






## PCR en tiempo real para la detección y genotipificación de las mutaciones p.C282Y y p.H63D en el gen *HFE* asociadas con hemocromatosis (qPCR *HFE*)

### Real-time PCR for the detection and genotyping of the p.C282Y and p.H63D mutations in the human *HFE* gene associated with hemochromatosis (qPCR *HFE*)

Laura M. Arias-Agudelo<sup>1</sup> , Claudia M. Alzate-Cano<sup>2</sup> , Catalina Franco-Alzate<sup>3</sup> , Vanessa Santiago-Pacheco<sup>4</sup> , Jairo A. Mesa-Arango<sup>5</sup> 

### Utilidad clínica de la prueba

La hemocromatosis (HC) es un trastorno genético autosómico que afecta los genes relacionados con el metabolismo del hierro. En consecuencia, las anomalías hereditarias de las proteínas implicadas en el transporte y la regulación del hierro, pueden conducir a su absorción excesiva en el tracto gastrointestinal y llevar a una sobrecarga progresiva que puede ocasionar complicaciones sistémicas de elevada morbilidad y mortalidad. Avances recientes en el conocimiento de la fisiopatología y las bases moleculares del metabolismo del hierro, han determinado que la HC es causada por mutaciones en al menos cinco genes diferentes, siendo el gen *HFE* el factor genético más relevante asociado a la HC, dadas sus funciones relacionadas con la modulación de la expresión de la hepcidina, la hormona primaria en la regulación de la absorción del hierro. La mayoría de los pacientes con HC portan genotipos mutantes en *HFE*, siendo hasta un 95 % de los casos asociados a la mutación homocigota para p.C282Y, y una menor proporción asociados al genotipo heterocigoto compuesto p.C282Y/p.H63D. La mutación p.S65C presenta una significancia clínica poco clara en los casos de HC, y en consecuencia, su implementación en la práctica clínica y en

<sup>1</sup> Microbióloga y Bioanalista, MSc en Ciencias Básicas Biomédicas, Laboratorio Clínico Hematológico. Medellín, Colombia.

<sup>2</sup> Microbióloga y Bioanalista, Laboratorio Clínico Hematológico. Medellín, Colombia.

<sup>3</sup> Médica, Especialista en Patología. Directora Médica, Laboratorio Clínico Hematológico. Medellín, Colombia.

<sup>4</sup> Médica, Especialista en Patología. Laboratorio Clínico Hematológico. Profesora Auxiliar, Departamento de Patología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.

<sup>5</sup> Microbiólogo y Bioanalista, PhD en Biología, Laboratorio Clínico Hematológico. Medellín, Colombia. E-mail: jmesa@hematologico.com

el diagnóstico rutinario es controversial. Además del gen *HFE*, las mutaciones en los genes que codifican la hemojuvelina (*HJV*), la hepcidina (*HAMP*) y el receptor de la transferrina 2 (*TFR2*), también se han asociado en menor frecuencia con alteraciones en la regulación de la homeostasis del hierro y el desarrollo de HC [1,2].

Si bien la hemocromatosis suele estar principalmente relacionada con mutaciones en el gen *HFE* (cromosoma 6p21.3), este trastorno tiene una fisiopatología común, y una expresión clínica y fenotípica variable, que depende de diversos factores [3]. Para su diagnóstico y seguimiento adecuado es necesario tener en cuenta elementos clínicos, bioquímicos y moleculares. La elevación de la ferritina sérica sin explicación alternativa, acompañada de elevación en la saturación de la transferrina, llevan a la sospecha de la enfermedad y orientan a la realización del tamizaje genético del gen *HFE* para complementar el diagnóstico. Así pues, la genotipificación de mutaciones en *HFE* está indicada en personas con hallazgos clínicos sugestivos de HC y con historia familiar de la enfermedad en primer grado de consanguinidad [4].

## Fundamento de la técnica

A la fecha, se han descrito una gran variedad de métodos y estrategias moleculares para la tipificación de mutaciones en el gen *HFE*. Entre estas, las metodologías más utilizadas se basan en la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) (41 %), la PCR acoplada a la digestión con enzimas de restricción o PCR-RFLP (16 %), la PCR acoplada a la detección por hibridación en fase reversa, el secuenciamiento directo del gen *HFE* con previa amplificación por PCR, y el secuenciamiento capilar tipo Sanger (11 %) [4].

