



# **UNIVERSIDAD DE MURCIA**

## **DEPARTAMENTO DE MEDICINA INTERNA**

Estudio Descriptivo Mutacional de Pacientes  
Hemofílicos en la Región de Murcia

**D. Faustino García Candel  
2013**



# UNIVERSIDAD DE MURCIA

## DEPARTAMENTO DE MEDICINA INTERNA

Estudio descriptivo mutacional de pacientes hemofílicos  
en la Región de Murcia

D. Faustino García Candel

2013

# Agradecimientos

*Al Servicio de Hematología y Hemoterapia del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca.*

*A Maruja Majado, José María Moraleda y Eduardo Tizzano por el apoyo constante.*

*A Alfonso Morales por el estímulo y confianza depositados.*

*A Manolo Moreno por ser mi maestro, sin él no se hubiera sido posible este trabajo.*

## GLOSARIO DE TÉRMINOS

ADN:	Ácido desoxirribonucleico
ARN:	Ácido ribonucleico
CpG:	Dinucleótidos Citosina-fosfato-Guanina no metilados
CAT:	Dominio catalítico
dHPLC:	Denaturing High Performance Liquid Chromatography
ddNTPs:	Dideoxynucleótidos
EGF:	Epidermal Growth Factor
ENAC:	Entidad Nacional de Acreditación
EDTA:	Ácido etilendiaminetetracético
F8:	Gen del factor VIII
F9	Gen del factor IX
FvW:	Factor von Willebrand
FT:	Factor Tisular
FVIII:C	Factor VIII Coagulante
FvW:Ag	Factor de von Willebrand Antigénico
HA	Hemofilia A
HADB	Hemophilia A Data Base
HAG	Hemofilia A Grave
HAM	Hemofilia A Moderada
HAL	Hemofilia A Leve
HB	Hemofilia B
HBG	Hemofilia B Grave
ISTH	International Society of Thrombosis and Hemostasis
IVS1	Inversión intrón 1
IVS22	Inversión de intrón 22
KDa	Kilodaltons
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa

## GLOSARIO DE TÉRMINOS

RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
STR	Short Tandem Repeats
Taq	Taq ( <i>Thermus aquaticus</i> ) polimerasa
VNTR	Variable Number of Tandem Repeats

## AMINOÁCIDOS Y SUS ABREVIATURAS

Ala	Alanina
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
Asp	Ácido aspártico
Cys	Cisteína
Gln	Glutamina
Glu	Ácido glutámico
Gly	Glicina
His	Histidina
Ile	Isoleucina
Leu	Leucina
Lys	Lisina
Met	Metionina
Phe	Fenilalanina
Pro	Prolina
Ser	Serina
Thr	Treonina
Trp	Triptófano
Tyr	Tirosina
Val	Valina

# ÍNDICE

<b>A. INTRODUCCIÓN</b>	<b>10</b>
1. INTRODUCCIÓN	11
1.1. Breve recuerdo histórico	11
1.2. Clasificación de la Hemofilia	12
1.3. Papel del FVIII y FIX en el proceso de coagulación	12
1.4. Aspectos clínicos de la Hemofilia	14
1.5. Aspectos psicosociales de la Hemofilia	15
1.6. Aspectos diagnósticos de la Hemofilia	15
2. ANTECEDENTES	16
2.1. Bases moleculares de la Hemofilia A	16
2.2. El gen del FVIII (F8)	17
2.3. Estructura del FVIII	17
2.4. Síntesis del FVIII	21
2.5. Alteraciones genéticas en el gen F8	21
2.5.1. Grandes reordenamientos	22
2.5.2. Inserciones y deleciones	25
2.5.3. Mutaciones puntuales	26
2.6. Bases moleculares de la Hemofilia B	27
2.7. Estructura y síntesis del FIX	28
2.8. Alteraciones genéticas en el gen F9	32
2.8.1. Mutaciones puntuales	33
2.8.2. Mutaciones hotspots	34
2.8.3. Mutaciones que truncan la proteína	34
2.8.4. Mutaciones que afectan a la región promotora	34
3. ESTUDIO DE PORTADORAS DE HEMOFILIA	35
4. DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE LA HEMOFILIA	39
4.1. Técnicas indirectas o de ligamiento genético	39
4.2. Secuenciación nucleotídica directa	41

<b>B. OBJETIVOS</b>	<b>43</b>
Objetivos	<b>44</b>

<b>C. MATERIAL Y MÉTODO</b>	<b>45</b>
1. PACIENTES	<b>46</b>
1.1. Estudio diagnóstico	<b>46</b>
1.2. Familias	<b>47</b>
1.2.1. Definición de portadora obligada	<b>47</b>
1.2.2. Definición de portadora posible	<b>47</b>
2. SECUENCIA DE ESTUDIO GENÉTICO	<b>48</b>
2.1. Hemofilia A	<b>48</b>
2.2. Hemofilia B	<b>49</b>
2.3. Estudio indirecto con marcadores	<b>50</b>
2.3.1. Marcadores extragénicos	<b>52</b>
2.3.2. Marcadores intragénicos	<b>52</b>
2.4. Estudio mutacional	<b>53</b>
2.4.1. Inversión del intrón 22	<b>53</b>
2.4.2. Inversión del intrón 1	<b>55</b>
2.4.3. Determinación de mutaciones puntuales y pequeñas deleciones/ inserciones	<b>56</b>
2.4.4. Detección de grandes deleciones o duplicaciones por PCR cuantitativa en tiempo real	<b>59</b>
3. METODOLOGÍA ESTADÍSTICA	<b>60</b>

<b>D. RESULTADOS</b>	<b>61</b>
1. DATOS GENERALES	<b>62</b>
1.1. Hemofilia en la Región de Murcia	<b>62</b>
1.2. Distribución de afectados de Hemofilia A según la gravedad	<b>64</b>

<b>D. RESULTADOS</b>	<b>61</b>
1.3. Distribución de afectados de Hemofilia B según la gravedad en la Región de Murcia	<b>65</b>
1.4. Familias de afectados estudiadas	<b>65</b>
<b>2. DESCRIPCIÓN DE FAMILIAS Y PORTADORAS SEGÚN TIPO DE HEMOFILIA</b>	<b>68</b>
2.1. Familias estudiadas con Hemofilia A	<b>68</b>
2.2. Familias estudiadas con Hemofilia B	<b>69</b>
2.3. Distribución de portadoras en el total de familias estudiadas	<b>70</b>
2.4. Distribución de portadoras en familias con Hemofilia A	<b>72</b>
2.4.1. Portadoras obligadas	<b>72</b>
2.4.2. Portadoras posibles	<b>72</b>
2.5. Distribución de portadoras en familias con Hemofilia B	<b>73</b>
2.5.1. Portadoras obligadas	<b>73</b>
2.5.2. Portadoras posibles	<b>73</b>
2.6. Distribución de no portadoras confirmadas	<b>73</b>
<b>3. DESCRIPCIÓN GENERAL DE LAS MUTACIONES ENCONTRADAS</b>	<b>74</b>
3.1. Distribución de los diferentes tipos de mutación	<b>75</b>
3.2. Mutaciones no descritas en registros internacionales	<b>77</b>
3.3. Distribución familiar de cada mutación según tipo y gravedad de Hemofilia	<b>79</b>
3.3.1. Familias con Hemofilia A grave	<b>79</b>
3.3.2. Familias con Hemofilia A moderada	<b>80</b>
3.3.3. Familias con Hemofilia A leve	<b>81</b>
3.3.4. Familias con Hemofilia B grave	<b>82</b>
3.3.5. Familias con Hemofilia B leve	<b>83</b>
3.4. Mutaciones recurrentes	<b>83</b>
<b>4. DESCRIPCIÓN POR FAMILIAS DE CADA GRUPO DE MUTACIÓN</b>	<b>84</b>
4.1. Inversión del intrón 22	<b>84</b>
4.2. Inversión del intrón 1	<b>86</b>

<b>D. RESULTADOS</b>	<b>61</b>
4.3. Grandes deleciones	<b>86</b>
4.4. Pequeñas deleciones	<b>87</b>
4.5. Mutaciones puntuales	<b>88</b>
4.6. Mutaciones de splicing	<b>91</b>
4.7. Duplicaciones	<b>92</b>
<b>5. RESUMEN DE RESULTADOS DESTACADOS</b>	<b>93</b>
5.1. Familias con casos esporádicos	<b>93</b>
5.2. Familias estudiadas sin disponer de muestras de afectados	<b>93</b>
5.3. Familias con historia de inhibidor	<b>94</b>

<b>E. DISCUSIÓN</b>	<b>95</b>
1. DATOS GENERALES	<b>96</b>
2. FAMILIAS Y PORTADORAS SEGÚN EL TIPO DE HEMOFILIA	<b>102</b>
3. MUTACIONES ENCONTRADAS	<b>107</b>
4. DESCRIPCIÓN FAMILIAR DE CADA GRUPO DE MUTACIÓN	<b>112</b>

<b>F. CONCLUSIONES</b>	<b>114</b>
CONCLUSIONES	<b>115</b>

<b>G. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>116</b>
------------------------	------------

<b>H. ANEXO</b>	<b>137</b>
DIFUSIÓN DE TRABAJOS CIENTÍFICOS RELACIONADOS	<b>138</b>

**A** >>> **Introducción**

### 1. INTRODUCCIÓN

La Hemofilia fue la primera coagulopatía congénita conocida. Se caracteriza por una deficiencia de la actividad de Factor VIII de la coagulación (Hemofilia A) o de Factor IX de la coagulación (Hemofilia B o enfermedad de Christmas). La prevalencia estimada es de alrededor de 1 por 5000 varones nacidos (para Hemofilia A) y de 1 por 30000 varones nacidos (para Hemofilia B). La transmisión es como un rasgo recesivo ligado al cromosoma X (herencia ligada al sexo). Por tanto, las mujeres pueden transmitir la enfermedad, pero no padecerla (salvo situaciones raras de homocigotos o doble heterocigosis en hijas de portadoras y padres hemofílicos, o existencia de otras alteraciones cromosómicas)<sup>(1)</sup>.

#### 1.1. Breve recuerdo histórico

Los orígenes de la Hemofilia se remontan probablemente al periodo Cretácico. Esta enfermedad hereditaria se presenta en al menos tres órdenes de mamíferos placentarios: Perissodactyla (Ungulata), Fissipedia (Carnivora) y Anthroipoidea (Primates), estando descrita más concretamente en caballos, perros y humanos. Se estima que la tasa de mutación en nuestra especie se encuentra entre  $2.5-4.2 \times 10^{-5(2,3)}$ .

La primera descripción sobre la Hemofilia se remonta al siglo II antes de Cristo, en un pasaje del Talmud babilonio. Inicialmente se pensaba que la Hemofilia era causada por anomalías en el sistema vascular, pero no fue hasta finales del siglo XIX y principios del XX cuando se pensó la deficiencia de un componente de la sangre como la causa responsable de la enfermedad<sup>(4)</sup>.

Las dos últimas décadas del siglo XX han sido especialmente prolíficas en descubrimientos que han permitido avanzar de forma exponencial tanto en el conocimiento profundo de las bases moleculares de las Hemofilias como en el tratamiento de las mismas. Así, en 1982 fue clonado el gen del FIX<sup>(5)</sup>, en 1983 el FVIII había sido ya purificado a homogeneidad y el gen que lo codifica fue finalmente identificado y caracterizado en 1984<sup>(6)</sup>. Casi de forma simultánea, la descripción de la técnica de la PCR (Polymerase Chain Reaction)<sup>(7)</sup> revoluciona el diagnóstico molecular de la Hemofilia. Todo ello hizo posible la creación de un nuevo tipo de productos terapéuticos, los llamados factores recombinantes, que a diferencia de los de origen

## Introducción

plasmático no presentan riesgos de transmisión viral y suponen una mejora sustancial en el tratamiento de los hemofílicos.

### 1.2. Clasificación de la Hemofilia

Actualmente, tanto la Hemofilia A como la B pueden clasificarse clínicamente según la cantidad de FVIII/FIX que presente el paciente en tres tipos<sup>(8)</sup>:

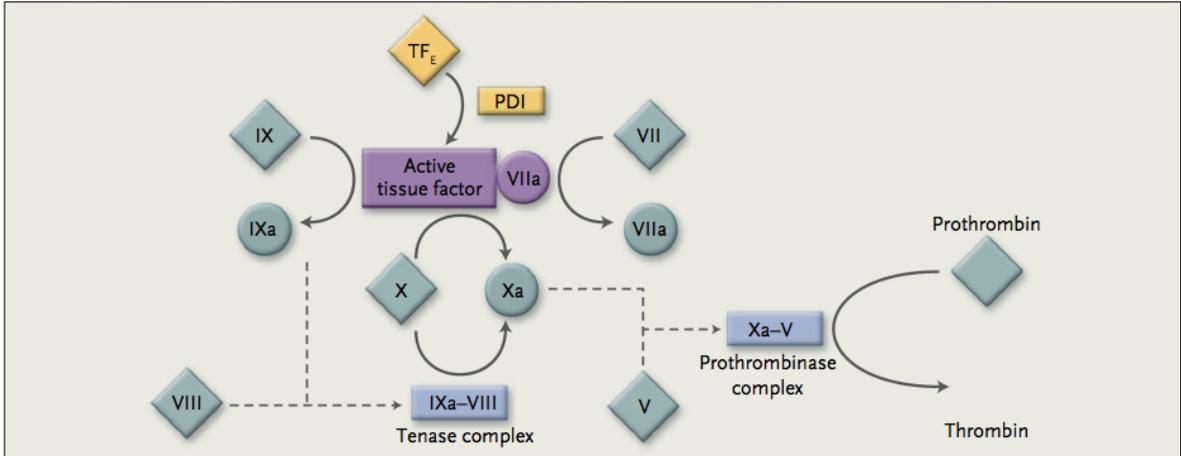
- .- Hemofilia grave:  $<0.01$  UI/ml ( $< 1\%$  del nivel normal)
- .- Hemofilia moderada:  $0.01 - 0.05$  UI/ml ( $1\%-5\%$  del nivel normal)
- .- Hemofilia leve:  $>0.05- <0.40$  UI/ml ( $>5\%- <40\%$  del nivel normal)

Donde el nivel normal corresponde a  $1$  UI/ml ( $100\%$ ), como ha sido definido por la Organización Mundial de la Salud (Estandarización de FVIII:C Plasmático) y distribuido por The National Institute for Biological Standards and Control, Potters Bar, Hertsfordshire, UK.

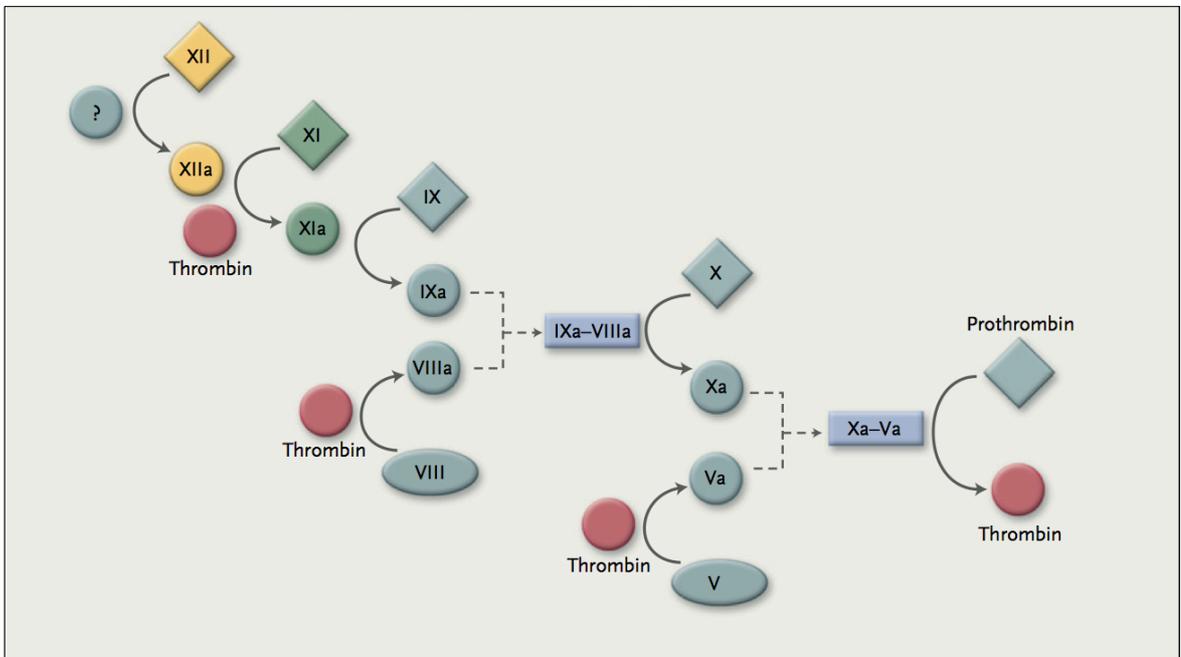
### 1.3. Papel del FVIII y FIX en el proceso de la coagulación

El factor VIII circula formando un complejo con el factor de von Willebrand. Actúa como un iniciador y regulador de la vía intrínseca de la coagulación. En los sitios de lesión de la pared vascular es activado a FVIIIa por una proteólisis limitada mediada por factor X activado (FXa) o por trombina, disociándose del factor de von Willebrand y uniéndose a las superficies fosfolipídicas junto con el FIXa, formando el complejo tenasa, que produce la activación del factor X (FXa) durante la fase de propagación de la coagulación. El factor Xa unido al factor V activado (FVa) forma el complejo protrombinasa que produce la transformación de la protrombina a trombina y así formar el coágulo de fibrina. El proceso de iniciación de la coagulación a partir de la unión del factor tisular activado y el factor VII activado (FVIIa) produce una activación ineficaz de factor X (FXa), que unido a factor V (FV) de membranas celulares genera pequeñas cantidades de trombina. Esta trombina generada es capaz de activar a FVIII y FV y factor XI (FXIa) acelerando las distintas reacciones enzimáticas que acabarán produciendo mayores cantidades de trombina y la posterior formación del coágulo de fibrina, constituyendo la fase de amplificación de la coagulación <sup>(9,10)</sup>. Ambas fases de la coagulación están esquematizadas en las figuras 1 y 2.

## Introducción



**Figura 1.** Inicio del proceso de coagulación. Tomado de Furie B et al. 2008<sup>(9)</sup>.



**Figura 2.** Fase de propagación de coagulación. Tomado de Furie B et al. 2008<sup>(9)</sup>.

### 1.4. Aspectos clínicos de la Hemofilia

La clínica se basa en la aparición de sangrados recurrentes, cuya intensidad y frecuencia están en estrecha relación con la gravedad del defecto de la proteína FVIII o FIX (según se trate de Hemofilia A o Hemofilia B respectivamente). La clínica de ambos tipos de Hemofilias son indistinguibles. En la Hemofilia grave existen hemorragias recurrentes, que pueden ser espontáneas o después de un procedimiento quirúrgico y trauma mínimo. En ausencia de historia familiar, los niños pueden debutar de forma frecuente con sangrado tras circuncisión. También existe un 2-8% de riesgo de hemorragia intracraneal y extracraneal en el momento del parto. Por otra parte, los niños con formas graves desarrollan equimosis palpables desde los 3-4 meses de edad. Son frecuentes los hematomas intramusculares y las hemorragias intraarticulares, teniendo especial importancia aquellas hemorragias localizadas en regiones anatómicas determinadas que pueden causar síndrome compartimental como las localizadas en antebrazos o región gemelar. Una localización de especial gravedad es el hematoma del músculo psoas-Iliaco que puede suponer riesgo vital<sup>(1)</sup>.

Una de las complicaciones más importantes, como consecuencia de los hemartros de repetición, la constituye la artropatía hemofílica por lesión de la sinovial y cartílago por liberación del hierro, citoquinas y la neo-angiogénesis, que producen cambios moleculares y la perpetuación del estado de inflamación crónica en la articulación. El objetivo principal en la actualidad del manejo de la Hemofilia es evitar la artropatía hemofílica<sup>(11,12)</sup>. Las formas moderadas no están asociadas con sangrados espontáneos, siendo normalmente causados por procedimientos quirúrgicos o traumatismos mínimos. Los primeros síntomas hemorrágicos pueden aparecer entre el primer y segundo año de vida. Las formas leves tienen una baja incidencia de sangrado, pero pueden aparecer tras procedimientos quirúrgicos o traumatismos importantes<sup>(1)</sup>.

La complicación más temida actualmente en el tratamiento de la enfermedad es la aparición de aloanticuerpos contra el factor VIII/FIX administrado, denominado inhibidor y que aparece más frecuentemente en las formas graves<sup>(13)</sup>.

### **1.5. Aspectos psicosociales de la Hemofilia**

En el manejo integral del paciente hemofílico adquiere una importancia relevante su entorno familiar y social. Con el avance registrado en los últimos años en el consejo genético, diagnóstico prenatal y el estudio de portadoras, la repercusión psicológica sobre los pacientes y familiares tiene mayor relevancia. Las tensiones emocionales y la preocupación ante la posibilidad de un recién nacido afectado, y su cuidado durante la infancia y la adolescencia, pueden llegar a suponer graves implicaciones en las relaciones de pareja. El impacto puede ser mayor en aquellas familias en las que aparece el primer caso de Hemofilia. En este sentido adquiere especial importancia la existencia de asociaciones de enfermos vinculados con los centros de tratamiento especializados que permitan hacer un tratamiento integral del paciente y de su entorno familiar, desde el consejo genético, el cuidado durante la infancia y la adolescencia y el apoyo a los padres en forma de asistencia psicológica y la implantación de circuitos de información médica sobre esta enfermedad<sup>(14)</sup>.

### **1.6. Aspectos diagnósticos de la Hemofilia**

El correcto diagnóstico de la deficiencia del factor VIII/IX es fundamental para realizar una estrategia adecuada de tratamiento. Es extremadamente importante discriminar entre formas graves, moderadas y leves pues tiene una importante implicación en el comportamiento clínico del déficit. Un adecuado diagnóstico implica métodos de cribado lo suficientemente sensitivos y específicos, así como ensayos para determinar la actividad del FVIII/FIX. En el caso de la Hemofilia A, existen tres métodos para medir su actividad coagulante, los métodos coagulométricos de una etapa y de dos etapas y los ensayos cromogénicos. Los ensayos cromogénicos son más sensibles que los coagulométricos de una etapa, especialmente para detectar las formas graves<sup>(15)</sup>.

En los últimos años se ha profundizado en el conocimiento molecular de esta enfermedad, adquiriendo mayor importancia la relación entre el genotipo y el fenotipo de esta patología y el comportamiento ante las distintas modalidades de tratamiento. Pese a que es reciente la utilización de técnicas de diagnóstico molecular, ya se han publicado un elevado número de mutaciones en los genes de la Hemofilia A y B, lo que hace impracticable un estudio molecular a toda la población. Sin embargo, sería

## Introducción

adecuado realizar un estudio sistemático de las mutaciones del intrón 22 dado que son las más frecuentes en la Hemofilia A y suelen corresponderse con las formas más graves.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Bases moleculares de la Hemofilia A

El FVIII es una proteína que en su forma inmadura tiene un tamaño de 2351 aminoácidos, incluyendo un péptido señal de 19 residuos. Tras su procesamiento, la forma madura, de 2332 aminoácidos y con un peso molecular estimado de 265 kilodaltons (KDa) (sin tener en cuenta las modificaciones postranscripcionales), circula en plasma asociada de forma no covalente al Factor von Willebrand (FvW) a una concentración que normalmente oscila entre los 150 y los 200 ng/ml. El FvW actúa como molécula transportadora del FVIII, asegurando su correcta secreción así como su protección frente a la degradación proteolítica. Además, dicha asociación asegura la localización de cantidades suficientes de FVIII en las zonas expuestas del subendotelio donde ha de actuar, gracias a la capacidad del FvW para fijarse a éste y a determinadas glicoproteínas plaquetarias<sup>(16)</sup>. El FVIII tiene una estructura de varios dominios (A1-A2-B-A3-C1-C2). Las regiones enlazadas entre los dominios se denominan con letras minúsculas a1, a2, a3. La localización de los dominios límites y los lugares de proteólisis durante la secreción y activación se denominan por números. El FVIII es un heterodímero que circula unido a FvW a través de la interacción con la región a3 en la cadena N-terminal y con el dominio C2. Varias proteasas interactúan con el heterodímero activado en diferentes posiciones (figura 3). La asociación con las membranas celulares es realizada primariamente a través del dominio C2, su eliminación supondría una falta de unión a las superficies de las plaquetas<sup>(10)</sup>.

