la de las moléculas MHC de clase I (4). Además, dada su proximidad física a los genes del HLA, originalmente, se lo denominó como un gen HLA-H. La proteína codificada por el gen HFE interacciona con el receptor de la transferrina y está implicada en la regulación de la absorción del hierro (5).

Estos autores, descubrieron dos mutaciones puntuales que se podían encontrar repetidamente en pacientes con hemocromatosis hereditaria. La sustitución de G (guanina) por A (adenina) en la posición 845 del gen HFE origina un cambio de la cisteína (C) por tirosina (Y) en la posición del aminoácido 282 en la proteína (mutación C282Y). Una mutación en la posición 187 lleva a la sustitución de C (citosina) por G y, en consecuencia, a un cambio en la posición 63 de la proteína de una histidina (H) en ácido asparagínico (D) (mutación H63D) (3).

La evidente asociación entre la mutación C282Y y la hemocromatosis hereditaria se ha visto probada por numerosos estudios. Esta mutación aparece en heterocigosis en, aproximadamente, un 5 % de la población total (6). Más del 90 % del total de pacientes con hemocromatosis son portadores del alelo C282Y en homocigosis (1,6,7).

La asociación entre la mutación H63D y la hemocromatosis hereditaria parece mucho menos evidente. El alelo mutado está muy extendido, y aparece en homocigosis en, aproximadamente, un 20% de la población (6,8). La presencia de la mutación H63D en homocigosis, no produce una predisposición a padecer hemocromatosis hereditaria. Sin embargo, los pocos pacientes de hemocromatosis que tienen la mutación C282Y en heterocigosis, presentan muy frecuentemente la mutación H63D (1,3,7). Debido a su proximidad física en el gen HFE, nunca se ha encontrado a las dos mutaciones de manera simultánea en un solo cromosoma (6). Esto significa que los pacientes que son homocigotos por lo que respecta a la mutación C282Y son siempre negativos respecto a la mutación H63D, y viceversa (8-16).

La determinación de las mutaciones específicas en el gen HFE es un diagnóstico de gran importancia, ya que la enfermedad no reduce la esperanza de vida si se diagnostica y se trata en un estadio temprano de la enfermedad.

La terapia es la realización de sangrías con el objetivo de mantener la concentración de ferritina entre 10-20 ng/ml. El diagnóstico temprano y el tratamiento mediante sangrías con el fin de normalizar el hierro sérico antes de la presentación de los síntomas previene el desarrollo de las complicaciones de la HH (10).

Actualmente considerado el gen HFE como el gen responsable de la HH, ya que un porcentaje elevado de pacientes con hemocromatosis son homocigotos para una mutación que causa una sustitución de una cisteína por una tirosina en posición 282 (C282Y).

Se ha confirmado que esta mutación es la más prevalente en la hemocromatosis, aunque su frecuencia es distinta dependiendo de la población estudiada. La mutación (C282Y) en familias australianas de origen escocés irlandés aparece en el 100 % de los pacientes con HH y en el sur de Europa se encuentra en un 64-76 % de los pacientes que presentan sobrecarga de hierro severa (10,11,17). En el gen HFE se ha encontrado otra mutación: el cambio de una citosina por una guanina en posición 187 que conlleva a la sustitución de una histidina por ácido aspártico en posición 63 (H63D). Esta mutación aparece en población normal, pero aparece con una frecuencia más alta en pacientes con hemocromatosis, lo cual indicaría que junto a otros factores ambientales o genéticos aumentaría el riesgo para depositar el hierro.

Algunos autores en 1999 encontraron una nueva mutación 193 A T con cambio en la serina a cisteína (S65C) localizada en el exon 2 en la cercanía de H63D. Esta

forma parece que está asociada a una forma leve de HHC (5-13).

La prevalencia de la enfermedad se sitúa entre 1/200 a 1/400 individuos de la población. La frecuencia en heterocigotos es un portador entre 1/8 y 1/10 (2,7,10).

El índice de saturación de transferrina (IST), está considerado como la prueba de cribado más efectiva y de mayor rentabilidad para discriminar posibles afectados por la enfermedad. El punto de corte del IST para considerar que existe sobrecarga férrica varía desde el 45-60%, dependiendo de los autores. En todo caso, es más alto en hombres que en mujeres debido posiblemente a las pérdidas sanguíneas de la menstruación y/o embarazo, así el Colegio Americano de Patólogos (CAP), lo establece en 60% en hombres y 50% en mujeres.

