

# Importancia del polimorfismo 5569G/A del intrón 4 del gen HFE en el diagnóstico de la hemocromatosis hereditaria



Ruth Román, Anna Colomer, Nadina Erill, Xavier Puig y Manuel Guix

BIOPAT. Biopatología Molecular. Grup Assistència. Hospital de Barcelona. Barcelona.

**FUNDAMENTO:** Puesto que la presencia del polimorfismo 5569A en pacientes con predisposición a sufrir hemocromatosis hereditaria puede comprometer su diagnóstico, se han revisado las muestras previamente caracterizadas con la mutación Cys282Tyr y se ha determinado la incidencia del polimorfismo en nuestro entorno.

**PACIENTES Y MÉTODO:** Se revisaron 20 muestras y se incluyeron 56 controles, estudiados mediante PCR-FRLP.

**RESULTADOS:** El diagnóstico se confirmó en los 8 casos susceptibles de error. Sin embargo, se detectó una deficiencia de amplificación del alelo normal en dos de los heterocigotos (17%). La frecuencia alélica del polimorfismo 5569A en la población control fue del 14,3%.

**CONCLUSIONES:** Aunque no se cometió error diagnóstico, se recomienda la utilización de cebadores que no incluyan al polimorfismo 5569A en el diagnóstico de la hemocromatosis hereditaria.

Palabras clave: Hemocromatosis. Gen HFE. Mutación Cys282Tyr. Polimorfismo 5569G/A.

## Importance of 5569G/A polymorphism in intron 4 of HFE gene in the diagnosis of hereditary hemochromatosis

**BACKGROUND:** The presence of the 5569A polymorphism may lead to misdiagnosis of patients susceptible of hereditary hemochromatosis (HH). For that reason, samples containing the Cys282Tyr mutation were revised and the frequency of this polymorphism in our environment was assessed.

**PATIENTS AND METHOD:** Twenty samples were retested and 56 controls were included. The study was performed by PCR-RFLP.

**RESULTS:** The diagnosis was confirmed in 8 cases susceptible of error. However, an amplification deficiency of normal alleles was detected in 2 heterozygous (17%). The allelic frequency of the 5569A polymorphism in the control population was 14.3%.

**CONCLUSIONS:** Although misdiagnosis was not committed, we recommend changing to any primer that does not include the 5569G/A polymorphism in the study of HH.

Key words: Hemochromatosis. HFE gene. Cys282Tyr mutation. 5569G/A polymorphism.

Med Clin (Barc) 2001; 117: 690-691

Correspondencia: Dr. M. Guix Pericas. BIOPAT. Biopatología Molecular. Hospital de Barcelona. Avda. Diagonal, 660, sòtan 1. 08034 Barcelona. Correo electrónico: mguix@biopat.es

Recibido el 23-4-2001; aceptado para su publicación el 25-7-2001

La hemocromatosis hereditaria es una enfermedad autosómica recesiva caracterizada por un aumento de la absorción intestinal de hierro y su posterior depósito en distintos órganos. El diagnóstico temprano y su tratamiento pueden prevenir la aparición de complicaciones como cirrosis hepática, diabetes, carcinoma hepatocelular y muerte prematura. Dos mutaciones en el gen HFE se han identificado en pacientes de hemocromatosis hereditaria<sup>1</sup>: Cys282Tyr y His63Asp. En España, se puede atribuir hasta el 80% de los casos a la sustitución Cys282Tyr en homocigosis, mientras que las formas heterocigota compuesta y homocigota His63Asp son la causa de un porcentaje mucho menor de los mismos<sup>2</sup>. En lo referente a la frecuencia de la mutación Cys282Tyr en la población caucásica normal, los datos obtenidos en el sur y el este de Europa apuntan a que entre el 2 y el 4% de los individuos es portador de ésta en heterocigosis, y sólo el 0,5% la posee en homocigosis<sup>3</sup>.

El diagnóstico habitual de hemocromatosis hereditaria incluye la detección de las mutaciones Cys282Tyr y His63Asp mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para lo cual suelen utilizarse los cebadores originales descritos por Feder et al<sup>1</sup>. Recientemente se ha referido la presencia de un polimorfismo, el 5569G/A, situado en el lugar de unión del cebador antisentido que se emplea para detectar la mutación Cys282Tyr. Este polimorfismo, descrito únicamente en asociación al alelo no mutado, puede disminuir su amplificación, de manera que un heterocigoto Cys282Tyr que lo presente puede ser diagnosticado erróneamente de homocigoto<sup>4</sup>.