### 2.2. El gen del FVIII (F8)

El gen del FVIII (F8) se encuentra en la porción telomérica distal del brazo largo del cromosoma X, en la banda Xq28<sup>(17)</sup>. Fue caracterizado en 1984<sup>(6)</sup> (figura 4). Consta de 26 exones que se extienden a lo largo de unas 186.000 pares de bases en el genoma humano y que dan lugar a un mRNA de prácticamente 9 Kb, incluyendo 7.053 nucleótidos codificantes<sup>(18,19)</sup>. Veinticuatro de los exones tienen un tamaño que varía entre las 69 y las 262 pares de bases, mientras que los dos restantes, los exones 14 y 26, contienen 3106 y 1958 pares de bases respectivamente. La mayor parte del exón 26 corresponde a secuencia transcrita y no traducida. De los 25 intrones 6 tienen más de 14 Kb, uno de los cuales, el intrón 22, contiene una isla CpG que está asociada a dos transcritos adicionales: F8A (llamado Gen A asociado a FVIII) de 1.8 Kb y abundantemente producido por una amplia variedad celular y F8B (Gen B asociado a FVIII) de 2.5 Kb . En el momento de su descubrimiento suponían los primeros genes intrónicos descubiertos en el genoma de mamíferos con una función todavía incierta. F8B se transcribe en la misma dirección que el gen FVIII y da lugar a un mRNA de 2.5 Kb que incluye un exón propio y los exones 23 a 26 del gen FVIII. <sup>(20-22)</sup>

Por su parte, el gen F8A no contiene intrones y se transcribe en sentido opuesto<sup>(23)</sup>. A unas 400 Kb en posición telomérica distal del gen FVIII se encuentran dos copias del gen F8A, con una homología cercana al 100% y cuya presencia, es la responsable de casi el 50% de las Hemofilias A graves<sup>(24)</sup>.

### 2.3. Estructura del FVIII

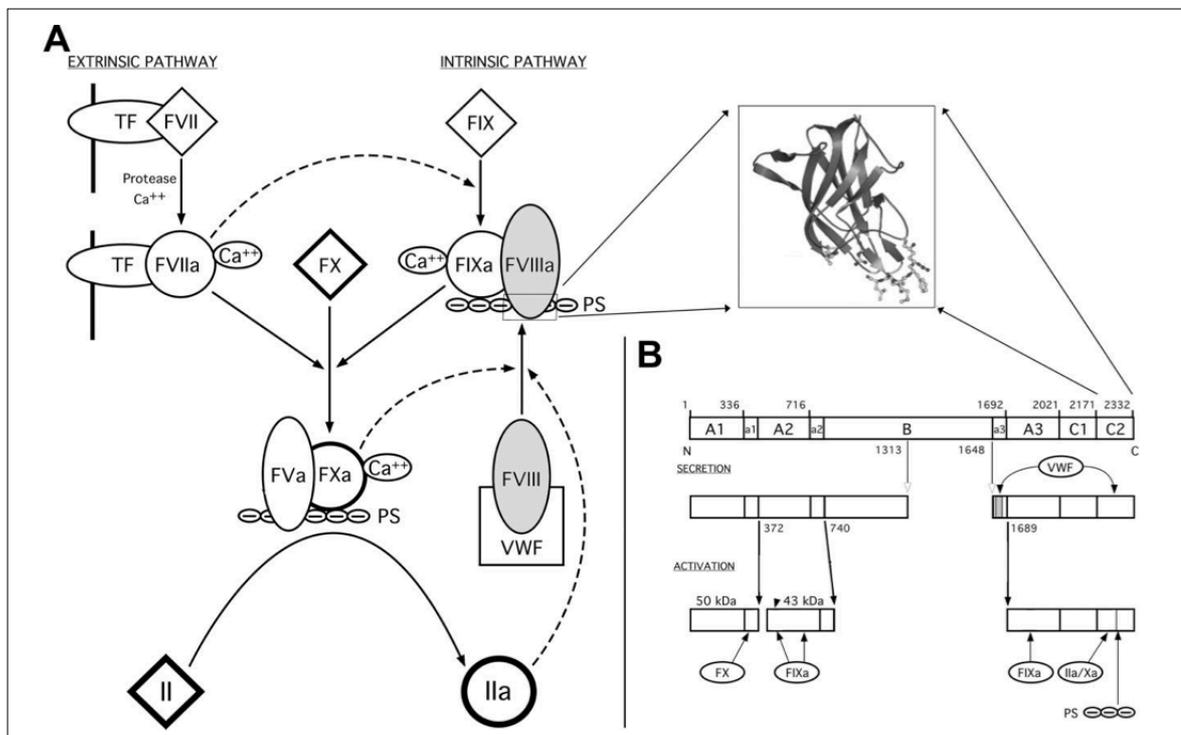
La estructura del FVIII, deducida a partir de la secuencia nucleotídica, consta de 6 dominios del tipo A1-A2-B-A3-C1-C2. Presenta una homología aminoacídica de alrededor del 40% con 5 de los 6 dominios de que también consta el factor V de coagulación, y cuya disposición también es similar, sin embargo el dominio B parece no estar relacionado<sup>(6)</sup>.

Por otra parte, los dominios C1 y C2 también parecen presentar una cierta relación con otras proteínas como las lectinas. Respecto al dominio B, no se ha encontrado hasta

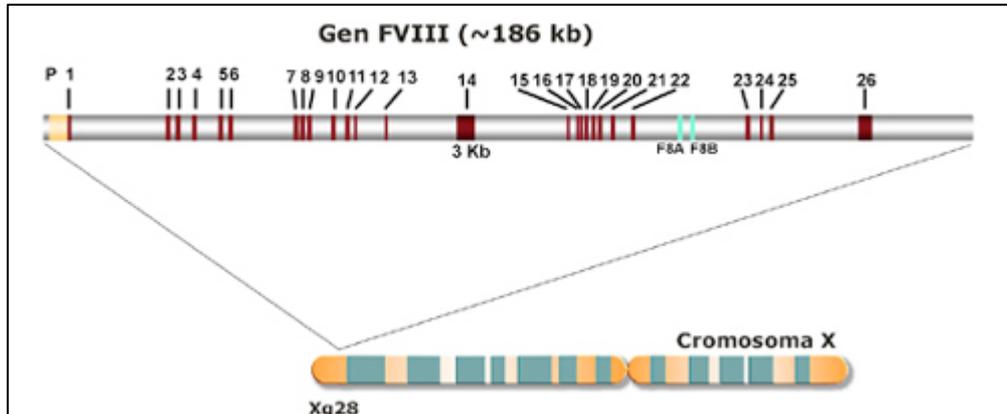
## Introducción

el momento homología significativa con ninguna de las diversas secuencias proteicas existentes en las bases de datos<sup>(25)</sup>.

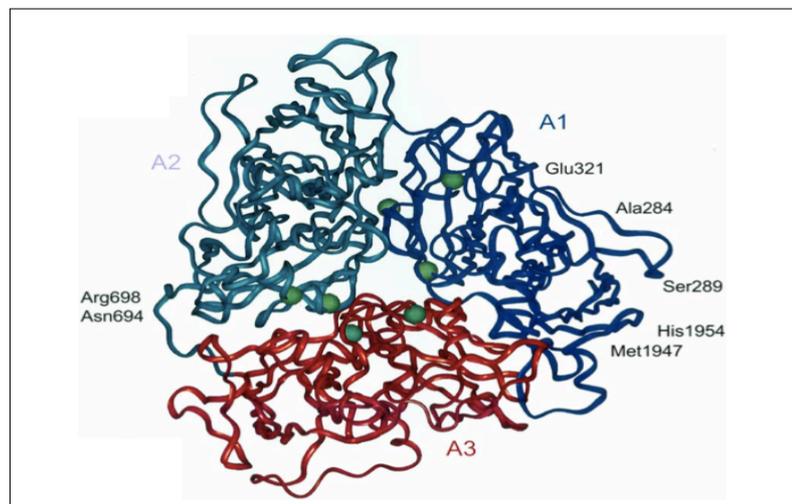
El FVIII es muy sensible al procesamiento proteolítico. Mayoritariamente circula asociado al FvW en forma de dos cadenas, una pesada que incluye los dominios A1-A2-B y otra ligera A3-C1-C2, unidas de forma no covalente mediante la interacción de iones  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Cu}^{2+}$ . Aunque existen ligeras discrepancias en la bibliografía, el modelo de delimitación de los diferentes dominios más ampliamente aceptado es el de Gitschier y colaboradores<sup>(6)</sup>. Según éste, los dominios se acotan según las siguientes coordenadas: A1 entre los residuos 1 y 328; A2 entre 380 y 711; B entre 712 y 1648; A3 entre 1694 y 2019; C1 entre 2020 y 2172; C2 entre 2173 y 2332. (Fay PJ. et al, 2005)<sup>16</sup>. Existen además dos regiones ricas en aminoácidos ácidos: una entre los dominios A1 y A2 (región a1) que contiene 15 ácidos aspártico y glutámico y parece estar implicada en la actividad procoagulante del FVIII; otra entre los dominios B y A3 (región a3), también rica en dichos aminoácidos y que contiene la zona de unión al FvW<sup>(16)</sup>. (Figuras 5, 6 y 7)



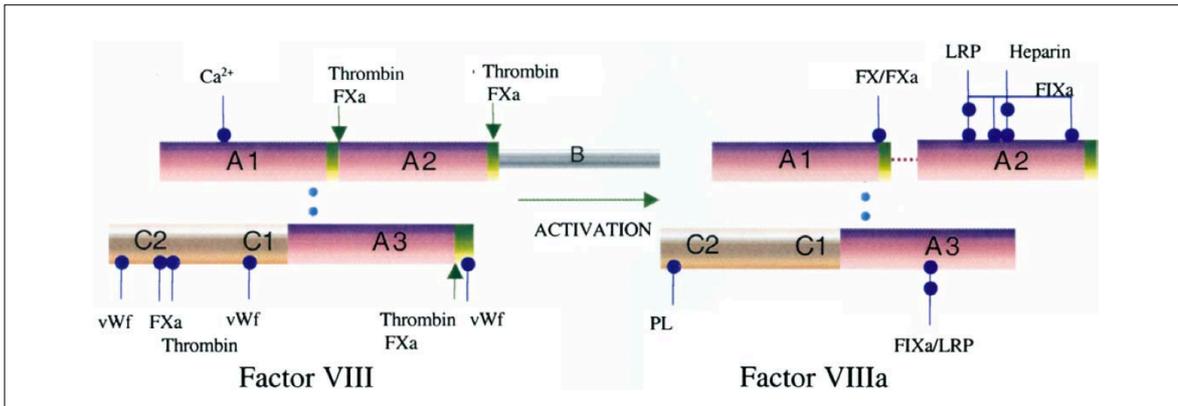
**Figura 3.** Estructura de la proteína FVIII en relación con su función hemostática (ver texto). Tomado de: Shen BW, et al. 2008<sup>(10)</sup>.



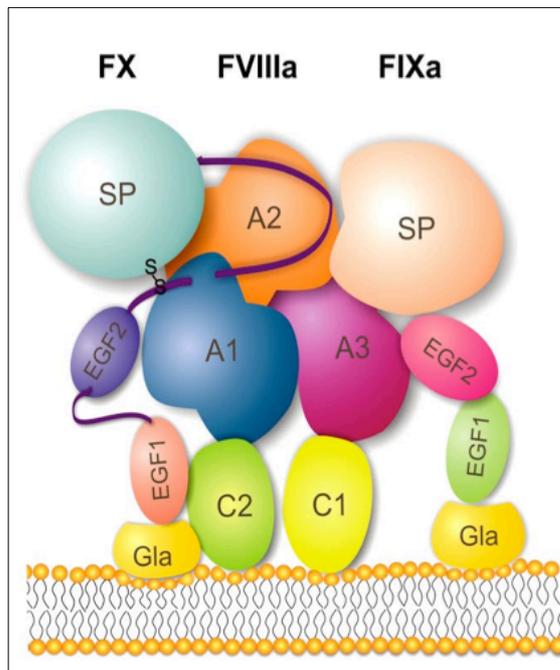
**Figura 4.** Localización y organización genómica del gen F8. Las zonas marcadas de color rojo corresponden a los exones del gen F8.



**Figura 5.** Modelo de estructura de FVIII describiendo sus diferentes dominios. Dominio A1 representado de color azul, dominio A2 de color cian y dominio A3 de color rojo. Las esferas de color verde indican los residuos alfa-carboxilados. (Tomado de Fay P. et al 2005) (16)



**Figura 6.** Factor VIII y Factor VIII activado. Los dominios A se representan de color rosa. Los dominios C de color dorado. Los segmentos a1, a2 y a3 de color verde. Dominio B de color plateado. Las cadenas pesadas y ligeras del heterodímero FVIII están vinculadas a través de puentes dependientes de ion cobre ( $\text{Cu}^+$ ), representados por alfileres de color azul. La asociación electrostática de los dominios A1 y A2 está representada por la línea de puntos suspensivos de color rojo. (Tomado de Fay P. et al 2005)<sup>(16)</sup>



**Figura 7.** Representación esquemática del complejo Xasa y mecanismo de activación del Factor X: se representan las proteínas FVIII con sus dominios, el factor IX activado y el sustrato factor X, y su disposición en la formación del complejo Xasa. (Tomado de Vencesla et al. 2008 Blood)<sup>(26)</sup>

### 2.4. Síntesis del FVIII

La determinación del lugar de biosíntesis de FVIII en el organismo ha sido un tema especialmente controvertido. Se ha demostrado la presencia de mRNA del FVIII en diversos órganos tales como bazo, páncreas y riñón<sup>(27)</sup>. Sin embargo el hígado es el órgano productor de FVIII por excelencia, más concretamente las células sinusoidales y en menor medida los hepatocitos<sup>(28)</sup>. A pesar de que otros órganos como el bazo y el riñón expresan cantidades similares de mRNA por gramo de tejido, el gran tamaño del hígado lo convierte en la principal fuente de FVIII<sup>(27)</sup>. Una clara demostración se encuentra en el hecho de que pacientes hemofílicos sometidos a trasplante hepático recuperan los niveles de FVIII hasta valores de normalidad<sup>(29,30)</sup>. Además, el promotor del gen FVIII contiene secuencias características de expresión específica de hepatocitos<sup>(27-31)</sup>.

### 2.5. Alteraciones genéticas en el gen F8

Los defectos asociados con Hemofilia A pueden ser divididos en varias categorías:

1.- Grandes reordenamientos.

2.- Inserciones o deleciones de secuencias genéticas de tamaño variable, desde un par de bases hasta el gen entero.

3.- Sustituciones simples en las bases del DNA produciendo cambio de posición de aminoácidos en la proteína final ("missense" o pérdida de sentido), cadena peptídica de terminación prematura ("non sense" o sin sentido, o mutaciones "stop"), o defectos en las zonas de acoplamiento o "splicing" del RNAm<sup>(32)</sup>.

Para recoger todas las mutaciones descritas en el gen F8 se creó el registro internacional HADB (The Haemophilia A Mutation Database and FVIII Resource Site (HAMSTeRS/HADB)<sup>(33)</sup>. En ella están registradas las distintas mutaciones descubiertas desde 1996 hasta la actualidad, proporcionando una fuente de información muy valiosa

## Introducción

para el seguimiento de esta patología y como referencia a la hora de describir nuevas mutaciones en el gen F8<sup>(34)</sup>.

La alteración recurrente más importante clínicamente es un reordenamiento que afecta al intrón 22 (inversión del intrón 22), afectando aproximadamente al 45% de todas las formas graves de Hemofilia A<sup>(35)</sup>.

### 2.5.1. Grandes reordenamientos

Están principalmente representados por la inversión del intrón 22, dada su frecuencia y relevancia clínica.

#### **- La inversión del intrón 22 (IVS22)**

A partir de la clonación del gen FVIII en 1984 diversos grupos iniciaron la búsqueda de las mutaciones responsables de la enfermedad en los pacientes afectados de Hemofilia A. La descripción de la técnica de la PCR agilizó tremendamente dicha búsqueda<sup>(36)</sup>.

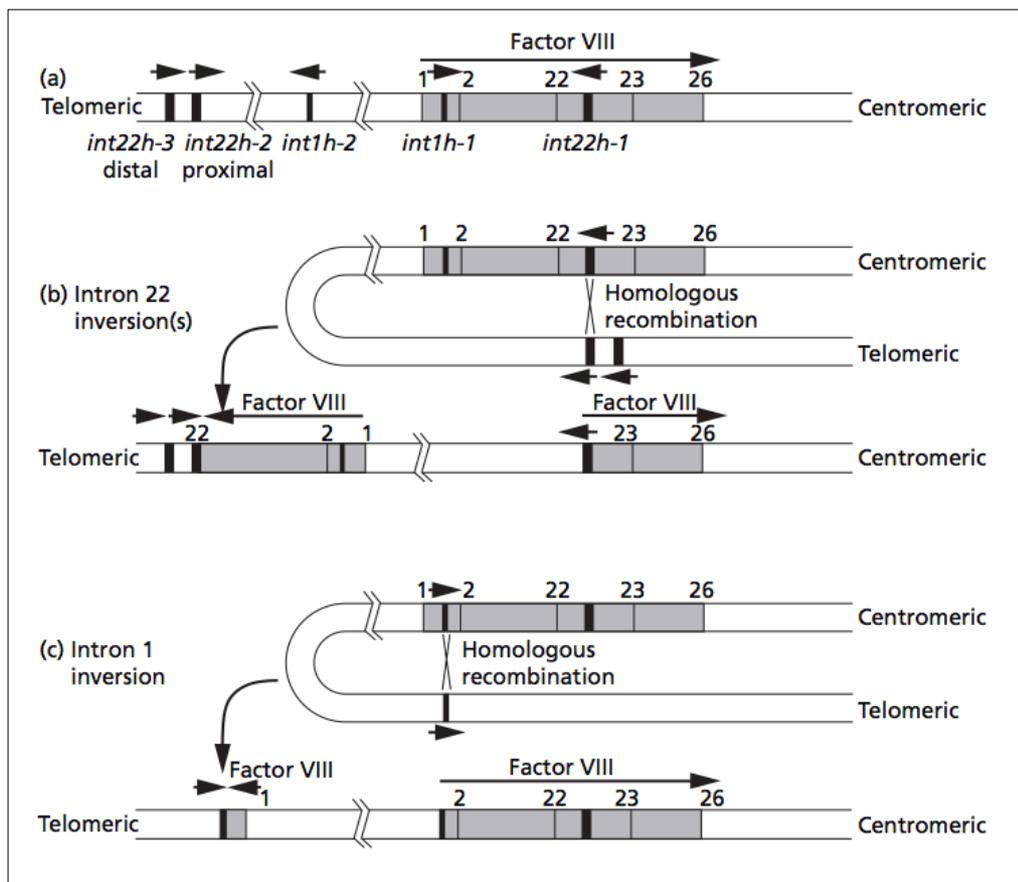
Gitschier y colaboradores<sup>(6)</sup> habían hallado, en el interior de las 32 Kb del intrón 22(IVS22) de individuos sanos, un islote CpG asociado a dos transcritos adicionales que denominaron F8A y F8B. F8B es un transcrito de 2.5 kb y es transcrito en la misma dirección que el gen F8, usando un exón privado. El gen F8A (int22th-1) es transcrito en sentido opuesto al gen F8, presenta además dos copias altamente homólogas en la porción telomérica distal a unas 400 Kb del gen FVIII: los denominados F8A'(int22th-2) y F8A'' (int22th-3). Una recombinación intracromosómica homóloga desigual entre el gen F8A intrónico y alguna de sus copias teloméricas da lugar a la división del gen del FVIII en dos mitades muy distanciadas una de la otra, orientadas en sentido opuesto<sup>(24,36)</sup>, lo que se traduce en una alteración importante en la secuencia codificante del gen.

En la Figura 8 se presenta de forma esquemática el proceso que da lugar a la inversión del intrón 22. Ello requiere de la torsión del extremo del brazo largo del cromosoma X para permitir el encuentro de las regiones homólogas y que se pueda

## Introducción

producir la recombinación, cuya frecuencia estimada es de aproximadamente  $4 \times 10^6$ . Los genes implicados en la recombinación (F8A, F8A' y F8A'') tienen un tamaño aproximado de 9 Kb y una homología cercana al 100%. Cuando la recombinación involucra al gen F8A', la copia más cercana al gen FVIII, la inversión se denomina proximal o de tipo 1 y se encuentra en el 78% de los casos. Cuando el gen implicado es el F8A'', situado en el extremo, la inversión se denomina distal o de tipo 2 (19% de los casos).

Se ha descubierto una tercera variante, minoritaria (3% de los casos), que ocurre en individuos portadores de tres copias extragénicas del gen F8A<sup>(37)</sup>. Los efectos fenotípicos de los tres tipos de inversiones son, lógicamente, absolutamente idénticos.



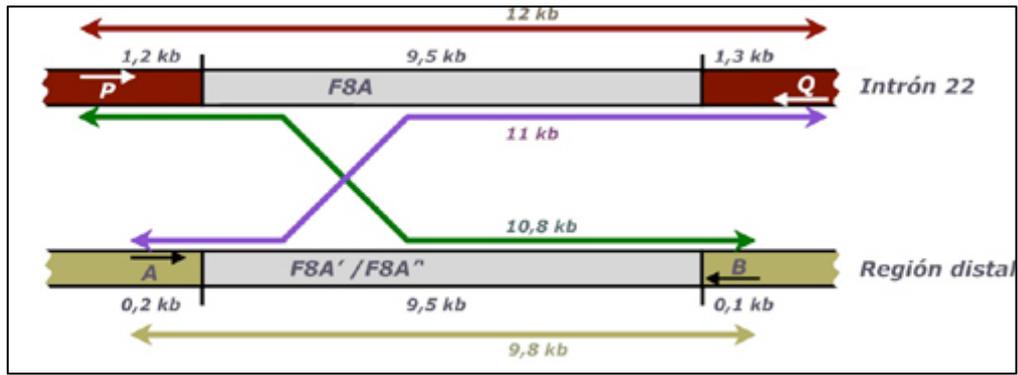
**Figura 8.** Mecanismo de formación de las inversión del intrón 22 y del intrón 1 del gen FVIII. La recombinación entre las secuencias homólogas en el intrón 22 y la región telomérica del cromosoma X conduce a la separación de los exones 1-22 de los exones 23-26, con la formación de una secuencia invertida y recolocación de la secuencia telomérica homóloga (a y b). La recombinación entre la secuencia del intrón 1 y su secuencia homóloga telomérica produce la recolocación y la inversión del intrón 1 (a y c). (Tomado de Kembal-Cook G. and Gomez K. 2010)<sup>(32)</sup>.

## Introducción

La inversión del intrón 22 se origina de forma mayoritaria en las células germinales masculinas, según demostró un estudio de marcadores polimórficos que permitió trazar así el origen del cromosoma portador de la mutación entre los ascendientes de individuos afectados. Una más que plausible explicación a este hecho, una vez conocido el mecanismo que da lugar a la inversión del intrón 22, es que durante la meiosis que tiene lugar en la espermatogénesis, la falta de un segundo cromosoma X homólogo favorece el encuentro entre los genes F8A y F8A'/F8A'' cuando el cromosoma se curva sobre si mismo. En el caso de la meiosis que acontece en las células germinales femeninas, el apareamiento de los dos cromosomas X presentes inhibiría dicho encuentro y por tanto la generación de la mutación<sup>(37)</sup>.

Entre un 40 y un 45% de las Hemofilias A graves están originadas por el fenómeno de la inversión del intrón 22. Estos elevados porcentajes, que varían poco entre las diferentes poblaciones, la convierten con diferencia, en la mutación recurrente más relevante por sus graves consecuencias clínicas y sociales. Por ello el estudio molecular de los hemofílicos graves se inicia en la mayoría de laboratorios, sino en todos, analizando la presencia de la inversión del intrón 22. La técnica clásica para su estudio ha sido la de Southern Blot<sup>(38)</sup>. Sin embargo, Liu y colaboradores han describieron una técnica basada en la amplificación por PCR de múltiples fragmentos genómicos de gran tamaño que supone una notable mejora en la práctica diagnóstica y que se esquematiza en la Figura 9<sup>(39)</sup>. Finalmente Rossetti y col. (2005)<sup>(40)</sup> han descrito un método más fiable que amplifica fragmentos de menor tamaño y que ha sido en validado en el laboratorio de Genética del Hospital Sant Pau (ver sección 2.4.1 de Material y Métodos).

## Introducción



**Figura 9.** Estrategia de PCR de fragmentos largos para la detección de la inversión del intrón 22.

### .- La inversión del intrón 1 (IVS1)

Resulta de la recombinación entre una secuencia de 1 kb en el intrón 1 (int1h-1) y una secuencia homóloga (inth1-2) distanciados por 140 kb aproximadamente en sentido 5' hacia F8. Esta recombinación produce la separación de la secuencia promotora del exón 1 del resto del gen F8. Esta alteración aparece aproximadamente en el 2%-5% de los casos de Hemofilia A grave<sup>(41)</sup>. En la figura 8 se esquematiza este tipo de inversión.

### 2.5.2. Inserciones y deleciones

#### Inserciones:

La mayoría estas alteraciones descritas en las bases de datos consisten en inserciones de una base adicional de adenina y por lo general producen una alteración en el marco de lectura ("frameshift"), produciendo un fenotipo grave de enfermedad. Sin embargo, existe una minoría de casos que están asociados con niveles bajos, pero medibles de FVIII, con clínica moderada o incluso leve.<sup>(42)</sup>

#### Deleciones:

Se pueden dividir en:

.- Pequeñas deleciones: (< 50pb)

Generalmente causan alteraciones "frameshift" (cambio del marco de lectura) y se asocian normalmente con formas graves de enfermedad, aunque hay unos pocos casos asociados con formas moderadas y leves.

## Introducción

.- Grandes deleciones: (> 50pb)

Producen normalmente formas graves de enfermedad, con ausencia de de FVIII antigénico y de su actividad; con alto riesgo de desarrollo de inhibidor contra el FVIII<sup>(42)</sup>.