En 1996, fue clonado el gen de la hemocromatosis (HFE), que está en el brazo corto del cromosoma 6, y posteriormente se han descrito dos mutaciones principales; la mutación en el aminoácido 282, en la que la cisteína es sustituida por tirosina (C282Y), y la mutación en el aminoácido 63, en el que la histidina es sustituida por aspártico (H63D).

Los homocigotos para la mutación C282Y expresan fenotipo de hemocromatosis en un porcentaje muy alto, pero que varía según la población considerada. La mayoría de homocigotos C282Y asintomáticos son mujeres premenopáusicas, mientras que para los hombres mayores de 40 años la penetrancia de la homocigosidad C282Y es del 95% para la sobrecarga de hierro. Los heterocigotos dobles, C282Y/H63D, pueden presentar algunos rasgos bioquímicos, pero muy pocas veces tienen expresión clínica, a menos que se den otros factores coadyuvantes como alcoholismo, anemia hemolítica o porfiria cutánea tarda (10).

Los homocigotos H63D pueden presentar el fenotipo de hemocromatosis, pero no está claro que esta mutación sea capaz por sí sola de dar lugar a la sobrecarga de hierro.

Hay un 20% de hemocromatosis no asociadas a los fenotipos C282Y y H63D que escaparían del diagnóstico genético, esto ayuda a comprender que la biopsia hepática sea aún hoy día el patrón de oro para el diagnóstico de la hemocromatosis, ya que posibilita la cuantificación química del hierro expresado por el índice hepático de hierro (IHH): ($\mu\text{moles de Fe/g de hígado seco}$)/edad del paciente. Un índice superior a 1,9 indica hemocromatosis. Una tercera alteración de bases que reemplaza serina por cisteína (S65C) se presenta en el 1,5% de la población europea. Aunque S65C se considera un polimorfismo benigno, un genotipo C282Y/S65C puede conferir un ligero incremento en el riesgo de enfermedad, contribuyendo a un fenotipo de enfermedad leve (16-20).

Se han detectado otras mutaciones HFE en familias individuales cuya frecuencia y efectos en la población general quedan todavía por estudiarse (10-13).

MECANISMO DE ACCIÓN DE LAS MUTACIONES

El producto proteico del gen HFE es una glicoproteína transmembrana de tipo I, con 343 residuos aminoácidos, que contiene una cadena pesada unida a la membrana con 3 dominios extracelulares. Se piensa que la HFE regula la toma de hierro por un mecanismo que implica el enlace dependiente del pH con la proteína receptora de la transferrina. De acuerdo con este mecanismo, las células adquieren hierro gracias a la transferrina que transporta dos iones hierro; ésta se une a pH 7,4 a un dímero formado por dos moléculas del receptor de transferrina que está en la membrana celular. Todo este complejo entra a la célula por endocitosis, luego se libera el hierro dentro de la célula y es transportado al citoplasma, volviendo la transferrina y su receptor a la superficie celular (6,10,12). Aunque el mecanismo molecular exacto con que actúa la HFE se discute, se piensa que la proteína HFE se une al receptor de transferrina e influencia el reparto intracelular de hierro mediado por el complejo hierro-transferrina. Hay varios modelos propuestos, pero el que parece más probable se basa en que la HFE bloquea el enlace de transferrina al receptor de transferrina y es responsable de la regulación negativa de la toma de hierro. La HFE se asocia con el receptor de transferrina en o en la proximidad del sitio de enlace, e inhibe competitivamente la unión con hierro-transferrina (10,13).

Se han estudiado, los efectos de las mutaciones C282Y y H63D en la función y estructura de la proteína HFE. La C282Y, convierte un residuo Cys en uno de Tyr, y esto evita la formación de un puente disulfuro, alterando el plegamiento de la proteína HFE. La proteína mutante no se une a la beta-2-microglobulina, lo que impide el transporte de la proteína y la expresión en la superficie de la célula; la proteína es retenida en el retículo endoplasmático y es degradada aceleradamente, produciendo como resultado final la pérdida de la función de la proteína (1314).

La mutación H63D da lugar a una proteína que se expresa en la superficie de la célula, pero con una interacción con el receptor de la transferrina distinta a la del alelo salvaje. Como resultado se deposita más hierro en las células (11).

