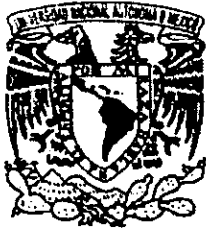


00346



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

11

ESTUDIO DE MUTACIONES EN EL GEN DE LA HEMOFILIA A
Y DIAGNOSTICO MOLECULAR DE PORTADORAS

299830

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS (BIOLOGIA CELULAR)

P R E S E N T A
RAFAEL MARTINEZ GALLEGOS

DIRECTOR DE TESIS: DR. DIEGO JULIO ARENAS ARANDA



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A

MAMA Y PAPA

POR SU APOYO INCONDICIONAL

MIS HERMANOS

RICARDO, MALE, CRISTY, JAIME Y ALE

MIS NIÑOS

JAZMÍN, OLIVER Y EL RECIEN LLEGADO JASIT

MIS AMIGOS

FRANCISCO, EFRAIN, JAVIER, PEDRO, MIGUEL Y MANUEL

Y...

Fiecare dintre noi este un inger cu o singura
aripa. Si nu putem zbura decat in doi, imbratisati.

Ioana Burcut

Todo dentro de nosotros es un angel con solo un ala.
Solo podemos volar juntos, en un abrazo.

Ioana Burcut

El error no es ceguera, el error es cobardía... Toda
conquista, todo paso adelante es consecuencia del
coraje, de la dureza consigo mismo, de la limpieza
consigo mismo...

Friedrich Nietzsche

¿Que es bueno? – Todo lo que eleva la voluntad de
poder, el poder mismo en el hombre.

¿Qué es malo? – Todo lo que procede de la debilidad.

¿Qué es felicidad? – El sentimiento de que el poder
crece, de que una resistencia queda superada.

Friedrich Nietzsche

AGRADECIMIENTOS

A las familias que participaron en este estudio y afrontan esta enfermedad

A los Ingenieros Lourdes San Cristóbal y Almanza por el apoyo técnico aportado a este trabajo

A mis maestros Diego, Ramon, Rosenda y Haidee por compartir su experiencia

A mis compañeros: Adan, Normand, Xochitl, Margarita, Julio, Caro, Carmen, Elena, Paul, Israel, Javier y Pedro

RESUMEN

La Hemofilia A se caracteriza clínicamente por anomalías en el factor VIII asociado a la coagulación sanguínea. Su incidencia es de 1/5000 niños nacidos vivos. Esta patología se hereda de manera recesiva ligada al cromosoma X. El gen del factor VIII se localiza en el cromosoma Xq23.1. Se han reportado tres marcadores con número variable de repetidos en tandem (VNTR's) asociados al gen, dos intragénicos, *Int13* e *Int22* y un extragénico *St14*. En nuestra población se ignora el grado de heterocigocidad de estos marcadores polimórficos y su posible utilidad en el diagnóstico de portadoras para Hemofilia A. Por otro lado alrededor del 25% de todos los pacientes hemofílicos presentan una alteración característica en el gen, que consiste en una inversión que se produce por una recombinación homóloga entre las regiones *Int22c* del gen *FVIII* y las regiones *Int22a* e *Int22b* situadas fuera del gen, produciendo un fenotipo grave. Esta alteración puede ser detectada en familias sin antecedentes mediante la amplificación en cadena de la polimerasa (PCR) de las regiones involucradas.

Los objetivos de este trabajo fueron 1) Analizar la frecuencia y heterocigocidad alélica de los marcadores VNTR's *Int13*, *Int22* y *St14*, en individuos sanos no emparentados; 2) Definir el estado portador en familias mexicanas con antecedentes de hemofilia A; 3) Identificar la inversión 1-22 en individuos mexicanos afectados por hemofilia grave y sus familiares

Para el análisis de la heterocigocidad de los marcadores VNTR's se estudiaron 160 cromosomas X obtenidos a partir de individuos no emparentados entre sí, para el diagnóstico de portadoras se trabajaron 10 familias con antecedentes de Hemofilia A y para determinar la inversión se seleccionaron dos familias con hemofilia de tipo severo sin antecedentes hereditarios, todos pertenecientes a la población mexicana. A partir del DNA genómico de cada individuo se amplificaron mediante PCR las regiones de interés. Los productos de amplificación fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa y de poliacrilamida.

La heterocigocidad encontrada para los marcadores *Int13*, *Int22* y *St14* fue de 45%, 50% y 83% respectivamente. El marcador *St14* fue el marcador más informativo en la detección de portadoras y presentó un alelo no reportado de 680pb. De 39 mujeres analizadas 16 fueron portadoras, 15 no portadoras y en 8 no se logró definir su condición. Se determinó la inversión en un individuo con hemofilia grave, esta alteración no se encontró en la madre y hermanas. En la segunda familia no se detectó la inversión por lo que la enfermedad se debe posiblemente a otra mutación en el gen.

El uso de marcadores de tipo VNTR's en la detección de portadoras es de utilidad ya que aumenta la precisión del diagnóstico en familias con antecedentes familiares de la Hemofilia A. Por otro lado la técnica para detectar la inversión abre la posibilidad de diagnóstico en aquellas familias sin antecedentes hereditarios y con fenotipo grave.

ANTECEDENTES

El primer caso reconocido de Hemofilia se describe en el Talmud Babilónico, en la segunda centuria después de Cristo; Rabbi Simon ben Gamaliel realizó una circuncisión a un infante cuyos primos maternos habían muerto después de la operación. Ocho siglos después durante el periodo árabe en España aparece el primer caso reportado en la literatura médica. Khalif ibn Abbas describió a un hombre que tras una herida sufrió una hemorragia incontrolable la cual le ocasionó la muerte²².

A principios de 1800 John Otto describió el patrón de transmisión de esta enfermedad "Es una circunstancia peculiar en donde solo los hombres están sujetos a esta extraña afección. Las mujeres no la padecen, sin embargo aún tienen la capacidad de transmitirla a sus hijos". La característica clínica principal observada fueron sangrados graves a partir de lesiones triviales²².

En 1911 Bulloch y Filders en una recopilación monumental revisaron cerca de 1000 casos de hemofilia, extrayendo 224 árboles genealógicos. Ellos describieron la mayoría de las características clínicas que hoy en día se siguen utilizando²².

En 1909 Baterson publicó el libro *Los principios hereditarios de Mendel* en el cual aparece un análisis de la ceguera al color ligada de manera recesiva al cromosoma X. Él interpretó que las mujeres portadoras son heterocigotas y por lo tanto no afectadas. Además explicó por qué los hijos de los hombres afectados son normales, mientras que sus hijas son portadoras, concluyó correctamente que el dimorfismo sexual se encontraba implicado. Se hizo la correlación con hemofilia y se observó que encajaba de manera idéntica. A su vez la existencia de mujeres homocigotas

afectadas también fue predicha y explicada por Baterson²².

El caso familiar más famoso de hemofilia es el de los descendientes de la reina Victoria. Ninguno de los ancestros de la Reina sufrieron sangrados, sin embargo ella fue portadora ya que uno de sus hijos (Leopoldo) estuvo afectado y dos de sus hijas fueron portadoras, transmitiendo la enfermedad a sus hijos (Figura 1). A través de intermatrimonios y matrimonios entre dinastías, el gen fue llevado a otras tres familias reales en Europa, con consecuencias trágicas en la familia Real de Rusia. Entre los varones afectados solo Leopoldo tuvo hijos y murió a la edad de 31 años²². Dado que la hemofilia se produce por la deficiencia ya sea del factor VIII o IX y puesto que todos los afectados en esta familia han muerto se desconoce cual de los dos tipos afectó a la familia Real. Una posible causa de la enfermedad en esta familia pudo ser el gameto proporcionado por el padre de la Reina, Edward, Duke de Kent, quien tenía 54 años cuando Victoria nació³⁵.

En 1893 comenzaron los estudios para encontrar la alteración en la sangre de los hemofílicos. Almroth Wright mostró que en un tubo capilar la sangre normal coagula en 6 minutos, mientras que la sangre de un niño con hemofilia grave toma más de 10 minutos en hacerlo. En 1911 Thomas Addis demostró que el tiempo que toma la sangre de un hemofílico en coagular puede ser corregido con una fracción de sangre normal. Por otro lado demostró el retraso que existe en la conversión de protrombina a trombina, concluyendo que la deficiencia de protrombina era la causa de la falla hemostática. En 1935 Quick utilizando un nuevo método para medir la protrombina mostró que ésta se encontraba en niveles normales en la sangre de hemofílicos. Otra teoría, elaborada por Morawitz en 1908,

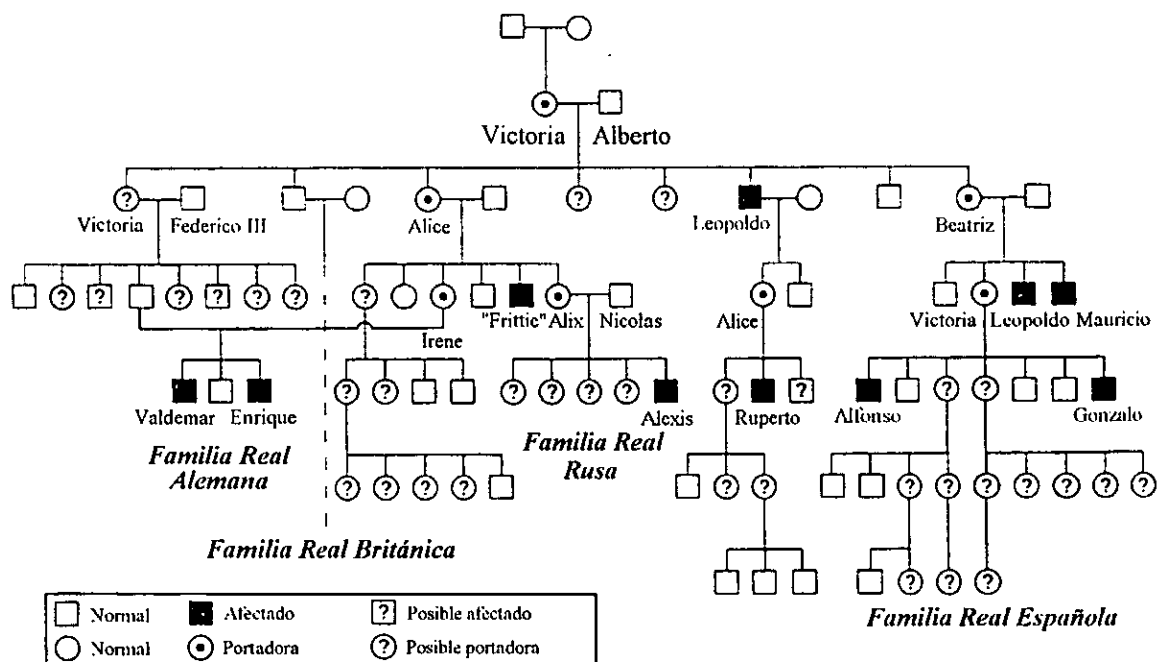


Figura 1. Arbol genealógico de la Reina Victoria y sus descendientes.

propuso que la hemofilia se debía a la deficiencia de los corpúsculos para producir trombocinasa, sin embargo esta hipótesis no fue corroborada en experimentos posteriores²².

En 1937 Patek y Taylor reexaminaron la fracción sanguínea que Addis había utilizado para corregir el tiempo de coagulación en la sangre de hemofílicos. Observaron que esta fracción era una euglobulina que contenía varias proteínas. Ellos denominaron a esta fracción "globulina" y posteriormente "globulina antihemofílica" (AHG). Por lo que la hemofilia se consideró una deficiencia de AHG²².

En 1952 se reportó que la alteración se corrigió en un paciente con hemofilia cuando su sangre fue mezclada con la sangre de otro paciente con características similares. Este dato fue importante ya que se concluyó que existía otro factor involucrado en la hemofilia. Por convenio internacional a AHG

se le asignó el número romano VIII y al nuevo factor se le asignó el número IX, denominándoles hemofilia A y B respectivamente²².

En la década de los 50's comenzaron los trabajos para purificar el factor VIII, sin embargo estos trabajos no tuvieron éxito ya que el factor VIII copurifica con su proteína de transporte, el Factor von Willebrand (vWF), por otro lado el factor VIII es inestable y se encuentra en concentraciones muy bajas en sangre¹⁵. No fue hasta 1979 cuando el factor VIII fue separado completamente del Factor von Willebrand mediante purificación por inmunofinidad^{10,60}. En 1982 utilizando anticuerpos monoclonales fabricados a partir de factor VIII porcino se consiguió aislar suficiente Factor VIII para poder realizar una secuencia polipeptídica parcial, lo cual permitió la clonación de su cDNA y posteriormente el descubrimiento del gen^{57,62}.

Características Clínicas

Se estima que a nivel mundial la incidencia de la hemofilia A es de 1 en 10,000 niños nacidos vivos, sin embargo este dato puede estar subestimado ya que en países en donde existe un centro de registro detallado la incidencia es mayor, tal es el caso del Reino Unido en donde se encuentra una incidencia de 1 en 5000 niños nacidos vivos⁴⁹. Una causa posible de la estimación baja pueden ser los casos no reportados de hemofilia ligera y moderada; ambas representan la mitad de los casos de hemofilia y comúnmente suelen pasar desapercibidas manifestándose solamente tras una intervención quirúrgica mayor o en algún traumatismo considerable.

La enfermedad generalmente afecta a varones y posee un patrón de herencia recesivo ligado al cromosoma X. La gravedad en la frecuencia del sangrado es inversamente proporcional a los niveles residuales del Factor VIII en sangre (Tabla I)¹. Cualquier articulación puede tener sangrados, sin embargo las más afectadas son regularmente las de carga y/o tensión importante como son tobillos, rodillas, cadera y codos. Si estos sangrados no son tratados pueden producir dolor, rigidez e inflamación durante días e incluso semanas. La sangre es extremadamente irritante para la sinovial y causa sobrecrecimiento de la misma lo que da fragilidad al tejido capilar originando que existan sangrados recurrentes. Probablemente por la acumulación de hierro en los condrocitos se presenta una artritis degenerativa produciendo irregularidades en el contorno articular terminando finalmente en anquilosis²².

El sangrado muscular se concentra principalmente en los músculos grandes de muslos, pantorrillas, pared abdominal posterior y glúteos. Estos sangrados producen necrosis isquémica y contractura.

Tabla I. Relación entre actividad del factor VIII y gravedad de la enfermedad

Factor VIII (U/dl)	Sangrado	Incidencia (%)
<2	Grave. Sangrados espontáneos en articulaciones, músculos y órganos internos	50
2-10	Moderado. Algunos sangrados espontáneos, sangrados ante traumatismos menores	30
>10-30	Leve. Sangrados sólo ante traumatismos fuertes o cirugías	20

La hematuria es poco frecuente presentándose uno o dos episodios por década y regularmente cesa espontáneamente. El sangrado orofaríngeo es poco común, sin embargo es clínicamente peligroso ya que puede ocasionar la obstrucción de vías respiratorias²².