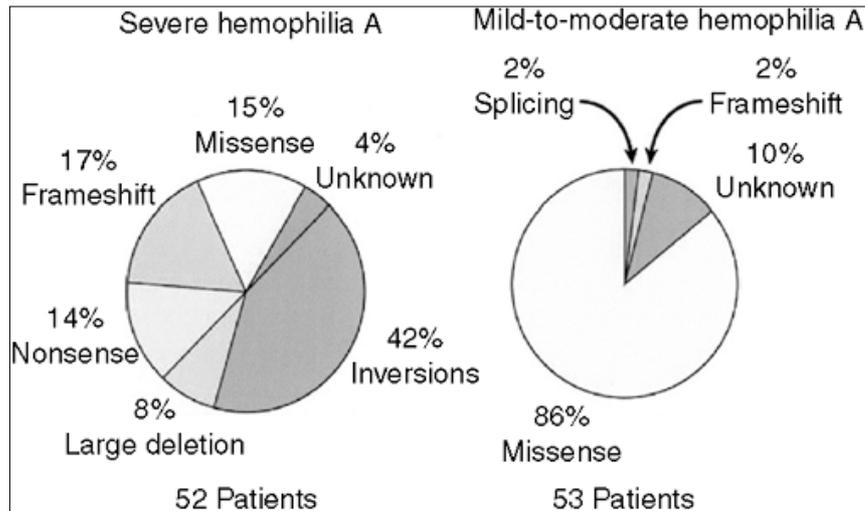
### 2.5.3. Mutaciones puntuales

La sustitución de una base en los exones del gen F8 pueden dar un cambio de aminoácidos (mutación "missense" o mutación con pérdida de sentido) o la introducción de un codón de parada, que causa una parada prematura de la cadena peptídica (mutación "nonsense" o mutación sin sentido). Por otra parte, la sustitución de bases en los sitios de splicing de RNAm (en los límites intrón-exón) que puede llegar a producir una alteración en el número de exones o generar exones incompletos (mutación "splicing").

El exón 14 es aproximadamente 10 veces más grande que la media de tamaño del resto de los exones y tiene mayor carga de mutaciones generalmente.

Mientras que las mutaciones missense y splicing se pueden asociar a todo tipo de gravedad, las nonsense son casi exclusivas de las formas graves.

La gran mayoría de las mutaciones puntuales han sido descritas una vez (con más de 1400 mutaciones missense individuales en las bases de datos). Esto sugiere la existencia de algún factor predisponente para la replicación errónea a nivel de la cromatina, como puede ser el efecto del dinucleótido CpG (mutación "hotspot" en los dinucleótidos C-fosfato-G, zonas predispuesta a sufrir mutaciones con más frecuencia, hasta 10-20 veces más que en cualquier otro dinucleótido), secuencias redundantes o por otros factores locales<sup>(32)</sup>.



**Esquema 1.** Mutaciones del gen F8 en Hemofilia A grave y moderada-leve. La frecuencia de los defectos genéticos en Hemofilia A grave y moderada-leve se muestran identificados desde estudios en los que todas las mutaciones fueron identificadas en una muestra poblacional determinada. (Tomado de Kaufman RJ, et al. 2006.)<sup>(42)</sup>

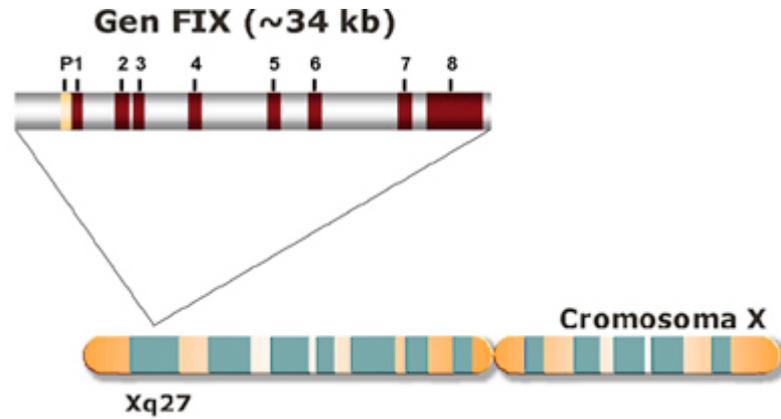
## 2.6. Bases moleculares de la Hemofilia B

La Hemofilia B, caracterizada por una deficiente actividad del FIX, es unas 5-6 veces menos frecuente que la Hemofilia A y se estima que afecta a unas 15-20 personas por millón. Al igual que el FVIII, el FIX participa en la fase intermedia de la vía intrínseca de coagulación. Es sintetizado en el hígado y circula inactivo en plasma a una concentración media de 2-5 ug/ml en forma de una única cadena polipeptídica de 415 aminoácidos y unos 56 KDa, de los cuales el 20% corresponden a carbohidratos. Su vida media es de unas 24 horas aproximadamente<sup>(43,44)</sup>.

El FIX es una serin-proteasa que se activa tras sufrir una proteólisis específica por el FXIa o por el complejo FVIIa-FI. Una vez activado, el FIXa puede formar el complejo de activación del FX uniéndose al FVIIIa, fosfolípidos de superficie y Ca<sup>2++</sup>. La existencia en las células endoteliales de receptores con alta afinidad para el FIX asegura una activación eficiente y localizada del FX por el complejo FIXa-FVIIIa, que actúa como una unidad. Resulta por tanto lógico que las Hemofilias A y B presenten una gran similitud

## Introducción

clínica, dado que son el resultado de alteraciones moleculares que afectan la función de dos componentes diferentes que forman parte de un mismo complejo<sup>(43,44)</sup>.



**Figura 10.** Localización y organización genómica del gen F9.

### 2.7. Estructura y síntesis del FIX

El gen del FIX (F9) se encuentra localizado en la región telomérica del brazo largo del cromosoma X, en la banda Xq27<sup>(45)</sup>. En la misma región, en posición distal, se encuentran los loci correspondientes a los genes FMR-1 (su alteración provoca el desarrollo del Síndrome del cromosoma X frágil) y FVIII<sup>(46)</sup>. Tal y como se indica en la Figura 6, el gen F9, clonado en 1982, tiene un tamaño cercano a las 34 Kb y consta de 8 exones y 7 intrones<sup>(47-50)</sup>. El tamaño de los exones varía entre los 25 nucleótidos del exón 3 y los 1935 nucleótidos del exón 8. Los intrones también presentan una gran heterogeneidad en su longitud, siendo de tan solo 188 nucleótidos en el intrón 2 y de 9473 nucleótidos en el intrón 6.

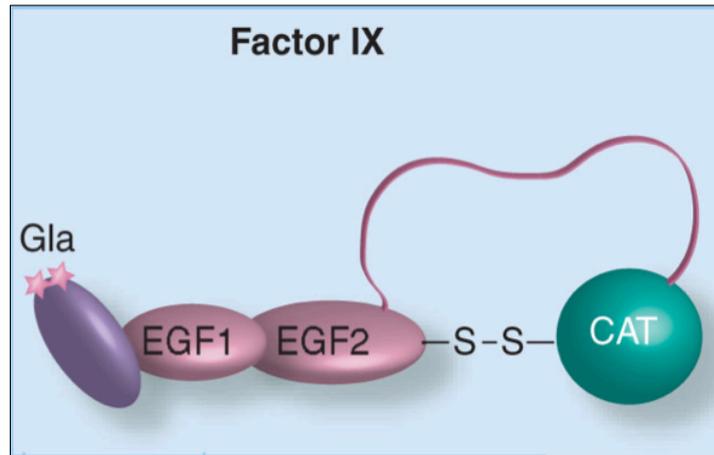
Los ocho exones dan lugar a un total de 7 dominios funcionales y, prácticamente, cada exón codifica un dominio. Así, el exón 1 corresponde al péptido señal, el exón 2 al propéptido y a la región Gla, el exón 3 codifica para una región rica en aminoácidos aromáticos que hace de puente entre los dominios adyacentes, el exón 4 da lugar a la región EGF-1, el exón 5 a la región EGF-2, el exón 6 codifica para el péptido de

## Introducción

activación y finalmente los exones 7 y 8 corresponden al dominio proteasa o catalítico<sup>(51)</sup>.

El comienzo de la proteína madura se caracteriza por un dominio de 40 aminoácidos rico en ácido  $\gamma$ -carboxiglutámico conocido como dominio Gla. Sus doce residuos de ácido glutámico son carboxilados por una carboxilasa dependiente de vitamina K y juegan un papel fundamental en la unión del FIX al  $\text{Ca}^{2++}$ . Dominios homólogos del tipo Gla se hallan también en otras proteínas dependientes de vitamina K, presentando una secuencia altamente conservada, lo cual es coherente con el hecho de que todas ellas se unen también al  $\text{Ca}^{2++}$ . Los residuos 3 a 11 están directamente implicados en la unión a la membrana de la célula endotelial<sup>(52)</sup>.

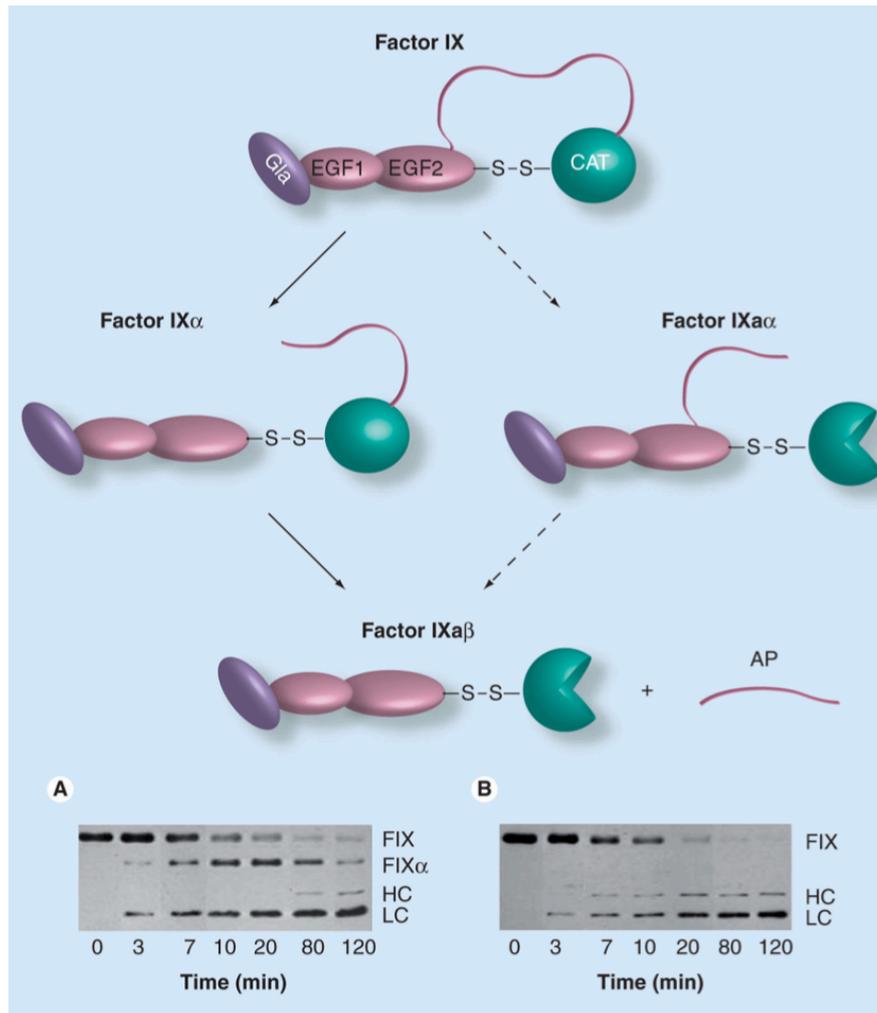
Los dominios EGF-1 y EGF-2 tienen esta denominación por presentar una gran homología con los del factor de crecimiento epidérmico (Epidermal Growth Factor). Ambos están situados en tándem y comprenden los residuos 48 a 127. Dominios similares se encuentran en otras serin-proteasas como el FX, uroquinasa y FXII. En EGF-1 se encuentra una región de alta afinidad por el  $\text{Ca}^{2++}$ , al igual que en el dominio Gla<sup>(53)</sup>. En la posición 64 se encuentra un residuo poco común de ácido  $\beta$ -hidroxiaspártico, resultado de la hidroxilación post-traducciona del ácido aspártico. Esto ocurre en un 25% de las moléculas de FIX y su función, si es que la tiene, se desconoce aún<sup>54</sup> (figuras 11 y 12).



**Figura 11.** Estructura del FIX. Los dominios Gla y EGF están alineados con el dominio catalítico serin-proteasa (CAT). La activación del factor IX a factor IXa afecta a los dos puntos proteolíticos en ambos extremos del péptido de activación (representado por la cinta que conecta el dominio EGF2 a CAT). (Tomado de Smith SB. et al. 2008)<sup>(54)</sup>

El péptido de activación, el dominio contiguo a los EGF1 y 2, es el dominio menos conservado entre las serin-proteasas. Consta de 35 aminoácidos comprendidos entre los residuos Arg145 y Arg180, sobre los cuales actúa el FXIa. Sin embargo, sólo el corte proteolítico en Arg180 da lugar a la actividad catalítica del FIXa. Los residuos Thr159 y Thr169 se encuentran O-glicosilados<sup>(55)</sup>.

El dominio proteasa o catalítico del FIX corresponde al de una típica serin-proteasa. Es el dominio más grande y se extiende desde el residuo 181 al 415. El centro activo contiene, al igual que en la mayoría de las proteínas de esta familia de enzimas, los residuos His221, Asp269 y Ser365. Las secuencias aminoacídicas que flanquean estos tres residuos están también muy conservadas. Este es el caso de la posición 359 correspondiente a la zona de unión al sustrato, donde se encuentra una aspartato imprescindible para conferir la especificidad proteolítica. La rotura del enlace peptídico entre Arg180 y Val181 permite a este último residuo interactuar con Asp364, lo que ocasiona un cambio conformacional y un aumento de la actividad catalítica de la proteína<sup>(56)</sup>.

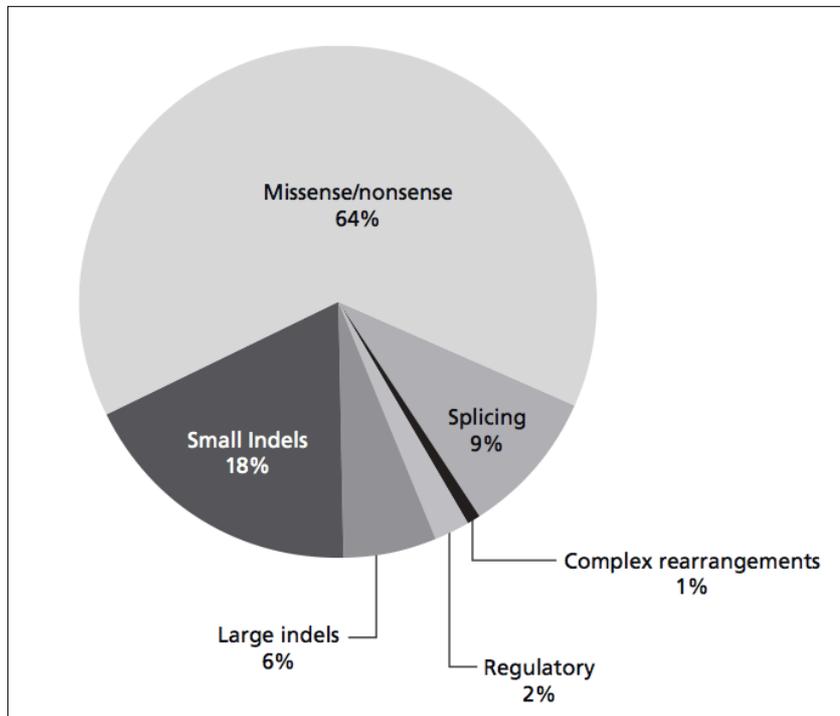


**Figura 12.** Activación del FIX. Posible mecanismo de activación del factor IX a la proteasa FIXaβ. En la imagen se describen dos western inmunoblots que reflejan el proceso de activación en el tiempo mediado por FVII/Factor tisular (A) o por FXIa (B). El factor IX es convertido a IXaβ por rotura tras las posiciones de Arg<sup>145</sup> y Arg<sup>180</sup>, liberando el péptido de activación (cinta que conecta a EGF2 con CAT) que conecta el dominio CAT (también conocido como cadena pesada) con la cadena ligera no catalítica (Dominios Gla y EGF). Las cadenas ligera y pesada del factor IXaβ permanecen unidas por un puente disulfuro. El complejo FVII/Factor tisular inicialmente produce rotura del factor IX tras la posición de Arg<sup>145</sup>, formando el factor IXα (A), que no es activa ya que el péptido de activación permanece unido al dominio catalítico. El complejo factor VIIa/FT produce rotura en el FIXα tras la posición de Arg<sup>180</sup> para formar el factor IXaβ. El dominio con actividad proteasa está representado con la porción de círculo de color verde. El factor XIa también produce rotura en FIX inicialmente tras la posición de Arg<sup>145</sup>, no obstante, no se observa el producto intermedio FIXα en os experimentos de western inmunoblots tiempo dependiente (B), posiblemente porque la rotura tras la posición Arg<sup>180</sup> debe de ser relativamente rápida. La rotura inicial de FIX tras posición Arg<sup>180</sup> para formar el factor IXaα parcialmente activo es una reacción menor durante la coagulación normal, pero es el mecanismo preferido de activación de la proteasa encontrada en el veneno de la víbora de Russell. (Tomado de Smith SB, et al. 2008)<sup>(54)</sup>.

## 2.8. Alteraciones genéticas en el gen F9

La primera referencia sobre mutación en el gen del F9 se realizó previamente a la clonación de dicho gen y se denominó mutación Chapel Hill, en 1983<sup>(57)</sup>. Pero fue a raíz del uso generalizado de PCR cuando se empezaron a describir nuevas mutaciones en dicho gen.

La Hemofilia B es una alteración mutacional muy heterogénea, con lo que en cada individuo se debe de secuenciar la totalidad del gen para clarificar la causa de su enfermedad. Uno de los objetivos del estudio genético es el permitir realizar predicciones fenotípicas basadas en la experiencia de similares mutaciones en otros pacientes<sup>(44)</sup>. En este sentido, es muy importante la existencia de bases de datos internacionales como Haemophilia B Mutation Database<sup>(58)</sup> donde enviar nuevos casos y otras bases de datos donde hay registradas sobre las 900 mutaciones diferentes<sup>(59-61)</sup>.



**Figura 13.** Resumen de los diferentes tipos de mutaciones en Hemofilia B. Se observa el predominio de las mutaciones missense/nonsense, seguidas por las pequeñas deleciones o inserciones. (Tomado de Gomez, K. 2010)<sup>(44)</sup>

### 2.8.1. Mutaciones puntuales

Son las alteraciones moleculares más frecuentes en Hemofilia B, suponiendo el 64% de todas las mutaciones. Generalmente son causadas por adiciones erróneas de nucleótidos durante la replicación del ADN. Existen ciertos nucleótidos o grupos de nucleótidos que son más frecuentemente mutados que otros<sup>(44)</sup>.

Cuando las mutaciones causantes de HB ocurren espontáneamente durante la meiosis suelen ocurrir frecuentemente en los gametos masculinos. Estudios poblacionales indican que cuando ocurre una mutación esporádica y resulta en un estado de portadora es ocho veces más probable que se haya originada en los gametos masculinos<sup>(62,63)</sup>.

Los efectos de las mutaciones puntuales varían dependiendo de dónde se producen en el gen. Alteraciones en la secuencia codificante pueden conducir a mutaciones missense, codones de parada prematura (mutaciones sin sentido) o en mutaciones de splicing.

Las mutaciones missense pueden ser clasificadas en tipo I y tipo II. Las de tipo I son mutaciones cuantitativas que producen una reducción de los niveles de una proteína normal. La mutación tipo II o cualitativas producen una reducción de la función de la proteína, que puede presentarse con cantidades normales o descendidas de proteína. Para poder distinguir estos dos tipos de mutaciones es preciso la medición del FIX antigénico y funcional (actividad coagulante). Las mutaciones sin sentido (nonsense) ocurren cuando un cambio de un nucleótido produce la introducción de un codón de parada prematuro. Normalmente producen un defecto grave de tipo I<sup>(64)</sup>.

Los exones de empalme (splicing) para formar el correcto ARN mensajero se basa en el reconocimiento de los uniones de empalme por parte del ARN polimerasa. Las mutaciones de splicing suponen el 9% de todas las mutaciones en HB y pueden ocurrir por mutaciones puntuales en secuencias intrónicas, produciendo un lugar aceptor de empalme alternativo<sup>(44)</sup>.

### **2.8.2. Mutaciones Hotspots**

Por efecto de zonas más sensibles a la aparición de mutaciones, como la secuencia dinucleotídica CpG, que son zonas de hipermetilación, favoreciendo la aparición de errores en el proceso de reparación del DNA<sup>(65,66)</sup>.

### **2.8.3. Mutaciones que truncan la proteína**

Las inserciones o deleciones de unos pocos nucleótidos suponen el 18% de todos los tipos de mutaciones en HB. Estas alteraciones ocurren frecuentemente en secuencias de dinucleótidos de repetición. Como estos dinucleótidos son frecuentemente intrónicos, estos errores no tienen consecuencias normalmente, pero en ocasiones pueden afectar a elementos que controlan el marco de lectura si están afectadas secuencias codificantes y es probable que se produzca un defecto grave de proteína.

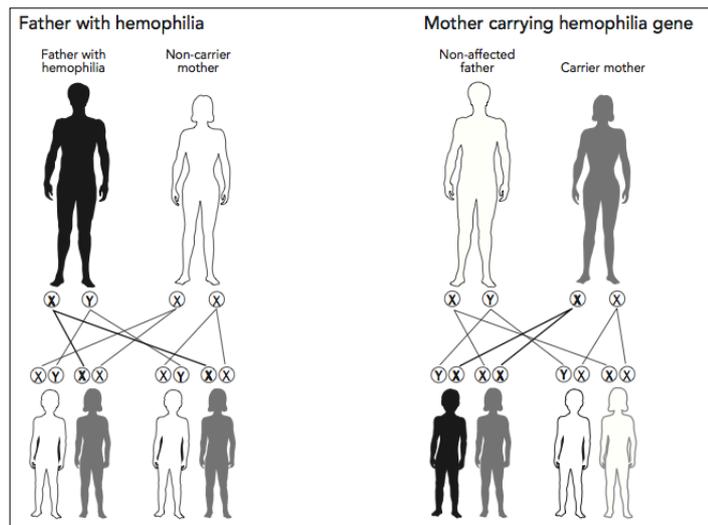
Los reordenamientos genéticos o las grandes deleciones que afectan a una gran parte del gen suponen un 7% de todas las alteraciones en HB (al contrario que en HAG, donde son más frecuentes). El origen de las deleciones es más frecuente a partir de los gametos femeninos<sup>(44,67)</sup>.

### **2.8.4. Mutaciones que afectan a la región promotora**

Un ejemplo característico es la Hemofilia B Leyden, caracterizada por bajos niveles de FIX en la infancia y aumento hasta prácticamente normal en la edad adulta. dicho fenómeno está relacionado con el aumento de los niveles de testosterona en la pubertad. Esta mutación ocurre en la región promotora del gen F9, produciendo la alteración en la transcripción de las zonas de unión del FIX, lo cual es compensado por la respuesta a andrógenos<sup>(68,69)</sup>.

### 3. ESTUDIO DE PORTADORAS DE HEMOFILIA

La Hemofilia A y B son desórdenes hereditarios recesivos ligados al cromosoma X. Cuando una mujer es portadora, existe un 50% de posibilidades de que un hijo varón nazca con la enfermedad o que una hija nazca siendo portadora. Cuando los hijos nacen de una pareja de un hemofílico y una mujer normal, todos los hijos varones serán sanos, pero todas las hijas serán portadoras obligadas. (Figura 14)



**Figura 14.** Representación esquemática de herencia ligada al sexo en Hemofilia. En el caso de un padre afectado de Hemofilia, todas sus hijas serán portadoras y ningún hijo estará afectado. En el caso de madre portadora, el 50% de los hijos estarán afectados y las hijas que hereden el cromosoma X materno con la alteración serán portadoras.

Las portadoras posibles a las que se vayan a realizar pruebas sufren presiones psicológicas y sociológicas que influirán en su percepción de las implicaciones personales del posible estado de portadora. La percepción social particular sobre el estado de portadora de la enfermedad influirá a la hora de elegir ser estudiada. Otros aspectos que también influirán son el grado de ansiedad por miedo a padecer la enfermedad, sus complicaciones y la disponibilidad de tratamiento seguro. Las mujeres con parientes hemofílicos graves, con inhibidores o con VIH están más interesadas en estudiarse. Aquéllas con parientes con enfermedad moderada o que no lo han vivido

## Introducción

próximamente, pueden tener una percepción diferente de la enfermedad y ven de forma diferente la posibilidad de realizarse estudio de posible portadora. La mujer que confirme su estado de portadora precisará una gran ayuda para aceptar su papel en su familia y en la sociedad. En este sentido, juegan un papel fundamental las Asociaciones de Hemofilia, con apoyo profesional tanto a pacientes como portadoras<sup>(70)</sup>.

Las portadoras de Hemofilia heredan, normalmente, de uno sus progenitores un gen anómalo del FVIII o FIX. Como el otro gen del otro progenitor es normal, el nivel de FVIII o FIX coagulante es 50%-75% de lo normal, que normalmente es suficiente para una hemostasia normal<sup>(70)</sup>.