CRITERIOS DIAGNÓSTICOS DE LA HEMOCROMATOSIS HEREDITARIA

En cuanto a los criterios diagnósticos, se consideran sugestivos de HH, en ausencia de otras causas potenciales de sobrecarga férrica, IST persistentemente incrementada (50% para mujeres premenopáusicas y 60% para hombres y mujeres posmenopáusicas) y ferritina elevada ($> 200 \mu\text{g/l}$ para mujeres premenopáusicas o $> 300 \mu\text{g/l}$ para hombres y mujeres posmenopáusicas) (8-10).

Ante un aumento de IST, la detección de las mutaciones de la hemocromatosis confirma el diagnóstico en pacientes sintomáticos y resulta básico para detectar los casos subclínicos, como cribaje, habiendo demostrado ser coste-efectivo.

Para detectar las mutaciones del HFE existen varios métodos, basados en la amplificación de la región específica del gen por PCR y posterior detección de la mutación. Los métodos más comunes usan una enzima de restricción para diferenciar los alelos (enzima que corta el alelo que contiene la mutación, pero no el de tipo salvaje), seguidos de electroforesis para diferenciar el alelo mutante del alelo salvaje, por diferencia del tamaño de los fragmentos de ácidos nucleicos (10).

La ampliación de alelos específicos es otro método usado comúnmente. En este, cebadores específicos del alelo salvaje o del mutante están diseñados para que la posición de la mutación se encuentre cercana al extremo 3' del cebador. Cada uno de estos, amplificará solamente su alelo específico. La presencia o ausencia de amplificación con los cebadores específicos identifica el genotipo (8,14).

Un tercer método utiliza para este mismo modelo de hibridación cebadores comunes para alelos mutados y salvajes, pero los que son específicos son las sondas de hibridación marcadas radiactivamente o fluorescentemente, identificando así los diferentes alelos por las distintas temperaturas de fusión en PCR a tiempo real (5-15).

RECOMENDACIONES PARA PACIENTES CON SOSPECHA DE HH

Actualmente en todas las Areas Sanitarias de todos los Hospitales de la red pública se están solicitando muchos estudios moleculares del gen HFE al año, que se derivan a otros laboratorios, con un gasto muy importante y los resultados son remitidos a las consultas solicitantes. Esta demanda está aumentando cada año, y actualmente no es posible realizar un diagnóstico de hemocromatosis sin estudio molecular. Es conveniente en aquellos enfermos que se realizan este estudio que se acompañe de consejo genético por un profesional.

Los objetivos del estudio de HC consisten en:

1. El estudio molecular de las mutaciones del gen HFE. La amplificación mediante PCR de tres regiones de DNA dentro del gen de la HFE para posteriormente identificar mediante digestiones con enzimas de restricción la presencia/ausencia de mutaciones responsables de HH.
2. Consejo genético: Se debe realizar consejo genético para informar al paciente y a la familia de la forma de herencia, las implicaciones de la enfermedad, riesgo genético. Se debe realizar la historia familiar, árbol

genealógico y los test genéticos para clarificar el estado de los miembros de la familia.

El test que se debe de realizar en una primera fase es la saturación de la transferrina. Todos los adultos con HHC tienen elevada la saturación de la transferrina (>45 %). El estudio molecular para las mutaciones C282Y, H63D y S65C se debe de utilizar como test confirmatorio. Los pacientes que no tienen estos genotipos representan un grupo heterogéneo enfermedad hepática u otros síndromes metabólicos.

La biopsia hepática estará indicada en:

- Pacientes que no tengan los genotipos de HHC y tengan saturación de la transferrina por encima de 65 %
- En los pacientes que no tienen los genotipos de la HHC, la saturación de la transferrina está entre 45-60 % y no tienen signos de enfermedad hepática.

La prueba de ADN permite la detección inequívoca tanto de personas portadoras de una copia de la mutación, con riesgo de tener hijos con la enfermedad, como de personas con dos copias de la mutación que ya presenta la enfermedad o que la desarrollarán con una altísima probabilidad en el futuro.

La idoneidad de realizar la prueba genética a toda la población en general está siendo considerada por diversas asociaciones médicas (23-25). Consideraciones a favor de la medida son el hecho de la elevada incidencia de la HH, la falta de hallazgos clínicos en el curso temprano de la misma, la falta de especificidad de estos hallazgos clínicos una vez se manifiesten, el bajo coste de la prueba genética y del tratamiento así como la eficacia de un tratamiento temprano y el elevado coste y poco éxito de un diagnóstico y tratamiento tardíos (23-27).