La cirugía mayor y los traumatismos expuestos en pacientes sin tratamiento producen hemorragias peligrosas. Estas hemorragias no son abundantes, sin embargo son muy persistentes. Puede haber una cicatrización frágil que fácilmente puede romperse reiniciando el sangrado. Ocasionalmente una hemorragia continua en los músculos puede producir un pseudotumor hemofílico. Esta condición se ve en personas que son resistentes al tratamiento convencional o en aquellos pacientes que no tienen a su alcance un tratamiento adecuado. Las equimosis también son muy comunes en hemofilia, sin embargo solamente tienen significancia estética ya que son superficiales²².

Los sangrados en el sistema nervioso central pueden surgir después de una lesión

pequeña en la cabeza y son la causa más común de muerte en los hemofílicos

La enfermedad puede darse a conocer desde la etapa neonatal con un cefalohematoma y sangrados prolongados en el cordón umbilical. En la mayoría de los casos el diagnóstico se realiza cuando el infante presenta varios equimosis debidos a sus primeros intentos al caminar. Muchas veces esta situación es confundida con el síndrome del niño maltratado. Tan pronto como el niño tiene una actividad más intensa pueden comenzar los sangrados en las articulaciones.

Como ya se ha mencionado, en pacientes con hemofilia moderada o ligera muchas veces la enfermedad se manifiesta tardíamente cuando existen sangrados intensos como resultado de traumatismos ó cirugías importantes²².

Diagnostico Clínico de Hemofilia A

Las pruebas de laboratorio más comunes en pacientes con hemofilia son el tiempo parcial de tromboplastina (PTT), tiempo de protrombina (PT), tiempo de coagulación de trombina (TCT), tiempo de coagulación y cuenta de plaquetas. También se realizan pruebas con anticuerpos para el antígeno vWF, para distinguir entre la hemofilia A y la enfermedad de von Willebrand ya que ambas pueden confundirse con las pruebas normales de laboratorio²².

Biología Molecular

El gen del Factor VIII fue clonado en 1984¹⁵. A partir de una secuencia polipeptídica parcial de la proteína se sintetizó un oligonucleótido que fue hibridado contra una

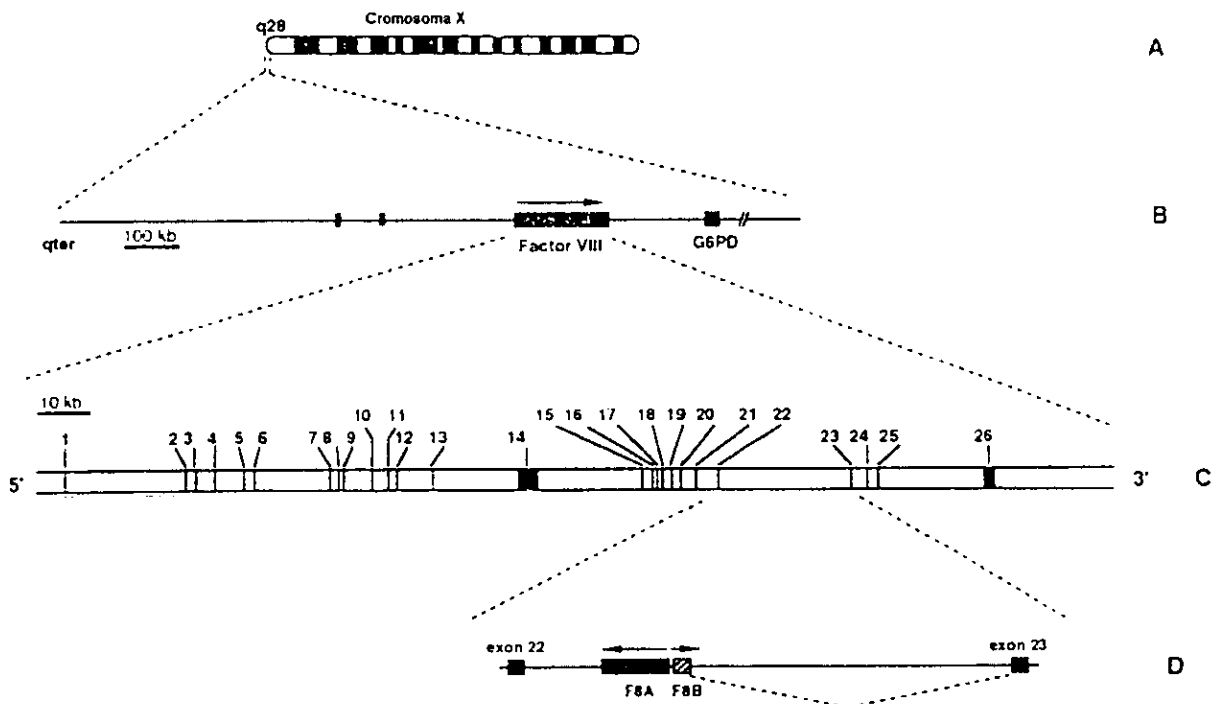


Figura 2. Localización y estructura del gen del Factor VIII. A. Localización en el cromosoma X. B. Localización con respecto a G6PD. C. Intrones y exones del gen. D. Posición en el intron 22 de los genes F8A y F8B.

librería genómica del bacteriófago λ con ello se "caminó en el genoma" utilizando una serie de clones sobrelapadas de bacteriófago λ y cósmidos^{57,68}. Este mapeo reveló que el gen del Factor VIII se encuentra localizado en el brazo largo del cromosoma X, en la banda Xq28³⁶ a 1 Mb del telómero (Figura 2a)^{45,62}. Se encuentra ligado con dos loci, por una parte con el locus de G-6-PD a una distancia de 500 kb y por otra parte con el locus de la ceguera al color (Figura 2b)^{4,12}.

El gen del Factor VIII posee una longitud de 186 kb, contiene 26 exones y 25 intrones. La secuencia de los exones, los límites exón-intrón y la región UTR 5' ya se han determinado. La longitud de los exones varía desde 69 hasta 262 pb, a excepción de los exones 14 y 26 que poseen un tamaño de 3106 y 1958 pb respectivamente (Figura 2c)

El mRNA tiene una longitud de 9 kb con una secuencia para codificar 7053 nucleótidos. En el intrón 22 existe una isla CpG que está asociada con dos genes adicionales. Uno de ellos tiene una longitud de 1.8 kb y produce un transcrito en una gran variedad de células³². Tiene una orientación opuesta a la del Factor VIII y no posee interrupción. A esta secuencia se denomina "gen A" asociado al Factor VIII (F8A). El segundo gen denominado "gen B" asociado al Factor VIII (F8B) tiene una longitud de 2.5 kb y se transcribe en la misma dirección que el Factor VIII utilizando los exones 23 al 26³² (Figura 2d). La función de ambos no es conocida.

El factor VIII se expresa principalmente en hígado, bazo y nódulos linfáticos. No se ha detectado en médula ósea, linfocitos ni células endoteliales. En el hígado la célula que lo sintetiza primordialmente es el hepatocito^{66,70}.

Proteína

El gen del Factor VIII codifica una proteína de 2351 aminoácidos, los primeros 19 residuos constituyen al péptido señal⁶². La proteína madura contiene 2332 aminoácidos con un peso molecular de 263,763 daltons. Posee 25 sitios potenciales de glicosilación y 23 residuos de cisteína; 14 de ellos están conservados en el Factor V, sugiriendo que ambas proteínas se pliegan de manera similar.

El Factor VIII tiene tres dominios con una homología del 30 por ciento entre sí. El primer dominio es A1, codificado por los exones 1 al 8 comprende los aminoácidos 1 al 329. El segundo dominio A2 es codificado por los exones 9 al 13 y una sección del 14, comprende los residuos 380 al 711. El dominio A3 es codificado por la región 3' del exón 14 y los exones 15 al 18 sus residuos son del 1649 al 2019.

Los dominios A poseen homología con los dominios A de las proteínas ferredoxina, ceruloplasmina y Factor V^{20,62}.

Los dominios A2 y A3 se encuentran separados por una región de 983 aminoácidos denominada dominio B. Este dominio es codificado por casi todo el exón 14, posee 19 de los 25 sitios de glicosilación. Hasta el momento no posee función conocida.

En la región carboxilo terminal de la proteína se encuentran dos dominios, C1 y C2. El dominio C1 es codificado por los exones 20 al 23, correspondiendo a los residuos 2020 al 2172⁵⁵. El dominio C2 es codificado por los exones 24 al 26 con los residuos 2173 al 2332. Estos dominios poseen una homología con las cadenas A, C y D de la discoidina I y con los dominios C del Factor V²⁹.

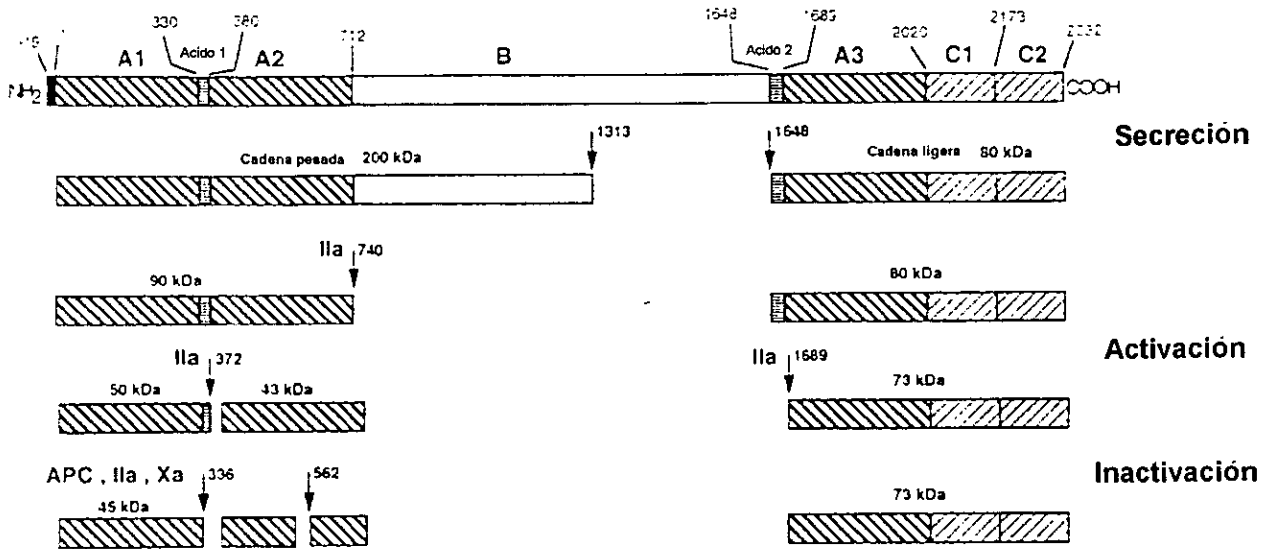


Figura 3. Cortes proteolíticos en el Factor VIII en su secreción, activación e inactivación.

El orden de los seis dominios desde extremo amino terminal al carboxilo terminal es el siguiente: A1-A2-B-A3-C1-C2⁶².

Biosíntesis del Factor VIII

El Factor VIII se sintetiza como una cadena sencilla de 2351 aminoácidos²¹. Los primeros 19 aminoácidos corresponden al péptido señal el cual es cortado en el retículo endoplásmico (RE). En el RE oligosacáridos de manosa son añadidos a los residuos de asparagina, a su vez una porción significativa de Factor VIII es unido a una proteína denominada GRP78 (proteína reguladora de glucosa 78 kDa)⁴². Se desconoce si esta proteína se secreta junto con el factor VIII o es degradada previamente⁶¹. El factor VIII pasa al aparato de Golgi en donde es cortado en los sitios R1313 y R1648 pertenecientes al dominio B. Estos cortes generan una cadena pesada de 200 kDa del extremo amino terminal y una cadena ligera

de 80 kDa del extremo carboxilo terminal (Figura 3). Así mismo se le añaden carbohidratos a los residuos serina y treonina, y se sulfatan seis residuos de tirosina en ambas cadenas⁶⁷.

En el plasma la cadena pesada se asocia iónicamente con la cadena ligera. El factor vWF es requerido para estabilizar al factor VIII uniéndose a las dos cadenas en el fluido extracelular. Además de dar estabilidad, vWF promueve las asociaciones de las dos cadenas y protege a la cadena pesada de la inactivación^{21,64}.

El factor VIII es activado por cortes proteolíticos realizados por el factor IIa en presencia de superficies fosfolipídicas⁹. El corte en la cadena pesada R740 genera un polipéptido de 90 kDa que es a su vez cortado en R372 para generar polipéptidos de 50 y 43 kDa¹³. La cadena ligera es cortada en R1689 liberando al vWF y produciendo un polipéptido de 73 kDa (Figura

3)⁴³. Después de la activación, el factor VIII es un heterodímero constituido por la subunidad A1 de 50 kDa, la subunidad A2 de 43 kDa y la subunidad A3-C1-C2 de 73 kDa. Todas las subunidades interactúan con fosfolípidos y la superficie plaquetaria⁴⁴.

El factor VIII es un participante importante en la coagulación sanguínea ya que activa al factor IXa y éste a su vez activa al Factor X. El Factor IXa, en presencia del Factor VIII activado, iones calcio y fosfolípidos cargados negativamente, realiza un corte en el extremo amino terminal del factor X produciendo factor Xa con lo cual prosigue la hemostasis⁶¹.

La inactivación del factor VIII se realiza por cortes de la proteína activada C (APC) en la regiones R336 y R562. Los factores IIa, Xa y IXa también cortan en R336. La enfermedad de trombofilia heredada en donde existe la formación de coágulos sanguíneos se debe a la resistencia del factor VIII al corte proteolítico en esta región¹¹.

Se ha observado que mutaciones en la región R740 no afectan la actividad del factor VIII^{43,44}, sin embargo mutaciones en R372 y R1689 son importantes ya que el factor IIa no puede realizar los cortes para activarlo³.

Mutaciones en la subunidad A2 resultan en la pérdida de la actividad del factor VIII. El dominio B abarca los aminoácidos 740 al 1648, deleciones de los segmentos 797 al 1652 y 759 al 1639 no interfieren con la actividad normal del factor VIII. La función específica de ambos dominios es desconocida^{9,58}.

Mutaciones en el vWF en las regiones de unión al factor VIII resultan en un fenotipo similar al de la hemofilia A pero con un modelo de herencia autosómico recesivo³⁹.

Mutaciones en el Gen FVIII

Cerca del 95 por ciento del total de las mutaciones encontradas en el gen del factor VIII son mutaciones puntuales consistentes de sustitución, eliminaciones e inserciones de segmentos pequeños de nucleótidos⁵⁹. Las eliminaciones grandes se encuentran dentro del 5 por ciento y usualmente producen hemofilia de tipo grave, estas eliminaciones se distribuyen a lo largo del gen sin patrón fijo y se producen por recombinación no homóloga de una región del gen^{1,69}.

Solamente en ocho mutaciones puntuales se ha encontrado la relación estructura-función entre el gen y la proteína. Mutaciones en los sitios de corte para el factor IIa 372 y 1689 bloquean la activación del factor VIII. Por otro lado, existen dos mutaciones que añaden dos sitios de glicosilación en la proteína en 564 y 1770. En ambos casos el factor VIII se encuentra presente en niveles normales pero está inactivo³.