Puede existir clínica hemorrágica en portadoras en las que el nivel de factor esté dentro de una Hemofilia leve, por debajo del 40%-30%, que puede ser debido a:

.- LIONIZACIÓN EXTREMA: Basado en la hipótesis de Lyon<sup>71</sup>; consiste en la inactivación de uno de los dos cromosomas X en las mujeres, que se produce de forma precoz en el desarrollo embrionario, en el estadio de blastocisto (12-16 semanas de la fecundación), y al azar en cada una de las células del embrión. Posteriormente, en diferentes grupos celulares se expresará uno u otro de los cromosomas. La actividad o inactividad establecida se mantendrá en las divisiones celulares sucesivas. Si el cromosoma inactivado es el normal, la mujer puede comportarse clínicamente como un paciente varón<sup>(70)</sup>.

.- HOMOCIGOSIS: Los dos cromosomas X de la mujer poseen el gen defectuoso. Esta situación es extraordinariamente rara (inferior a 1 de cada 100 emparejamientos)<sup>(72)</sup>.

.- Alteraciones cromosómicas del tipo SD. DE TURNER (45, X): Al faltarle un cromosoma sexual, en el caso de transmitirle la enfermedad, desarrollarían clínicamente la misma<sup>72</sup>.

.- Cuando existe la variante de la enfermedad de von Willebrand tipo 2N (Normandía) doble heterocigoto<sup>(70)</sup>.

El primer paso en el asesoramiento genético es averiguar por qué la consultante cree que es portadora y la realización de un árbol familiar. Las conclusiones de este estudio preliminar pueden ser tres:

## Introducción

.- La mujer no es portadora: cuando procediendo de una familia de hemofílicos por vía paterna, su padre no padece la enfermedad. No obstante, puede aparecer "de novo" en una familia sin antecedentes como consecuencia de una mutación, pero esto es muy raro, imprevisible y no se puede evidenciar mediante estudios genético "a priori"<sup>(70)</sup>.

.- Ser portadora obligada: En el caso de que su padre sea hemofílico conocido (salvo los raros casos de mosaicismo somático), o sea madre de más de un hijo hemofílico (excluyendo los gemelos idénticos) o aquella mujer con un hijo hemofílico y un hijo de su hija (nieto) que sea hemofílico o que tuviera un hijo hemofílico y una historia bien documentada de existencia de Hemofilia en la rama materna<sup>(70)</sup>.

Se denomina MOSAICO al individuo que presenta en su organismo dos o más líneas celulares genéticamente distintas, consecuencia de alteraciones en las fases celulares iniciales del desarrollo embrionario, afectando al cigoto tras la primera división mitótica. Ambas líneas derivan del mismo cigoto y con contenidos genético diferentes. Tanto si el mosaicismo es somático (afecta sólo a células somáticas) como germinal (afecta sólo a células germinales), como gonosomal (afecta a ambos grupos celulares), la probabilidad de volver a tener un hijo hemofílico depende de la cantidad de óvulos que porten la alteración, lo cual es difícil de establecer<sup>(72)</sup>. También se aplica a los padres de portadoras de donde proviene el cromosoma X con la mutación pero que no presenta la enfermedad (puede ser de novo o mosaico).

.- Posible portadora: En el caso de que tenga familiares afectados por línea materna y no tenga hijos enfermos o tenga un hijo hemofílico sin que haya habido otro caso dentro de la familia. Existen cuatro posibilidades<sup>(70,72)</sup>:

1. Que la consultante herede el gen a través de una línea materna silente, es decir, que el gen se haya transmitido de mujer a mujer sin expresarse, siendo una verdadera heterocigota.

2. Que la madre sea un mosaicismo germinal.

3. Que la enfermedad de su hijo sea consecuencia de un único óvulo con la alteración genética y que el resto de sus óvulos sean normales.

4. Que el hijo sea un mosaicismo somático grave, y que las células incapaces de sintetizar factor sean la mayoría.

## Introducción

Antes del uso generalizado del diagnóstico genético, se utilizaba la valoración fenotípica e inmunológica del estado de portadora; partiendo de la base de que una portadora tiene aproximadamente unos niveles de factor de 25%-75% del valor normal de factor circulante, pero diversas situaciones clínicas y estados inflamatorios pueden alterar estos niveles y por otra parte existe la posibilidad de superposición de valores en las portadoras con mujeres normales, no pudiéndose establecer el diagnóstico de portadora con seguridad. En Hemofilia A se utilizaron ( y en algunos casos esporádicos actualmente) los niveles de FVIII:C y FvW:Ag para intentar establecer el estado de portadora. No obstante, unos valores normales no descarta el estado de portadora, habiéndose visto valores anormales en personas no portadoras. Tras la aparición de los estudios de DNA , estas técnicas han quedado en segundo plano<sup>(73)</sup>.

#### 4. DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE LA HEMOFILIA

El diagnóstico molecular de la Hemofilia fue posible a partir de la clonación y caracterización de los genes FVIII y FIX. Sin embargo, y a pesar de que la identificación de ambos genes tuvo lugar de forma prácticamente simultánea, las peculiaridades de cada uno de ellos tales como el tamaño, complejidad estructural, etc. han dado lugar a que las estrategias diagnósticas hayan evolucionado de forma sensiblemente diferente.

En el caso de la Hemofilia A grave, el estudio comienza por la determinación de la inversión del intrón 22, dada su elevada recurrencia. Cuando la inversión del intrón 22 ha sido descartada o cuando se trata de Hemofilia B, el estudio molecular se plantea según diversas técnicas<sup>(74-76)</sup>.

Actualmente existen 3 tipos de metodologías:

##### 4.1. Técnicas indirectas o de ligamiento genético.

Se basan en la propiedad que tiene el ADN, en el que se encuentran ciertos marcadores polimórficos que permiten un seguimiento del cromosoma portador del gen defectuoso, aunque no proporciona información sobre el tipo de mutación<sup>(77, 78)</sup>. Estos marcadores no tienen ninguna relación con la anomalía y pueden estar localizados intra o extragenéticamente; siendo los más fiables los intragénicos por tener menor probabilidad de recombinación entre el loci polimórfico y la mutación.

Los marcadores utilizados pueden ser:

1.- Tipo RLPF (Restriction Fragment Length Polymorphism), en los que se determina la presencia o ausencia de una determinada diana de restricción<sup>(79)</sup>.

2.- Tipo STR (Short Tandem Repeats), que consisten en repeticiones de pocas bases un número variable de veces y que se encuentra localizados a lo largo de todo el genoma. Estos marcadores son más informativos por ser multialélicos y proporcionar una mayor heterocigosidad en la población<sup>(80,81)</sup>.

Los polimorfismos dialélicos han sido también ampliamente utilizados dado que, aún siendo menos informativos, proporcionan una mayor seguridad diagnóstica como estudio complementario adicional. Entre éstos destacan los polimorfismos BclI<sup>(82, 83)</sup>, HindIII y XbaI<sup>(77,78,84,85)</sup>.

En las tablas 1 y 2 se recogen los marcadores intragénicos comúnmente utilizados en el diagnóstico indirecto de la Hemofilia A y B respectivamente.

## Introducción

**Tabla 1.** Polimorfismos intragénicos utilizados en el diagnóstico indirecto de la Hemofilia A.

Primer designation	Sequence 5'–3'	PCR product size/bp*
<i>Alu</i> NI forward	TAATGTACCCAAGTTT TAGG	260 bp (–) 232 and 28 bp (+)
<i>Alu</i> NI reverse	TATAGAACAGCCTAATATAGCAACAGACTC	
Intron 13 forward	TGCATCACTGTACATATGTATCTT	(CA) <sub>n</sub> 20 repeats = 141 bp
Intron 13 reverse	CCAAATTACATATGAATAAGCC	
<i>Bcl</i> I forward	TAAAAGCTTTAAATGGTCTAGGC	142 bp (–) 99 and 43 bp (+)
<i>Bcl</i> I reverse	TTCGAATTCTGAAATTATCTTGTTTC	
<i>Hind</i> III forward	AAGGTCCTCGAGGGCGAGCAT	Product = 717 bp
<i>Hind</i> III reverse	AAGGTCGGATCCGTCCAGAAG	469 and 248 bp (–) 469, 167 and 81 bp (+)
Intron 22 forward	TTCTAAGAATGTAGTGTGTG	(GT) <sub>n</sub> (AG) <sub>n</sub> 26 repeats = 83 bp
Intron 22 reverse	TAATGCCACATTATAGA	
<i>Xba</i> I Intragenic:		Product 6.6 kb
Forward XEF	CTGGAGAATCTAAGAGGATAGAGGACAACATTTACC	6.1 + 0.5 kb (–)
Reverse XER	AGTACTTCTCCAGGGTCTGGGCGTGCTC	1.3 + 4.8 + 0.5 kb (+)
<i>Msp</i> I Intragenic:		Product 176 bp
DWF forward	GGTGCTCAGTAGCCTGTCTGTTGTG	141 + 35 bp (–)
DWR reverse	GCCACTACGCTCAGGTCTGAGTC	96 + 45 + 35 bp (+)
	(Nested PCR: first round <i>Xba</i> I Intragenic PCR above, followed by second round using these primers)	

\*+: Presencia de sitio de restricción; -: Ausencia de sitio de restricción. La frecuencia de alelos con los polimorfismos en la población caucásica está expuesta en la base de datos de HAMSTeRS. (Tomado de Keeney S et al. 2005)<sup>(86)</sup>.

**Tabla 2.** Polimorfismos utilizados en el diagnóstico indirecto de la Hemofilia B.

Primer designation	Sequence 5'–3'	PCR product size/bp*	Heterozygosity†
<i>Hha</i> I forward	ACA GGC ACC TGC CAT CAC TT	–230 bp	0.48
<i>Hha</i> I reverse	AGA TTT CAA GCT ACC AAC AT	+150 and 80 bp	
<i>Dde</i> I forward	GGG ACC ACT GTC GTA TAA TGT GG	369 bp large common allele	0.36
<i>Dde</i> I reverse	CTG GAG GAT AGA TGT CTC TAT CTG	319 bp small common allele	
<i>Mse</i> I forward	GAT AGA GAA ACT GGA AGT AGA CCC	Undigested = 369 bp	0.44
<i>Mse</i> I reverse	TTA GGT CTT TCA CAG AGT AGA ATT T	–176, 83, 73 and 37 bp	
<i>Sal</i> I forward	CTC GTT GTG CAC ATG TAC CC	+176, 57, 26, 73 and 37 bp	
<i>Sal</i> I reverse	CAA TAC CAC CCT ATC CTT CGT CGA	–317 bp	0.49
<i>Mnl</i> I forward	AAG TGA CAA GGA TGG GCC TCA ATC	+295 and 22 bp	
<i>Mnl</i> I reverse	GAA ACT TGC CTA AAT ACT TCT C	Undigested = 422 bp	0.44
		–333, 62 and 27 bp	
		+214, 119, 62 and 27 bp	

\*+: Presencia de restricción. -: Ausencia de restricción. † Frecuencia de heterocigosidad en la población de raza caucásica. (Tomado de Mitchell M, et al. 2005)<sup>(87)</sup>.

### **4.2. Secuenciación nucleotídica directa.**

Antes de la secuenciación nucleotídica directa automática se intentaba detectar el exón o región que portaba la mutación y conseguir una detección por secuencia más sencilla mediante técnicas como Denaturing High Performance Liquid Chromatography (dHPLC)<sup>(88)</sup>

La secuenciación nucleotídica directa es la aproximación más simple conceptualmente, pues consiste en analizar de forma directa el gen implicado en la patología mediante la determinación de la secuencia de nucleótidos de las regiones implicadas en la regulación y expresión de la proteína.

La técnica de secuenciación consta de varias etapas comunes<sup>(89)</sup>:

#### 1. Obtención de ADN genómico:

Se realiza a partir de unos pocos mililitros de sangre periférica extraída en presencia de EDTA (aunque puede utilizarse otras muestras biológicas).

Existen varios métodos; si bien la mayoría incluyen un choque osmótico, un tratamiento posterior con detergente y proteasa inespecífica y una precipitación final de ADN con etanol.

#### 2. Amplificación por técnica de PCR:

Mediante el uso de oligonucleótidos específicos, se obtienen productos de ADN amplificados que contienen la región promotora, exones y los intrones. Dado el gran tamaño de los genes implicados, es inviable la secuenciación de todo el gen (VIII o IX) y se recurre al análisis de las zonas más relevantes.

#### 3. Secuenciación directa y análisis de los resultados: basado en la técnica de Sanger.

Actualmente se realiza secuenciación cíclica directa mediante dideoxinucleótidos marcados con fluorocromos; analizando las reacciones de secuencia mediante sistemas de electroforesis capilar. Una vez que el secuenciador ha efectuado la lectura de las bases nucleotídicas, los datos son transferidos automáticamente a un soporte informático. Posteriormente se realiza el análisis comparativo mediante la alineación de

## **Introducción**

las secuencias del gen normal, localizando así el punto discordante correspondiente a la mutación.

A pesar de que la mayoría de mutaciones se hallan en las regiones codificantes o adyacentes, no se puede descartar de manera excepcional alteraciones en regiones intrónicas distales, y por tanto no incluidas en el análisis, que puedan ser causantes de la patología. No obstante, la secuenciación directa es la técnica que posee mayor porcentaje de efectividad, casi el 100%<sup>(89-91)</sup>.

**B** >>> **Objetivos**

## **Objetivos**

### **1. Objetivo principal:**

Estudiar el tipo de alteraciones genéticas mutacionales que afectan a la población de pacientes hemofílicos de la Región de Murcia, y su distribución según el tipo de Hemofilia y su gravedad.

### **2. Objetivos secundarios:**

Estudiar la distribución de las portadoras en las distintas familias con miembros afectados de Hemofilia.

Estudiar la frecuencia de aparición de inhibidores en nuestra serie en relación con el tipo de mutación hallada.

Determinar una estrategia de estudio molecular para los pacientes y portadoras.

Como resultado de este estudio se pretende realizar una base de datos con el censo de todas las familias estudiadas y añadir futuros estudios, facilitando de esta forma el acceso a la información sobre distintas mutaciones, número de portadoras y edades; con la consiguiente mejora en el acceso de información, planteamiento de futuros estudios y un adecuado asesoramiento genético.



# Material y Método

## **1. PACIENTES**

Para empezar el estudio, partimos de los probando hemofílicos censados en nuestra región, utilizando los datos del registro del Servicio de Hematología del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca y de la Asociación Murciana de Hemofilia. Distribuimos los probandos en familias, detectando todas las portadoras posibles y obligadas. A partir de la alteración del probando se hace el estudio de las posibles portadoras.

Estudiamos a 73 pacientes de un total de 80 censados, con una mediana de edad de 26 años (rango 3-76 años). De las 53 familias no relacionadas censadas, estudiamos a 46. Siete familias no se incluyeron en el estudio, seis por negarse a participar en el mismo a pesar de una correcta actitud informativa sobre el objeto del estudio, y una por estar fuera del periodo dedicado al trabajo.

### **1.1. Estudio diagnóstico**

La dosificación de los factores VIII y IX se realizó en el laboratorio de Hemostasia del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca, que cuenta con la acreditación de la norma 15189 por ENAC (Entidad nacional de Acreditación ([www.enac.es](http://www.enac.es))). Los afectados se diagnosticaron mediante técnicas coagulométricas en un paso<sup>(15)</sup> realizadas mediante autoanalizadores (ACL TOP 500, Instrumental Laboratories, Lexington, MA, USA) utilizando el reactivo Factor VIII-deficient plasma y SynthASIL PTT del laboratorio comercial Instrumental Laboratories. La gravedad de la afectación se clasificó según las directrices de la ISTH (Subcomité para FVIII/FIX)<sup>(8)</sup>. Se utilizó la técnica cromogénica en casos en los que el nivel de FVIII/FIX estaba en el límite entre cada tipo de gravedad de Hemofilia o en los que no había concordancia entre clínica y nivel de factor<sup>(15)</sup>.

Las muestras de sangre para el estudio genético fueron recogidas en tubos con EDTA (10 ml) y enviadas el mismo día de la extracción al Servicio de Genética del Hospital de Sant Pau (Barcelona).

## **1.2. Familias**

Los afectados fueron distribuidos por familias no relacionadas. En dichas familias detectamos a las portadoras mediante la realización del árbol genealógico y las agrupamos en posibles y obligadas<sup>(74)</sup>. Se extrajo muestra de las mismas (en igual proporción que en el caso de los afectados) y se procedió al envío de muestras de igual forma que en el caso de los afectados para la realización del estudio genético. No se realizó estudio de nivel de FVIII/FIX en plasma a las portadoras que no lo tuvieran hecho con anterioridad al inicio de este trabajo, no obstante, se completará dicho estudio en proyectos posteriores.

### **1.2.1. Definición de portadora obligada**

En el caso de que su padre sea hemofílico conocido (salvo los raros casos de mosaicismo somático o germinal ), o sea madre de más de un hijo hemofílico (excluyendo los gemelos idénticos) o aquella mujer con un hijo hemofílico y un hijo de su hija (nieto) que sea hemofílico o que tuviera un hijo hemofílico y una historia bien documentada de existencia de Hemofilia en la rama materna.<sup>(70)</sup>

### **1.2.2. Definición de portadora posible**

En el caso de que tenga familiares afectos por línea materna y no tenga hijos enfermos o tenga un hijo hemofílico sin que haya habido otro caso dentro de la familia.

<sup>(70)</sup>

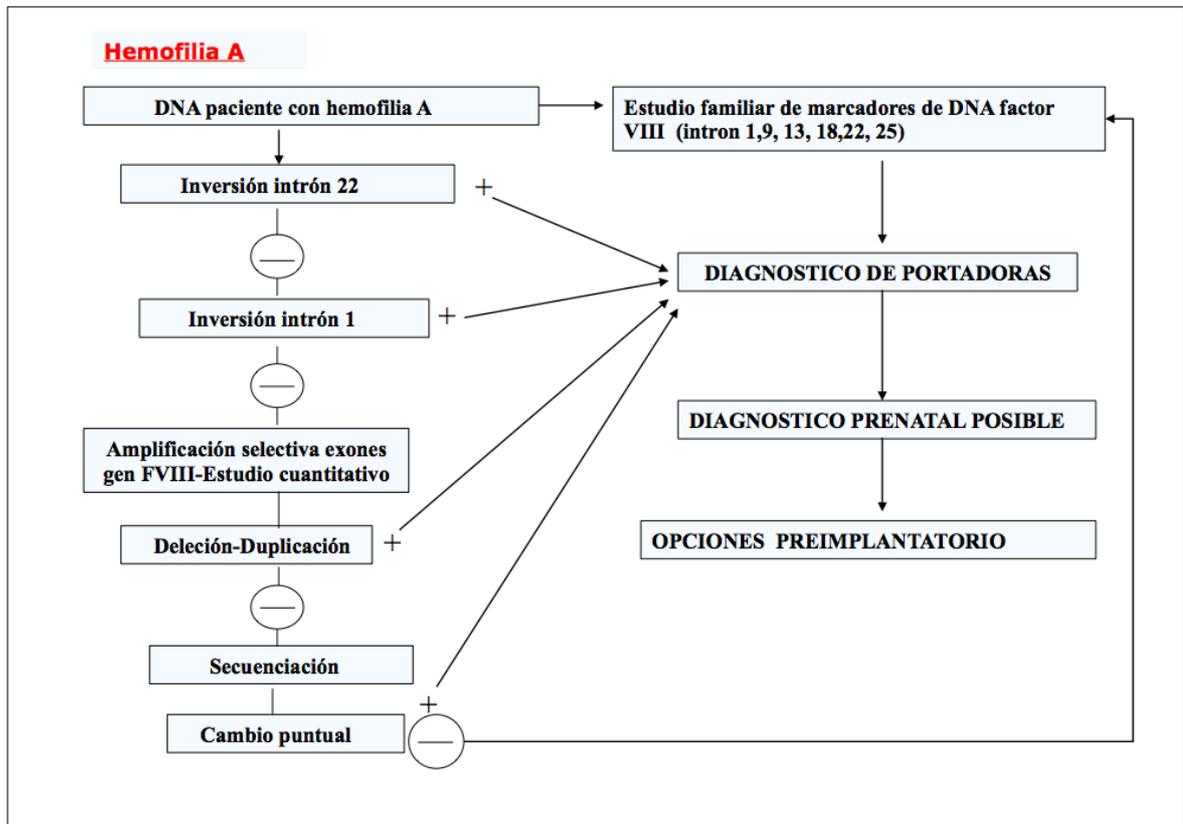
## **2. SECUENCIA DE ESTUDIO GENÉTICO**

### **2.1. Hemofilia A**

Los pacientes con Hemofilia A fueron estudiados en primer lugar para definir presencia o ausencia de la inversión del intrón 22 según la técnica de Southern descrita en trabajos anteriores<sup>(24,76)</sup> y más recientemente con la PCR inversa descrita por Rossetti et al (2005)<sup>(40)</sup>. En los pacientes que fueron negativos para dicha inversión, se les estudió para detectar la otra inversión recurrente en el intrón 1 según protocolo descrito en Tizzano et al., (2003)<sup>(41,77)</sup>. Aquellos pacientes negativos para ambas inversiones fueron estudiados por secuenciación directa de los 26 exones del gen del F8 en 34 reacciones de PCR según los cebadores y metodología descrita por David et al. (1994)<sup>(92)</sup>, y en la base de datos HAMSTeRS/HADB<sup>(33)</sup> con algunas variaciones (Vencesla et al., Blood, 2008)<sup>(26)</sup>. Dicho método es útil asimismo para detectar la presencia de alguna delección de exón único o de varios exones que está presente en aproximadamente el 5% de los casos graves (según la base de datos HAMSTeRS). El estudio de portadoras en estos casos se realiza aplicando metodologías de análisis cuantitativo por PCR a tiempo real (ver apartado 2.4.4.).

Por otra parte se realizó estudio indirecto por marcadores extragénicos (DXS52-St14) e intragénicos (repeticiones dinucleotídicas CA/TG) en el intrón 1, 13 y 22<sup>(94,95)</sup> y el reconocimiento de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) para el enzima de restricción BclI en el intrón 18 amplificando los fragmentos genómicos obtenidos por técnica de Reacción de Polimerasa en Cadena (PCR)<sup>(72)</sup>. De esta forma se puede establecer la segregación del cromosoma X con la mutación en la familia para estudio de portadoras y asimismo complementa el estudio directo de las mutaciones (Algoritmo 1).

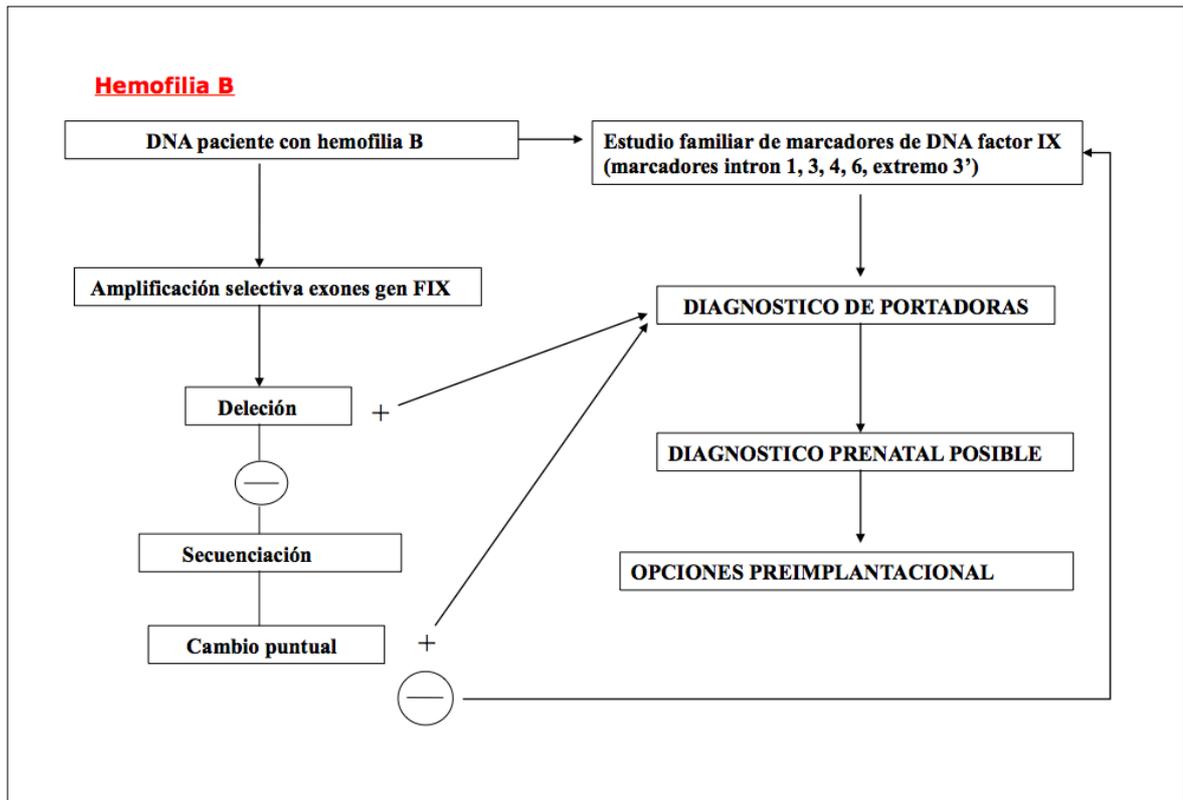
Una vez detectado el cambio nucleotídico, se identifica la posición dentro del gen del F8 y se investiga si ya está descrita en pacientes hemofílicos en la base de datos de la Hemofilia o en la literatura reciente.