En cualquier caso, se recomienda la prueba de ADN cuando se dé alguna de la circunstancias siguientes (21-38):

- Un diagnóstico previo de hemocromatosis.
- Historial familiar con hemocromatosis o existencia de individuos portadores de la mutación en la familia.
- Elevación inesperada de enzimas sericas hepáticas.
- Cirrosis o carcinoma hepatocelular.
- Diabetes mellitus.
- Síntomas inespecíficos compatibles: fatiga, dolores abdominales y en la articulaciones, arritmia cardiaca, impotencia, hiperpigmentación, hipertiroidismo, hipogonadismo, hepatoplenomegalia.
- Porfiria cutánea y talasemia. Las personas con estas enfermedades que además tengan la mutación en el gen HFE pueden sufrir una sobrecarga adicional de hierro.

HEPCIDINA. LA HORMONA DEL HIERRO

La hepcidina es un péptido del tipo beta defensina, que actúa como un regulador de la homeostasis del hierro. Esta es de origen hepático y está modulada por los requerimientos de hierro del organismo, y como respuesta a estados inflamatorios o infecciosos (39-41).

Es inducida por la inflamación y la carga de hierro y suprimida por la anemia y la hipoxia. Actúa a nivel de la absorción del hierro a nivel intestinal y es muy característico de trastornos tales como la HH o las talasemias. Hasta hace poco solo existía una prueba para la determinación de la hepcidina, una prueba de inmunodot en orina. Pero recientemente, se ha publicado un nuevo método para determinar hepcidina en orina mediante un láser de espectrofotometría de absorción de masas con ionización. Se encontraron picos para las tres formas de hepcidina en orina, en especial para la hepcidina-25 el coeficiente de correlación obtenido fue de 0,9275. Este nuevo método es fácil de realizar si se dispone de la instrumentación adecuada y posiblemente permitirá estudios a mayor escala (40-42).

La acción de la hepcidina, que es un péptido que desempeña un papel clave en el metabolismo del hierro humano, en 2 variantes de la hemocromatosis hereditaria, lo que condujo a la atractiva hipótesis de que podría ser un denominador patológico común en todas las formas de este síndrome. Si bien la función de una HFE2 denominada hemojuvelina (HJV) es desconocida, los niveles de hepcidina están disminuidos en personas con mutaciones de HJV, lo que sugiere que aquella sería probablemente una moduladora de la hepcidina. Dada la gravedad fenotípica de la hemocromatosis hereditaria relacionada con una mutación en el gen HAMP que codifica para la hepcidina y para la HJV, ésta probablemente desempeña un papel importante en ese aspecto. La pérdida de la regulación mediada por la HJV puede producir síntesis aumentada de hepcidina en respuesta al aumento del hierro plasmático, lo que produce resultado similar al causado por la pérdida de hepcidina (41-42).

PROCESO DIAGNÓSTICO ASPECTOS ETICOS Y CONSEJO GENÉTICO

Técnica molecular

Consiste en los siguientes pasos:

1.- Extracción del DNA cromosómico de células sanguíneas.

Se extrae DNA de las muestras de sangre para un posterior análisis y utilizarlo como molde para la amplificación génica mediante PCR. Se realizará mediante kit comercial.

2.- Realización del análisis de las mutaciones

La metodología actual en el estudio molecular de las mutaciones del gen HFE de la hemocromatosis se puede realizar mediante:

1. De forma manual (método clásico)
2. De forma automática (equipo Light Cycler)

A continuación se expone las diferencias entre una técnica y otra:

- a) El tiempo estimado en la realización de la extracción del DNA es igual para los 2 métodos.
- b) El tiempo de los recursos humanos estimado para la realización del estudio molecular con la técnica:
 - Método clásico de PCR, digestión y obtención del resultado: 10 horas aproximadamente
 - Automática mediante el uso del Light Cycler: 1 hora.

MÉTODO MANUAL (MÉTODO CLÁSICO)

Este consiste en un ensayo de hibridación reversa en "blot" para la determinación de dos mutaciones puntuales en el gen HFE de la hemocromatosis humana.

En primer lugar, se lleva a cabo una PCR (reacción en cadena de la polimerasa) utilizando el DNA aislado a partir de sangre completa. En esta reacción, se amplifican dos fragmentos del gen HFE utilizando "primers" específicos marcados con biotina.

La caracterización de los segmentos amplificados del gen se produce mediante una reacción de hibridación con oligonucleótidos específicos de secuencia (SSOP-PCR).