La sustitución de nucleótidos se encuentra distribuida por todo el gen. Se ha visto sin embargo que las mutaciones se incrementan un poco más en la región correspondiente al dominio A2. Así mismo se ha observado que el 50% de las mutaciones que bloquean por completo los niveles de factor VIII en sangre se encuentran en este mismo dominio y probablemente estas mutaciones interfirieren en el plegamiento y estabilidad de la proteína. Estos datos sugieren que el dominio A2 puede ser el más importante en la actividad procoagulante³⁴.

El gen del factor VIII fue uno de los primeros en ser estudiado a nivel molecular y reveló una serie de mutaciones nuevas que posteriormente fueron descritas en otros genes¹⁶. Una de estas alteraciones

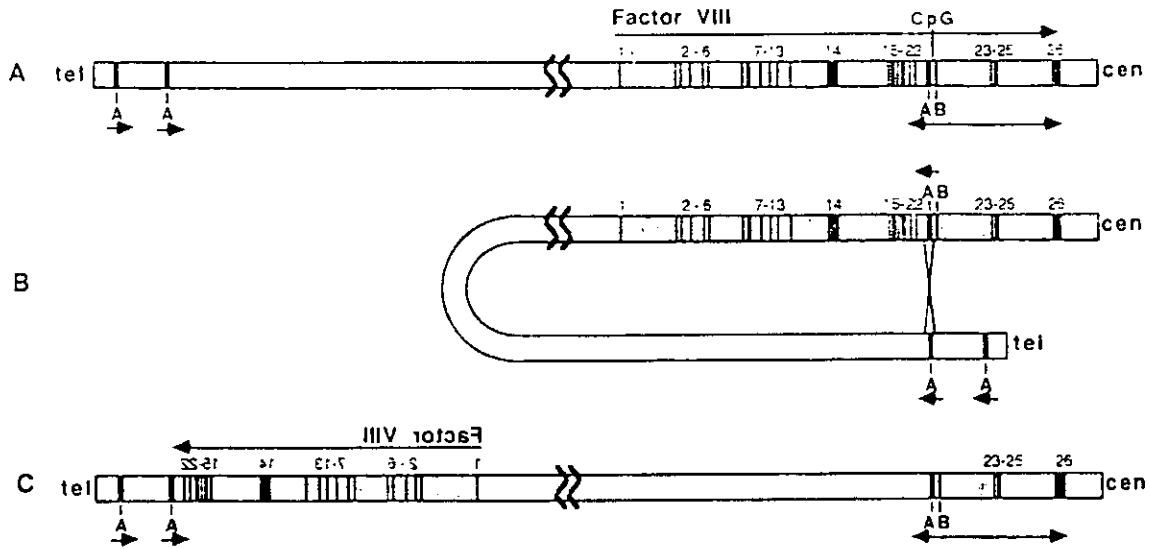


Figura 4. Inversión producida en el gen FVIII. A. Dos copias del gen F8A se encuentran río arriba hacia el telomero. B. Se puede presentar una recombinación homóloga entre el gen F8A y alguna de las dos copias. C. El gen es interrumpido en el intrón 22 y el segmento de los exones 1 al 22 quedan 400 kb río arriba en posición inversa.

fueron cambios de CG a TG⁴¹. El 35% de las mutaciones observadas en el gen del factor VIII corresponden a este tipo de cambios. Ellos se originan porque los dinucleótidos CG son los únicos que pueden ser metilados formando 5-metilcitosina, esta molécula puede ser desaminada espontáneamente originando una timina que al no ser reparada origina la mutación¹⁸.

Por otro lado, las primeras inserciones de transposones fueron descritas en 1987 en el gen FVIII en dos pacientes con elementos L1 insertados en el exón 14, estos elementos al parecer se retrotransportaron a partir de un elemento L1 activo localizado en el cromosoma 22²³.

Como ya se describió anteriormente en el intrón 22 se encuentra el gen F8A. Río arriba del extremo 5' del gen del factor VIII existen dos copias más de este gen. F8A puede unirse por mal apareamiento con alguna de estas dos copias produciendo una recombinación homóloga resultando en alguna de dos inversiones grandes que

interrumpen al gen del factor VIII. Esta inversión coloca a los exones del 1 al 22 unas 400 kb río arriba de los exones 23 al 26 y orientado en posición inversa (Figura 4). Esta alteración se encuentra presente en el 25% de todos los pacientes con hemofilia de tipo A y produce un fenotipo grave³⁸.

Diagnostico de Portadoras

De manera común las determinaciones bioquímicas del factor VIII son las más utilizadas para el diagnóstico de portadoras. Las mujeres portadoras de algún defecto en el gen FVIII poseen en promedio el 50 por ciento de factor VIII en su plasma. Sin embargo en la práctica se ha observado que los niveles de factor VIII entre mujeres normales y portadoras muchas veces se sobrelapan. Este problema tiene varias causas como: inactivación del cromosoma X al azar, edad, grupo sanguíneo, fase de respuesta aguda y estado hormonal¹⁴.

Para aumentar las probabilidades en la detección de una portadora se recurren a

cálculos estadísticos tomando en cuenta los datos bioquímicos, el grupo sanguíneo y edad. Después se recurre al análisis del árbol genealógico para poder obtener una probabilidad total. Desafortunadamente la precisión de este tipo de estudios da una certeza del 50%².

Dada la amplia variedad de mutaciones que se encuentran en el gen FVIII es muy difícil realizar el diagnóstico localizando la mutación que origina la enfermedad, por ello se recurre a métodos indirectos como el ligamiento genético de marcadores polimórficos. El principio del diagnóstico con estos polimorfismos consiste en reconocer al gen FVIII alterado en un paciente y posteriormente buscarlo en sus familiares¹⁷.

Varios polimorfismos han sido asociados con el gen FVIII. En un principio se utilizaron marcadores con fragmentos de restricción polimórficos en longitud (RFLP's) sin embargo la mayoría se encuentran fuera del gen y por lo tanto son susceptibles de sufrir un evento de recombinación con una probabilidad del 4%. Por ello los marcadores intragénicos son mas confiables para propósitos de diagnóstico. A pesar del gran tamaño del gen solamente cuatro marcadores RFLP's han sido identificados en el gen FVIII⁵. Debido a que estos marcadores son bi-alélicos se han presentado desequilibrios de ligación²⁸. Si los cuatro marcadores intragénicos son utilizados se alcanza una certeza del 65% en el diagnóstico²⁸.

A principios de los noventas se identificaron dentro y fuera del gen marcadores con secuencias variables repetidas en tandem (VNTR's). En los intrones 6, 13, 22 y 25. siendo los encontrados en los intrones 13 y 22 los más polimórficos. Fuera del gen se identificó al marcador St14⁸. Estos marcadores poseen múltiples alelos.

Precisamente su variabilidad alélica los hace muy útiles para el diagnóstico de portadoras ya que aumenta la certeza hasta casi un 99%²⁸. Para utilizar estos marcadores es necesario determinar previamente las frecuencias alélicas y su heterocigocidad. Estos datos ya han sido establecidos en poblaciones caucásica, canadiense, italiana, eslava, uzbeki y china¹⁹.

JUSTIFICACION

En México el diagnóstico de portadoras para hemofilia A se hace con métodos bioquímicos, pero como ya se ha comentado, la certeza con estos estudios es del 50%. Existen trabajos en nuestro país en los cuales se ha reportado el empleo de los marcadores RFLP's, sin embargo los resultados no han sido satisfactorios ya que presentan una certeza de entre 44 y 48% respectivamente^{6,48,50}. Con respecto a los marcadores VNTR's hasta el momento no se han determinado sus frecuencias y por lo tanto se desconoce si pueden ser útiles en el diagnóstico de portadoras en nuestro país

Por otro lado es de gran interés poder detectar la inversión característica de los exones 1 al 22 ya que se encuentra presente en el 25% de todos los casos de hemofilia, con ello se ampliaría aún mas la certeza en el diagnóstico.

OBJETIVOS

- 1) Analizar la frecuencia y heterocigocidad alélica de los marcadores VNTR's Int13, Int 22 y St14 en individuos mexicanos sanos no emparentados.
- 2) Definir el estado portador en familias mexicanas con antecedentes de hemofilia A

cálculos estadísticos tomando en cuenta los datos bioquímicos, el grupo sanguíneo y edad. Después se recurre al análisis del árbol genealógico para poder obtener una probabilidad total. Desafortunadamente la precisión de este tipo de estudios da una certeza del 50%².

Dada la amplia variedad de mutaciones que se encuentran en el gen FVIII es muy difícil realizar el diagnóstico localizando la mutación que origina la enfermedad, por ello se recurre a métodos indirectos como el ligamiento genético de marcadores polimórficos. El principio del diagnóstico con estos polimorfismos consiste en reconocer al gen FVIII alterado en un paciente y posteriormente buscarlo en sus familiares¹⁷.

Varios polimorfismos han sido asociados con el gen FVIII. En un principio se utilizaron marcadores con fragmentos de restricción polimórficos en longitud (RFLP's) sin embargo la mayoría se encuentran fuera del gen y por lo tanto son susceptibles de sufrir un evento de recombinación con una probabilidad del 4%. Por ello los marcadores intragénicos son mas confiables para propósitos de diagnóstico. A pesar del gran tamaño del gen solamente cuatro marcadores RFLP's han sido identificados en el gen FVIII⁵. Debido a que estos marcadores son bi-alélicos se han presentado desequilibrios de ligación²⁶. Si los cuatro marcadores intragénicos son utilizados se alcanza una certeza del 65% en el diagnóstico²⁸.

A principios de los noventas se identificaron dentro y fuera del gen marcadores con secuencias variables repetidas en tandem (VNTR's). En los intrones 6, 13, 22 y 25. siendo los encontrados en los intrones 13 y 22 los más polimórficos. Fuera del gen se identificó al marcador St14⁸. Estos marcadores poseen múltiples alelos.

Precisamente su variabilidad alélica los hace muy útiles para el diagnóstico de portadoras ya que aumenta la certeza hasta casi un 99%²⁸. Para utilizar estos marcadores es necesario determinar previamente las frecuencias alélicas y su heterocigocidad. Estos datos ya han sido establecidos en poblaciones caucásica, canadiense, italiana, eslava, uzbeki y china¹⁹.

JUSTIFICACION

En México el diagnóstico de portadoras para hemofilia A se hace con métodos bioquímicos, pero como ya se ha comentado, la certeza con estos estudios es del 50%. Existen trabajos en nuestro país en los cuales se ha reportado el empleo de los marcadores RFLP's, sin embargo los resultados no han sido satisfactorios ya que presentan una certeza de entre 44 y 48% respectivamente^{6,48,50}. Con respecto a los marcadores VNTR's hasta el momento no se han determinado sus frecuencias y por lo tanto se desconoce si pueden ser útiles en el diagnóstico de portadoras en nuestro país

Por otro lado es de gran interés poder detectar la inversión característica de los exones 1 al 22 ya que se encuentra presente en el 25% de todos los casos de hemofilia, con ello se ampliaría aún mas la certeza en el diagnóstico.

OBJETIVOS

- 1) Analizar la frecuencia y heterocigocidad alélica de los marcadores VNTR's Int13, Int 22 y St14 en individuos mexicanos sanos no emparentados.
- 2) Definir el estado portador en familias mexicanas con antecedentes de hemofilia A

- 3) Identificar la inversión 1-22 en individuos mexicanos afectados por hemofilia grave y sus familiares.

HIPOTESIS NULA

Los marcadores VNTR's son útiles en el diagnóstico de portadoras en nuestra población.

METODOS

Este trabajo fue evaluado y aceptado por el comité de ética del Hospital de Pediatría Centro Médico Nacional Siglo XXI IMSS, certificando la confidencialidad de los datos obtenidos. Cada participante fue informado y aceptó por escrito su colaboración.

Muestra biológica. Como grupo control se obtuvieron 80 muestras sanguíneas (160 cromosomas X) de mujeres mexicanas no emparentadas de Banco de sangre del Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS. Los pacientes se seleccionaron con diagnóstico clínico y bioquímico de hemofilia A en la Clínica de Hemofilia del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS.

Como criterios para seleccionar a las familias, se tomaron en cuenta antecedentes familiares con padres y abuelos mexicanos, número de posibles portadoras, no haber sido transfundidos al menos dos meses previos al estudio y el consentimiento por escrito para participar en el estudio. Para detectar la inversión se seleccionaron a dos familias con individuos con fenotipo grave.

Extracción de DNA. La extracción de DNA genómico se realizó a partir de 10 ml de sangre periférica utilizando la metodología descrita por Kempter²⁴, haciendo extracciones fenólicas. La concentración del DNA obtenido se determinó por espectrofotometría y la

integridad en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio al 0.5ng/ μ l³³.

Intrones 13 y 22. Las condiciones de amplificación se basaron en las reportadas por Lalloz^{27,28}, con algunas modificaciones para realizar los ensayos sin radioactividad. En un volumen final de 25 μ l se añadieron 0.25 mM de cada desoxinucleótido trifosfato (dNTP), 3.5 mM de MgCl₂, 20 pmol de cada oligonucleótido (Tabla II), 300 ng de DNA genómico y 1 unidad de Taq polimerasa. Las condiciones del termociclador fueron: desnaturalización inicial 5 min 95°C, 35 ciclos de 35 seg a 94°C, 1 min a 52°C (intrón 13) ó 54°C (intrón 22), 1 min 72°C, extensión final de 5 min por 72°C. Los productos de amplificación se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida como se describe más adelante.

Tabla II. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para amplificar los marcadores 13, 22 y St14, así como los utilizados en la Inversión 1-22.

SECUENCIA DE OLIGONUCLEÓTIDOS
Int13 5' GCATCACTGTACATATGTATCTT 3' 5' CAAATTACATATGAATAAGCC 3'
Int22 5' TTCTAAGAATGTAGTGTGTG 3' 5'TAATGCCCATATTATAGA 3'
St14 5' GGCATGTCATCACTTCTCTCATGTT 3' 5' CACCACTGCCCTCACGTCACCT 3'
Inversión 1-22 P 5' CCCTGCCTGTCCATTACACTGATGACATTATGCTGAC 3' Q 5' GCCTACAACCATTCTGCCTTCACTTTTCAGTGCAATA 3' A 5' ACAAGGGGGGAAGAGTGTGAGGGTGTGGGATAAGAA 3' B 5' CCCAACTATAACCAGCACCTTGAACCTTACCCTCT 3'

Marcador St14. Las condiciones utilizadas para amplificar este marcador fueron descritas por Richards⁴⁷. En un volumen final

- 3) Identificar la inversión 1-22 en individuos mexicanos afectados por hemofilia grave y sus familiares.

HIPOTESIS NULA

Los marcadores VNTR's son útiles en el diagnóstico de portadoras en nuestra población.

METODOS

Este trabajo fue evaluado y aceptado por el comité de ética del Hospital de Pediatría Centro Médico Nacional Siglo XXI IMSS, certificando la confidencialidad de los datos obtenidos. Cada participante fue informado y aceptó por escrito su colaboración.