**Algoritmo 1.** Secuencia de estudio molecular para Hemofilia A utilizado en este trabajo (ver explicación en el texto).

## 2.2. Hemofilia B

Para la Hemofilia B, al no estar descritos en el gen del factor 9 grandes reordenamientos recurrentes como las inversiones en el gen del factor 8, la estrategia se basa en el estudio directo de 11 fragmentos amplificados por PCR y se complementa con el estudio indirecto de los marcadores intragénicos Ddel en el intrón 1, XmnI en intrón 3, TaqI en el intrón 4, MnlI en exón 6 y HhaI en el extremo 3'; siendo detectados por técnica de PCR<sup>(75)</sup> (Algoritmo 2).



**Algoritmo 2.** Secuencia de estudio molecular para Hemofilia B utilizado en este trabajo (ver explicación en el texto).

### 2.3. Estudio indirecto con marcadores

El estudio indirecto con marcadores representa una serie de técnicas que nos permiten identificar el cromosoma X portador de la mutación en una familia. Para ello se utilizan distintos polimorfismos extragénicos e intragénicos. Para la detección de todos los marcadores se sigue un protocolo básico general a partir del cual existen una serie de particularidades propias de cada marcador:

A) Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que consiste en la amplificación selectiva de regiones específicas de ADN in vitro, utilizando la actividad de la enzima Taq polimerasa partiendo de una cadena molde y un pequeño oligonucleótido inicial (cebador) en presencia de nucleótidos en exceso y magnesio. Las condiciones y los cebadores utilizados con cada uno de los marcadores se pueden ver en la tabla 3.

**Tabla 3.** Marcadores extragénicos e intragénicos utilizados en el estudio indirecto para la determinación del alelo portador de la patología molecular de la Hemofilia A.

MARCADORES EXTRAGÉNICOS					
Marcador	Técnica	Cebadores	Tamaño	TªH	Descrita
St-14	PCR	HA STR14F_5' GGCATGTCATCACTTCTCATGT 3' HA STR14R_5' CACCACTGCCCTCACGCTCACTT 3'		65°C	Oberlé et al, 1985 <sup>(94)</sup>
MARCADORES INTRAGÉNICOS					
Marcador	Técnica	Cebadores	Tamaño	TªH	Descrita
Intrón 1	PCR Fluorescente	HA INT1F FAM_5 'ATGCAAAAGAACTGAAATGGG 3' HA INT1R_5' GACCCTGTACTTTTACCATTG 3'	141-154pb	58°C	Tizzano et al., 2005 <sup>(95)</sup>
Intrón 9	PCR Fluorescente	HA INT9F NED_5' GAGGTGGGATTGATATTTTCA 3' HA INT9R_5' GCACTCCAGCCTGGGTGAC 3'	145-155pb	55°C	Venceslá et al, 2008 <sup>(96)</sup>
Intrón 13	PCR Fluorescente	HAIN13FNED_5'TGCATTCAACTGTACATAAT GTATCTT3' HA INT13R_5' CCAAATTACAGATTGAATAAGCC 3'	133-149pb	48°C	Lalloz et al 1994 <sup>(93)</sup>
Intrón 18	PCR+ BclI	HAIN18F_5 'TAAAAGCTTAATATGGTCTAGGC 3' HAIN18R_5 'TTCGAATTCTGAAATTATCTTGTT 3'	142pb	55°C	Peake et al, 1993 <sup>(70)</sup>
Intrón 22	PCR Fluorescente	HA INT22F FAM_5' TTCTAAGAATGTAGTGTGTG 3' HA INT22R_5' TAATGCCACATTATAGA 3'	76-88pb	48°C	Lalloz et al 1994 <sup>(93)</sup>
Intrón 25	PCR Fluorescente	HA INT25F HEX_5' AGTCCAAGATCAAGGGGTAGG 3' HA INT25R_5' CATCACATTCCAGCCTGGACT 3'	150-165pb	60°C	Venceslá et al., 2008 <sup>(96)</sup>

TªH = Temperatura de Hibridación<sup>(70,93-95)</sup>.

## **Material y Método**

B) Análisis del producto amplificado por electroforesis en gel de agarosa.

B.1 Agarosa al 1.5% (Genotek) en forma de gel que actúa como tamiz molecular que discrimina los fragmentos por tamaños.

B.2 Se tiñe con 5 µl de bromuro de etidio que es un agente intercalante que se introduce entre las moléculas de ADN y emite fluorescencia cuando se irradia con luz ultravioleta.

B.3 Tampón electroforético 1X Tris, ácido Bórico y EDTA (TBE).

B.4 Marcador de tamaño conocido Phi X174/HaeIII (EUROBIO) que nos permite determinar el tamaño del fragmento de ADN amplificado.

B.5 Cubeta de electroforesis que se conecta a una fuente con un voltaje de 120 a 140 voltios durante 45 minutos aproximadamente.

### **2.3.1. Marcadores extragénicos**

El St-14 (DXS52) ha sido el marcador extragénico más utilizado en este trabajo de tesis y se encuentra a 2 centiMorgan (cM) (Unidad de recombinación genética) aproximadamente del locus del gen del F8<sup>(118)</sup>. Se trata de un minisatélite o Variable Number Tandem Repeat (VNTR) que es un ADN moderadamente repetitivo, de ahí que sea bastante útil para determinar el alelo portador. Al tratarse de un VNTR, la interpretación siempre se hace dentro de un contexto familiar, para poder observar la segregación de las repeticiones tanto del padre como de la madre pudiendo establecer un haplotipo de la familia en particular, los resultados serán unas bandas de diferentes tamaños dependiendo de los "tandem repeats" que tengan, este número de "repeats" se debe transmitir de forma conservada de padres a hijos. Existe de un 2-5% de riesgo que se produzca una recombinación entre el locus del St-14 y el gen del F8.

### **2.3.2. Marcadores intragénicos**

Los más comúnmente usados han sido el RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) del intrón 18<sup>(86)</sup> y los microsatélites (repeticiones dinucleotídicas) del intrón 13 y 22<sup>(116)</sup> y los marcadores microsatélites: el intrón 1, el intrón 9 y el intrón 25 (según Tizzano et al., 2005 y Vencesla et al., 2008)<sup>(95,96)</sup>.

## **Material y Método**

El polimorfismo del intrón 18 se amplifica con una PCR obteniendo un fragmento de 142 pares de bases y se digiere directamente con la enzima de restricción BclI que reconoce la siguiente diana T/GATCA dando lugar, a dos fragmentos de 99 y 43 pares de bases.

Para los microsatélites, la PCR de amplificación es fluorescente, en la que se utiliza uno de los cebadores marcado con un fluorocromo. Después del análisis electroforético cogemos un microlitro del producto de PCR y le añadimos 5µl de agua destilada más 19 µl de Hi-Di™ Formamida (APPLIED BIOSYSTEMS) y 0.5 µl de Rox™ Size Standard GeneSacan –500 (APPLIED BIOSYSTEMS), un marcador de tamaño estándar que está diseñado para tamaños de ADN comprendidos entre 35-500 pb. Las muestras se analizan en el ABI PRISM 3100 y 3130 con el software GeneMapper.

### **2.4. Estudio mutacional**

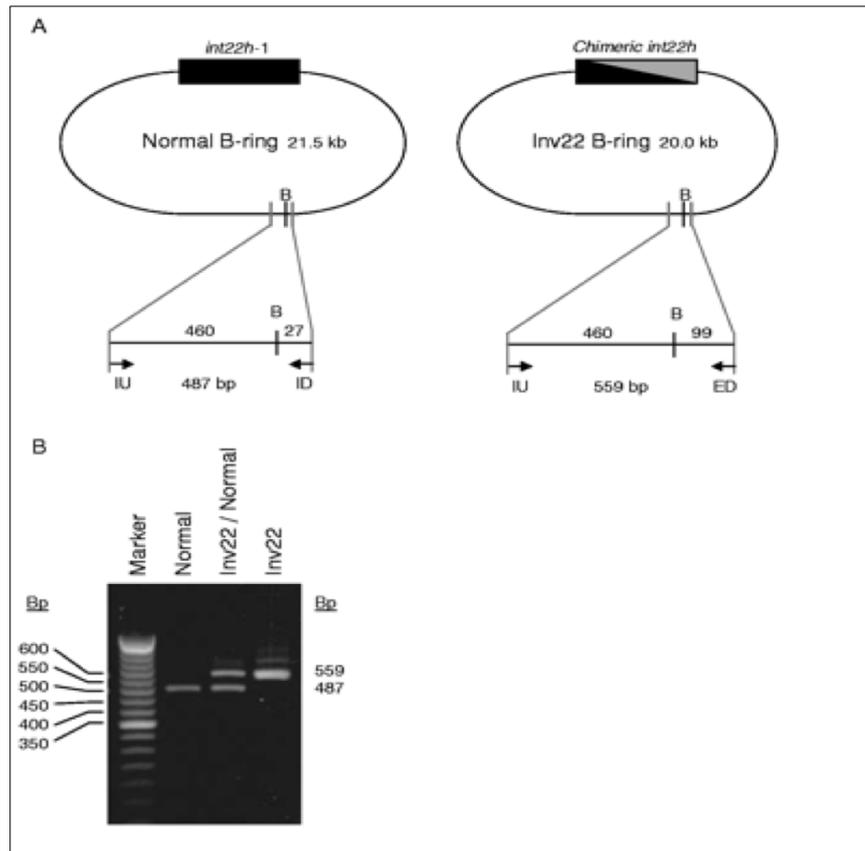
#### **2.4.1. Inversión del intron 22**

La detección de la inversión del Intron 22, se analizaba tradicionalmente por Southern- blot radioactivo y posteriormente no radioactivo<sup>(24)</sup>. Se han descrito algunos métodos de detección por Single-Tube PCR<sup>(39)</sup> y Longe-range PCR<sup>(21)</sup>. Más tarde se puso a punto el método de la PCR inversa descrita por Rossetti et al 2005<sup>(40)</sup> para la detección de dicha inversión, que es el que se utilizó para este trabajo. Este método consta de tres pasos:

A) Primero se lleva a cabo una digestión con BclI.

B) El segundo paso es una ligación propia de los fragmentos de restricción dando lugar a anillos con el BclI incluido.

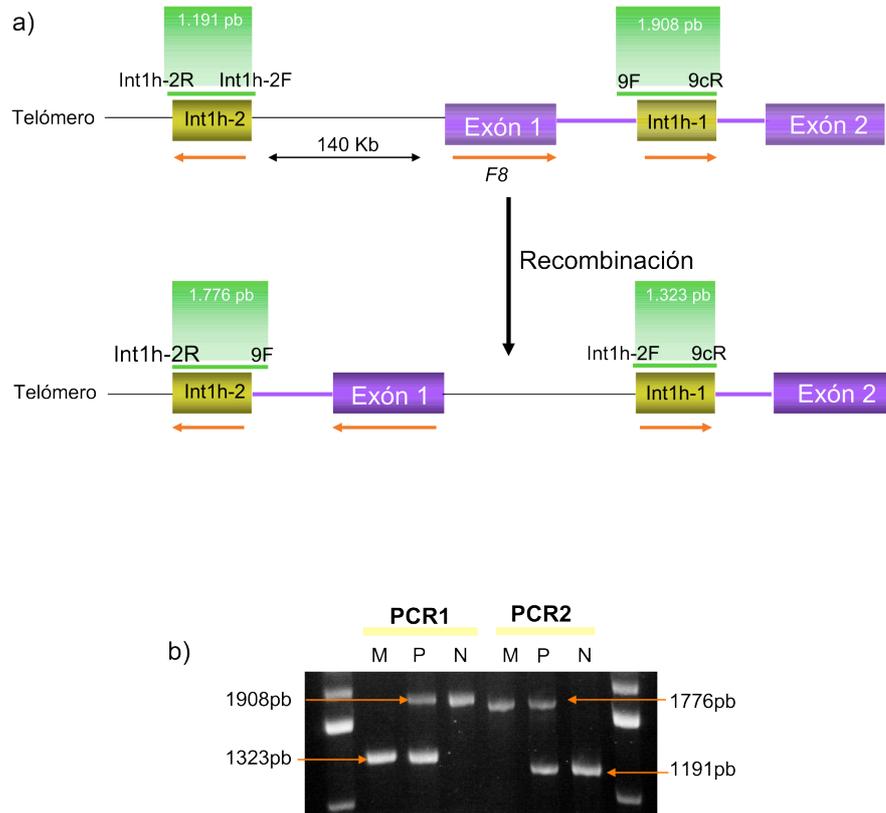
C) Por último, se realiza una PCR multiplex usando un set de tres cebadores donde podemos obtener dos tamaños de amplificación, uno correspondiente a la inversión, cuyo tamaño es 559 pb, y otro de 487 pb en el caso de no inversión (Figura 15).



**Figura 15.** I-PCR para la detección de la inversión del intron 22. (Rossetti et al. 2005)<sup>(40)</sup>. A) esquema de los anillos formados después de la ligación con el BclI. El que presenta un tamaño de 21.5 kb (izquierda) es el que se corresponde con la no inversión y el del tamaño 20Kb (derecha) es el obtenido después de la recombinación. B) Análisis en gel de agarosa de la I-PCR. Existen tres posibles fenotipos, normal de 559pb (2ª columna), mujer portadora (3ª columna) de 559pb+ 487pb y afectado de 487pb con la inversión del intron 22 (4ª columna). La primera columna se corresponde con el marcador de tamaño.

### 2.4.2. Inversión del Intrón 1

Se detecta mediante una PCR usando cuatro cebadores según la técnica descrita por Bagnall et al 2002<sup>(41)</sup> y modificada por Tizzano et al., 2003<sup>(77)</sup> (Figura 16).



**Figura 16.** Detección de la inversión del intrón 1.

a) Esquema de la región intrón 1 del gen F8 normal y después de la recombinación homóloga. Las flecha de color rojo indican la dirección de la transcripción. La región verde simboliza la zona amplificada. La pareja de "primers" utilizados son: Int1h-2R y Int1h-2F para la región Int1h-2 y 9F, 9cR para la zona Int1h-1. b) Imagen de la electroforesis después de las PCRs. Para la PCR1 se usaron los "primers" 9F, 9cR, Int1h-2F y para la PCR 2 los "primers" Int1h-2F; Int1h-2R y 9F. Los posibles genotipos son M= mutado; P= mujer portadora; N= normal

**2.4.3. Determinación de mutaciones puntuales y pequeñas deleciones o inserciones**

El gen F8 consta de 26 exones; para el estudio de su secuencia y la de las zonas de unión intrón-exón, se han utilizado los cebadores descritos originalmente por David et al<sup>(92)</sup>. Para el estudio de 1.9 kb de la región promotora se usaron los cebadores descritos en el artículo de Boekhorst et al., 2005<sup>(97)</sup>. Las condiciones de amplificación son similares a las descritas en estos trabajos con ligeras modificaciones (Tabla 4).

**Tabla 4.** Condiciones de PCR y secuencia de los cebadores utilizados para la amplificación del gen F8 y de su región promotora. Los exones con asterisco (\*) están modificados para dar productos de PCR más pequeños para que se puedan secuenciar con resultados más eficientes según Venceslá et al., 2008 Blood<sup>(26)</sup>.

Exón	Tamaño	Secuencia		Condiciones de PCR		
		5´	3´	TªH	Ciclos	Cl <sub>2</sub> Mg
1	393 pb	AATCCTATCGGTTACTGCTTA AGCATCACAACCATCCTAAC		58°	30	2mM
2	250 pb	TCAGGAGGTAGCACATACAT GTCCAATATCTGAAATCTGC		58°	30	1mM
3	357 pb	TGCTTCTCCACTGTGACCT ATCTAGTAAATGTTAAGAAATACA		94° 50°	0.5°/cicloX19ciclos 1seg/cicloX19ciclos	1.5mM
4	320 pb	GTACAGTGGATATAGAAAGGAC GATTCAGTTGTTTGTACTTCTC		58°	30	1.74mM
5	281 pb	CTTACTGTCAAGTAACTGATG CTTCATTCCTGAACAGTAATG		58°	30	1.74mM
6	424 pb	TCCCACTTATTGTCATGGAC TACAGAACTCTGCTGCTGAA		58°	30	2mM
7	420pb	GGCAAGAGCTGTTGGTTTG TGCCAGTAAATTTTATTAAGT		53°	30	1mM
8	515pb	CCATATAGCCTGCAGAACAT CTGATGCTCAGCTATGTTAG		58°	30	2mM
9		CTAACATAGCTGAGCATCAG AGATATGTCCATTGGAGACAA		94° 50°	0.5°/cicloX19ciclos 1seg/cicloX19ciclos	1.74mM
10		CTAGCCTCAAATTAATAATG ACTTTAGACTGGAGCTTGAG		58°	30	1.5mM
11		GCGACTTTAGCTTCCACTTG GAGAGAGCTAAATCCCAGAC		58°	30	2mM
12	282pb	TGCCATCGCTTTCATCATAG CATTCAATATCTGGACATCAC		58°	30	1.5mM
13	501pb	GTCTCCTCACATTGGGATTG CAGAGGAGAACTAGATCCC		58°	30	2mM
14A*	442 pb	ATCTGGGAATGGGAGAGAAC TAGGACTCTGTGCAAGAGC		58°	30	2mM
14B*	552 pb	GACATAGAGAAGACTGACCC AGACTCAGTAAGGGGAGATG		58°	30	2mM

## Material y Método

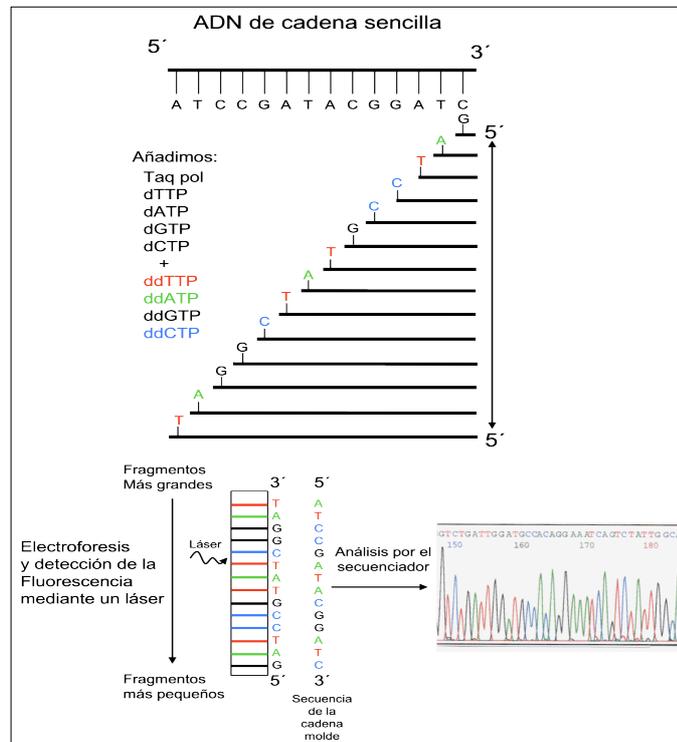
14C*	630 pb	TTCCTTAGGACCCCAAGTA CCTTTGTATCCACCTTGCTG	58°	30	2mM
14D*	600 pb	GAATAGTCCATCAGTCTGGC GTCAGTGTATGTATCTGAGGC	58°	30	2mM
14 E*	450 pb	AGTGGTAGTAGGAAAGGGTG CTGCTGGCTTGATTAGGAG	58°	30	2mM
14F*	550 pb	TATGACGGGGCATATGCTCC GTCTTGAATAGGACCCTGG	58°	30	2mM
14G* 14G*	530 pb	AAAGGGCCATTACTCAGTC CTAATCGCTCCCTCTGTTC	58°	30	2mM
14H*	510 pb	ACACTGTTCTCCGAAACCA ATGGCGTTTCAAGACTGGTG	58°	30	2mM
14I*	540 pb	TTTGTCCCTGAACGCTTG TTGTCCCTGATTCTCTACC	58°	30	2mM
15		GGCACCTAGGAAAATGAGGAT CAAATGTGCAAGGGACATTACC	58°	30	2mM
16		AGCATCCATCTTCTGTACCA TCACTAGATTCCAGAATGACA	58°	30	1.74mM
17		TGTCATTCTGGAATCTACTGA CACTCCACAGATACTCT	58°	30	1.5mM
18		AGAGTATATCTGTGGGAGTG CTTAAGAGCATGGAGCTTGT	94° 50°	0.5°/cicloX19ciclos 1seg/cicloX19ciclos	1.5mM
19		GCAAGCACTTTGCATTTGAG GCAACCATTCCAGAAAGGA	58°	30	1.5mM
20		ACGTTGAGTACAGTTCTTGG ACTAATAGAAGCATGGAGATG	58°	30	1.74mM
21		GAATTAATCTCTGATTTCTCTA GAGTGAATGTGATACATTTCC	94° 50°	0.5°/cicloX19ciclos 1seg/cicloX19ciclos	1.74mM
22		GGACACACCTGTAGCAATGT CCTCAAACCTAGGATATCC	58°	30	1.74mM
23		GGACACACCTGTAGCAATGT CCTCAAACCTAGGATATCC	58°	30	2mM
24		GCTCAGTATAACTGAGGCTG CTCTGAGTCAGTTAAACAGT	58°	30	1.74mM
25		AGTGCTGTGGTATGGTTAAG TTGCTCTGAAAATTTGGTCATA	58°	30	1.5mM
26		GGTTAATCCTGGACTACTG GTGCTGCTAGGATTTAGCA	58°	30	1.74mM
<b>Región Promotora (1.9Kb)</b>					
Promotor 1		AAATGCCAGGTGGTTATGAGT			
Promotor 2		CTGCTGCCAGTATGAGGAATT			
Promotor 3		TCTGAGAAGAGGAGTGACAGGA			
Promotor 4		CTAAGCAGTAACCGATAGGATTG			

T<sup>a</sup>H: Temperatura de Hibridación. Cl<sub>2</sub>Mg: Cloruro de Magnesio. mM: Milimoles.

## Material y Método

Los pasos siguientes a la PCR de amplificación son:

1. El producto resultado de la amplificación se siembra en un gel de agarosa al 1.5%, teñida con 5µl de bromuro de etidio para la comprobación del producto de amplificación.
2. Purificación del producto de amplificación con un Kit por columnas "QIAquick column purification PCR-Kit" (Qiagen).
3. PCR de secuenciación por el método enzimático de Sanger et al (1977)<sup>(89)</sup>, a partir de ADN de cadena sencilla y un único cebador complementario a la cadena molde usando el kit de secuenciación de DNA Perkin Elmer-Applied Biosystems en un secuenciador automático ABI PRISM 3100 Avant (Applied Biosystems) (Figura 17).



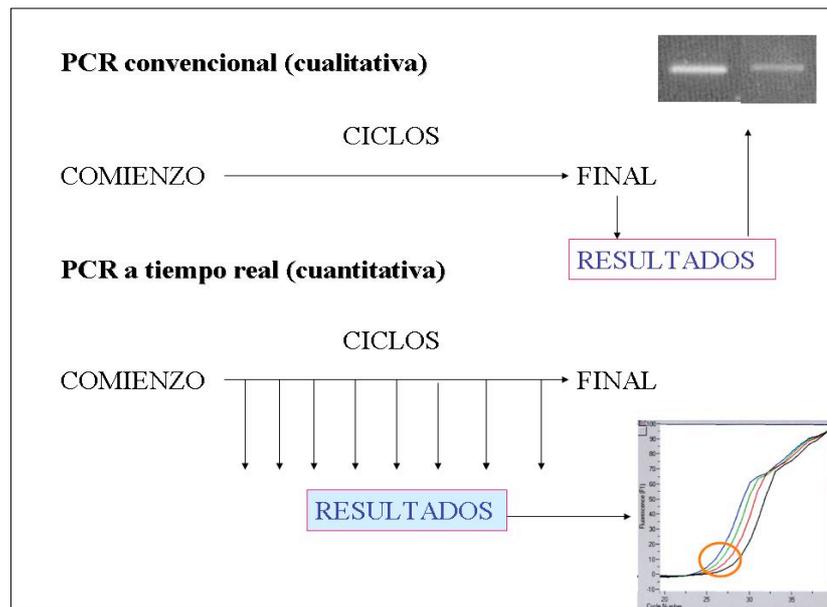
**Figura 17.** PCR de secuenciación.

La principal característica es la utilización de dideoxinucleótidos (ddNTPs), el cual una vez incorporado se interrumpe la síntesis de ADN. Cada ddNTP va marcado con un fluorocromo de diferente color. La polimerasa va incorporando nucleótidos dNTP hasta que por azar se incorpora un ddNTP. La reacción se somete a electroforesis capilar en el secuenciador automático donde las moléculas se ordenan por medida de mayor a menor y son estimuladas por un láser, la emisión de color es detectada por el secuenciador que lo traduce por la base nitrogenada que le corresponde.