El DNA amplificado se desnaturaliza, y se pone en contacto con tiras de nitrocelulosa en los pocillos de la cubeta de incubación que se proporciona. En las tiras de nitrocelulosa se encuentran las sondas de los genes tanto para el tipo nativo como para la secuencia mutada de los dos segmentos de gen analizados en el ensayo, así como varias zonas de control.

Durante la hibridación, el DNA amplificado y desnaturalizado se une a las sondas de los genes incluidas en las tiras. Los pasos de lavado altamente específicos aseguran que esta unión únicamente se conserva si la secuencia de la sonda es complementaria al 100 % con la secuencia de la amplificación. Los híbridos formados por la sonda del gen y el DNA amplificado marcado con biotina pueden revelarse entonces mediante una reacción colorimétrica proporcionada por el complejo biotina / estreptavidina / fosfatasa alcalina con el substrato NBT / BCIP

Evaluación e interpretación de los resultados

Una vez que se hayan secado, las tiras tienen que colocarse en papel blanco. La plantilla específica, en la que están señaladas las zonas de reacción, sirve de ayuda para la evaluación. Si una zona marcada se corresponde de manera exacta con la zona de reacción de la tira, se la puede considerar identificada.

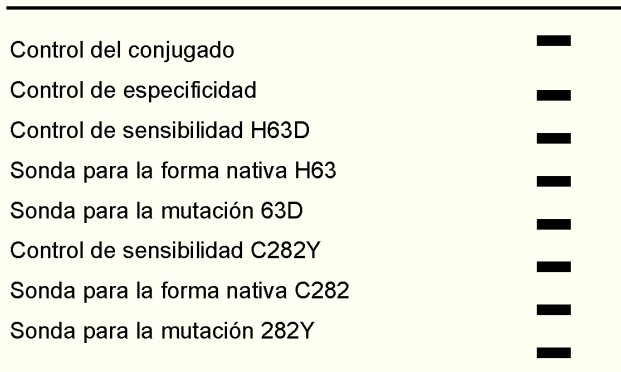


Figura 1.-Zonas de control y sondas para los genes que se encuentran en la tira de nitrocelulosa.

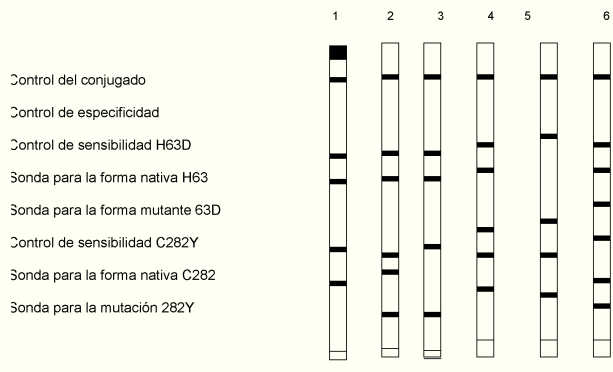


Figura 2.- Patrón de bandas para todos los genotipos posibles

Cada tira tiene una zona de control para el conjugado, una para la especificidad y dos para la sensibilidad. Las zonas de control para el conjugado y para la sensibilidad tienen que desarrollarse completamente durante el test. Si dichas zonas de control no llegan a revelarse, se va a obtener un resultado falso negativo. En tal caso, hay que repetir el test.

Si se revela la zona de control para la especificidad, se va a obtener una falsa reacción positiva. También en este caso habría que repetir el test

Las señales específicas de la sonda tan sólo se pueden considerar positivas si su intensidad es aproximadamente la misma que la del control universal.

En total, hay 8 zonas de reacción definidas y susceptibles de ser reveladas (Figura 1).

En total, hay 8 zonas de reacción definidas y susceptibles de ser reveladas.

- Control del conjugado
- Control de especificidad
- Control de sensibilidad H63D
- Sonda para la forma nativa H63
- Sonda para la mutación 63D
- Control de sensibilidad C282Y
- Sonda para la forma nativa C282
- Sonda para la mutación 282Y

El siguiente (Figura 2) muestra todas las combinaciones que son posibles:

Resultados :

Resultados (Figura 2):

1. homocigoto: H63 (forma nativa)
homocigoto: C282 (forma nativa)
2. homocigoto: H63 (forma nativa)
heterocigoto: C282 (alelo mutado) - 282Y (alelo mutado)
3. homocigoto: H63 (forma nativa)
homocigoto: 282Y (alelo mutado)
4. heterocigoto: H63 (forma nativa) - 63D (alelo mutado)
homocigoto: C282 (forma nativa)
5. homocigoto: 63D (alelo mutado)
homocigoto: C282 (forma nativa)
6. heterocigoto: H63 (forma nativa) - 63D (alelo mutado)
heterocigoto: C282 (forma nativa) - 282Y (alelo mutado)

5. homocigoto: 63D (alelo mutado)
homocigoto: C282 (forma nativa)
6. heterocigoto: H63 (forma nativa) - 63D (alelo mutado)
heterocigoto: C282 (forma nativa) - 282Y (alelo mutado)

Aspectos Eticos.