Muestra biológica. Como grupo control se obtuvieron 80 muestras sanguíneas (160 cromosomas X) de mujeres mexicanas no emparentadas de Banco de sangre del Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS. Los pacientes se seleccionaron con diagnóstico clínico y bioquímico de hemofilia A en la Clínica de Hemofilia del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS.

Como criterios para seleccionar a las familias, se tomaron en cuenta antecedentes familiares con padres y abuelos mexicanos, número de posibles portadoras, no haber sido transfundidos al menos dos meses previos al estudio y el consentimiento por escrito para participar en el estudio. Para detectar la inversión se seleccionaron a dos familias con individuos con fenotipo grave.

Extracción de DNA. La extracción de DNA genómico se realizó a partir de 10 ml de sangre periférica utilizando la metodología descrita por Kempter²⁴, haciendo extracciones fenólicas. La concentración del DNA obtenido se determinó por espectrofotometría y la

integridad en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio al 0.5ng/ μ l³³.

Intrones 13 y 22. Las condiciones de amplificación se basaron en las reportadas por Lalloz^{27,28}, con algunas modificaciones para realizar los ensayos sin radioactividad. En un volumen final de 25 μ l se añadieron 0.25 mM de cada desoxinucleótido trifosfato (dNTP), 3.5 mM de MgCl₂, 20 pmol de cada oligonucleótido (Tabla II), 300 ng de DNA genómico y 1 unidad de Taq polimerasa. Las condiciones del termociclador fueron: desnaturalización inicial 5 min 95°C, 35 ciclos de 35 seg a 94°C, 1 min a 52°C (intrón 13) ó 54°C (intrón 22), 1 min 72°C, extensión final de 5 min por 72°C. Los productos de amplificación se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida como se describe más adelante.

Tabla II. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para amplificar los marcadores 13, 22 y St14, así como los utilizados en la Inversión 1-22.

SECUENCIA DE OLIGONUCLEÓTIDOS
Int13 5' GCATCACTGTACATATGTATCTT 3' 5' CAAATTACATATGAATAAGCC 3'
Int22 5' TTCTAAGAATGTAGTGTGTG 3' 5'TAATGCCCATATTATAGA 3'
St14 5' GGCATGTCATCACTTCTCTCATGTT 3' 5' CACCACTGCCCTCACGTCACCTT 3'
Inversión 1-22 P 5' CCCTGCCTGTCCATTACACTGATGACATTATGCTGAC 3' Q 5' GCCTACAACCATTCTGCCTTTCACITTCAGTGCAATA 3' A 5' ACAAAGGGGGAAGAGTGTGAGGGTGTGGGATAAGAA 3' B 5' CCCAACTATAACCAGCACCTTGAACCTACCCTCT 3'

Marcador St14. Las condiciones utilizadas para amplificar este marcador fueron descritas por Richards⁴⁷. En un volumen final

de 25µl se añadieron 0.25mM de cada dNTP's, 1.5 mM de MgCl₂, 20 pmol de cada oligonucleótido (Tabla II), 250 ng de DNA genómico y 1 unidad de Taq polimerasa. Las condiciones del termociclador fueron: desnaturalización inicial 5 min 94° C, 24 ciclos de 20 seg a 94°C, 30 seg a 55° C y 20 seg a 74° C, extensión final de 5 min a 74° C. Los productos de amplificación se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio (0.5/µl).

Inversión 1-22. La reacción se realizó en base al trabajo de Qiang⁴⁶. En un volumen final de 50µl se añadieron 0.25 mM de dGTP y dGTP7-deaza, 0.5mM de los restantes dNTP's, 7.5% de dimetilsulfóxido (DMSO), 40 pmol de los oligonucleótidos P y Q, 12 pmol de los oligonucleótidos A y B. (Tabla II), 2.25 mM de MgCl₂, 3.3 unidades de Taq "Spand Long Template" (Roche) y 250 ng de DNA genómico. Las condiciones del termociclador fueron: desnaturalización inicial de 2 minutos a 94°C, 10 ciclos de 12 seg a 94°C, 30 seg a 65°C, 12 min a 68°C, 20 ciclos de 12 seg a 94°C, 30 seg a 65°C, 12 min a 65°C con 20 seg mas por cada ciclo adicional. Extensión final de 15 min a 68°C. Los productos de amplificación se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 0.6%. El gel se analizó mediante el sistema de análisis digital IS1000 de Alpha Innotech.

Geles de poliacrilamida. Se construyó una cámara de electroforesis para geles de poliacrilamida de 33 cm de longitud con separadores de 1.2 mm de espesor. La electroforesis se llevó a cabo en geles de poliacrilamida al 8% no desnaturalizantes a un voltaje de 650 Volts. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio a 0.5ng/µl. El tamaño de bandas fue obtenido mediante regresión lineal utilizando el sistema de imagen digital IS1000 de Alpha innotech.

Digestión con enzima Taq I. Algunos productos de amplificación del marcador St14 fueron sometidos a digestión con la endonucleasa Taq I. En un volumen final de 20µl se añadieron 13µl del producto de amplificación, 2µl de buffer de digestión y 5U de enzima Taq I (Gibco). La incubación se realizó por 2 horas a 65°C⁵². Los productos de digestión fueron corridos en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio.

RESULTADOS

Haplotipos

Los haplotipos de individuos no emparentados fueron utilizados para definir la frecuencia alélica así como la heterocigocidad de los marcadores Int13, Int22 y St14. Se analizaron 160 cromosomas X de mujeres mestizas mexicanas no emparentadas. Fueron 8 los alelos encontrados para el intrón 13, sus tamaños y frecuencias se muestran en la tabla III, el rango de repetidos fué de (CA)₁₉ a (CA)₂₆ (Figura 5). De acuerdo al número de alelos la heterocigocidad esperada era de 83%, sin embargo la observada fue del 41.3%. La frecuencia de heterocigocidad observada respecto a la esperada ($P < 0.001$) fue estadísticamente significativa (tabla III).

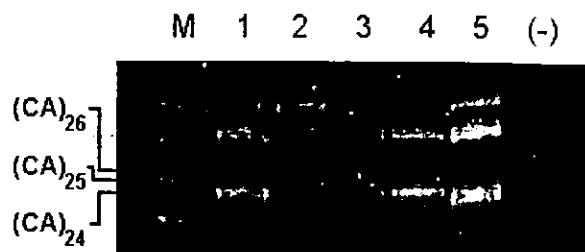


Figura 5. Gel de poliacrilamida al 8% mostrando los haplotipos del marcador Int13 en individuos normales. Carril 2 alelos (CA)₂₅ y (CA)₂₆, Carriles 1, 3 y 4 alelo (CA)₂₄ M marcador de peso molecular, (-) control negativo

de 25 μ l se añadieron 0.25mM de cada dNTP's, 1.5 mM de MgCl₂, 20 pmol de cada oligonucleótido (Tabla II), 250 ng de DNA genómico y 1 unidad de Taq polimerasa. Las condiciones del termociclador fueron: desnaturalización inicial 5 min 94° C, 24 ciclos de 20 seg a 94°C, 30 seg a 55° C y 20 seg a 74° C, extensión final de 5 min a 74° C. Los productos de amplificación se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio (0.5/ μ l).

Inversión 1-22. La reacción se realizó en base al trabajo de Qiang⁴⁶. En un volumen final de 50 μ l se añadieron 0.25 mM de dGTP y dGTP7-deaza, 0.5mM de los restantes dNTP's, 7.5% de dimetilsulfóxido (DMSO), 40 pmol de los oligonucleótidos P y Q, 12 pmol de los oligonucleótidos A y B. (Tabla II), 2.25 mM de MgCl₂, 3.3 unidades de Taq "Spand Long Template" (Roche) y 250 ng de DNA genómico. Las condiciones del termociclador fueron: desnaturalización inicial de 2 minutos a 94°C, 10 ciclos de 12 seg a 94°C, 30 seg a 65°C, 12 min a 68°C, 20 ciclos de 12 seg a 94°C, 30 seg a 65°C, 12 min a 65°C con 20 seg mas por cada ciclo adicional. Extensión final de 15 min a 68°C. Los productos de amplificación se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 0.6%. El gel se analizó mediante el sistema de análisis digital IS1000 de Alpha Innotech.

Geles de poliacrilamida. Se construyó una cámara de electroforesis para geles de poliacrilamida de 33 cm de longitud con separadores de 1.2 mm de espesor. La electroforesis se llevó a cabo en geles de poliacrilamida al 8% no desnaturalizantes a un voltaje de 650 Volts. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio a 0.5ng/ μ l. El tamaño de bandas fue obtenido mediante regresión lineal utilizando el sistema de imagen digital IS1000 de Alpha innotech.

Digestión con enzima Taq I. Algunos productos de amplificación del marcador St14 fueron sometidos a digestión con la endonucleasa Taq I. En un volumen final de 20 μ l se añadieron 13 μ l del producto de amplificación, 2 μ l de buffer de digestión y 5U de enzima Taq I (Gibco). La incubación se realizó por 2 horas a 65°C⁵². Los productos de digestión fueron corridos en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio.

RESULTADOS

Haplotipos

Los haplotipos de individuos no emparentados fueron utilizados para definir la frecuencia alélica así como la heterocigocidad de los marcadores Int13, Int22 y St14. Se analizaron 160 cromosomas X de mujeres mestizas mexicanas no emparentadas. Fueron 8 los alelos encontrados para el intrón 13, sus tamaños y frecuencias se muestran en la tabla III, el rango de repetidos fué de (CA)₁₉ a (CA)₂₆ (Figura 5). De acuerdo al número de alelos la heterocigocidad esperada era de 83%, sin embargo la observada fue del 41.3%. La frecuencia de heterocigocidad observada respecto a la esperada ($P < 0.001$) fue estadísticamente significativa (tabla III).

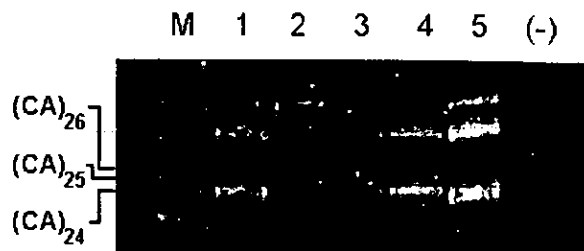


Figura 5. Gel de poliacrilamida al 8% mostrando los haplotipos del marcador Int13 en individuos normales. Carril 2 alelos (CA)₂₅ y (CA)₂₆, Carriles 1, 3 y 4 alelo (CA)₂₄ M marcador de peso molecular, (-) control negativo

El marcador Int22 tuvo 4 alelos en nuestra población, sus tamaños y frecuencias se muestran en la tabla III. Los alelos encontrados fueron $(CA)_{26}$ (3.9%), $(CA)_{25}$ (34.2%), $(CA)_{24}$ (48.6%) y $(CA)_{23}$ (13.1%) (Figura 6). La heterocigocidad esperada fue de 64% y la observada de 52.6%, estas diferencias fueron estadísticamente significativas.

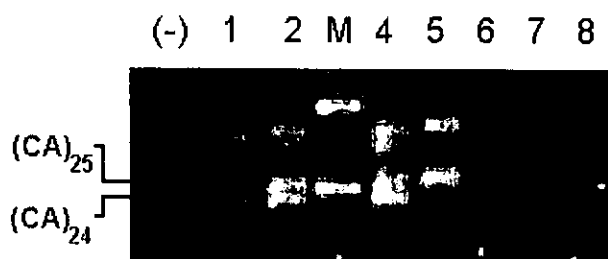


Figura 6. Productos de amplificación del marcador Int22 en población abierta en un gel de poliacrilamida al 8%. Se puede apreciar los alelos $(CA)_{24}$ y $(CA)_{25}$. M marcador de peso molecular, (-) control negativo.



Figura 7. Gel de Agarosa al 1% con amplificadas del marcador St14 en población normal. Entre otros alelos se aprecian los alelos de 3000 pb, 1300 pb y el nuevo alelo identificado de 680 pb. M marcador de peso molecular, (-) control negativo.

Para el marcador St14 se encontraron 10 alelos (Figura 7) cuyos tamaños y frecuencias se muestran en la tabla III. El alelo de 680 pb no se ha reportado en otras poblaciones y obtuvo la mayor frecuencia con un 30%, lo cual sugiere que puede ser un marcador característico de nuestra población.

Tabla III Alelos y frecuencias de los marcadores St14, Int13 e Int22 encontrados en población mexicana

	St14*	Int13	Int22
	680 [30]	$(CA)_{19}$ [2.6]	$(CA)_{23}$ [13.1]
	884 [3]	$(CA)_{20}$ [9.3]	$(CA)_{24}$ [48.6]
	1187 [3]	$(CA)_{21}$ [16]	$(CA)_{25}$ [34.2]
	1220 [6]	$(CA)_{22}$ [8.6]	$(CA)_{26}$ [3.9]
	1300 [12]	$(CA)_{23}$ [14]	
	1390 [4]	$(CA)_{24}$ [14]	
	1570 [26]	$(CA)_{25}$ [10]	
	1630 [1]	$(CA)_{26}$ [5.3]	
	1690 [7]		
	3000 [0.03]		
H. E.	80	83	64
H. O.	83	41.3	52.6
X^2	0.11	20.9	2.03
P	0.8-0.70	<0.001	0.5-0.3

Los porcentajes de las frecuencias alélicas se encuentran en corchetes, *alelos en pares de bases. H. O. = Heterocigocidad observada, H. E.= Heterocigocidad esperada = $1 - (p^2 + q^2 + r^2 \dots)$ donde p, q y r son la frecuencia de alelos),

La heterocigocidad observada para el St14 fue de 83% mientras que la esperada fue del 81% lo que lo hace el mejor marcador para el diagnóstico de portadoras.

Diagnóstico de portadoras

El diagnóstico de portadoras fue realizado en 39 mujeres pertenecientes a ocho familias mexicanas con antecedentes familiares de la enfermedad. Se aseguró que los pacientes no hubieran sido transfundidos al menos en los dos últimos meses para evitar falsos positivos. De las 39 mujeres analizadas 16 fueron portadoras, 15 no y en 8 no se logró determinar su condición. Las mujeres informativas fueron heterocigotas para al menos uno de los marcadores utilizados. El marcador St14 fue informativo en 31 mujeres (79.4%), le siguió el Int22 en 18 (46.1%) y finalmente el int13 en 8 mujeres (20.5%)

En la figura 8 se muestra el diagnóstico molecular para portadoras en una familia mexicana usando el marcador St14. La madre I-1 es heterocigota para este marcador posee los alelos 680 y 3000, su hijo II-1 heredó el alelo de 3000pb que segrega con la enfermedad. La hermana de la señora I-2 tiene el mismo patrón de bandas por lo tanto es portadora, sin embargo a su hija II-2 heredó el alelo de 680, por lo cual no es portadora. Sus sobrinas II-3 y II-4 no poseen el alelo 3000 por lo que ellas tampoco son portadoras.