**2.4.4. Detección de grandes deleciones o duplicaciones mediante la técnica de PCR cuantitativa a tiempo real (Quantitative Real time polymerase Chain Reaction)**

Cuando un paciente no amplifica algún determinado exon(es), el diagnóstico de portadoras se hace más complejo dado que el cromosoma X normal enmascara la deleción en una PCR cualitativa. La PCR cuantitativa permite el seguimiento de la cinética de amplificación del fragmento de DNA en tiempo real, existiendo una relación lineal entre el número de ciclos necesarios para detectar la fluorescencia de amplificación y la concentración de ADN diana de la muestra, es una técnica rápida y sencilla, con una elevada especificidad, reproducibilidad y sensibilidad, donde las posibilidades de contaminación son mínimas (Figura 18).

La cuantificación se realiza en un analizador LightCycler® 1.5 por un método basado en la fluorescencia y canales de detección. Es un termociclador que lleva incorporado un fluorímetro que detecta la fluorescencia emitida a una longitud de onda de 530,640 y 705 nm, el fluorocromo utilizado en nuestro caso es el SYBRGreen I cuya lectura se hace a 530 nm. Este fluorocromo se intercala entre el ADN de doble cadena (dsADN). El protocolo se describe en Tizzano et al., 2005<sup>(95)</sup>.



**Figura 18.** Diferencias entre PCR cualitativa y PCR cuantitativa a tiempo real. La fluorescencia emitida ciclo a ciclo (de ahí el nombre a tiempo real) permite establecer una relación con el número inicial de copias (única, doble o triple), siguiendo una curva patrón establecida con ADNs de concentraciones conocidas (líneas de colores en la parte inferior derecha).

### 3. METODOLOGÍA ESTADÍSTICA

Para el manejo estadístico descriptivo de los datos obtenidos se utilizó el software Microsoft Excel 2011 para Mac OS X, versión 14.2.5.

**D** >>> **Resultados**

### 1. DATOS GENERALES

En nuestra región se han registrado 80 pacientes hemofílicos vivos pertenecientes a 53 familias no relacionadas. Hemos realizado el estudio genético buscando la alteración causante de la Hemofilia a 46 familias (38 con Hemofilia A y 8 con Hemofilia B), con un total de 73 pacientes hemofílicos vivos (59 con Hemofilia A y 14 con Hemofilia B). Siete familias no han sido estudiadas a nivel genético. De las 7 familias que no se incluyeron en el estudio, 5 no quisieron que se les realizara el estudio genético (correspondían a familias con un afectado con Hemofilia A leve en cada una de ellas). De igual forma, el único afectado (y su familia) del grupo de Hemofilia B moderada de nuestra región se negó también a la realización del estudio genético. En una familia con HAG sin antecedentes familiares, no se ha podido realizar el estudio genético en el periodo de tiempo dedicado a realizar este trabajo. No obstante, no existen descendientes portadores de la enfermedad en la actualidad y la madre, que era portadora obligada, está fallecida.

#### 1.1. Hemofilia en la Región de Murcia

De los 80 pacientes vivos, 65 (81,2%) tenían Hemofilia A y 15 (18,5%) Hemofilia B. La mediana de edad de los pacientes fue de 28 años (rango de 1 mes a 76 años). Los datos generales del tipo de Hemofilia en nuestra comunidad aparecen reflejados en la tabla 5 y figura 19.

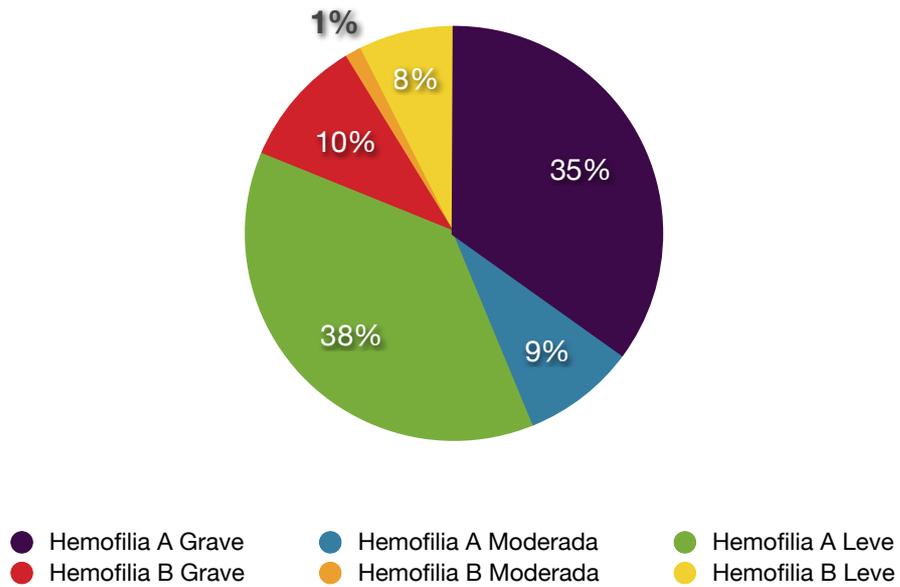
Hay 4 familias en las que el afectado había fallecido en el momento del inicio de este trabajo, pero que se ha conseguido hallar la mutación causante de la enfermedad en los familiares. Se trata de la familia 5 (HAM) y las familias 21, 26 y 31 (todas ellas con HAG). En los 4 casos se trata de alteraciones no descritas en los registros internacionales. En una de estas familias (la número 21), disponíamos del resultado del estudio genético con anterioridad al inicio de este trabajo en 2007.

**Resultados**

**Tabla 5.** Distribución de los afectados según el tipo y gravedad de Hemofilia.

HEMOFILIA EN MURCIA	
Hemofilia	Pacientes
Hemofilia A Grave	28†
Hemofilia A Moderada	7
Hemofilia A Leve	30*
Hemofilia B Grave	8
Hemofilia B Moderada	1**
Hemofilia B Leve	6

† Un paciente no incluido en el estudio genético.\* Cinco pacientes no incluido en el estudio genético.\*\* No incluido en el estudio genético.

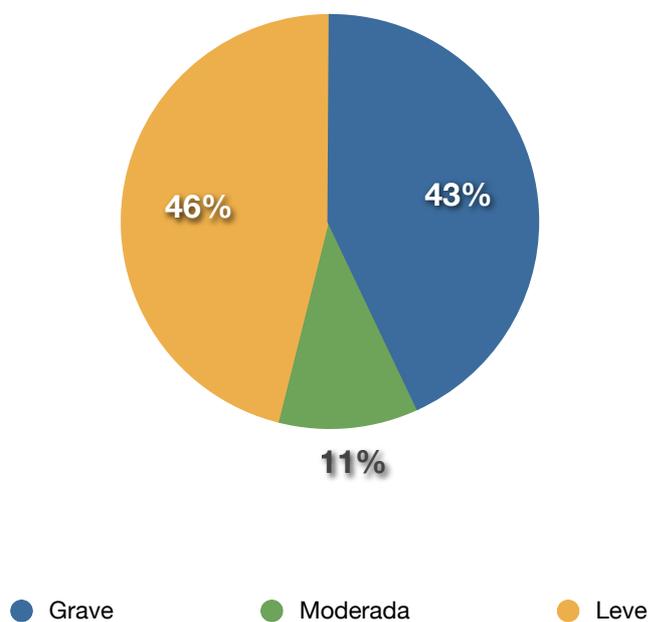


**Figura 19.** Representación de la Hemofilia en Murcia según tipo y gravedad.

## Resultados

### 1.2. Distribución de afectados de Hemofilia A según la gravedad.

En la figura 20 se expone la distribución del total de los afectados de Hemofilia A según la gravedad, observándose un discreto predominio de casos con Hemofilia A leve sobre los afectados con Hemofilia A grave, repartiéndose ambos grupos la mayoría de casos con Hemofilia A.

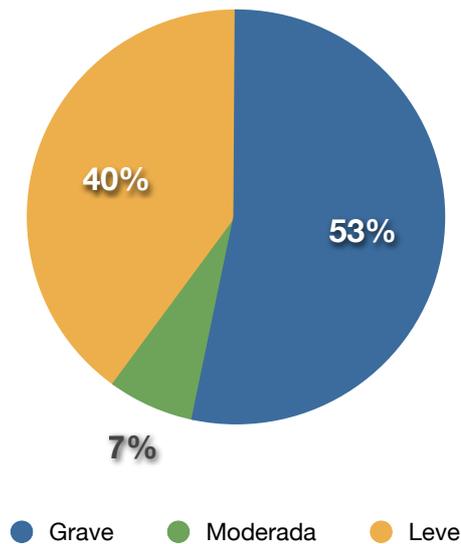


**Figura 20.** Afectados con Hemofilia A: Distribución según la gravedad.

## Resultados

### 1.3. Distribución de afectados de Hemofilia B según la gravedad en la Región de Murcia.

En la figura 21 se expone la distribución del total de afectados de Hemofilia B según la gravedad donde se puede apreciar que más del 50% de los casos corresponden a Hemofilia B grave.



**Figura 21.** Afectados con Hemofilia B: Distribución según la gravedad.

### 1.4. Familias de afectados estudiadas.

En la tabla 6 se exponen los datos generales de las distintas familias estudiadas, con el número de afectados vivos, tipo de Hemofilia y código con el que se identifica durante el presente trabajo. Como se puede ver, existe una mediana de afectados por familia de 1 (rango 0-6).

## Resultados

**Tabla 6.** Familias estudiadas.

FAMILIAS ESTUDIADAS		
Código	Tipo de Hemofilia	Nº de afectados
1	HAM	2
2	HAG	1
3	HAL	4
4	HAM	3
5	HAM	0*
6	HAG	1
7	HAG	1
8	HAL	1
9	HAG	2
10	HAG	2
11	HAG	2
12	HBL	4
13	HAL	3
14	HAL	6
15	HAG	1
16	HBG	1
17	HAG	1
18	HAG	1
19	HAL	1
20	HAG	2
21	HAG	0*
22	HBG	1
23	HBG	2
24	HAM	2
25	HAG	1
26	HAG	0*
27	HAG	1
28	HBL	2
29	HAL	1
30	HAG	2
31	HAG	0*
32	HAG	2
33	HBG	2
34	HBG	1
35	HAG	2
36	HAG	1
37	HAL	1
38	HAL	1
39	HBG	1

## Resultados

Continuación.

FAMILIAS ESTUDIADAS		
Código	Tipo de Hemofilia	Nº de afectados
40	HAG	1
41	HAG	1
42	HAL	1
43	HAG	1
44	HAL	4
45	HAG	1
46	HAL	2

\* Afectados fallecidos en el momento del estudio.

## 2. DESCRIPCIÓN DE FAMILIAS Y PORTADORAS SEGÚN TIPO DE HEMOFILIA

### 2.1. Familias estudiadas con Hemofilia A

La mutación en el gen del factor VIII (gen F8) se ha encontrado en las 38 familias no relacionadas de los 59 afectados con Hemofilia A. En este grupo, 21 familias (55,3%), con 27 pacientes, corresponden a Hemofilia A grave. En 5 familias (13,1%), con 7 pacientes en total, el diagnóstico es de Hemofilia A moderada. En 12 familias (31,5%), hay 25 pacientes con Hemofilia A leve. Los datos se muestran en la tabla 7.

Considerando el número de pacientes por familia en este grupo, encontramos que en 19 de ellas (50%) hay un solo afectado, siendo el diagnóstico de HAG en 13 y de HAL en las otras 6. En las otras 15 familias (39,5%) hay varios afectados (mediana de 2 afectados (2-6)) con una mediana de edad de 29 años (rango 4-76 años), de las que 7 corresponden a HAG, 3 tienen HAM y 5 presentan HAL. Las 4 familias restantes no tienen afectados en el momento del estudio.

Cuando nos fijamos en el número de portadoras en las familias con Hemofilia A, encontramos que hay 22 familias con una portadora, de las cuales 17 corresponden a HAG y 5 corresponden a HAL. Dentro del grupo de HAG destaca la presencia de dos familias (22 y 38) de origen extranjero con antecedentes familiares en su país de origen. La distribución del número de portadoras según la gravedad con o sin antecedentes familiares se muestra en la tabla 8.

**Tabla 7.** Distribución de afectados y familias con Hemofilia A de acuerdo a la gravedad de la enfermedad.

FAMILIAS CON HEMOFILIA A		
Gravedad de Hemofilia	Afectados	Familias
	N (%)	N(%)
Hemofilia A Grave	27 (44,3%)	21 (55,3%)
Hemofilia A Moderada	7 (11,5%)	5 (13,1%)
Hemofilia A Leve	27 (44,3%)	12 (31,6%)
Total	61 (100%)	38 (100%)

**Tabla 8.** Distribución de familias y portadoras con Hemofilia A

ANTECEDENTES FAMILIARES	GRAVEDAD HEMOFILIA	PORTADORA ÚNICA	VARIAS PORTADORAS
			N (MEDIANA EDAD Y RANGO)
Con antecedentes familiares	Grave	5	5 (36 años, rango 22-95)
	Moderada	0	4 (38 años, rango 18-88)
	Leve	2	4 (35 años, rango 13-73)
	Total	7	13 (40.5 años, rango 8-95)
Sin antecedentes familiares	Grave	12	1 (38 años, rango 36-63)
	Leve	3	2 (38.5 años, rango 22-65)
	Total	15	3 (38 años, rango 22-65)

## 2.2. Familias estudiadas con Hemofilia B

Se han encontrado mutaciones en el gen F9 en las 8 familias no relacionadas de los 14 afectados vivos con Hemofilia B. En este grupo, 6 familias (con 8 afectados en total) corresponden al grupo de HBG. Dos familias (con 6 afectados en total), corresponden a HBL. El único caso de HBM no fue incluido en el estudio.

Considerando el número de pacientes por familia en este grupo, en 4 de ellas con HBG había un solo afectado. En las otras 4 familias había varios afectados (mediana de 2 afectados (2-4), con una mediana de edad de 40,5 años (rango 4-49 años)), de las que 2 familias tenían HBG y otras dos HBL. Los datos se muestran en la tabla 9.

Atendiendo al número de portadoras en este grupo, encontramos que hay 3 familias con una portadora (que corresponde a la madre), todas ellas pertenecientes al grupo de HBG. En una de estas familias no se identificó la mutación en la madre portadora. Por otra parte, encontramos 5 familias con varias portadoras, de las que 3 corresponden a HBG y 2 a HBL. La distribución del número de portadoras según la gravedad con o sin antecedentes familiares se muestra en la tabla 10.

## Resultados

**Tabla 9.** Distribución de afectados y familias con Hemofilia B de acuerdo a la gravedad de la enfermedad.

FAMILIAS CON HEMOFILIA B		
Gravedad de Hemofilia	Afectados	Familias
	N (%)	N (%)
Hemofilia B Grave	8 (57.1%)	6 (75%)
Hemofilia B Leve	6 (42.8%)	2 (25%)
Total	14 (100%)	8 (100%)

**Tabla 10.** Distribución de familias y portadoras con Hemofilia B.

ANTECEDENTES FAMILIARES	GRAVEDAD HEMOFILIA	PORTADORA ÚNICA	VARIAS PORTADORAS
			N (MEDIANA DE EDAD Y RANGO)
Con antecedentes familiares	Grave	0	0
	Moderada	0	0
	Leve	0	2 (39 años, rango 15-70)
	Total	0	2 (39 años, rango 15-70)
Sin antecedentes familiares	Grave	3	3 (44.5 años, rango 10-70)
	Leve	0	0
	Total	3	3 (44.5 años, rango 10-70)

### 2.3. Distribución de Portadoras en el total de familias estudiadas: (Hemofilia A y B)

De acuerdo con la definición de portadoras obligadas y posibles (ver sección 1.2 de Material y Métodos), hemos estudiado a un total de 149 miembros femeninos de las diferentes familias. Se ha confirmado el estado de portadora en 102 casos (68,4%) y no se ha confirmado en los restantes 47 (31,5%). Las portadoras confirmadas presentan una

## Resultados

mediana de edad de 38 años (rango de 8 a 95 años), de las que 48 (47%) corresponden a portadoras obligadas y 54 (52,9%) a portadoras posibles. Las portadoras obligadas están distribuidas en 25 familias, siendo 42 portadoras de HA y 6 portadoras de HB. Su distribución se expresa en la tabla 11. Las portadoras posibles están distribuidas en 26 familias, siendo 41 portadoras de HA y 13 portadoras de HB. Su distribución se presenta en la tabla 12. Hay que destacar que a la familia 15 no se ha podido realizar el estudio tanto indirecto como directo de las portadoras por problemas de disponibilidad. Los afectados de dicha familia han sido estudiados y se ha detectado la alteración causante de la enfermedad.

**Tabla 11.** Distribución de portadoras obligadas por tipo y gravedad de Hemofilia.

PORTADORAS OBLIGADAS		
	Hemofilia A	Hemofilia B
Grave	17 (40,5%)	2 (33,3%)
Moderada	13 (30,9%)	0
Leve	12 (28,6%)	4 (66,6%)
Total	42 (100%)	6 (100%)

**Tabla 12.** Distribución de portadoras posibles por tipo y gravedad de Hemofilia.

PORTADORAS POSIBLES		
	Hemofilia A	Hemofilia B
Grave	23 (56,1%)	7 (53,8%)
Moderada	7 (17,1%)	0
Leve	11 (26,8%)	6 (46,1%)
Total	41 (100%)	13 (100%)

## Resultados

En la tabla 13 se muestra la distribución las portadoras por grupo de edades.

**Tabla 13.** Distribución de portadoras por grupo de edades.

PORTADORAS POR GRUPOS DE EDADES		
< 16 años	16-45 años	>45 años
12	63	27

### 2.4. Distribución de portadoras en familias con Hemofilia A

#### 2.4.1. Portadoras obligadas

En las 38 familias estudiadas con Hemofilia A había 22 familias con un total de 42 portadoras obligadas. De estas familias, 12 tienen HAG, con una mediana de portadora por familia de 1 (1-5); 4 familias tienen HAM con una mediana de portadora por familia de 3.5 (1-5), y 6 familias tienen HAL, con una mediana de portadora por familia de 1.5 (1-5).

#### 2.4.2. Portadoras posibles

En 23 de las 38 familias con Hemofilia A había 41 portadoras posibles. De estas familias, 14 tienen HAG, con una mediana de portadora por familia de 1 (1-6); 3 tienen HAM, con una mediana de portadora por familia de 2 (2-3); y 6 familias tiene HAL, con una mediana de portadora por familia de 2 (1-3).

En tres familias no se detectó la presencia de alteración genética en el estudio realizado a las madres (que eran portadoras posibles). Se trata de 2 familias con HAG (familias 2 y 18) y 1 familia con HAL (familia 46). En todas ellas, el estudio indirecto demostró que eran portadoras del haplotipo afectado.

## **2.5. Distribución de portadoras en familias con Hemofilia B**

### **2.5.1. Portadoras obligadas**

De las 8 familias con Hemofilia B estudiadas hay 4 familias con un total de 6 portadoras obligadas . De estas familias, 2 tienen HBG con una portadora en cada familia; y otras 2 familias con HBL y 2 portadoras en cada familia.

### **2.5.2. Portadoras posibles**

De las 8 familias con Hemofilia B encontramos 7 familias con un total de 13 portadoras posibles. De estas familias, 5 tienen HBG con una mediana de 1 portadora por familia (1-2) y 2 familias tienen HBL, con 3 portadoras cada una de ellas.

Hemos encontrado una familia en la que no se ha detectado la presencia de alteración genética en el estudio realizado a la madre (que era portadora posible). Se trata de la familia 16 en la que el estudio indirecto demostró que eran portadoras del haplotipo afectado.

## **2.6. Distribución de no portadoras confirmadas**

Los 47 casos en los que no se ha confirmado el estado de portadora se distribuyen en 22 familias (8 de ellas sin antecedentes). En 11 familias con HAG existen un total de 26 casos de no portadoras. En 4 familias con HAM se detectan 9 casos de no portadoras. En 4 familias con HAL, con 5 casos totales y 3 familias con HBG, con 7 casos totales. (Tabla 14)

**Tabla 14.** Distribución de no portadoras.

CASOS DE NO PORTADORAS				
	HAG	HAM	HAL	HBG
Familias	11	4	4	3
Casos totales	26	9	5	7

### 3. DESCRIPCIÓN GENERAL DE LAS MUTACIONES ENCONTRADAS

De los 73 pacientes incluidos en el estudio, hemos encontrado la alteración causante de la enfermedad en todos ellos. En la tabla 15 se muestra la distribución de cada tipo de mutación entre todos los casos de Hemofilia.

**Tabla 15.** Resumen de los tipos de mutación en afectados.

TIPO DE MUTACIÓN	CASOS N (%)	FAMILIAS N (%)	HISTORIA INHIBIDORES
Inversión de Intrón 22	14 (19,2%)	9 (19,5%)	Sí (en 4 casos)
Inversión de Intrón 1	2 (2,7%)	1 (2,2%)	No
Grandes deleciones (más de 50 pb)	2 (2,7%)	2 (4,3%)	Sí (en 1 caso)
Pequeñas deleciones (menos de 50 pb)	2 (2,7%)	2 (4,3%)	No
Missense	43 (58,9%)	25 (54,3%)	Sí (2 casos transitorios)
Nonsense (codón stop)	3 (4,1%)	3 (6,5%)	Sí (en 1 caso)
Splicing	6 (8,2%)	3 (6,5%)	No
Duplicación	1 (1,4%)	1 (2,2%)	No
Total	73	46	8

## Resultados

La presencia de inhibidor se apreció en los casos con HAG, 4 entre los casos con Inversión del Intrón 22 (aunque en uno de ellos fue transitorio), 2 entre los casos con mutación missense (en ambos casos transitorios), 1 caso en un afectado con una gran deleción y otro caso en el grupo de mutación nonsense.

### 3.1. Distribución de los diferentes tipos de mutación

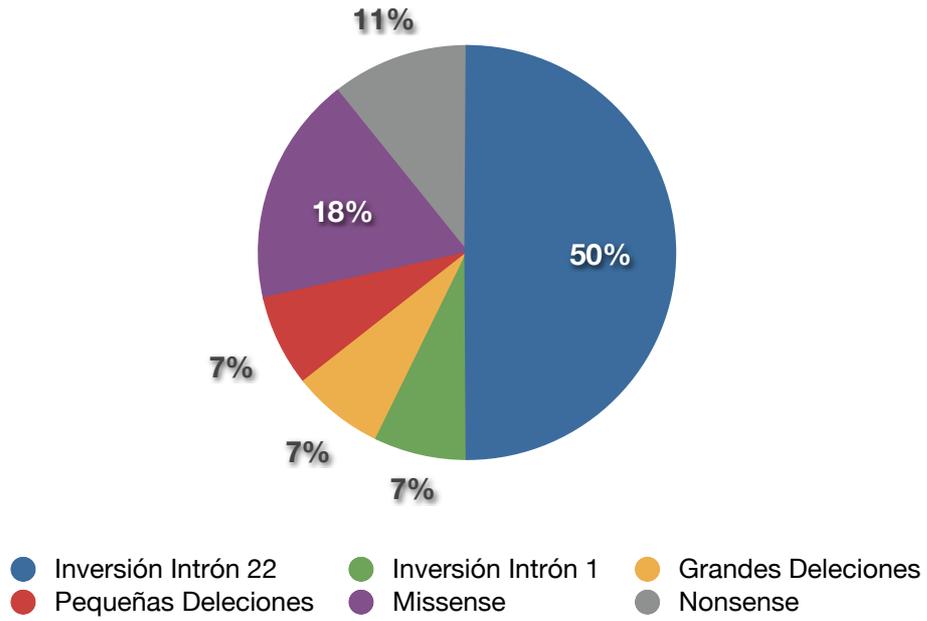
En la tabla 16 se muestra la distribución de cada alteración por tipo de Hemofilia y gravedad, agrupándolas en familias.

**Tabla 16.** Frecuencia diferenciada por gravedad y tipo de Hemofilia.

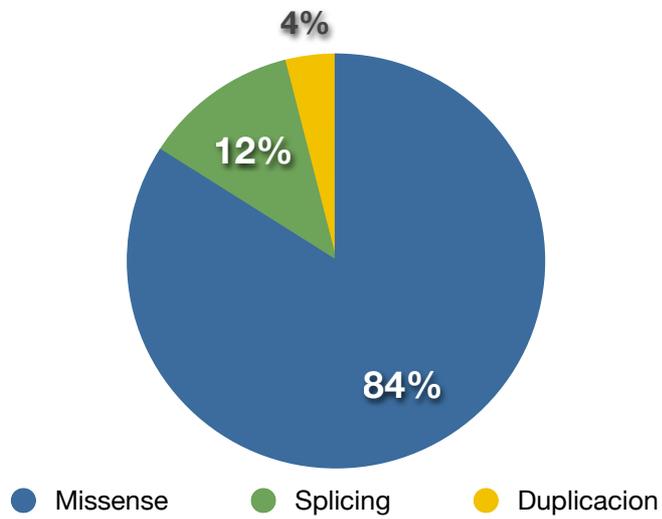
	H A G		H A M		H A L		H B G		H B L	
	Familias	Total casos	Familias	Total casos	Familias	Total casos	Familias	Total casos	Familias	Total casos
Inversión Intrón 22	9 (39,1%)	14	-	-	-	-	-	-	-	-
Inversión Intrón 1	1 (4,3%)	2	-	-	-	-	-	-	-	-
Grandes deleciones	2 (8,7%)	2	-	-	-	-	-	-	-	-
Pequeñas deleciones	2 (8,7%)	2	-	-	-	-	-	-	-	-
Missense	5 (21,7%)	5	4 (100%)	7	9 (81,8%)	21	4 (66,6%)	5	2 (%)	5
Nonsense	4 (17,4%)	3	-	-	-	-	-	-	-	-
Splicing	-	-	-	-	1 (9,1%)	3	2 (33,3%)	3	-	-
Duplicación					1 (9,1%)	1				
Total	23	28	4	7	11	25	6	8	2	5

En las figuras 22, 23 y 24 se muestra la distribución de los distintos tipos de mutaciones en cada tipo de Hemofilia.