- Consentimiento informado: Se informará al paciente por escrito de la naturaleza y propósitos del siguiente protocolo. Los derechos de los pacientes estarán en todo momento protegidos por la declaración de Helsinki.

Consejo Genético

El proceso diagnóstico del paciente con sospecha de HHC se detalla siguiendo el algoritmo que se recoge en la figura 3.

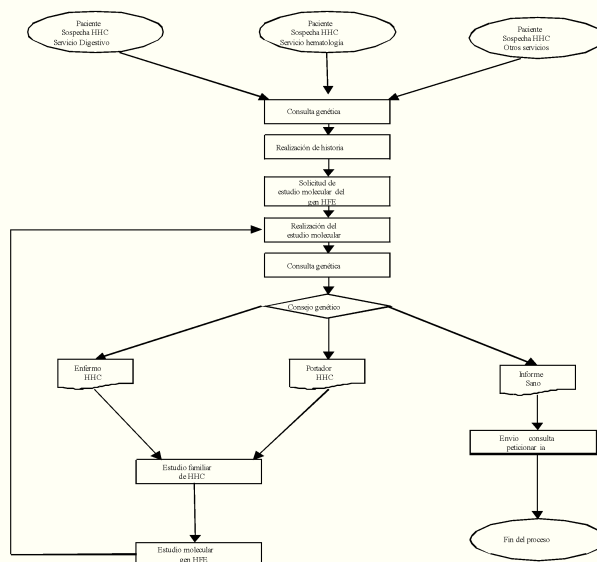


Figura 3.- Algoritmo diagnóstico de la HH.

CONCLUSIONES

La hemocromatosis hereditaria (HH) es una enfermedad hereditaria autosómica recesiva que se caracteriza por una absorción intestinal de hierro elevada y por una sintomatología clínica relacionada con el acúmulo de hierro en hígado, páncreas, corazón, piel, articulaciones y testículos. Sin terapia el desarrollo de los síntomas aparecen en hombres entre los 40 y 60 años y en mujeres después de la menopausia. Después de los 40 años es común la aparición en hombres de fibrosis hepática o cirrosis. En pacientes no tratados es común la aparición de pigmentación de la piel, diabetes mellitus, insuficiencias cardíacas o arritmias, artritis e hipogonadismo.

El diagnóstico de HHC en pacientes con clínica consiste en análisis bioquímicos (saturación de transferrina, ferritina en suero) y confirmación mediante biopsia hepática y/o diagnóstico molecular para la mutación C282Y y H63D del gen HFE (cromosoma locus 6p21). Tradicionalmente saturación de la transferrina (SAT) > de 60 % en los hombres o 50 % o más en mujeres sugieren HHC en ausencia de otras causas de elevación de saturación de la transferrina. Estudios recientes sugieren que el umbral de la SAT puede ser más sensible para detectar HHC. Concentraciones altas de ferritina en pacientes no tratados no es específico de la HH. Cerca de 87% de los pacientes con HHC son homocigotos para la mutación C282Y o heterocigotos compuestos para la mutación C282Y y H63D.

El estudio molecular de las mutaciones del gen HFE y en el consejo genético, nunca puede suplir el análisis de la utilidad de la Resonancia Magnética Nuclear como prueba para determinar la sobrecarga hepática de hierro frente a la biopsia hepática.