Debido a la utilidad y fácil implementación en el laboratorio, la PCR es la herramienta más frecuentemente utilizada para complementar el diagnóstico de la HC. A continuación, se describe la PCR en tiempo real cualitativa (qPCR *HFE*), que permite la discriminación alélica de las mutaciones p.C282Y y p.H63D asociadas con HC. La qPCR *HFE* se basa en la utilización de oligonucleótidos específicos para la amplificación de los exones 2 y 4 del gen *HFE* ubicado en el cromosoma 6 (6p21.3). En estos exones, y mediante sondas de ADN fluorescentes marcadas con los fluoróforos FAM y HEX, se realiza la detección y discriminación alélica (alelos de tipo salvaje [WT] y mutados [MUT]) simultánea de las mutaciones p.H63D y p.C282Y, permitiendo que en una sola reacción sea posible determinar el genotipo de la muestra en estudio [5,6].

## Muestra y almacenamiento

La muestra estandarizada para el tamizaje de las mutaciones p.C282Y y p.H63D es la sangre total obtenida por venopunción en tubo tapa lila (anticoagulada con EDTA). Las muestras deben ser transportadas y almacenadas en refrigeración (2 °C a 8 °C) por un periodo de tiempo no superior a 72 horas antes de su procesamiento, con el fin de garantizar su estabilidad.

## Procedimiento

La prueba utilizada para la detección y genotipificación de las mutaciones p.C282Y y p.H63D se lleva a cabo en tres pasos: 1) purificación del ADN de la muestra en estudio, incluido el análisis espectral y cuantificación del material genético purificado (ADN genómico); 2) preparación de la mezcla de componentes para la reacción de qPCR

(*master mix*) y adición de las muestras de ADN purificado de cada paciente; y 3) amplificación del material genético de interés por qPCR, acoplado a la detección por fluorescencia en tiempo real, y análisis e interpretación de los resultados. La purificación del ADN se realiza a partir de 200  $\mu$ L de la muestra de sangre total anticoagulada, la cual es sometida a digestión usando detergentes, la enzima proteinasa K, y con incubación posterior a temperaturas entre 56 °C y 70 °C. Finalizado el proceso de purificación por cromatografía de adsorción con columnas de gel de sílice, se obtiene una solución acuosa con el ADN genómico. El procedimiento de purificación se realiza con el kit Qiamp DNA Mini kit (Qiagen, Alemania), siguiendo las recomendaciones del fabricante. La calidad del ADN es evaluada mediante análisis espectral (relación de absorción A260 nm/A280 nm y A260 nm/A230 nm), y su cuantificación se obtiene por absorción de luz a 260 nm (NanoDrop ONE-W, Thermo Fisher Scientific).

A continuación, el ADN purificado es utilizado como muestra para la qPCR, donde cada reacción preparada corresponderá a la mezcla de reactivos para la amplificación de regiones específicas de los exones 2 y 4 del gen *HFE*, incluidos los oligonucleótidos y sondas marcadas con fluoróforos (específicos para cada variante alélica), las enzimas ADN polimerasa y uracil-ADN glicosilasa, y un tampón amortiguador con los nucleótidos trifosfato (dNTPs). La amplificación de los ácidos nucleicos se lleva a cabo usando un termociclador con módulo óptico (CFX96, BioRad), y los productos de amplificación de cada alelo (amplicones de ADN de cadena doble) son detectados en tiempo real, a través de la medición de la señal de fluorescencia emitida por los fluoróforos acoplados a las sondas. La qPCR

*HFE* tarda en promedio unas 3 horas, e incluye las reacciones con el ADN purificado de cada paciente, y cuatro reacciones adicionales como control de la qPCR; tres de ellas corresponden a controles positivos (genotipos heterocigoto, homocigoto mutante, y homocigoto no mutado o de genotipo salvaje [WT]), y un control negativo (reacción sin ADN) (**tabla 1**).

## Interpretación de los resultados

Al finalizar la amplificación del material genético de interés, los resultados crudos (señales de fluorescencia) de la qPCR son analizados utilizando el *software* de discriminación alélica del CFX96 (BioRad), con parámetros específicos que permiten la validación y reporte definitivo de los genotipos detectados (**figura 1**). La interpretación de los resultados involucra el análisis inicial de la amplificación del ADN para los controles positivos, el control negativo, y las muestras de los pacientes (**tabla 1**). La amplificación esperada del ADN en los controles positivos, así como la ausencia de señales de fluorescencia en el control negativo, permiten garantizar la validez y confiabilidad de los resultados obtenidos en la qPCR.