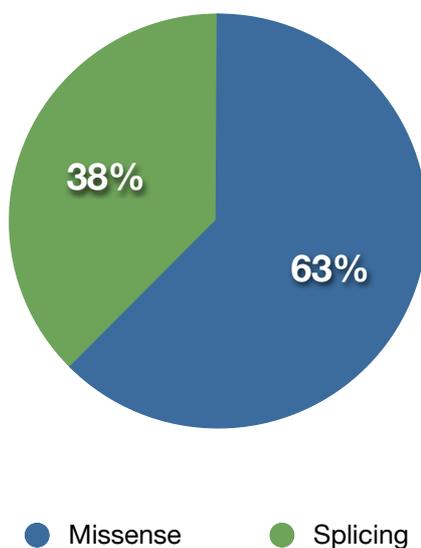
Resultados



**Figura 22.** Casos totales de mutaciones en HAG



**Figura 23.** Casos totales de mutaciones en HAL

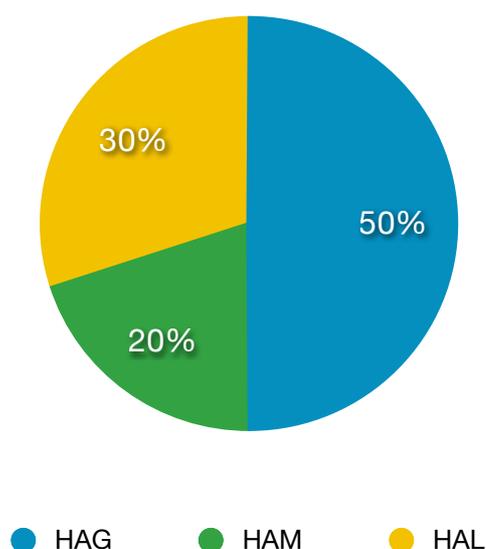


**Figura 24.** Casos totales de mutaciones en HBG

### 3.2. Mutaciones no descritas en los registros internacionales

Hemos detectado 11 mutaciones no descritas en los registros internacionales, afectando todas a familias con Hemofilia A, la mitad de los casos en HAG, el tipo de alteración y su distribución se muestra en la tabla 17 y figura 25.

## Resultados



**Figura 25.** Distribución de mutaciones no descritas en registros internacionales según el tipo de Hemofilia.

**Tabla 17.** Mutaciones no descritas en registros internacionales.

MUTACIONES NO DESCRITAS						
Nº Exón	Cambio de nucleótido (de: a:)	Cambio de Aminoácido	Tipo de mutación	Código Familia	HA	Inhibidores
3	A>T	p.Iso86Phe	Missense	5	HAM	No
3	C>G	p.Ala78Gly	Missense	37 y 46	HAL	No
4	T>C	p.Leu176Pro	Missense	2	HAG	No
7	G>A	p.Gly261Asp	Missense	42	HAL	No
8	C>T	p.Ser402Phe	Missense	28	HBL	No
12	G>T	p.Trp585Cys	Missense	45	HAG	Sí (transitorio)
14	3949-3950delTC	p.P1318X	Pequeña delección / Frameshift	21	HAG	No
22	A>T	p.Lys2085Stop	Stop	31	HAG	No
23	C>A	p.Pro2142His	Missense	4	HAM	No
23	C>T	p.Pro2153Leu	Missense	6 y 26	HAG	No*
24	G>A	p.Ala2208Thr	Missense	14	HAL	No

\*En la familia 6 apareció un inhibidor de baja respuesta transitorio.

## Resultados

Como se puede observar, las mutaciones p.Ala78Gly y p.Pro2153Leu se repiten en dos familias diferentes cada una (familias 37 y 46 y familias 6 y 26 respectivamente). En la familia 6 se detectó la presencia de un inhibidor transitorio de baja respuesta.

### 3.3. Distribución familiar de cada mutación según tipo de Hemofilia y gravedad

#### 3.3.1. Familias con Hemofilia A grave

La alteración más frecuente es la inversión del intrón 22, seguida de mutaciones puntuales (missense y nonsense). (Figura 26 y tabla 18).

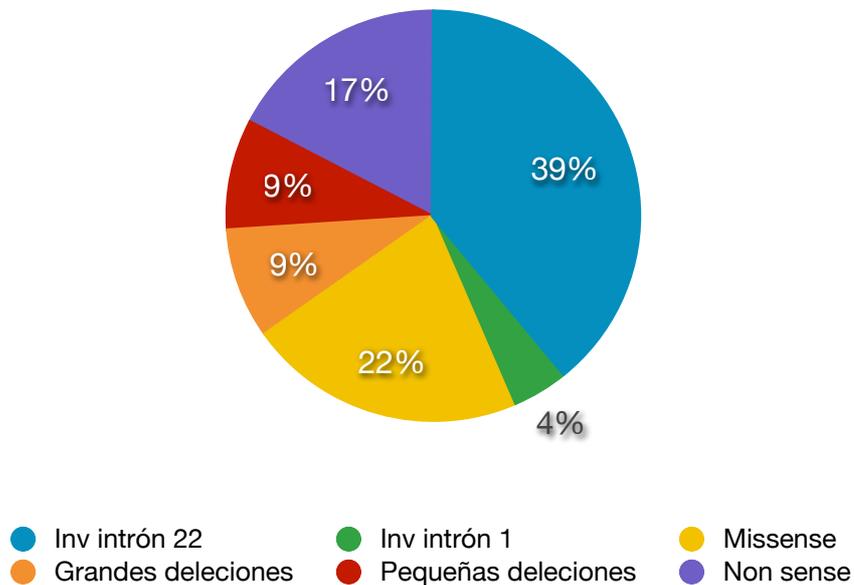
**Tabla 18.** Mutaciones en HAG.

MUTACIONES EN HAG						
Nº Exón/Intrón	Exón/Intrón	Código Familia	Cambio de nucleótido (de: a:)	Cambio de Aminoácido	Tipo de mutación	Referencia <sup>†</sup>
1	Intrón	20	-	-	Inversión	
4	Exón	2	T>C	p.Leu176Pro	Missense	No descrita
7	Exón	10	T > G	p.Phe276Leu	Missense	Tagariello et al (2000)
8	Exón	25	G>A	p.Trp393X	Stop	No descrita
12	Exón	45	G>T	p.Trp585Cys	Missense	No descrita
14	Exón	27	3637-3644delA	p.I1194fsX5	Delección parcial Frameshift	Lin et al (1993)
14	Exón	43	C>T	p.Arg795X	Stop	Pattison et al (1990a)
14	Exón	21	39949-3950delTC	p.Pro1318X	Delección parcial Frameshift	No descrita
18	Exón	40	C>T	p.Arg1966X	Stop	Reiner & Thompson (1992)
22	Exón	30	A>T	p.Lys2085X	Stop	No descrita
22	Intrón	*	-	-	Inversión	
23	Exón	6 y 26	C>T	p.Pro2153Leu	Missense	No descrita
26	Exón	36	-	-	Delección completa (Gran delección)	?
23-26	Exón	18	-	-	Gran delección	Din et al (1986) Lavergne et al (1992)

\* Las familias afectadas se detallan en el apartado dedicado a la inversión del intrón 22 más adelante.

† Referencias tomadas de HAMSTeRs/HADB<sup>35</sup>, consultada en enero de 2012.

## Resultados



**Figura 26.** Distribución de mutaciones en familias HAG

### 3.3.2. Familias con Hemofilia A moderada

Todas las alteraciones encontradas resultaron ser del tipo mutaciones puntuales (missense), como se muestra en la tabla 19.

**Tabla 19.** Mutaciones en familias HAM

MUTACIONES EN HAM						
Nº Exón/Intrón	Exón/Intrón	Código Familia	Cambio de nucleótido (de: a:)	Cambio de Aminoácido	Tipo de mutación	Referencia <sup>†</sup>
3	Exón	5	A>T	p.Iso86Phe	Missense	No descrita
20	Exón	1 y 24	G>C	p.Ala2039Pro	Missense	Tagariello et al (2000)
23	Exón	4	C>A	p.Pro2142His	Missense	No descrita

<sup>†</sup> Referencias tomadas de HAMSTeRs/HADB<sup>(35)</sup>, consultada en 2012.

**Resultados**

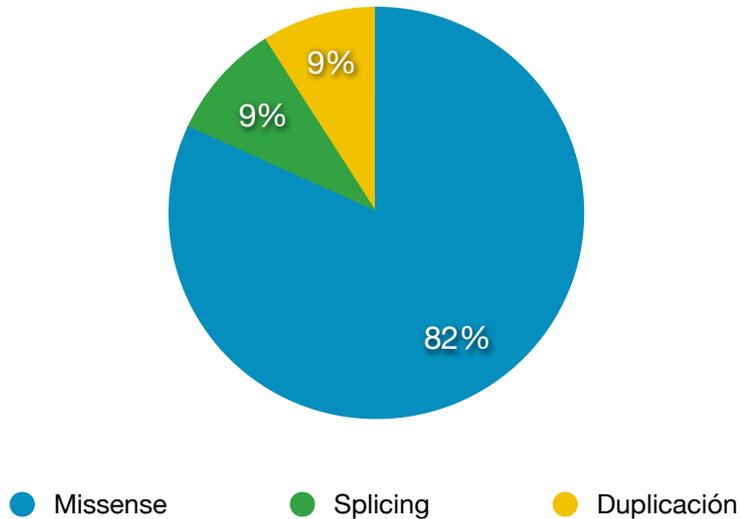
**3.3.3. Familias con Hemofilia A leve**

En este grupo observamos el predominio de las mutaciones tipo missense, con un caso de mutación tipo splicing y otro con duplicación. (Figura 27 y tabla 20)

**Tabla 20.** Mutaciones en HAL.

MUTACIONES EN HAL						
Nº Exón/Intrón	Exón/Intrón	Código Familia	Cambio de nucleótido (de: a:)	Cambio de Aminoácido	Tipo de mutación	Referencia†
1	Intrón	13	T>C	IV1+2T>C	Splicing	Casaña et al (2004)
3	Exón	37 y 46	C>G	p.Ala78Gly	Missense	No descrita
7	Exón	3	G>A	p.Glu272Lis	Missense	Youssoufian et al (1988b)
7	Exón	42	G>A	p.Gly261Asp	Missense	No descrita
11	Exón	19 y 29	G>A	p.Arg531His	Missense	Schwaab et al (1995a)
12	Exón	44	C>T	p.Arg593Cys	Missense	Higuchi et al (1991b)
14	Exón	38	-	-	Duplicación completa	?
16	Exón	8	G>A	p.Ala1824Thr	Missense	Casaña et al (2004)
24	Exón	14	G>A	p.Ala2208Thr	Missense	No descrita

† Referencias tomadas de HAMSTeRs/HADB<sup>(35)</sup>, consultada en enero de 2012.



**Figura 27.** Distribución de mutaciones en familias HAL.

## Resultados

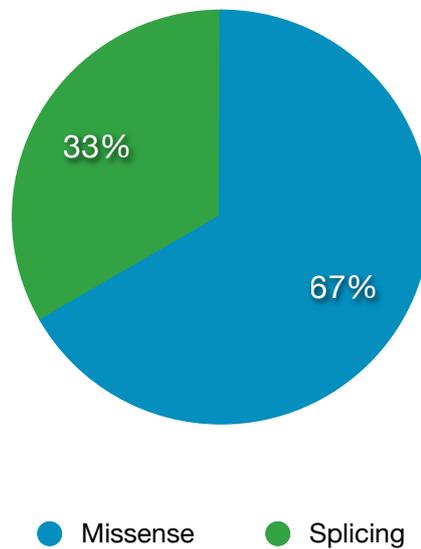
### 3.3.4. Familias con Hemofilia B grave

En este grupo, las mutaciones predominantes fueron las tipo missense (Figura 28 y tabla 21).

**Tabla 21.** Mutaciones en HBG.

MUTACIONES EN HBG						
Nº Exón/Intrón	Exón/Intrón	Código Familia	Cambio de nucleótido (de: a:)	Cambio de Aminoácido	Tipo de mutación	Referencia†
1	Intrón	16	G>A	IVS1+1G>A	Splicing	Wulff, Hermann et al
2	Intrón	33	G>C	IVS2+1G>C	Splicing	Ketterling et al (1999)
7	Exón	34	G>A	p.Gly208Asp	Missense	Mukherjee et al (2004)
8	Exón	23	T>C	p.Leu279Ser	Missense	Ghanem et al (1993)
8	Exón	39	G>T	p.Arg333Leu	Missense	Bottema et al (1991)
8	Exón	22	G>A	p.Cys289Tyr	Missense	Tagariello et al (2000)

† Referencias tomadas de Haemophilia B Mutation Database<sup>(60)</sup>, consultada en enero de 2012.



**Figura 28.** Distribución de mutaciones en familias HBG.

## Resultados

### 3.3.5. Familias con Hemofilia B leve

En este grupo, las mutaciones encontradas corresponden al tipo missense. Se muestran en la tabla 22.

**Tabla 22.** Mutaciones en HBL.

MUTACIONES EN HBL						
Nº Exón/Intrón	Exón/Intrón	Código Familia	Cambio de nucleótido (de: a:)	Cambio de Aminoácido	Tipo de mutación	Referencia <sup>†</sup>
8	Exón	28	C>T	p.Ser402Phe	Missense	No descrita
8	Exón	27	G>A	p.Arg248Glu	Missense	Tagariello et al (2000)

<sup>†</sup> Referencias tomadas de Haemophilia B Mutation Database<sup>(60)</sup>, consultada en 2012.

### 3.4. Mutaciones recurrentes

Las mutaciones recurrentes encontradas se muestran en la tabla 23. Como se puede observar, la alteración recurrente más frecuente es la inversión del intrón 22, siendo exclusiva de la HAG. Tenemos mutaciones de tipo missense distribuidas en los tres tipos de HA. No hemos encontrado mutaciones recurrentes en familias con HB.

**Tabla 23.** Descripción de las mutaciones recurrentes encontradas.

MUTACIONES RECURRENTE						
Código Familia	Exón/Intrón	Nº Exón/Intrón	Cambio de nucleótido (de: a:)	Cambio de Aminoácido	Tipo de mutación	Hemofilia
37 y 46	Exón	3	C>G	p.Ala78Gly	Missense	HAL
19 y 29	Exón	11	G>A	p.Arg531His	Missense	HAL
1 y 24	Exón	20	G>C	p.Ala2039Pro	Missense	HAM
6 y 26	Exón	23	C>T	p.Pro2153Leu	Missense	HAG
*	Intrón	22	-	-	Inversión	HAG

\* Las familias afectadas se detallan en el apartado dedicado a la inversión del intrón 22 más adelante.

#### 4. DESCRIPCIÓN POR FAMILIAS DE CADA GRUPO DE MUTACIÓN

##### 4.1. Inversión del intrón 22

Encontramos 9 familias afectadas, con un total de 11 portadoras. Todos los casos corresponden a HAG, constituyendo el grupo de alteración genética recurrente más importante. La distribución se muestra en la tabla 24.

En tres familias existía historia de haber desarrollado un inhibidor de alta respuesta (>5 UB/ml), con la peculiaridad de que se ha conseguido la inmunotolerancia y el borramiento del inhibidor a FVIII.

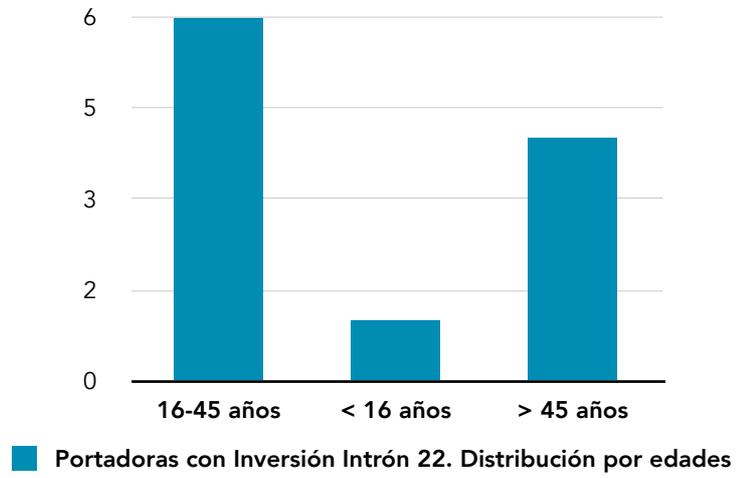
**Tabla 24.** Descripción de las familias con inversión del intrón 22 mostrando la incidencia de antecedentes y de portadoras posibles y obligadas

INVERSIÓN INTRÓN 22								
Código Familia	Antecedentes	Tipo	Nº de portadoras	Obligadas	Posibles	16-45 años	< 16 años	> 45 años
7	No	HAG	1	0	1	0	0	1
9	Sí	HAG	3	1	2	2	0	1
11	Sí	HAG	1	1	0	1	0	0
15	Sí	HAG	1	1	0	0	1	0
17	No	HAG	1	0	1	1	0	0
30	No	HAG	1	1	0	0	0	1
32	No	HAG	1	1	0	0	0	1
35	Sí	HAG	1	1	0	1	0	0
41	No	HAG	1	0	1	1	0	0
TOTAL			11	6 (54,5%)	5 (45,4%)	6 (54,5%)	1 (9,1%)	4 (36,4%)

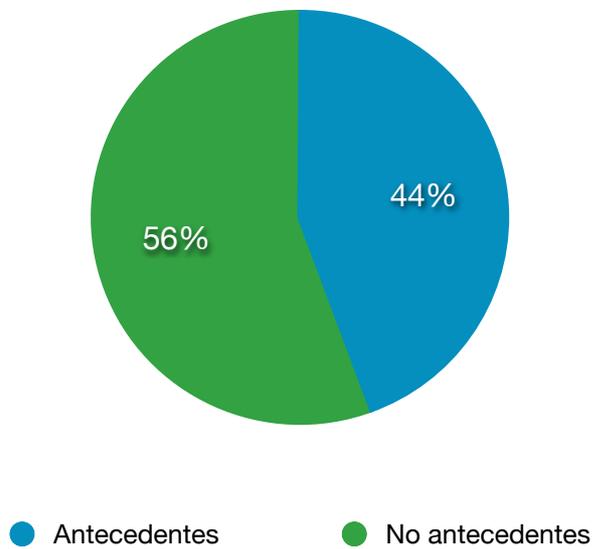
En la distribución por edades se aprecia que el grupo mayoritario es el que comprendido entre los 16 y 45 años. (Figura 29).

La mayor parte de los casos (56%) son esporádicos. En este grupo se detectó la alteración genética en todas las madres estudiadas (Figura 30).

## Resultados



**Figura 29.** Distribución por edades de portadoras de mutación inversión de intrón 22.



**Figura 30.** Distribución de familias con portadoras de inversión de intrón 22 según existencia de antecedentes.

## Resultados

### 4.2. Inversión del Intrón 1

Sólo se ve afectada una familia, en la que existe una portadora obligada por haber tenido 2 hijos hemofílicos graves. Se trata de una familia de origen marroquí con varios antecedentes de hijos fallecidos tras circuncisión en su país de origen. (Tabla 25)

**Tabla 25.** Portadoras con Inversión Intrón 1

INVERSIÓN DE INTRÓN 1								
Código Familia	Antecedentes	Tipo Hemofilia	Nº de portadoras	Obligadas	Posibles	16-45 años	< 16 años	> 45 años
20	Sí	HAG	1	1	0	1	0	0

### 4.3. Grandes deleciones

En este caso sólo existen dos familias con grandes deleciones, 1 familia con la deleción del exón 23 al 26 (familia número 18), con HAG, en la que no se ha encontrado alteración genética en el ADN de sangre periférica de la madre, existiendo la posibilidad de que se trate de una deleción de novo o por mosaicismo germinal en la madre del paciente. No existen antecedentes de Hemofilia en esta familia. En la otra familia (36) se ha detectado la presencia de una deleción completa del exón 26 asociada a la aparición de un inhibidor de alta respuesta. En dicha familia, el afectado es inmigrante y su única hija es portadora obligada de dicha mutación. En este grupo, 1 familia no presentaba antecedentes. La distribución de este grupo se describe en la tabla 26.

**Tabla 26.** Portadoras con grandes deleciones (exon 23-26 y exón 26)

GRANDES DELECIONES								
Código Familia	Antecedentes	Tipo Hemofilia	Nº de portadoras	Obligadas	Posibles	16-45 años	< 16 años	> 45 años
18	No	HAG	1	0	1	1	0	0
36	Sí	HAG	1	1	0	0	1	0
TOTAL			2	1(50%)	1(50%)	1(50%)	1(50%)	0

## Resultados

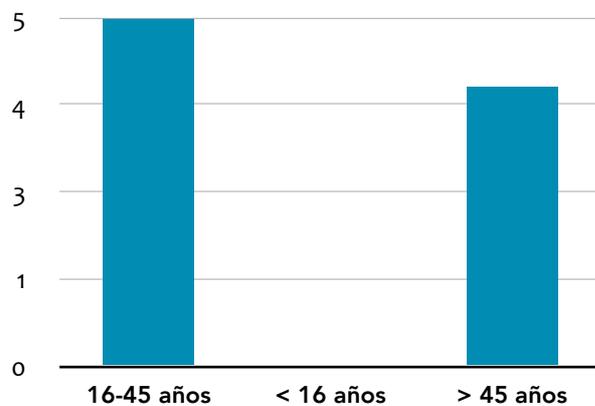
### 4.4. Pequeñas deleciones

Hemos encontrado 2 familias con presencia de pequeñas deleciones. En una existía el antecedente familiar, mientras que la otra familia se trata de un caso esporádico (Tabla 27).

**Tabla 27.** Distribución de pequeñas deleciones (deleciones parciales)

PEQUEÑAS DELECIONES								
Código Familia	Antecedentes	Tipo Hemofilia	Nº de portadoras	Obligadas	Posibles	16-45 años	< 16 años	> 45 años
21	Sí	HAG	6	0	6	3	0	3
27	No	HAG	3	0	3	2	0	1
TOTAL			9	0	9 (100%)	5 (55,5%)	0	4 (44,4%)

En la figura 31 se muestra la distribución por grupos de edades de las portadoras en este grupo.



■ Portadoras con Deleciones parciales. Distribución por edades

**Figura 31.** Distribución por edades de portadoras de deleciones parciales.

### 4.5. Mutaciones puntuales

Se trata del grupo de familias más amplio (Tabla 28), donde encontramos de nuevo que el grupo predominante de portadoras es el que comprende el rango de edad entre los 16 y 45 años (Figura 32). En este tipo de mutación predominan los casos con antecedentes familiares (Figura 33).

En la familia 42 no se pudo realizar el estudio genético de la madre (por estar la fallecida) ni de la hermana por ser de edad avanzada y sin descendencia. Las dos hijas son portadoras seguras.

Dentro de los casos esporádicos tenemos dos casos en los que no se ha podido encontrar la mutación en las madres correspondientes:

- En la familia 2 no se detecta alteración genética en el ADN de sangre periférica de la madre, existiendo la posibilidad de que se trate de una deleción de novo o por mosaicismo germinal
- La familia 46 en cambio, se trata de un caso esporádico donde la madre tiene dos hijos hemofílicos, pero en la que no hemos encontrado la alteración genética, lo que indica que se trata de un caso de mosaicismo germinal.