En el diagnóstico molecular del gen HFE de la HH, la prueba genética es coste efectiva actualmente en todos los Hospitales de nuestro país.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Merryweather-Clarke AT, Pointon JJ, Shearman JD. Global prevalence of putative haemochromatosis gene mutations *J Med Genet* 1997; 34: 275-278
- 2.- Schettler G und Greten H. *Innere Medizin Thieme Verlag Stuttgart*, 1998; 9. Auflage: 875-877
- 3.- Feder JN, Gnirke A, Thomas W. A novel MHC class 1-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis *Nat Genet*, 1996; 13: 399-408
- 4.- Lebron JA, Bennett MJ, Vaughn DE. Crystal structure of the hemochromatosis protein HFE and characterization of its interaction with transferrin receptor. *Cell*, 1998; 93: 111-123.
- 5.- Feder JN, Penny DM, Irrinki A. The hemochromatosis gene product complexes with the transferrin receptor and lowers its affinity for ligand binding. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998; 95: 1472-1477.
- 6.- Gottschalk R, Seidl C, Löffler T. HFE codon 63/282 (H63D/C282Y) dimorphism in German patients with genetic hemochromatosis *Tissue Antigens* 1998; 51: 270-275.
- 7.- Beutler E, Gelbart T, West C. Mutation analysis in hereditary hemochromatosis *Blood Cells Mol Dis* 1996; 22: 187-194.
- 8.- Burt MJ, Geroge PM, Upton JD. The significance of haemochromatosis gene mutations in the general population: implications for screening. *Gut* 1998; 43: 830-836.
- 9.- Catherine Mura, Odile Raguenees, and Claude Férec HFE Mutations Analysis in 711 Hemochromatosis probands: Evidence for S65C Implication in mild form of Hemochromatosis *Blood*, 1999; 93: 2502-2505.
- 10.- Bernard PS, Ajioka RS, Kushner JJ, Wittwer CT. Homogeneous multiplex genotyping of Hemochromatosis mutations with Fluorescent Hybridization Probes. *Am J Pathol* 1998; 153: 1055-1059.
- 11.- Carella M, D'Ambrosio L, Totaro A, et al. Mutation analysis of the HLA-H gene in Italian hemochromatosis patients. *Am J Hum Genet* 1997; 60: 828-832.
- 12.- Espinós Pérez D. Algunos comentarios sobre la hemocromatosis. *Ann Med Intern* 2000; 17: 625-627.
- 13.- Kris V Kowdley, Jonathan F tait, Robin L Bennett, Arno G Motulsky; Universiti of Washington. www.geneclinics.org
- 14.- Lyon E, Frank EL. Hereditary hemochromatosis since discovery of the HFE gene. *Clin Chem* 2001; 4: 1147-1156.
- 15.- Jouanolle AM, Gandon G, Jezequel P, et al. Hemochromatosis and HLA-H. *Nature Genet* 1996; 14:251-252.
- 16.- Morrison ED, Kowdley KV. Genetic liver disease in adults. Early recognition of the three most common causes. *Postgrad Med* 2000;107:147-152, 155, 158-9
- 17.- Jazwinska EC, Pyper WR, Burt MJ, et al. Haplotype analysis in Australian hemochromatosis patients: evidence for a predominant ancestral haplotype exclusively associated with hemochromatosis. *Am J Hum Genet* 1995; 56: 428-433.
- 18.- Sanchez M, Bruguera M, Quintero E, Barrio Y, Mazzara R, Rodes J, Oliva R. Hereditary hemochromatosis in Spain. *Genet Test* 2000; 4:171-176
- 19.- Witte DL, Crosby WH, Edwards CQ, Fairbanks VF, Mitros AA. Practice guideline development task force of College of American Pathologists. Hereditary Hemochromatosis. *Clin Chem Acta* 1996; 245: 139-200.
- 20.- Hashem B, El-Serag HG, Inadomi JM, Kowdley KV. Screening for hereditary hemochromatosis in siblings and children of affected patients. *Ann Intern Med* 2000;132: 261-9.
- 21.- Hahn JU, Steiner M, Bochnig S, Schmidt H, Schuff-Werner P, Kerner W. Evaluation of a diagnostic algorithm for hereditary hemochromatosis in 3,500 patients with diabetes. *Diabetes Care*. 2006;29:464-6..
- 22.- De Domenico I, Ward DM, Musci G, Kaplan J. Iron overload due to mutations in ferroportin. *Haematologica*. 2006; 91:92-5.
- 23.- Nisselle AE, Collins VR, Gason AA, Flouris A, Delatycki MB, Allen KJ, Aitken MA, Metcalfe SA. Educational outcomes of a workplace screening program for genetic susceptibility to hemochromatosis. *Clin Genet*. 2006;69:163-70.
- 24.- Matas M, Guix P, Castro JA, Parera M, Ramon MM, Obrador A, Picornell A. Prevalence of HFE C282Y and H63D in Jewish populations and clinical implications of H63D homozygosity. *Clin Genet*. 2006;69:155-62.
- 25.- Alexander J, Kowdley KV. Hereditary hemochromatosis: genetics, pathogenesis, and clinical management. *Ann Hepatol*. 2005;4:240-7.
- 26.- Star A, Tu E, Niemann J, Gabriel JC, Joiner CS, Valcke K. Label-free detection of DNA hybridization using carbon nanotube network field-effect transistors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:921-6.
- 27.- Beutler E. Hemochromatosis: Genetics and Pathophysiology. *Annu Rev Med*. 2006;57:331-47.
- 28.- van der A DL, Peeters PH, Grobbee DE, Roest M, Voorbij HA, van der Schouw YT. HFE genotypes and dietary heme iron: No evidence of strong gene-nutrient interaction on serum ferritin concentrations in middle-aged women. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2006;16(1):60-8.
- 29.- von Delius S, Lersch C, Schulte-Frohlinde E, Fend F, Dobritz M, Schmid RM, Eckel F. Hepatocellular carcinoma associated with hereditary hemochromatosis occurring in non-cirrhotic liver. *Z Gastroenterol*. 2006; 44(1):39-42.
- 30.- Jones R. Screening for hereditary hemochromatosis in the primary-care setting. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*. 2006;3:12-3..
- 31.- Nichols L, Dickson G, Phan PG, Kant JA. Iron binding saturation and genotypic testing for hereditary hemochromatosis in patients with liver disease. *Am J Clin Pathol*. 2006 Feb;125(2):1-5.
- 32.- Vazquez-Romero M, Boixeda-de Miquel D, Vallcorba-Gomez del Valle I, Foruny-Olcina JR, Martin de Argila C, San Roman-Cos-Gayon C.