Con estos antecedentes, y dado que para nuestra prueba diagnóstica se utilizó el cebador que incluía el polimorfismo, se consideró oportuno confirmar el diagnóstico de todos los casos caracterizados con la mutación Cys282Tyr usando cebadores alternativos. Se determinó también la presencia del polimorfismo 5569G/A en todos los casos remitidos para estudio de hemocromatosis hereditaria. Puesto que el riesgo de error diagnóstico depende, en parte, de la frecuencia del polimorfismo 5569A, se determinó además

su prevalencia en población control de nuestro entorno (Barcelona).

## Pacientes y método

Las muestras remitidas para estudio de la hemocromatosis hereditaria procedían de 70 sujetos. Sólo en 20 de ellos se detectó la mutación Cys282Tyr; de éstos, 8 resultaron homocigotos y 12 heterocigotos (8 simples y 4 compuestos). Como grupo control de población normal se incluyeron 56 muestras pertenecientes a 32 varones y 24 mujeres con procesos inflamatorios no específicos en amígdalas y/o adenoides.

El estudio de los pacientes se realizó con muestras de sangre periférica anticoaguladas con EDTA, y el de los controles con muestras, obtenidas por resección quirúrgica, de tejido linfóide fijado en formol e incluido en parafina. Para la extracción de ADN se utilizaron protocolos convencionales de salting out para la sangre y de digestión con proteinasa K-SDS para el tejido.

Hasta octubre de 2000, nuestro laboratorio realizó la detección sistemática de las mutaciones Cys282Tyr y His63Asp del gen HFE basándose en un protocolo de amplificación y restricción enzimática, para el que se utilizaban los cebadores descritos por Feder et al<sup>1</sup> a una temperatura de unión de 62 °C. Como estrategia alternativa para detectar la mutación Cys282Tyr se emplearon nuevos cebadores recomendados por la AMP (American Association of Molecular Pathology): 5'CCTAAGACGTATTGCCCAATG y 5'GACTAGGGTGCCAGACGGT. Estos cebadores, cuya secuencia elude el polimorfismo 5569G/A, permiten la amplificación de un producto de 320 pb que incluye las mismas dianas de restricción para RsaI que el fragmento original, y el propio polimorfismo. Cada reacción de 25 µl contenía MgCl<sub>2</sub> (1,5 mmol/l), dNTPs (800 nmol/l), 10 pmol de cada cebador y 0,7 U de mezcla enzimática Expand High Fidelity PCR System (Boehringer Mannheim Corp., Indianapolis, IN, EE.UU.), además de 200 ng de ADN. Las condiciones de amplificación fueron: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s; 58 °C 30 s; 72 °C 30 s (35 ciclos); 72 °C 7 min y 4 °C ∞. Tras digestión con RsaI, los fragmentos se separaron por electroforesis en agarosa al 2% y se visualizaron con EtBr (fig. 1A). El exceso de producto amplificado para el estudio de la mutación Cys282Tyr se digirió con MseI para identificar el polimorfismo 5569G/A (fig. 1B).

En los casos en que se llevó a cabo secuenciación, ésta se efectuó en ambos sentidos con los cebadores originales<sup>1</sup> mediante el sistema ABI PRISM® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (PE Applied Biosystems, Warrinton, Reino Unido), previa purificación de los productos de PCR con los dispositivos MICROCON® YM-50 Centrifugal Filter Devices (Amicon Millipore Corp., Bedford, MA, EE.UU.).

## Resultados

El diagnóstico de hemocromatosis hereditaria se confirmó con los cebadores alternativos en los 8 homocigotos Cys282Tyr susceptibles de error. Tras el estudio del polimorfismo 5569G/A en la población remitida (compuesta por 20 sujetos con la mutación Cys282Tyr y 50 sin ella), 14