En la figura 9 se muestra el diagnóstico molecular de portadoras en la familia 2 con el marcador St14. La madre I-1 posee los alelos 680 y 1690, su hijo II-1 heredó el alelo 1690 siendo éste el que segrega con la enfermedad. La tía del afectado (I-2) es portadora: Cabe señalar que I-2 tiene también un hijo con hemofilia por lo cual se confirma su estado portador, a su hija II-2 le heredó el alelo 1690 por lo que ella también es portadora.

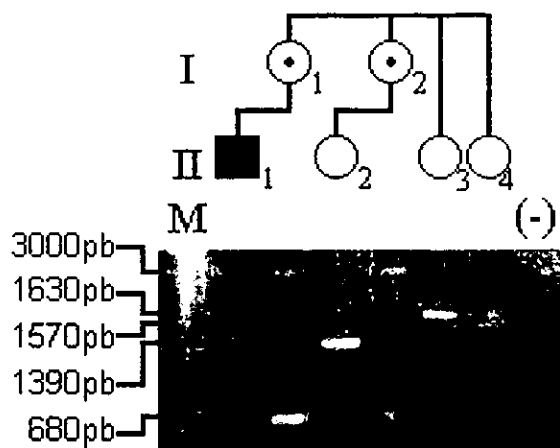


Figura 8. Gel de agarosa al 1% en donde se muestra el diagnóstico de portadoras utilizando el marcador St14 en la familia 1, en este caso el alelo que segrega la enfermedad es el de 3000pb. M marcador de peso molecular, (-) control negativo.

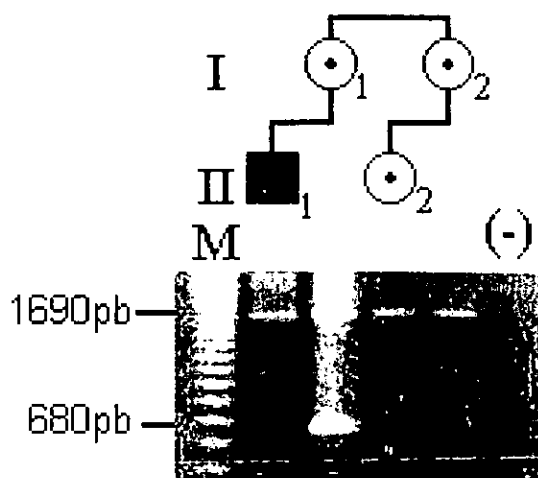


Figura 9. Fotografía de un gel de agarosa al 1% con los productos de amplificación del marcador St14 en la familia 2. M marcador de peso molecular, (-) control negativo.

En la figura 10 se muestra el diagnóstico molecular de portadoras en la familia 3 con el marcador St14. La madre I-1 posee los alelos 1390 y 1690, su hijo (II-1) heredó el alelo de 1690 el cual segrega con la enfermedad. Sus hijas II-3 y II-4 fueron

homocigotas para este mismo alelo por lo que son portadoras. Dado que este paciente posee hemofilia de tipo severo fue elegido para buscar la inversión característica del gen lo cual se describe mas adelante.

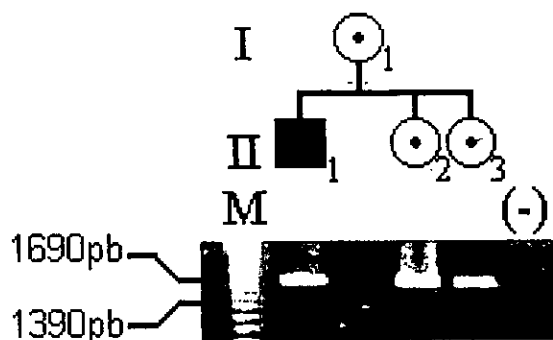


Figura 10. Imagen de un gel de agarosa al 1% con amplificaciones del marcador St14 en la familia 3. En esta familia ambas hermanas fueron homocigotas para el alelo de 1690 pb y por lo tanto fueron portadoras. M marcador de peso molecular, (-) control negativo.

El diagnóstico de hemofilia con el marcador St14 de la familia 4 se describe en la figura 11. La madre (I-1) posee los alelos 680 y 1690, su hijo (II-1) heredó el alelo 1690, que segrega con la enfermedad. En esta familia existen ocho mujeres que faltan por determinar su estado, ellas habitan en provincia por lo que la toma de muestra no se pudo llevar a cabo durante el estudio. Dado que los alelos ya están definidos, cuando en ellas se realice el estudio por comparación de los mismos se podrá realizar el diagnóstico.

En la figura 12 se muestra el diagnóstico de la familia 6 con el marcador St14. La madre I-1 posee los alelos 680 y 1630, su hijo heredó el alelo 1630. Su hija posee el alelo materno 680 y el paterno 1300 por lo que ella no es portadora.

En la figura 13 se muestra el diagnóstico con el marcador St14 para la familia 7. La madre

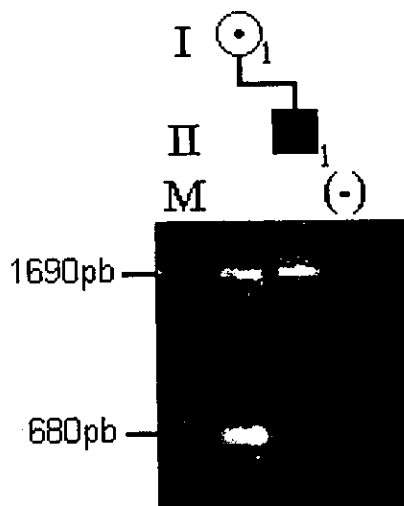


Figura 11. Gel de agarosa al 1% en donde se observa la determinación del alelo que segrega con la enfermedad en la familia 4 utilizando el marcador St14. M marcador de peso molecular, (-) control negativo.

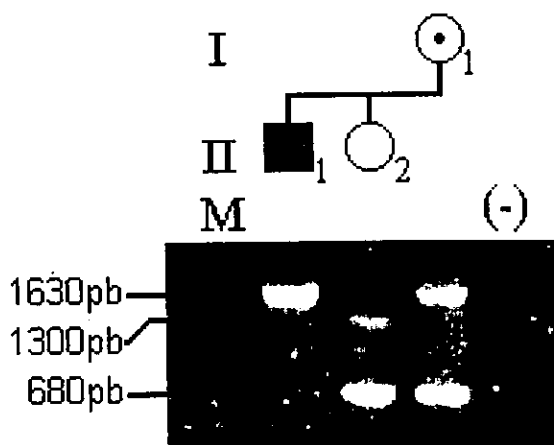


Figura 12. electroforesis en un gel de agarosa al 1%. Utilizando el marcador St14 se definió en la familia 6 que el alelo que segrega con la enfermedad es el de 1630pb. M marcador de peso molecular, (-) control negativo.

I-1 fue homocigota para el alelo 680, su hijo II-1 también posee este alelo. Dada esta situación no se puede determinar el alelo que esta segregando con la enfermedad por lo que en las mujeres II-2, II-3 y II-4 no se puede definir su estado. Sin embargo en las mujeres II-5, II-6 y II-7 se descarta que sean

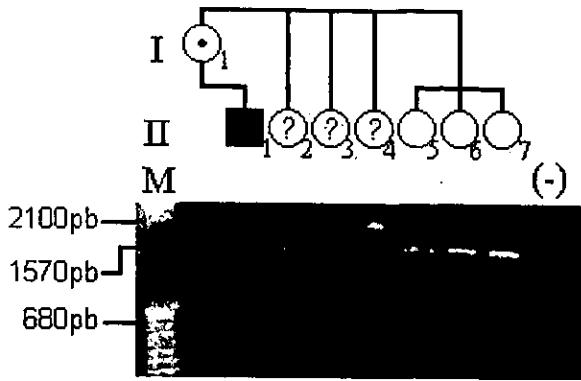


Figura 13. Gel de agarosa al 1% con amplificaciones del marcador St14 en la familia 7 en donde las mujeres II-5, II-6 y II-7 se definieron como no portadoras al ser homocigotas para el alelo 1570pb. M marcador de peso molecular, (-) control negativo.

portadoras ya que ellas son homocigotas para el alelo 1570. La madre de ellas tuvo tres varones, pero ninguno de ellos tuvo la enfermedad por lo que se puede afirmar que ella tampoco es portadora.

Solamente la familia ocho fue informativa para los tres marcadores. Para el marcador St14 (Figura 14a) la madre I-1 posee los alelos 680 y 1690, el individuo índice II-1 posee el alelo de 1690 pb y por lo tanto es el alelo que segrega con la enfermedad, su hermana II-2 posee los alelos 1690 de su madre y 1390 de su padre y por lo tanto es portadora, la otra hermana II-3 posee el alelo 1390 del padre y 680 de la madre, por lo que no es portadora. Con el marcador Int22 (Figura 14b) la madre I-1 es heterocigota para los alelos (CA)₂₅ y (CA)₂₆, su hijo II-1 heredó el alelo (CA)₂₆, su hija II-2 es homocigota para ambos alelos paternos (CA)₂₆ y por lo tanto es portadora, su hermana II-3 heredó el alelo paterno (CA)₂₆ y el materno (CA)₂₅ por lo que ella no es portadora. Con el marcador Int13 (Figura 14c) la madre fue heterocigota con los alelos (CA)₂₂ y (CA)₂₃, a su hijo I-1 heredó el alelo (CA)₂₂; su hija II-2 fue nuevamente

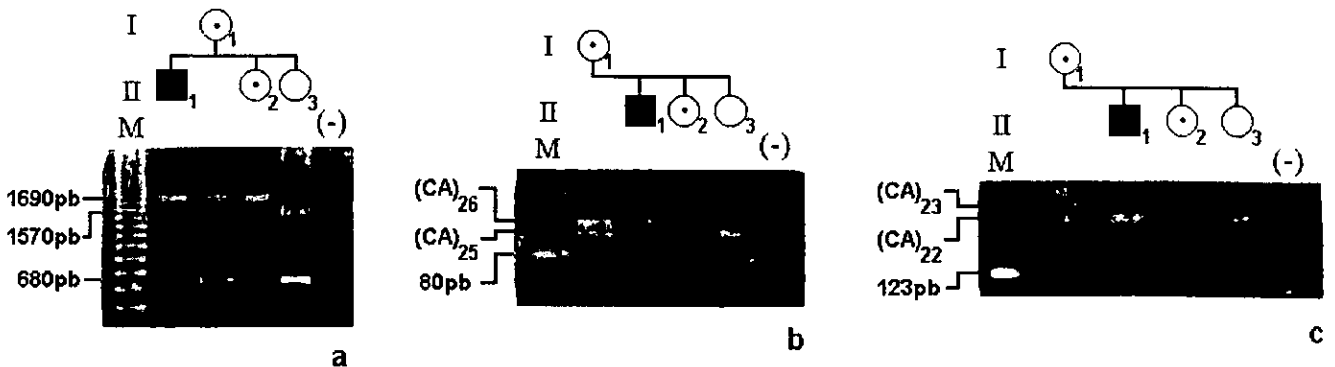


Figura 14. Diagnóstico de portadoras utilizando los marcadores St14, Int13 e Int22 en la Familia 8. a. Gel de agarosa al 1% utilizando el marcador St14, el alelo que segrega con la enfermedad es de 1690pb por lo tanto II-2 es portadora y II-3 no lo es, b. Gel de poliacrilamida al 8% con los productos de amplificación del marcador Int13, con este marcador el alelo que segrega con la enfermedad es el (CA)₂₆ materno, por los alelos presentes en las hijas se observa que el padre posee este mismo alelo y por lo tanto II-2 al ser homocigota para el se define como portadora, c. Gel de poliacrilamida al 8% mostrando el diagnóstico con el marcador Int22, con este marcador el alelo que segrega con la enfermedad es el (CA)₂₂ y nuevamente al ser homocigota II-2 se define como portadora. M marcador de peso molecular, (-) control negativo.

homocigota para ambos alelos paternos $(CA)_{22}$ y se comprueba que es portadora. Su hermana II-3 heredó el alelo materno $(CA)_{23}$ y el paterno $(CA)_{22}$ y nuevamente se comprueba que no es portadora.

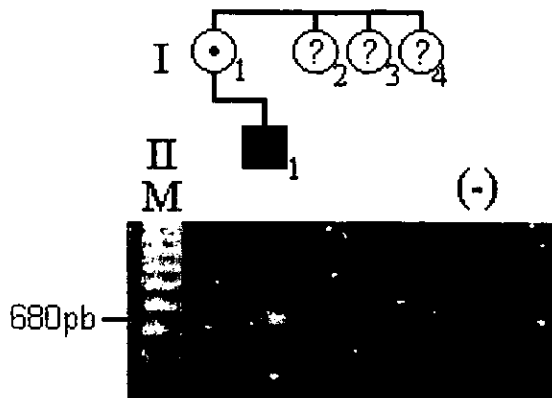


Figura 15. Gel de agarosa al 1% donde se muestra los productos de amplificación del marcador St14 en la familia 9, todos los individuos fueron homocigotos para el fragmento de 680pb. M marcador de peso molecular, (-) control negativo.

En la familia 9 se presentó un caso particular ya que las mujeres de esta familia fueron homocigotas para los tres marcadores. En el caso del marcador St14 (Figura 15) se observa que tanto la madre I-1 como sus hermanas I-2, I-3 y I-4 son homocigotas para el alelo 680. Para poder diferenciar al alelo que segrega con la enfermedad se realizó la digestión de estos con la enzima Taq I. Se obtuvieron dos fragmentos de 200 y 480 pb en las cuatro mujeres y el individuo índice (Figura 16). Nuevamente las mujeres fueron homocigotas por lo que no se pudo definir su estado.

Determinación de la inversión

Para determinar la inversión se citó a una familia sin antecedentes de la enfermedad y con fenotipo severo. Dado el desarrollo del

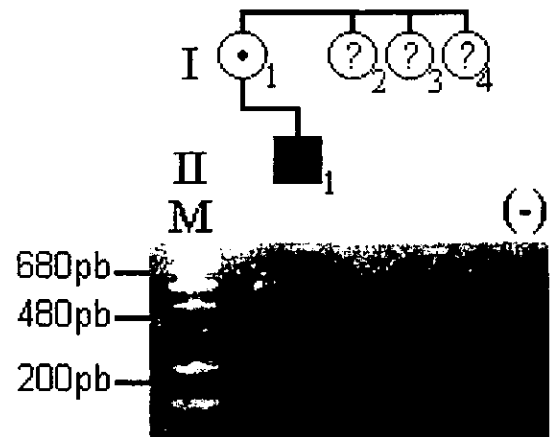


Figura 16. Gel de agarosa al 1% con los productos de la digestión de amplificados del marcador St14 utilizando la enzima Taq I en la familia 9. En este caso todos los individuos fueron homocigotos para los fragmentos de 200 y 400pb y por lo tanto no se pudo definir el estado de las mujeres. M marcador de peso molecular. (-) control negativo.

experimento (ver en discusión) se pueden esperar solamente tres productos de amplificación: 12, 11 y 10kb. Los amplificados de 12 y 10kb representan a los alelos normales y el amplificado de 11kb evidencia una recombinación del gen la cual produce la inversión del mismo. En la figura 17 observamos que el individuo índice posee dos amplificados, uno de 10 kb que es uno de los alelos normales y otro de 11kb el cual representa una inversión en el gen. El fenotipo de este paciente era grave, presentaba valores de actividad del Factor VIII menores a 1%, frecuentes sangrados espontáneos en músculos y articulaciones de la cadera. Las rodillas y codos habían perdido la mayor parte de su movilidad por lo que su capacidad ambulatoria era muy reducida. Sus hermanas II-2 y II-3 tienen los amplificados de 10 y 12 kb por lo tanto ellas no portan la inversión. La madre I-1 también tiene ambos amplificados por lo que no es portadora y su hijo tiene la enfermedad probablemente por una mutación *de novo* o por un mosaico germinal en la madre.