## Ventajas y limitaciones de la prueba

La qPCR *HFE* para HC tiene un límite de detección de 0,5 ng de ADN/reacción. Los resultados de la amplificación y discriminación alélica son obtenidos en aproximadamente 5 horas, y los resultados son emitidos por el laboratorio en un periodo de 24 a 48 horas posteriores a la venopunción, siempre y cuando la muestra sea procesada bajo condiciones apropiadas y por personal debidamente entrenado.

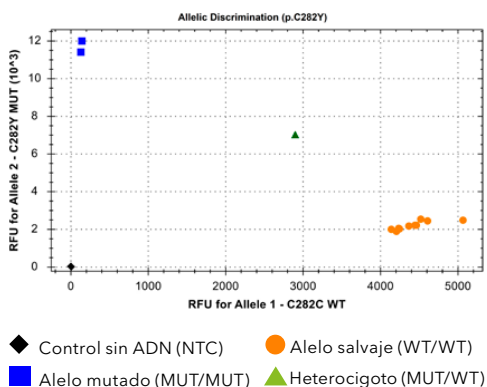
**Tabla 1.** Interpretación de los resultados de la prueba qPCR *HFE*

Alelo salvaje	Alelo mutante	Interpretación	Valor de referencia
+	-	Genotipo: tipo salvaje-WT (no portador)	
-	+	Genotipo: homocigoto mutante (portador)	
+	+	Genotipo: heterocigoto mutante (portador)	
-	-	No válido: una señal doble negativa indica inconsistencias, ya sea en el proceso de extracción o amplificación; adicionalmente, podría ser indicativo de la presencia de sustancias inhibidoras en el ADNg obtenido. En este caso, se debe: <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Verificar la estabilidad de los reactivos utilizados</li> <li>▪ Repetir la prueba desde la extracción del ácido nucleico</li> <li>▪ Realizar diluciones del material genético previo al proceso de amplificación</li> </ul>	No portador de las mutaciones evaluadas

WT: del inglés, *Wild Type*; ADNg: ADN genómico.

La qPCR *HFE* es una herramienta de apoyo para el diagnóstico y evaluación

de pacientes con sospecha de HC. Un resultado de no detección (no portador de las variantes alélicas o mutaciones) para las mutaciones p.C282Y y p.H63D evaluadas en la qPCR, no descarta la presencia de otras variantes alélicas o polimorfismos no evaluados en la prueba. Por lo tanto, los resultados deben ser interpretados con cautela, siguiendo el criterio del médico tratante y según el contexto clínico de cada paciente, para determinar la conducta clínica y/o la necesidad de consejería genética individual o al grupo familiar [4].



**Figura 1.** Análisis de discriminación alélica para la mutación p.C282Y. En la imagen se grafica la señal de fluorescencia relativa (RFU) en muestras con genotipo salvaje (WT/WT), mutante (MUT/MUT), heterocigoto (WT/MUT) y un control sin ADN blanco (NTC), obtenidas en la qPCR *HFE*. La distribución de los puntos en la gráfica se da en función de los alelos detectados en la muestra (señal de fluorescencia en HEX y/o FAM).

## Referencias

1. **Girelli D, Busti F, Brissot P, Cabantchik I, Muckenthaler MU, Porto G.** Hemochromatosis classification: update and recommendations by the BIOIRON Society. *Blood* 2022;139:3018-3029. <https://doi.org/10.1182/blood.2021011338>.
2. **Santos P, Krieger JE, Pereira AC.** Molecular diagnostic and pathogenesis of hereditary hemochromatosis. *Int J Mol Sci* 2012;13:1497-

1511. <https://doi.org/10.3390/ijms13021497>.
3. **Brissot P, Pietrangelo A, Adams PC, de Graaff B, McLaren CE, Loréal O.** Haemochromatosis. *Nat Rev Dis Primers* 2018;4:18016. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.16>.
  4. **Porto G, Brissot P, Swinkels DW, Zoller H, Kamarainen O, Patton S, et al.** EMQN best practice guidelines for the molecular genetic diagnosis of hereditary hemochromatosis (HH). *Eur J Hum Genet* 2016;24:479-495. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2015.128>.
  5. **Gochee PA, Powell LW, Cullen DJ, Du Sart D, Rossi E, Olynyk JK.** A population-based study of the biochemical and clinical expression of the H63D hemochromatosis mutation. *Gastroenterology* 2002;122:646-651. [https://doi.org/10.1016/s0016-5085\(02\)80116-0](https://doi.org/10.1016/s0016-5085(02)80116-0).
  6. **Le Gac G, Férec C.** The molecular genetics of haemochromatosis. *Eur J Hum Genet* 2005;13:1172-1185. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201490>.