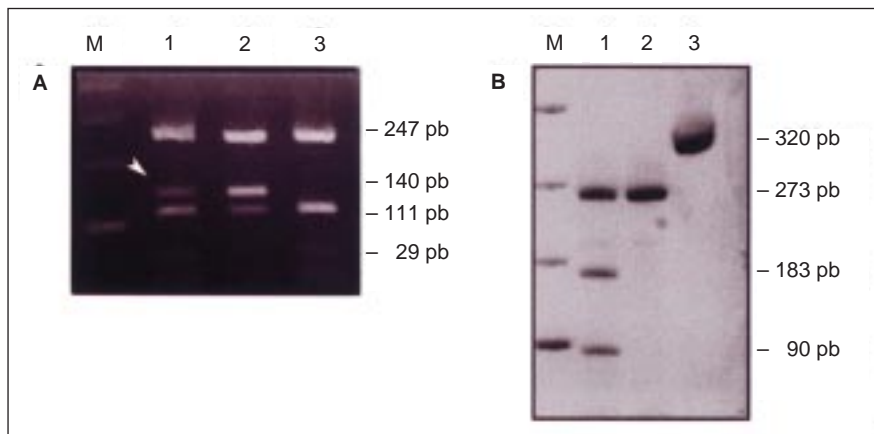


Fig. 1. Gels de electroforesis que ponen de manifiesto el patrón de restricción de los distintos productos que incluyen el codón 282 del gen HFE. A) detección de la mutación Cys282Tyr en agarosa, tras digestión con RsaI: marcador 100 pb ladder (carril M); heterocigoto Cys282Tyr/5569A (carril 1); heterocigoto Cys282Tyr/5569G (carril 2); homocigoto Cys282Tyr (carril 3). La flecha señala la disminución de intensidad del fragmento de 140 pb correspondiente al alelo no mutado, debido a la deficiencia de amplificación. B) detección del polimorfismo 5569G/A en acrilamida, tras digestión con MseI: marcador 100 bp ladder (carril M); heterocigoto 5569G/A (carril 1); homocigoto 5569G (carril 2); fragmento no digerido (carril 3).

casos resultaron heterocigotos 5569A, siendo dos de ellos además heterocigotos Cys282Tyr. Aunque estos dos heterocigotos 5569A/Cys282Tyr se diagnosticaron correctamente desde un principio, se detectó una deficiencia en la amplificación de los alelos no mutados reflejada en la menor intensidad de los fragmentos de restricción correspondientes a dichos alelos (fig. 1A). No obstante, la secuenciación de ambos casos –en los dos sentidos– puso de manifiesto que el grado de amplificación del alelo 5569A no mutado era prácticamente nulo, detectándose tan sólo un rastro de pico normal en la posición correspondiente al cambio Cys282Tyr (fig. 2). Los resultados del estudio del polimorfismo 5569G/A en la población control permitieron asignar la forma 5569A en heterocigosis a 16 de los 56 individuos estudiados (29%), lo que corresponde a una frecuencia alélica del 14,3%.

### Discusión

Los trabajos de Jeffrey et al<sup>4</sup> y de Somerville et al<sup>5</sup> indicaron el elevado riesgo de error en el diagnóstico de hemocromatosis hereditaria que suponía la utilización de los cebadores originalmente descritos

por Feder et al<sup>1</sup> para detectar la mutación Cys282Tyr. A partir de estas publicaciones, otros autores revisaron sus diagnósticos con cebadores alternativos y refirieron tasas de error menores a las esperadas, lo que minimizaba, en consecuencia, la repercusión del posible fallo diagnóstico<sup>6-8</sup>. La discrepancia de estos resultados obedecería, según los propios autores, a múltiples factores. Podría atribuirse en parte a causas de muestreo, pues al hallarse el polimorfismo asociado únicamente al alelo no mutado, el riesgo de error aumentaría en proporción al número de heterocigotos Cys282Tyr presentes en la población estudiada, ya que éstos son los susceptibles de fallo diagnóstico<sup>9</sup>. Esto explicaría el elevado porcentaje de error (48%) descrito en el trabajo de Jeffrey et al<sup>4</sup>, pues en él se revisaba la prevalencia de la mutación en cuestión en una población voluntaria de donantes de sangre. También ciertas variaciones metodológicas permitirían explicar las discrepancias entre estudios, tales como las condiciones de PCR –y, en especial, la temperatura de unión de los cebadores<sup>1,8,10</sup>– y/o la calidad del ADN extraído. Nuestros resultados, aunque basados en una casuística reducida, coinciden con