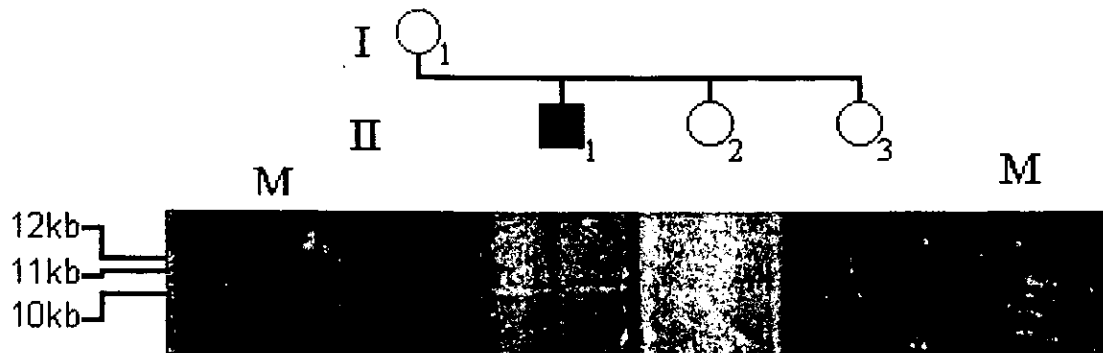


Figura 17. Gel de agarosa al 0.6% teñido con bromuro de etidio con los productos de amplificación para la Identificación de la inversión característica del gen FVIII en la familia 5. Se observa que el individuo II-1 posee el amplificado de 11 kb, evidenciando la inversión, sus hermanas II-2 y II-3 poseen los amplificados de 10 y 12 kb, por lo tanto no son portadoras. M marcador de peso molecular.

Se maneja que los marcadores de tipo VNTR's únicamente son útiles cuando existen antecedentes hereditarios de la enfermedad, sin embargo en esta familia se utilizó el marcador St14 para confirmar el estado no portador de las hijas. Dado que no existen antecedentes familiares se determina solamente si el alelo del paciente lo poseen sus hermanas. Si las hermanas poseen el alelo de su hermano no se pudo afirmar que son portadoras dado que se desconoce el origen de la enfermedad, ya sea por mutación *de novo* o mosaico germinal. Sin embargo si ellas presentan un alelo diferente al de su hermano se descarta que sean portadoras puesto que tendrían el alelo que no esta involucrado en la mutación. En la figura 18 observamos que el paciente II-1 posee el alelo materno 1630, sus hermanas II-2 y II-3 poseen el alelo 680 materno por lo tanto ellas no son portadoras.

Se realizó el ensayo para evidenciar la inversión en la familia tres, en donde el caso índice posee un fenotipo grave y sus hermanas por medio del marcador St14 fueron portadoras. En la figura 19 se observa

que el propositus posee los amplificados de 10 y 12 kb, no posee el amplificado de 11kb y por lo tanto la enfermedad se originó por otra mutación diferente a la inversión. A si mismo sus hermanas y su madre tienen los amplificados de 10 y 12 kb.

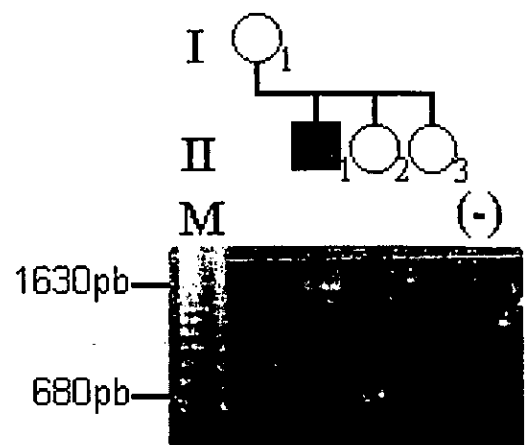


Figura 18. Gel de agarosa al 1%. Utilizando el marcador St14 se comprobó en la familia 5, que II-2 y II-3 no son portadoras ya que no poseen el alelo de 1630pb. M marcador de peso molecular, (-) control negativo.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

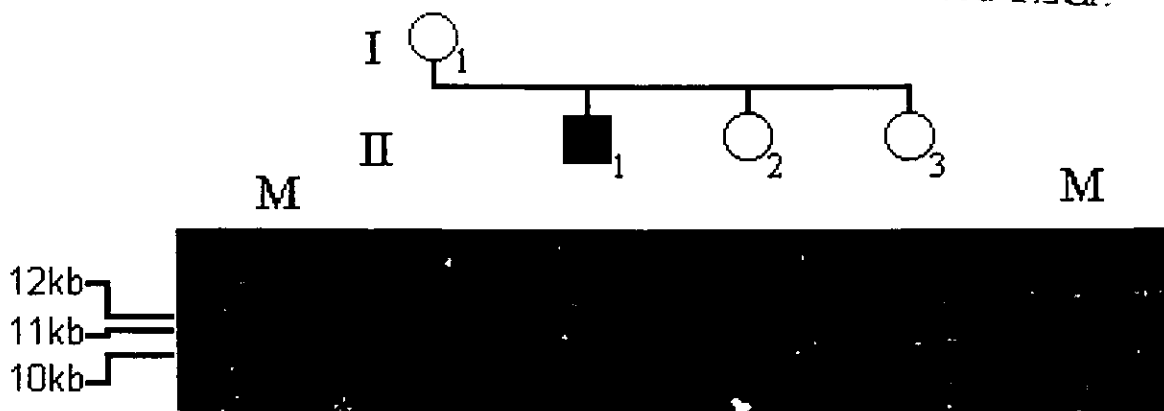


Figura 19. Gel de agarosa al 0.6% en donde se observa los productos de amplificación para identificar la inversión del gen FVIII en la familia 3. En este caso todos los individuos poseen amplificadores de 10 y 12 kb por lo que la alteración en esta familia se debe a otra mutación en el gen. M marcador de peso molecular.

DISCUSION

Se ha observado que en la mayoría de los pacientes con hemofilia presentan una mutación nueva. Antonarakis predijo que una tercera parte de todos los casos aislados podrían producirse como una mutación *de novo* en mujeres no portadoras, otra tercera parte puede producirse por una mutación generada en los abuelos maternos y el restante por mutaciones *de novo* en los pacientes. Esta predicción se ha comprobado en estudios moleculares de la enfermedad. Dado que no existen puntos calientes de mutaciones en el gen del factor VIII prácticamente cada caso no relacionado de hemofilia A posee una mutación diferente. En estudios moleculares se ha observado que más del 50% de pacientes no emparentados posee una mutación diferente^{1,2}.

Dada la alta incidencia de nuevas mutaciones en el gen es imposible realizar un diagnóstico de portadoras buscando la mutación a lo largo del gen en cada familia.

Los primeros estudios moleculares para diagnóstico utilizaban marcadores RFLP's fuera del gen FVIII. Con la caracterización del mismo en 1984 se identificaron marcadores RFLP's dentro del él y finalmente en la década de los noventas se identificaron marcadores VNTR's.

Los estudios con marcadores RFLP fueron sin duda un gran avance en el diagnóstico de portadoras, sin embargo debido a que ellos poseen polimorfismos dialélicos su rango de heterocigocidad utilizando varios marcadores RFLP's a la vez, nunca es mayor al 65%³⁷, además la información adicional que cada marcador pueda proporcionar puede fallar ante un desequilibrio de ligamiento, de hecho en nuestro país estos marcadores no son útiles en el diagnóstico de la hemofilia ya que presentan una efectividad del 44%⁵⁰.

Los marcadores VNTR's esparcidos por el genoma son efectivos en varias enfermedades debido a su gran

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

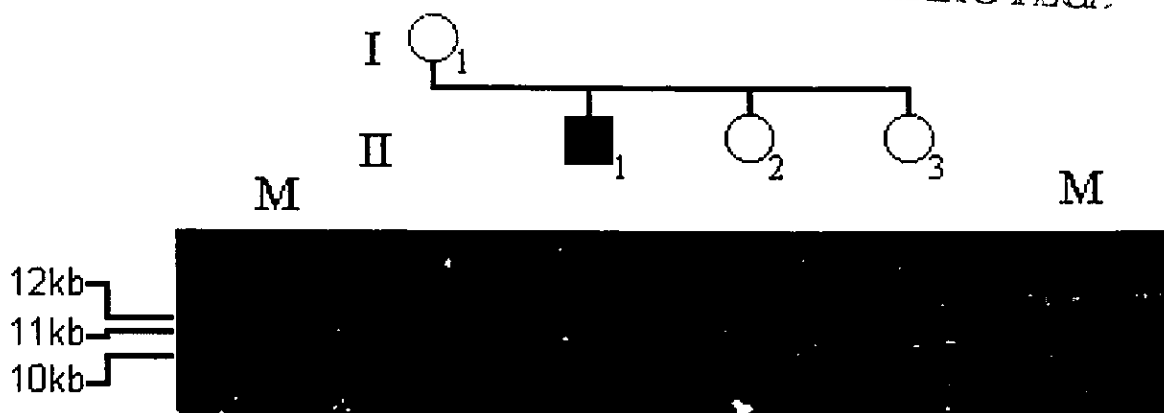


Figura 19. Gel de agarosa al 0.6% en donde se observa los productos de amplificación para identificar la inversión del gen FVIII en la familia 3. En este caso todos los individuos poseen amplificadores de 10 y 12 kb por lo que la alteración en esta familia se debe a otra mutación en el gen. M marcador de peso molecular.

DISCUSION

Se ha observado que en la mayoría de los pacientes con hemofilia presentan una mutación nueva. Antonarakis predijo que una tercera parte de todos los casos aislados podrían producirse como una mutación *de novo* en mujeres no portadoras, otra tercera parte puede producirse por una mutación generada en los abuelos maternos y el restante por mutaciones *de novo* en los pacientes. Esta predicción se ha comprobado en estudios moleculares de la enfermedad. Dado que no existen puntos calientes de mutaciones en el gen del factor VIII prácticamente cada caso no relacionado de hemofilia A posee una mutación diferente. En estudios moleculares se ha observado que más del 50% de pacientes no emparentados posee una mutación diferente^{1,2}.

Dada la alta incidencia de nuevas mutaciones en el gen es imposible realizar un diagnóstico de portadoras buscando la mutación a lo largo del gen en cada familia.

Los primeros estudios moleculares para diagnóstico utilizaban marcadores RFLP's fuera del gen FVIII. Con la caracterización del mismo en 1984 se identificaron marcadores RFLP's dentro del él y finalmente en la década de los noventas se identificaron marcadores VNTR's.

Los estudios con marcadores RFLP fueron sin duda un gran avance en el diagnóstico de portadoras, sin embargo debido a que ellos poseen polimorfismos dialélicos su rango de heterocigocidad utilizando varios marcadores RFLP's a la vez, nunca es mayor al 65%³⁷, además la información adicional que cada marcador pueda proporcionar puede fallar ante un desequilibrio de ligamiento, de hecho en nuestro país estos marcadores no son útiles en el diagnóstico de la hemofilia ya que presentan una efectividad del 44%⁵⁰.

Los marcadores VNTR's esparcidos por el genoma son efectivos en varias enfermedades debido a su gran

polimorfismo⁵⁶. A pesar del gran tamaño del gen del factor VIII hasta la fecha únicamente se han encontrado dos marcadores de tipo VNTR's útiles para el diagnóstico localizados en el intrón 13 y en el intrón 22. Dada la información que estos marcadores han mostrado, se ha recurrido a un marcador localizado fuera del gen, el marcador St14³⁰, que a pesar de su distancia de 2 cM del gen FVIII⁴⁷ posee un rango de confianza del 95%^{25,40}, de hecho solo se han reportado 17 recombinaciones desde su descubrimiento. Se ha demostrado que al utilizar marcadores VNTR's la probabilidad de error se encuentra por debajo del 1%³¹. En nuestro país para estos tres marcadores no se conoce el polimorfismo ni la heterocogocidad. De acuerdo a un análisis realizado en 100 familias con hemofilia del Hospital de Pediatría, se encontró que por cada paciente existen en promedio 5 mujeres en riesgo de ser portadoras. Por lo que se estima un

número de 500 mujeres tan solo en este hospital que necesitan de un estudio preciso que defina su estado portador. De aquí radica la importancia de poseer un diagnóstico preciso y rápido.

El análisis poblacional realizado en 160 cromosomas X reveló que el intrón 13, posee 8 alelos, pero a pesar de este número de alelos la heterocigocidad observada (41.3%) difiere significativamente ($p < 0.001$) de la esperada (83%). Estos valores ponen a la población Mexicana entre las poblaciones China y Eslava (Tabla IV). En la población china se presentan 7 alelos, sin embargo la heterocigocidad observada es del 53.7%, también un poco baja de acuerdo al número de alelos. Para el intron 22 se encontraron cuatro alelos y la heterocigocidad observada 52.6% difiere ($p 0.5-0.3$) de la esperada 64%. Estos valores están muy cercanos a la población

Tabla IV. Alelos y número de repetidos del Int13 encontrados en diversas poblaciones.

(CA) _n	Pb	Caucasica	Canadiense	China	Eslava	Uzbeki	Italiana	Thai	Turca	Mexicana
16	133	0.5	-	-	-	-	-	-	-	-
17	135	-	1.7	-	-	-	-	-	-	-
18	137	.05	1.2	-	-	-	-	-	-	-
19	139	7	4	-	3	-	5.6	20.5	1.8	2.6
20	141	45	7	-	56	80	61	59.1	51	9.3
21	143	29	25	-	19	14	22.2	11.4	34	16
22	145	11	48	1	11	3	2.8	9	7.8	28.6
23	147	5	13	1	10	3	5.6	-	4.3	14
24	149	1	0.4	9	-	-	2.8	-	0.8	14
25	151	-	-	53	-	-	-	-	-	10
26	153	-	-	32	-	-	-	-	-	5.3
27	155	-	-	3	-	-	-	-	-	-
28	157	-	-	1	-	-	-	-	-	-
H. E.		69	68	61	63	34	57.1	58.8	62	83
H. O.		91	71	53.7	34	-	-	-	50	41.3
X ²		7.01	0.13	0.87	13.35	-	-	-	2.32	20.9
P		0.001	0.07-0.9	0.5-0.3	<0.001	-	-	-	0.1-0.2	<0.001

Los datos de las frecuencias alélicas están dadas en porcentajes, H. O. = Heterocigocidad observada, H. E. = Heterocigocidad esperada = $1 - (p^2 + q^2 + r^2 \dots)$ donde p, q y r son la frecuencia de alelos.