- Hereditary hemochromatosis: phenotypic study in a Spanish population. *Med Clin (Barc)*. 2005;125(19):721-6.
- 32.- Fleming RE, Britton RS, Waheed A, Sly WS, Bacon BR. Pathophysiology of hereditary hemochromatosis. *Semin Liver Dis*. 2005;25(4):411-9.
- 33.- Ombiga J, Adams LA, Tang K, Trinder D, Olynyk JK. Screening for HFE and iron overload. *Semin Liver Dis*. 2005;25(4):402-10.
- 34.- Meeker JA, Miller SM. Hereditary hemochromatosis. *MLO Med Lab Obs*. 2005;37(10):10, 12, 14-6.
- 35.- Meier P, Schuff-Werner P, Steiner M. Hemochromatosis gene HFE Cys282Tyr mutation analysis in a cohort of Northeast German hospitalized patients supports assumption of a North to South allele frequency gradient throughout Germany. *Clin Lab*. 2005; 51:539-43.
- 36.- Vazquez Romero M, Boixeda de Miquel D, Martin de Argila de Prados C, Vallcorba Gomez del Valle I, Cabello Albendea P, Lopez San Roman A, San Roman Cos-Gayon C. Familiar penetrancy of HFE gene: four brothers of the same family affected by hereditary haemochromatosis] *Rev Esp Enferm Dig*. 2005;97(8):608-9.
- 37.- Pietrangelo A, Trautwein C. Mechanisms of disease: The role of hepcidin in iron homeostasis—implications for hemochromatosis and other disorders. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*. 2004;1(1):39-45.
- 38.- Zoller H, Cox TM. Hemochromatosis: genetic testing and clinical practice. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2005;3(10):945-58.
- 39.- Pietrangelo A. Hereditary hemochromatosis - A new look at an old Disease. *New Engl J Med* 2004; 350: 2383-2397.
- 40.- Rouault T, Mishra L, Deng CX. A role of SMAD4 in iron metabolism through the positive regulation of hepcidin expression. *Cell Metab*. 2005;2:399-409.
- 40.- Verga Falzacappa MV, Muckenthaler MU. Hepcidin: iron-hormone and anti-microbial peptide. *Gene*. 2005;364:37-44.
- 41.- Le Gac G, Ferec C. The molecular genetics of haemochromatosis. *Eur J Hum Genet*. 2005 Nov;13(11):1172-85.
- 42.- Gehrke SG, Herrmann T, Kulaksiz H, Merle U, Bents K, Kaiser I, Riedel HD, Stremmel W. Iron stores modulate hepatic hepcidin expression by an HFE-independent pathway. *Digestion*. 2005;72(1):25-32.