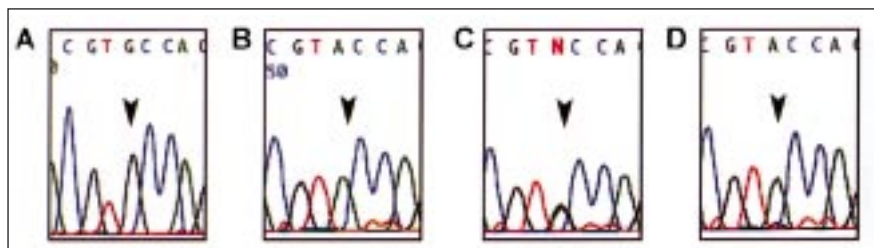


Fig. 2. Cromatogramas parciales de la cadena con sentido del producto amplificado que incluye el codón 282 del gen HFE. A) control no mutado; B) homocigoto Cys282Tyr; C) heterocigoto Cys282Tyr/5569A. La flecha señala la posición del nucleótido susceptible de mutación.

los de otros autores<sup>6</sup> y no parecen atribuir la magnitud del error al factor temperatura, ya que la unión de los cebadores se realizó inicialmente a 62 °C. Sin embargo, cabe destacar que, si bien no se cometió error diagnóstico con los homocigotos Cys282Tyr, si se detectó una reducción de la amplificación del alelo normal en dos de los 12 heterocigotos estudiados (17%). Esta disminución de amplificación, claramente apreciable tras restricción enzimática, hubiera pasado inadvertida si el estudio se hubiese realizado sólo por secuenciación directa. De todo lo expuesto anteriormente se deduce que las características de la muestra son, quizás, las más determinantes del fallo diagnóstico. La frecuencia alélica de 5569A hallada en nuestra población control (14,3%), similar a la descrita en otras publicaciones referidas a población caucásica<sup>4,7</sup>, indica que la orientación clínica que motiva el estudio de hemocromatosis hereditaria es el principal factor modulador del error. Al ser éste un factor ajeno a los laboratorios, sería recomendable el uso de cebadores que no incluyeran el polimorfismo 5569G/A, así como la revisión de los homocigotos Cys282Tyr anteriormente diagnosticados con los cebadores de Feder et al<sup>1</sup>.

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Feder JN, Gnirke A, Thomas W, Tsuchihashi Z, Ruddy DA, Basava A et al. A novel MHC class 1-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nat Genet* 1993; 13: 399-408.
- Roa S, Martín-Oterino JA, Rodríguez RE, García-Berrocal B, Sánchez-Rodríguez A, González-Sarmiento R. Estudio del gen HFE en una familia española de hemocromatosis hereditaria. *Med Clin (Barc)* 2001; 116: 100-103.
- Bacon BR, Powell LW, Adams PC, Kresina TF, Hoofnagle JH. Molecular medicine and hemochromatosis: at the crossroads. *Gastroenterology* 1999; 116: 193-207.
- Jeffrey GP, Chakrabarti S, Hegele RA, Adams PC. Polymorphism in intron 4 of HFE may cause overestimation of C282Y homozygote prevalence in haemochromatosis. *Nat Genet* 1999; 22: 325-326.
- Somerville MJ, Sprysak KA, Hicks M, Elyas BG, Vicen-Wyhyony L. An HFE intronic variant promotes misdiagnosis of hereditary hemochromatosis. *Am J Hum Genet* 1999; 65: 924-926.
- Elsa SH, Leykam V. HFE polymorphism and accurate diagnosis of C282Y hereditary hemochromatosis carriers. *Blood* 2000; 95: 2454-2455.
- The European Haemochromatosis Consortium, represented by: Merryweather-Clarke AT, Pointon JJ, Shearman JD, Robson KJH, Jouanolle AM, Mosser A et al. Polymorphism in intron 4 of HFE does not compromise haemochromatosis mutation results. *Nat Genet* 1999; 23: 271.
- Noll WW, Belloni DR, Stenzel TT, Grody WW. Polymorphism in intron 4 of HFE does not compromise haemochromatosis mutation results. *Nat Genet* 1999; 23: 271-272.
- Gómez PS, Parks S, Ries R, Tran TC, Gómez PF, Press RD. Polymorphism in intron 4 of HFE does not compromise haemochromatosis mutation results. *Nat Genet* 1999; 23: 272.
- Chin CYB, Beilby JP, Rossi E, Jeffrey GP. PCR conditions for HFE C282Y: lack of effect of 5569G/A polymorphism with 55 °C annealing. *Clinical Chem* 2000; 46: 303.