Tabla V. Frecuencias de los repetidos del intron 22 en varias poblaciones

(CA) _n	Pb	Caucásica	Canadiense	China	Italiana	Thai	Turca	Mexicana
20	71	-	-	1	-	-	-	-
21	73	-	-	-	-	-	-	-
22	75	-	-	-	-	-	-	-
23	77	1.3	6	-	2.5	-	0.4	13.1
24	79	-	53	-	5	-	1.2	48.6
25	81	30.7	35	29	22.5	30	38.8	34.2
26	83	66.7	3	63	65	66	56	3.9
27	85	-	2	7	5	4	3.2	-
28	87	1.3	-	-	-	-	0.4	-
H. E.		46	59	51	52	52.1	47.3	64
H. O.		37	71	44.4	-	-	48.5	52.6
X ²		1.76	2.44	0.85	-	-	0.38	2.03
P		0.1-0.2	0.1-0.2	0.3-0.5	-	-	0.5-0.7	0.5-0.30

Los datos de las frecuencias alélicas están dadas en porcentajes, H. O. = Heterocigocidad observada, H. E. = Heterocigocidad esperada = $1 - (p^2 + q^2 + r^2 \dots)$ donde p, q y r son la frecuencia de alelos.

Turca y nuevamente a la población China (Tabla V). En lo que respecta al marcador St14 se encontraron 10 alelos, la heterocigocidad esperada fue del 80%, sin embargo la observada fue del 83% por lo que este marcador fue el mejor de los tres para realizar el diagnóstico. En este último se detectó un nuevo alelo de 680 pb el cual a su vez fue el que presentó mayor frecuencia con un 30%.

Comparando la frecuencia alélica de este último marcador entre poblaciones se puede observar que los patrones de la población Mexicana son muy semejantes a las poblaciones asiáticas⁷, teniendo una mayor frecuencia en los alelos más pequeños (Tabla VI)^{54,63,65}. Este dato es interesante ya que aunado a las frecuencias encontradas en los intrones 13 y 22 se denota que la población mexicana posee una cercanía genotípica con la población asiática, esto coincide con una de las teorías que describe la ondas migratorias de los amerindios a partir de Asia^{53,58b}.

Al utilizar estos marcadores en el diagnóstico de portadoras se encontró que su comportamiento estuvo de acuerdo con lo observado en el análisis en población abierta. El marcador St14 fue informativo en 31 mujeres, Int22 en 18 e int13 en 8. A pesar de las frecuencias bajas que presentaron los marcadores Int13 e Int22 su aplicación indudablemente es útil. Al utilizar varios marcadores se eleva la certeza en el diagnóstico de tal manera que si uno de estos marcadores no es informativo en una familia lo podrán ser alguno de los dos restantes. Por lo cual no es conveniente utilizar únicamente el marcador más informativo para realizar el diagnóstico.

El marcador St14 mostró una gran versatilidad al poseer un sitio de corte con la enzima Taq I a 200 pb del extremo final del amplificado, este sitio se encuentra presente en un 60% y ausente en un 40% en todos los alelos con lo que aumenta su exactitud en el diagnóstico⁵².

Tabla VI. Alelos y frecuencias del marcador St14

Alelos pb	Noreste de china	Caucásicos	China	Méxicana
680	-	-	-	30
700	38	12	60.3	
884	-	-	-	3
1187	-	-	-	3
1220	-	2	1.3	6
1300	4.6	2	2.6	12
1390	23.2	10	11.5	4
1570	8.3	14	12.8	26
1630	11.1	2	6.4	1
1690	13	36	5.1	7
2100	0.9	-	-	-
2400	0.9	12	-	-
2900	-	8	-	-
3000	-	2	-	0.03
H. E.			60	80
H. O.	76.36			83
χ^2				0.11
p				0.8-0.70

Los datos de las frecuencias alélicas están dadas en porcentajes, H. O. = Heterocigocidad observada, H. E. = Heterocigocidad esperada = $1 - (p^2 + q^2 + r^2 \dots)$ donde p, q y r son la frecuencia de alelos.

En la familia 9 se presentó un caso particular puesto que todas las mujeres fueron homocigotas para los tres marcadores, incluyendo la digestión en St14. Esta situación se puede explicar por un efecto de endogamia dado que en una entrevista posterior al estudio los miembros de esta familia revelaron que sus padres y abuelos procedían del mismo poblado en Querétaro.

Desde el punto de vista práctico la efectividad de los marcadores VNTR se incrementa puesto que las reacciones se estandarizaron para ser efectuadas sin el uso de radioactividad resolviendo las bandas con bromuro de etidio, con ello el tiempo de trabajo empleado se reduce notablemente hasta casi seis horas aproximadamente. En la práctica un diagnóstico en una familia compuesta por cinco miembros puede realizarse en menos de cinco días.

Es necesario recordar que la aplicación de los marcadores VNTRs es únicamente en aquellas familias con antecedentes familiares de la enfermedad. Por otro lado

no pueden ser útiles cuando se produce un efecto de recombinación entre ellos, ya que se producen datos antagónicos, cuando esta situación se presenta la única alternativa para el diagnóstico es que se detecte directamente la mutación en el gen.

En 1992 Naylor³⁸ descubrió que en el 25% de todos los pacientes con hemofilia la enfermedad era generada por una inversión del gen, quedando éste interrumpido en el exón 22 provocando un fenotipo grave. Este hallazgo abrió la posibilidad de realizar diagnóstico en aquellas familias sin antecedente familiares y con fenotipo grave.

En un principio la detección de esta alteración se realizó utilizando hibridaciones de tipo Southern, esta técnica implicaba más de una semana de trabajo por ensayo, esto sin tomar en cuenta los costos requeridos. A finales de 1998 Qiang⁴⁶ y colaboradores reportaron un ensayo el cual mediante la amplificación de los segmentos implicados se puede detectar la inversión en tan solo dos días en una familia completa. Esta

prueba se basa en utilizar dos pares de oligonucleótidos denominados P-Q y A-B (Figura 20). Los oligonucleótidos P-Q amplificarán el segmento Int22h1 (F8A) el cual se encuentra dentro del gen del factor VIII dando un producto de 12 kb. Por otro lado los oligonucleótidos A-B amplifican los segmentos Int22h2 e Int22h3 que se encuentran fuera del gen dando un producto para ambos de 10 kb. Si existe una recombinación entre Int22h1 e Int22h2&3 entonces la combinación de los oligonucleótidos quedara P-B ó A-Q, en ambos casos el producto de amplificación es de 11kb con lo cual se evidencia una inversión en el gen. Solo uno de los segmentos Int22h2 ó Int22h3 se recombinará con Int22h1 por lo que en individuos con la inversión y en mujeres portadoras se observará aún un amplificado de 10 kb (Figura 20).

Este ensayo fue aplicado en dos familias con fenotipo grave, una de ellas sin antecedentes familiares. En la familia 3 no se identificó la alteración por lo cual el origen de la enfermedad en esta familia se debe a mutaciones en cualquier otra parte del gen. En la familia 5 se logró evidenciar la inversión en el caso índice, sin embargo sus hermanas y su madre no la poseen. Esta alteración se produce comúnmente por recombinaciones durante la división meiótica en la espermatogénesis, en estudios familiares se ha encontrado que el origen de tales inversiones es casi exclusivamente en un gameto de un hombre normal. En un rango más bajo se han detectado estas alteraciones en gametos femeninos⁵¹. En esta familia la madre no poseía a nivel somático la alteración, por lo cual la alteración no pudo haber surgido a partir de un gameto por parte del abuelo materno, por lo tanto su origen pudo deberse a un mosaico germinal en la madre, una alteración en la ovogénesis ó también cabe

la posibilidad de que la alteración sea una mutación *de novo* en el paciente.

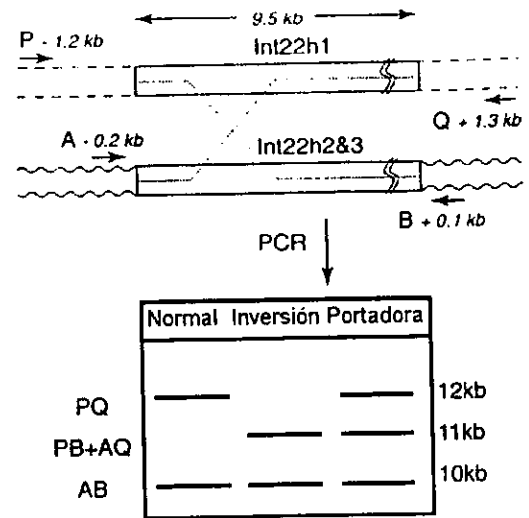


Figura 20. Esquema del ensayo para detectar la inversión 1-22 del gen FVIII mediante PCR. P y Q son los oligonucleótidos que amplifican la región Int22h1 del gen FVIII produciendo un amplificado de 10 kb, A y B son los oligonucleótidos que amplifican las regiones Int22h2 e Int22h3 simultáneamente dando un amplificado de 12 kb. Si existe una recombinación entre Int22h1 e Int22h2 ó Int22h3 entonces la combinación de oligonucleótidos puede ser P y B ó A y Q dando un amplificado de 11 kb.

El uso de marcadores de tipo VNTR's en la detección de portadoras es de utilidad ya que aumenta la precisión del diagnóstico en familias con antecedentes familiares de la Hemofilia A. Por otro lado la técnica para detectar la inversión abre la posibilidad de diagnóstico en aquellas familias sin antecedentes hereditarios y con fenotipo grave.

BIBLIOGRAFIA

1. Antonarakis SE (1995) Molecular genetics of coagulation factor VIII gene and hemophilia A. *Thromb Haemost* 74:322-328.
2. Antonarakis SE, Kazazian HH Jr (1988) The molecular basis of hemophilia A in man. *Trends Genet* 4: 233-237.

prueba se basa en utilizar dos pares de oligonucleótidos denominados P-Q y A-B (Figura 20). Los oligonucleótidos P-Q amplificarán el segmento Int22h1 (F8A) el cual se encuentra dentro del gen del factor VIII dando un producto de 12 kb. Por otro lado los oligonucleótidos A-B amplifican los segmentos Int22h2 e Int22h3 que se encuentran fuera del gen dando un producto para ambos de 10 kb. Si existe una recombinación entre Int22h1 e Int22h2&3 entonces la combinación de los oligonucleótidos quedara P-B ó A-Q, en ambos casos el producto de amplificación es de 11kb con lo cual se evidencia una inversión en el gen. Solo uno de los segmentos Int22h2 ó Int22h3 se recombinará con Int22h1 por lo que en individuos con la inversión y en mujeres portadoras se observará aún un amplificado de 10 kb (Figura 20).

Este ensayo fue aplicado en dos familias con fenotipo grave, una de ellas sin antecedentes familiares. En la familia 3 no se identificó la alteración por lo cual el origen de la enfermedad en esta familia se debe a mutaciones en cualquier otra parte del gen. En la familia 5 se logró evidenciar la inversión en el caso índice, sin embargo sus hermanas y su madre no la poseen. Esta alteración se produce comúnmente por recombinaciones durante la división meiótica en la espermatogénesis, en estudios familiares se ha encontrado que el origen de tales inversiones es casi exclusivamente en un gameto de un hombre normal. En un rango más bajo se han detectado estas alteraciones en gametos femeninos⁵¹. En esta familia la madre no poseía a nivel somático la alteración, por lo cual la alteración no pudo haber surgido a partir de un gameto por parte del abuelo materno, por lo tanto su origen pudo deberse a un mosaico germinal en la madre, una alteración en la ovogénesis ó también cabe

la posibilidad de que la alteración sea una mutación *de novo* en el paciente.

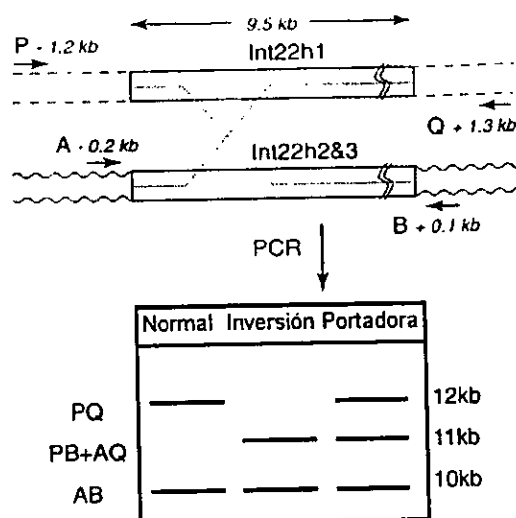


Figura 20. Esquema del ensayo para detectar la inversión 1-22 del gen FVIII mediante PCR. P y Q son los oligonucleótidos que amplifican la región Int22h1 del gen FVIII produciendo un amplificado de 10 kb, A y B son los oligonucleótidos que amplifican las regiones Int22h2 e Int22h3 simultáneamente dando un amplificado de 12 kb. Si existe una recombinación entre Int22h1 e Int22h2 ó Int22h3 entonces la combinación de oligonucleótidos puede ser P y B ó A y Q dando un amplificado de 11 kb.

El uso de marcadores de tipo VNTR's en la detección de portadoras es de utilidad ya que aumenta la precisión del diagnóstico en familias con antecedentes familiares de la Hemofilia A. Por otro lado la técnica para detectar la inversión abre la posibilidad de diagnóstico en aquellas familias sin antecedentes hereditarios y con fenotipo grave.

BIBLIOGRAFIA

1. Antonarakis SE (1995) Molecular genetics of coagulation factor VIII gene and hemophilia A. *Thromb Haemost* 74:322-328.
2. Antonarakis SE, Kazazian HH Jr (1988) The molecular basis of hemophilia A in man. *Trends Genet* 4: 233-237.

3. Arai M, Inaba H, Higuchi M, Antonarakis SE, Kazazian HH Jr, Fujimaki M, Hoyer LW (1989) Direct characterization of factor VIII in plasma: detection of a mutation altering a thrombin cleavage site (arginine-372-histidine). *Proc Natl Acad Sci USA* 86:4277-4281.
4. Boyer SH, Graham JB (1965) Linkage between the X chromosome loci for glucose-6-phosphate dehydrogenase electrophoretic variation and hemophilia A. *Am J Hum Genet* 17:320-324.
5. Brocker-Vriends AH, Briet E, Quadt R, Dreesen JC, Bakker E, Claassen-Tegelaar R, Kanhai HH, van de Kamp JJ, Pearson PL (1987) Genotype assignment of haemophilia A by use of intragenic and extragenic restriction fragment length polymorphisms. *Thromb Haemost* 57:131-136.
6. Carrillo MCP, Fragoso RH, Cisneros BV, Amparo ME, Cantú JM, Montañez CO (1993) Carrier detection of hemophilia A in a Mexican population by two Bcl I polymorphisms. *Arch Med Res* 24:139-142.
7. Chunlian J, Changkun L, Jun S, Li J, Wenhan D, Xue Z, Kailai S (1998) Polymorphism distribution of ST14(DXS52) VNTR in normal individuals in northeastern region of China and its application in gene diagnosis of hemophilia A. *Chung Hua I Hsueh I Chuan Hsueh Tsa Chih* 15:31-34.
8. Driscoll MC, Miller CH, Goldberg JD, Aledort LM, Hoyer LW, Golbus MS (1986) Recombination between factor VIIIc gene and St14 locus. *Lancet* 2:279.
9. Eaton DL, Wood WI, Eaton D, Hass PE, Hollingshead P, Wion K, Mather J, Lawn RM, Vehar GA, Gorman C (1987) Construction and characterization of an active factor VIII variant lacking the central one-third of the molecule. *Biochemistry* 25:8343-8347.
10. Fass ND, Knutson GJ, Katzmann JA (1982) Monoclonal antibodies to porcine factor VIII coagulant and their use in the isolation of active coagulant protein. *Blood* 53:594-599.
11. Fay PJ, Smudzin TM, Walker FJ (1991) Activated protein C-catalyzed inactivation of human factor VIII and factor VIIIa. Identification of cleavage sites and correlation of proteolysis with cofactor activity. *J Biol Chem* 266:20139-20145.
12. Freije D, Schlessinger D (1992) A 1.6-Mb contig of yeast artificial chromosomes around the human factor VIII gene reveals three regions homologous to probes for the DXS115 locus and two for the DXYS64 locus. *Am J Hum Genet* 51:66-80.
13. Fulcher CA, Zimmerman TS (1982) Characterization of the human factor VIII procoagulant protein with a heterologous precipitin antibody. *Proc Natl Acad Sci USA* 79:1648-1652.
14. Gilbert C, White II, Shoemaker CB (1989) Factor VIII gene and hemophilia A. *Blood* 73:1-12.
15. Gitschier J, Wood WI, Goralka TM, Wion KL, Chen EY, Eaton DH, Vehar GA, Capon DJ, Lawn RM (1984) Characterization of the human factor VIII gene. *Nature* 312:326-330.
16. Gitschier J, Wood WI, Tuddenham EG, Shuman MA, Goralka TM, Chen EY, Lawn RM (1985) Detection and sequence of mutations in the factor VIII gene of haemophiliacs. *Nature* 315:427-430.
17. Harper K, Winter RM, Pembrey ME, Hartley D, Davies KE, Tuddenham EG (1984) A clinically useful DNA probe closely linked to haemophilia A. *Lancet* 2:6-8.
18. Higuchi M, Kazazian HH Jr, Kasch L, Warren TC, McGinniss MJ, Phillips JA 3rd, Kasper C, Janco R, Antonarakis SE (1991) Molecular characterization of severe hemophilia A suggests that about half the mutations are not within the coding regions and splice junctions of the factor VIII gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:7405-7409.
19. Jarjanazi H, Timur AA, El-Maarri O, Handane SC (1998) Analysis of two microsatellite repeat polymorphisms of the factor VIII gene in the Turkish population. *Brit J Haematol* 100:589-593.
20. Kane WH, Davie EW. (1986) Cloning of a cDNA coding for human factor V, a blood coagulation factor homologous to factor VIII and ceruloplasmin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 83:6800-6804.
21. Kaufman, RJ, Wasley LC, Damer, A.J. (1988) Synthesis, processing, and secretion of recombinant human factor VIII expressed in mammalian cells. *J Biol Chem* 263:6352-6362.
22. Kazazian HH Jr, Tuddenham EGD, Antonarakis SE (1995) Hemophilia A and parahemophilia: deficiencies of coagulation factors VIII and V. Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, McGraw-Hill, International Edition. 3241-3263.
23. Kazazian HH Jr, Wong C, Youssoufian H, Scott AF, Phillips DG, Antonarakis SE (1988) Haemophilia A resulting from *de novo* insertion of L1 sequences represents a novel mechanism for mutation in man. *Nature* 332:164-166.
24. Kempter B (1992) Quick preparation of high molecular weight DNA freezin. *Tibs* 8:7-8.
25. Kirk HE, Robertson KA, Hay CW, Yong SL, McGillivray BC, Grove GH, MacGillivray RT (1987) Recombination within DXS52 (ST14) locus in family with haemophilia A. *Lancet* 1:560-561.
26. Kogan SC, Doherty ABM, Gitschier JPD (1987) An improved method for prenatal diagnosis of genetics diseases by analysis of amplified DNA sequences: application to hemophilia A. *N Engl J Med* 317:985-990.
27. Lalloz MR, Schwaab R, McVey JH, Michaelides K, Tuddenham EG (1994) Haemophilia A diagnosis by simultaneous analysis of two variable dinucleotide tandem repeats within the factor VIII gene. *Br J Haematol* 86:804-809.
28. Lalloz MRA, McVey JH, Pattinson JK, Tuddenham EGD (1991) Haemophilia A diagnosis by analysis of a hypervariable dinucleotide repeat within the factor VIII gene. *Lancet* 338:207-211.
29. Larocca D, Peterson JA, Urrea R, Kuniyoshi J, Bistrain AM, Ceriani RL (1991) A Mr 46,000 human milk fat globule protein that is highly expressed in human breast tumors contains factor VIII-like domains *Cancer Res*. 51:4994-4998.
30. Lehesjoki AE, de la Chapelle A, Rasi V (1986) Haemophilia A: two recombinations detected with probe St14. *Lancet* 2:280.
31. Lehesjoki AE, Sistonen P, Rasi V, de la Chapelle A (1991) Hemophilia A: genetic prediction and linkage studies in all available families in Finland. *Clin Genet* 39:199-209.
32. Levinson B, Kenwick S, Gamel P, Fisher K, Gitschier J (1992) Evidence for a third transcript from the human factor VIII gene. *Genomics* 14:585-589.
33. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J (1989) *Molecular Cloning: a laboratory manual*, second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
34. McGinniss MJ, Kazazian HH Jr, Hoyer LW, Bi L, Inaba H, Antonarakis SE (1993) Spectrum of mutations in CRM-positive and CRM-reduced hemophilia A. *Genomics* 15:392-398.
35. McKusick VA (1965) *The Royal Hemophilia*. *Sci Am* 213:88-95.
36. Migeon BR, McGinniss MJ, Antonarakis SE, Axelman J, Stasiowski B, Youssoufian H, Keams WG, Chung A,

- Pearson PL, Kazazian HH Jr, Muner RS (1993) Severe hemophilia A in a female by cryptic translocation: order and orientation of factor VIII within Xq28. *Genomics* 16:20-25.
37. Moodie P, Liddell MB, Peake IR, Bloom AL (1988) Carrier detection in 50 haemophilia A kindred by means of three intragenic and two extragenic restriction fragment length polymorphisms. *Br J Haematol* 70:77-84.
 38. Naylor JA, Green PM, Rizza CR, Giannelli F (1992) Factor VIII gene explains all cases of haemophilia A. *Lancet* 340:1066-1067.
 39. Nishino M, Girma JP, Rothschild C, Fressinaud E, Meyer D (1989) New variant of von Willebrand disease with defective binding to factor VIII. *Blood* 74:1591-1599.
 40. Oberle I, Camerino G, Heilig R, Grunebaum L, Cazenave JP, Crapanzano C, Mannucci PM, Mandel JL (1985) Genetic screening for hemophilia A (classic hemophilia) with a polymorphic DNA probe. *N Engl J Med* 312:682-686.
 41. Pattinson JK, Millar DS, McVey JH, Grundy CB, Wieland K, Mibashan RS, Martinowitz U, Tan-Un K, Vidaud M, Goossens M, Sampietro M, Mannucci PM, Krawczak M, Reiss J, Zoll B, Whitmore D, Bowcock S, Wensley R, Ajani A, Mitchell V, Rizza R, Winter P, Mayne EE, Schwartz M, Green PJ, Kakkar VV, Tuddenham EGD, Cooper DN (1990) The molecular genetic of hemophilia A: a directed search strategy for the detection of point mutations in the human factor VIII gene. *Blood* 76:2242-2248.
 42. Pittman DD, Kaufman RJ (1989) Structure-function relationships of factor VIII elucidated through recombinant DNA technology. *Thromb Haemost* 61:161-165.
 43. Pittman DD, Kaufman RJ (1988) Proteolytic requirements for thrombin activation of anti-hemophilic factor (factor VIII). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 85:2429-2433.
 44. Pittman DD, Wang JH, Kaufman RJ (1992) Identification and functional importance of tyrosine sulfate residues within recombinant factor VIII. *Biochemistry* 31:3315-3325.
 45. Poustka A, Dietrich A, Langenstein G, Toniolo D, Warren ST, Lehrach H (1991) Physical map of human Xq27-qter: localizing the region of the fragile X mutation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 88:8302-8306.
 46. Qiang Liu, Guity Nozari, Steve S. Sommer (1998) Single-Tube Polymerase Chain Reaction for Rapid Diagnosis of the Inversion Hotspot of Mutation in Hemophilia A. *Blood* 92:1458-1459.
 47. Richards B, Heilig R, Oberle I, Stojohann L, Hom GT (1991) Rapid PCR analysis of the St14 (DXS52) VNTR. *Nucleic Acids Res*. 19:1944.
 48. Rivera-Pérez J, Rojas-Martínez A, Charles-García F, Barrera-Saldaña HA (1993) Análisis molecular de la hemofilia A en familias del noreste de México. *Rev Inv Clin* 45:23-28.
 49. Rizza CR, Spooner RJ (1983) Treatment of haemophilia and related disorders in Britain and Northern Ireland during 1976-80: report on behalf of the directors of haemophilia centres in the United Kingdom. *Br Med J* 286:929-933.
 50. Rojas-Martínez A, Villalobos-Torres MC, Ortiz-de-Luna RI, Pompa-Garza MT, Barrera-Saldaña HA (1996) Molecular detection of carriers of hemophilia A in Mexican families. *Rev invest Clin* 48:125-127
 51. Rossiter JP, Young M, Kimberland ML, Hutter P, Ketterling RP, Gitschier J, Horst J, Morris MA, Schaid DJ, de Moerloose P, Sommer SS, Kazazian HH Jr, Antonarakis SE (1994) Factor VIII gene inversions causing severe hemophilia A originate almost exclusively in male germ cells. *Hum. Mol. Genet.* 3:1035-1039.
 52. Saksova L, Gecz J, Kadasi L, Ferak V (1993) TaqI digestion of PCR product increases the informativity of St14 VNTR for the diagnosis of hemophilia A. *Dis Markers* 11:139-141.
 53. Santos FR, Pandya A, Tyler CS, Pena DJ, Schanfield M, Leonard WR, Osivopa L, Crawford MH, Mitchell RJ (1999) The central Siberian origin for native american Y chromosomes. *Am J Hum Genet* 64:619-628.
 54. Shu-Rung Lin, Shu-Chuan Chang, Chia-Cheng Lee, Ming-Ching Shen, Shu-Wha Lin (1995) Genetic diagnosis of haemophilia A of chinese origin. *Br J Haematol* 91:722-727.
 55. Stubbs JD, Lekutis C, Singer KL, Bui A, Yuzuki D, Srinivasan U, Pary G (1990) cDNA cloning of a mouse mammary epithelial cell surface protein reveals the existence of epidermal growth factor-like domains linked to factor VIII-like sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:8417-8421.
 56. Taylor GR, Noble JS, Hall JL, Stewart AD, Mueller RF (1989) Hypervariable microsatellite for genetic diagnosis. *Lancet* 2:454.
 57. Toole JJ, Knopf JL, Wozney JM, Sultzman LA, Buecker JL, Pittman DD, Kaufman RJ, Brown E, Shoemaker C, Orr EC, Amphlett GW, Foster WB, Coe ML, Knutson GJ, Fass DN, Hewick RM (1984) Molecular cloning of a cDNA encoding human antihaemophilic factor. *Nature* 312:342-347.
 58. Toole JJ, Pittman DD, Orr EC, Murtha P, Wasley LC, Kaufman RJ (1986) A large region (approximately equal to 95 kDa) of human factor VIII is dispensable for *in vitro* procoagulant activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:5939-5942.
 - 58b. Torroni A, Wallace DC (1995) mtDNA haplogroups in native america. *Am J Hum Genet* 56:1234-1236.
 59. Tuddenham EG, Cooper DN, Gitschier J, Higuchi M, Hoyer LW, Yoshioka A, Peake IR, Schwaab R, Olek K, Kazazian HH, Lavergne J-M, Giannelli F, Antonarakis S (1991) Haemophilia A: database of nucleotide substitutions, deletions, insertions and rearrangements of the factor VIII gene. *Nucleic Acids Res* 19:4821-4833.
 60. Tuddenham EG, Trabold NC, Collins JA, Hoyer LW (1979) The properties of factor VIII coagulant activity prepared by immunoabsorbent chromatography. *J Lab Clin Med*. 93:40-53.
 61. van Dieijen G, Tans G, Rosing J, Hemker HC (1981) The role of phospholipid and factor VIIIa in the activation of bovine factor X. *J Biol Chem* 256:3433-3442.
 62. Vehar GA, Keyt B, Eaton D, Rodriguez H, O'Brien DP, Rotblat F, Oppermann H, Keck R, Wood WI, Harkins RN, Tuddenham EGD, Lawn RM, Capon DJ (1984) Structure of human factor VIII. *Nature* 312: 337-342.
 63. Wang X, Chu X, Ruan C (1995) St14 (DXS52) VNTR in the Chinese population and its application to genetic diagnosis of haemophilia A. *Nouv Rev Fr Hematol* 37:183-186.
 64. Weiss HJ, Sussman I, Hoyer LW (1977) Stabilization of factor VIII in plasma by the von Willebrand factor. *Studies on posttransfusion and dissociated factor VIII and in patients with von Willebrand's disease.* *J Clin Invest.* 60:390-404.
 65. Windsor S, Sherryl A, Taylor M, Lillicrap D (1994) Multiplex analysis of two intragenic microsatellite repeat polymorphisms in the genetic diagnosis of haemophilia A. *Br J Haematol* 86:810-815.
 66. Wion KL, Kelly D, Summerfield JA, Tuddenham EGD, Lawn RM (1985) Distribution of factor VIII mRNA and antigen in human liver and other tissues. *Nature* 317:726-729.

67. Wise RJ, Damer AJ, Krane M, Pittman DD, Kaufman RJ (1991) The role of von Willebrand factor multimers and propeptide cleavage in binding and stabilization of factor VIII. *J Biol Chem.* 266:21948-21955.
68. Wood WI, Capon DJ, Simonsen CC, Eaton DL, Gitschier J, Keyt B, Seeburg PH, Smith DH, Hollingshead P, Wion KL, Delwart E, Tuddenham EGD, Vehar GA, Lawn RM (1984) Expression of active human factor VIII from recombinant DNA clones. *Nature* 312:330-337.
69. Youssoufian H, Antonarakis SE, Aronis S, Tsiftis G, Phillips DG, Kazazian HH Jr (1987) Characterization of five partial deletions of the factor VIII gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:3772-3776.
70. Zelechowska MG, van Mourik JA, Brodniewicz-Proba T (1985) Ultrastructural localization of factor VIII procoagulant antigen in human liver hepatocytes. *Nature* 317:729-731