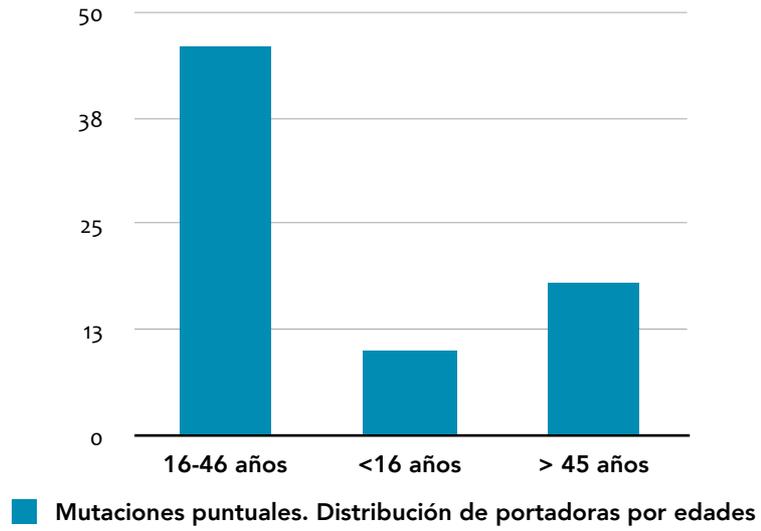
**Resultados**

**Tabla 28.** Distribución Mutaciones puntuales. (incluidas las mutaciones nonsense)

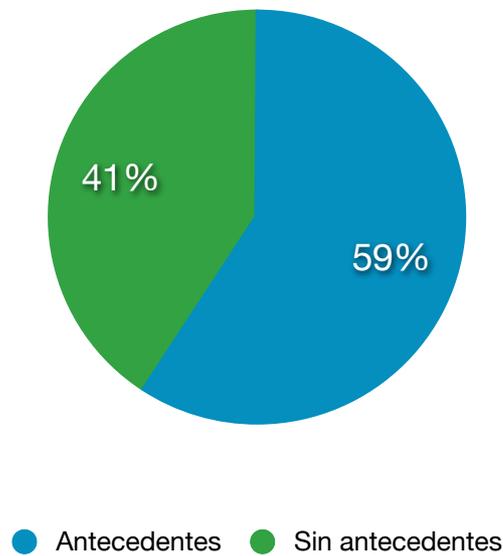
MUTACIONES PUNTALES								
Código Familia	Antecedentes	Tipo Hemofilia	N° de portadoras	Obligadas	Posibles	16-45 años	< 16 años	> 45 años
1	Sí	HAM	7	5	2	5	2	0
2	No	HAG	1***	0	1	1	0	0
3	Sí	HAL	5	2	3	3	1	1
4	Si	HAM	3	3	0	1	0	2
5	Sí	HAM	6	4	2	4	0	2
6	No	HAG	1	0	1	1	0	0
8	No	HAL	1	0	1	1	0	0
10	Sí	HAG	3	1	2	3	0	0
12	Sí	HBL	5	2	3	1	4	0
14	Si	HAL	5	5	0	4	0	1
19	No	HAL	2	0	2	1	0	1
22	No	HBG	1	0	1	1	0	0
23	No	HBG	1	1	0	1	0	0
24	Si	HAM	4	1	3	3	0	1
25	No	HAG	1	0	1	1	0	0
26	Sí	HAG	6	5	1	4	0	2
28	Sí	HBL	5	2	3	3	1	1
29	Si	HAL##	2	0	2	0	1	1
31	Sí	HAG	2	2	0	1	0	1
34	No	HBG	2	0	2	1	0	1
37	No	HAL	2	0	2	1	0	1
39	No	HBG	2	0	2	1	1	0
40	No	HAG	1	1	0	0	0	1
42	Sí	HAL	2	2	0	2	0	0
43	No	HAG	1	0	1	1	0	0
44	Si	HAL	1	1	0	0	0	1
45	No	HAG	1	0	1	1	0	0
46	No	HAL	1**	1	0	0	0	1
<b>TOTAL</b>			<b>74</b>	<b>38 (%)</b>	<b>36 (51,3%)</b>	<b>46(62,2%)</b>	<b>10(13,5%)</b>	<b>18(24,3%)</b>

\*\*Posible mosaicismo germinal o mutación de novo en el paciente. \*\*\* Caso de novo o mosaicismo germinal en la madre. ## Con niveles de FVIII normales en la actualidad.

## Resultados



**Figura. 32** Distribución por edades de portadoras de mutaciones puntuales.



**Figura 33.** Distribución de familias con portadoras de mutaciones puntuales según existencia de antecedentes.

## Resultados

### 4.6. Mutaciones de splicing

En este grupo encontramos 3 familias en las que de nuevo el grupo de portadoras más importante es el comprendido en el rango de edad de 16 a 45 años. (Figura 34). Los datos se muestran en la tabla 29.

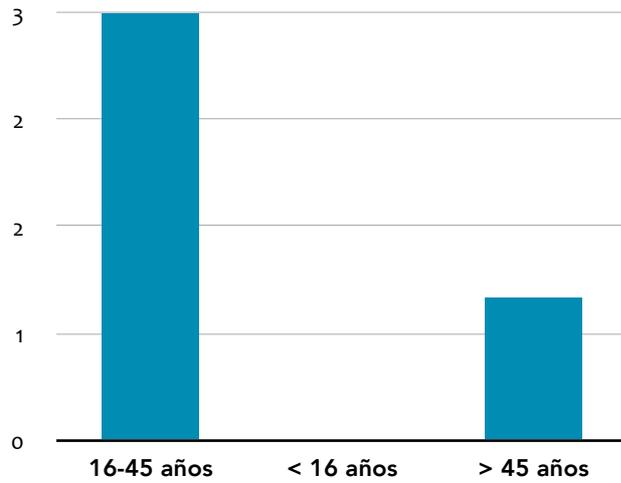
**Tabla 29.** Mutaciones de splicing.

MUTACIONES SPLICING								
Código Familia	Antecedentes	Tipo Hemofilia	Nº de portadoras	Obligadas	Posibles	16-45 años	< 16 años	> 45 años
13	Sí	HAL	1	1	0	1	?	?
16	No	HBG	1	0	1	1	0	0
33	No	HBG	2	1	1	1	0	1
Total	3		4	2	2	3	0	1

En el caso de la familia 13 no se ha podido estudiar a las posibles portadoras de la familia. Sólo se ha estudiado a los afectados de la familia. La madre es portadora obligada. En dicha familia existen antecedentes familiares hemorrágicos.

La familia 16 se trata de un caso esporádico que no se ha encontrado alteración genética en el ADN de sangre periférica de la madre, existiendo la posibilidad de que se trate de una delección de novo o por mosaicismo germinal.

## Resultados



■ Mutaciones de splicing. Distribución de portadoras por edades

**Figura 34.** Distribución por edades de portadoras de mutaciones de splicing.

### 4.7. Duplicaciones

Encontramos sólo una familia con una duplicación completa del exón 14, en la que no hemos hallado antecedentes familiares hemofílicos. En este caso, se ha podido detectar la mutación causante de Hemofilia en la madre. (Tabla 30)

**Tabla 30.** Distribución de duplicaciones

DUPLICACIONES								
Código Familia	Antecedentes	Tipo Hemofilia	Nº de portadoras	Obligadas	Posibles	16-45 años	< 16 años	> 45 años
38	No	HAL	1	0	1	1	0	0

## 5. RESUMEN DE RESULTADOS DESTACADOS

### 5.1. Familias con casos esporádicos

Respecto a las 46 familias estudiadas para la presencia de mutación hemos encontrado un total de 24 familias con casos esporádicos, que supone un 52,2% de las familias. Su distribución y frecuencia se muestra en la tabla 31. Dentro de este grupo, tenemos 4 familias (17,4%) en las que no hemos encontrado la alteración genética en la madre del afectado, distribuidas como indica la tabla 32.

**Tabla 31.** Familias sin antecedentes. (respecto al total de familias estudiadas)

FAMILIAS SIN ANTECEDENTES		
HAG	HAL	HBG
13 (28,3%)	5 (10,8%)	6(13%)

**Tabla 32.** Familias en las que no se ha detectado alteración en la madre

FAMILIAS SIN DETECTAR ALTERACION MATERNA		
HAG	HAL	HBG
2 (50%)	1 (25%)	1 (25%)

### 5.2. Familias estudiadas sin disponer de muestras de afectados

Nos hemos encontrado con 4 familias en las que no disponíamos de muestra del afectado, pero que se ha conseguido encontrar la alteración genética por secuenciación directa del gen de F8 de las posibles portadoras. Todas las familias correspondían a HA, predominando los casos de HAG. En la tabla 33 se muestra la distribución por tipo de Hemofilia de cada familia.

**Tabla 33.** Familias estudiadas sin muestra de afectado.

FAMILIAS SIN MUESTRA DE AFECTADO	
Familia	Tipo de Hemofilia
5	HAM
21	HAG
26	HAG
31	HAG

### 5.3. Familias con historia de inhibidor

En la tabla 34 se muestra la distribución de los casos con historia de inhibidor en nuestra serie.

**Tabla 34.** Distribución de casos con historia de presencia de inhibidor.

FAMILIAS CON HISTORIA DE INHIBIDOR			
Familia	Tipo de Hemofilia	Mutación	Inhibidor transitorio (si/no)
6	HAG	p.Pro2153Leu	Si
9	HAG	Inv. intrón 22	No
11	HAG	Inv. intrón 22	Si
17	HAG	Inv. intrón 22	No
25	HAG	p.Trp393Stop	No
36	HAG	Delección completa de exón 26	No
45	HAG	p.Trp585Cys	Si

**E** >>> **Discusión**

## Discusión

Nuestro servicio es centro de referencia para el tratamiento de la población hemofílica de nuestra región, por lo que la población incluida en el estudio se corresponde con la realidad de esta enfermedad en nuestro medio. Por otra parte, existe una estrecha colaboración con la Asociación Murciana de Hemofilia, con realización de frecuentes cursos de formación y entrevistas con las familias afectadas, siendo la comunicación continua y fluida, lo que permite un conocimiento de la situación social de esta población en nuestra comunidad.

### 1. DATOS GENERALES

El avance de las técnicas genéticas de diagnóstico ha supuesto un arma muy importante en la ayuda del diagnóstico en la Hemofilia, posibilitando el conocimiento de la correlación genotipo-fenotipo de la enfermedad, la detección de portadoras y predicción de riesgo de sangrado, diagnóstico prenatal y la predicción del desarrollo de inhibidores caracterización de la alteración causante de la enfermedad en los afectados y la detección de portadoras posibles distribuidas en la población<sup>(98,99)</sup>.

La Hemofilia está causada por una gran variabilidad de mutaciones que afectan al gen F8 o F9 y que normalmente se correlacionan con la gravedad de la enfermedad. Así, por ejemplo, las grandes deleciones o la inversión del intrón 22 se asocian a formas graves, mientras que las mutaciones de tipo missense y las pequeñas deleciones pueden aparecer en los distintos tipos de gravedad de la enfermedad<sup>(100)</sup>.

Dado que en ocasiones es difícil conseguir llegar al diagnóstico de estado de portadora basándonos sólo en los niveles del factor deficitario (pueden tener niveles dentro de la normalidad) y los antecedentes familiares, tenemos que recurrir a estudios de biología molecular para conseguir dicho diagnóstico<sup>(101)</sup>.

Para el estudio de la inversión del intrón 22 hemos utilizado la técnica de PCR inversa descrita por Rossetti et al en 2005<sup>(40)</sup>. La técnica de Southern Blot sigue considerándose el método de referencia para el estudio de la inversión del intrón 22, es una técnica robusta y capaz de distinguir entre los dos tipos de inversión del intrón 22, pero es una técnica muy laboriosa que requiere de 8 a 10 días para obtener algún resultado<sup>(24,102)</sup>. Posteriormente se diseñó un nuevo método llamado PCR de grandes

## Discusión

fragmentos (Longe-range PCR), mucho más rápido y sencillo, convirtiéndose en el método de referencia en muchos laboratorios, aunque presentaba problemas a la hora de la amplificación directa de secuencias grandes de más de 10 kilobases, que hace a esta técnica dependiente de unos rangos estrechos de calidad de DNA y de condiciones de termociclado y reactivos<sup>(103,104)</sup>. Para mejorar estos problemas se diseñó en 2005 una aproximación alternativa a la PCR inversa<sup>(40)</sup>. Tanto el método de PCR de grandes fragmentos como el de PCR inversa modificado no permiten distinguir entre inversiones del intrón 22 tipo 1 y 2, realizándose posteriormente nuevas modificaciones a ambas técnicas para distinguir ambos tipos de inversión y minimizar los errores diagnósticos<sup>(102,105,106)</sup>. La PCR inversa modificada es capaz además de detectar y hacer una evaluación semicuantitativa mosaicismos en portadoras, y trabajar de forma estable obre un amplio rango de calidades de DNA y procedimientos, como el diagnóstico prenatal, reduciendo al mínimo el posible error de diagnóstico<sup>(105)</sup>.

Las técnicas utilizadas para el estudio de la inversión del intrón 22 en este trabajo están basadas en la PCR inversa modificada descrita por Rossetti et al. (2005)<sup>(40)</sup>, aunque si bien no se utiliza la última modificación de PCR inversa de Rossetti et al. (2008)<sup>(105)</sup>, nos da la seguridad diagnóstica necesaria para estudio de portadoras y diagnóstico prenatal.

En los algoritmos 1 y 2 (ver secciones 2.1 y 2.2 de Material y Métodos) se muestra la estrategia seguida para el diagnóstico molecular en nuestros pacientes. Remarcar que en el caso de Hemofilia A, se trata de descartar en primer lugar la presencia de la inversión del intrón 22 y seguidamente la inversión del intrón 1 (basado en la técnica de Bagnall et al. 2002 y modificado por Tizzano et al 2003)<sup>(41,77)</sup>, pasando posteriormente al estudio de deleciones-duplicaciones y secuenciación directa para detectar cambios puntuales. En Hemofilia B se intenta descartar en primer lugar la presencia de deleciones y posteriormente, mediante secuenciación directa, la presencia de mutaciones puntuales.

## Discusión

Al ser nuestro centro el de referencia para el tratamiento de la Hemofilia en la comunidad de Murcia, como hemos comentado anteriormente, el presente estudio refleja la situación real de esta enfermedad en nuestra comunidad, tanto en la distribución de afectados, portadoras y sus familias, así como la alteración genética causante de la Hemofilia. La incidencia de Hemofilia en nuestra región es de 80 pacientes sobre un total de 1.470.069 habitantes (1:18375 habitantes). En España no existía un registro riguroso de estos pacientes y en 2008 se inició el Registro Nacional de Hemofilia A y B, obteniéndose los primeros resultados en 2010, con la presencia de 2993 pacientes hemofílicos (2595 con HA (86%) y 398 con HB (14%) y una incidencia de 1:15669 habitantes, siendo por tanto similar a la de nuestra comunidad<sup>(107,108)</sup>. Si comparamos la incidencia con la presentada en otros países de nuestro entorno encontramos que existen pocos datos al respecto, existiendo escasas publicaciones rigurosas o con datos recientes. En este sentido, encontramos referencias de registros de Polonia, Gran Bretaña y Suiza. En el caso de Suecia, encontramos datos del registro de 1982<sup>(109)</sup> y datos más dispersos de una publicación más reciente de 2011<sup>(110)</sup>. La incidencia nuestra región es similar a la de Polonia (1:12300 habitantes)<sup>(111)</sup> y Suiza (1:11577)<sup>(112,113)</sup> y discretamente inferior a la de países como Suecia (1:9514 habitantes) o Reino Unido (1:9519)<sup>(114)</sup>.

De los 80 pacientes existentes en nuestra región (distribuidos en 53 familias no relacionadas), 65 (81,2%) están afectados de Hemofilia A y 15 (18,5%) de afectados de Hemofilia B, con un ratio HA/HB de 4.4/1, inferior al mostrado en el registro nacional publicado por de Aznar et al. 2009, que era de 6.5/1 y con un porcentaje similar de afectados en el caso de HA (86.7% ) y algo más elevado en el caso de HB al mostrado en el mismo estudio (13.3%)<sup>115</sup>. La distribución de tipo de Hemofilia en nuestra región es similar a la de Suecia publicada por Larsson et al. 1982 (4.2/1)<sup>(109)</sup>, e inferior al ratio descrito en otros países como Polonia, Brasil y Suiza, publicado por Windyga et al 2006, Rezende et al. 2009 y von der Weid et al. 2009, con 6,2/1, 5,32/1 y 5/1 respectivamente<sup>(111,112,116)</sup>.

## Discusión

En cuanto a la distribución según la gravedad de Hemofilia A , se muestra en la tabla 35 la comparativa entre los datos del registro británico (UKHCDO del 2011), registros españoles (Aznar et al, 2009 y registro del Ministerio de Sanidad del 2010) del registro polaco (Windyga et al, 2006) y del suizo (von der Weid, 2009).

**Tabla 35.** Incidencia de Hemofilia A según lo grados de gravedad en los diferentes registros de Hemofilia A disponibles en la actualidad y en nuestra serie.

	Registro polaco <sup>(111)</sup>	Registro suizo <sup>(112)</sup>	UKHCDO 2011 <sup>(114)</sup>	Registros españoles		Nuestra serie
				Aznar et al. 2009 <sup>(115)</sup>	Registro nacional MSC <sup>(108)</sup>	
HAG	59,7%	37%	34,6 %	32,8 %	32,1%	43 %
HAM	14,1%	19%	9,9 %	13,9 %	13,3%	11 %
HAL	26,2%	44%	55,4 %	53,3 %	53%	46 %
n	1953	560	5367	2081	2595	65

Se puede apreciar que los porcentajes de nuestra serie son similares a los del registro suizo, mientras que sólo los porcentajes de HAM son similares al registro nacional español. El hecho de las diferencias con el registro español se pueden deber al diferente número de pacientes incluidos, aunque tampoco se puedan excluir otros factores étnicos o de otro tipo. En nuestro estudio el porcentaje de HAG y HAL es bastante similar, predominando la población con HAL.

En cuanto a la distribución de la población con Hemofilia B, existe un predominio de los casos graves. En comparación con los registros nacionales español, británico y suizo, predominan los casos de HBG (Tabla 36). La incidencia de HBL es similar a la expuesta en los registros españoles y británico, aunque más elevada que la expuesta en el registro polaco. En HBM tenemos un porcentaje muy bajo con respecto a los otros registros. Las diferencias pueden ser debidas al pequeño número de pacientes estudiados en relación a los registros nacionales mencionados.

Las técnicas utilizadas para la determinación del nivel de factor VIII/IX en los distintos registros consultados así como los puntos de corte para clasificar la gravedad de la enfermedad son los indicados en los estándares de la Sociedad Internacional de Trombosis y Hemostasia (ISTH)[5th International Standard for Blood Coagulation Factor VIII and Von Willebrand Factor in Plasma, Human (02/150), 2003].

**Tabla 36.** Comparación de diferentes registros nacionales de Hemofilia B

	Registro polaco <sup>(111)</sup>	Registro suizo <sup>(112)</sup>	Registros españoles		UKHCDO 2011 <sup>(114)</sup>	Nuestra serie
			Estudio Aznar et al. 2009 <sup>(115)</sup>	Registro MSC 2010 <sup>(108)</sup>		
HBG	56,6%	34%	29,1 %	26,6%	35,4 %	53 %
HBM	25,6%	34%	32,3 %	31,1	21,4 %	7 %
HBL	17,8%	32%	38,6 %	37,2%	42,9 %	40 %
n	316	112	319	398	1133	15

Siete familias (11%) de las 53 censadas en nuestra región no pudieron ser estudiadas, 6 de ellas (11%) rehusaron a la realización del estudio a pesar de haber recibido una completa información de la importancia del estudio. Curiosamente pertenecen a un grupo de pacientes que no suelen acudir de forma regular a las revisiones médicas ni a actos organizados por la Asociación Murciana de Hemofilia. La otra familia no fue incluida en el estudio por cumplirse el tiempo de reclutamiento de datos para el trabajo.

Gracias a las técnicas actuales es posible realizar el estudio genético de posibles portadoras pertenecientes a familias donde no se dispone de muestra del afectado partiendo de una portadora obligada y llegar al diagnóstico de portadora, y con la secuenciación directa llegar a la mutación causante de la enfermedad, posibilitando un asesoramiento genético eficaz en estas familias. Es interesante el hecho de que se consiguiera hacer el diagnóstico genético de estado de portadoras a 4 familias en las que no se disponía de muestra del afectado por haber fallecido antes del inicio del estudio; encontrando, curiosamente, alteraciones no descritas en el registro internacional The Haemophilia A Mutation Database and FVIII Resource Site (HAMSTeRS/HADB)<sup>(33)</sup> y que serán comentadas más adelante.

Cuando revisamos la incidencia de Hemofilia sin antecedentes familiares entre nuestros pacientes, encontramos que había un 52,2% de familias sin antecedentes de Hemofilia, con predominio de los casos con HAG. En el estudio de Aznar et al. existe un 44% de familias sin antecedentes. En el estudio de Kasper et al. 2007, sobre una población de 1122 afectados y 804 familias, se describe la existencia de un 46% de

## **Discusión**

familias sin antecedentes familiares, datos similares a los presentados en nuestra población. Tanto en el trabajo de Aznar et al. 2009 y de Kasper et al. 2007 se aprecia un predominio de los casos esporádicos en las familias con HAG y HBG, resultados similares a los mostrados en nuestra serie. Por otra parte, en el estudio de Windyga et al. 2006 existe más de un 50% de familias sin antecedentes, mientras que en el registro sueco (Larson et al. 1982) el 32% de las familias con casos de HA y el 26% de las familias con casos de HB no tenían historia familiar de Hemofilia<sup>(109,111,115,117)</sup>.

## 2. FAMILIAS Y PORTADORAS SEGÚN EL TIPO DE HEMOFILIA

Los 65 afectados de Hemofilia A están distribuidos en 38 familias, predominando las familias con Hemofilia A grave sobre las familias con Hemofilia A leve.

La suma de casos graves y moderados supone el 55,7% de los casos, discretamente superior a la proporción (48.7%) presentada en el estudio de Aznar et al. 2009 y al estudio sueco<sup>(109,115)</sup> (30%), y similar al reflejado en el registro suizo de von der Weid et al. 2010<sup>(112)</sup> (56%), mientras que los casos leves suponen el 44,3%, discretamente inferior a lo reportado en la serie de Aznar et al. 2009 (51.3%). Cuando separamos las formas graves de las moderadas, observamos una distribución similar de los casos graves y los leves, siendo las graves más frecuentes en nuestra serie con respecto al registro nacional de Aznar et al. Con respecto al estudio de Widynga et al. 2009, el porcentaje de casos graves es inferior, aunque en dicho estudio podría existir un infradiagnóstico de las formas menos graves<sup>(111)</sup>. Las discrepancias pueden ser debidas al hecho de que las formas menos graves de Hemofilia pueden estar infradiagnosticadas en muchos casos por la clínica leve de sangrado que pueden presentar y la falta de antecedentes familiares claros<sup>(111,115)</sup>.

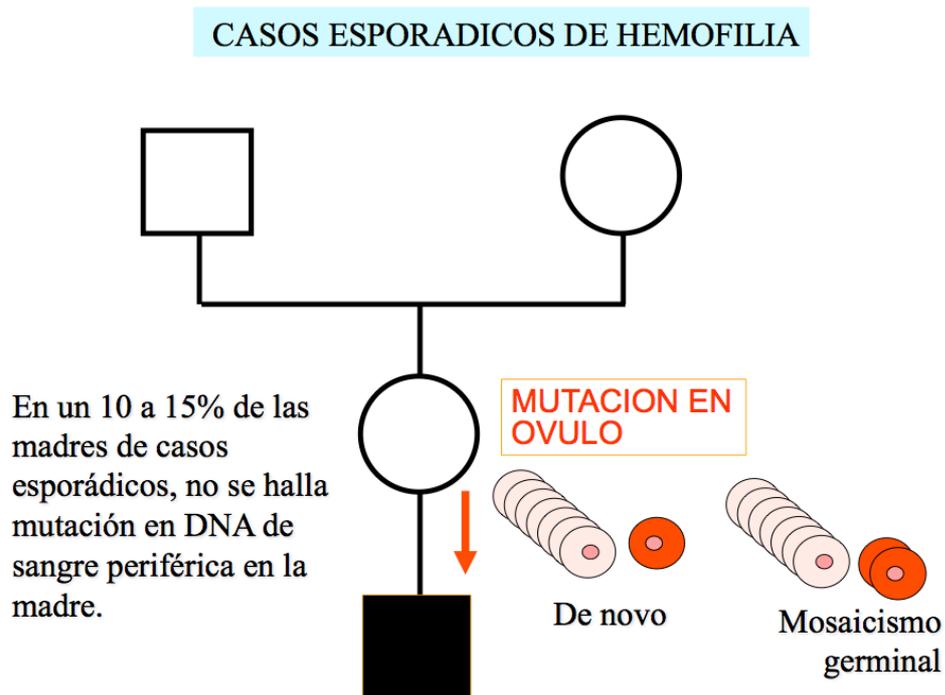
En nuestra serie hemos encontrado un 49% de familias sin antecedentes de enfermedad (similar a la serie de Windyga et al. 2006, Aznar et al. 2009 y Kasper et al. 2007) en las que encontramos una mayor prevalencia de portadoras únicas frente a los casos en los que sí había antecedentes familiares<sup>(111,115,117)</sup>. Es decir, la mayoría de estos casos presenta la relación: familias sin antecedentes, portadora única y HAG. En las familias con casos esporádicos se suele solicitar con más frecuencia el consejo genético por la duda que se le presenta a la posible portadora, mientras que en familias con varios casos de afectados, la madre tiene asumido que es portadora y no solicita el consejo genético<sup>(117,118)</sup>. Las familias con varias portadoras están repartidas de forma similar entre los distintos tipos de HA.

En el estudio de Kasper et al. 2007<sup>(117)</sup> se estima que el porcentaje de familias con casos esporádicos en HAG es del 25% aproximadamente, mientras que en nuestra serie es discretamente más alto, llegando al 28%, discretamente más alto. Sin embargo, en nuestro estudio hallamos un 8,5% de familias con casos esporádicos en HAL, sensiblemente más bajo que lo estimado por el estudio de Kasper et al. 2007<sup>(117)</sup>. En

## Discusión

estos casos, la mutación causante de la Hemofilia se puede originar recientemente pudiendo ser una mutación nueva (de novo), generada en el individuo afecto, sin que la madre sea portadora, pero esta situación es bastante infrecuente y se requieren estudios detallados para probar esta circunstancia. Cuando se da una verdadera mutación de novo en el hijo (mosaicismo somático) los futuros hermanos no serán hemofílicos. En la mayoría de los casos, la madre es portadora, ya que las mutaciones en Hemofilia se generan predominantemente en los gametos masculinos, lo que supone que la mutación pudo haberse generado en los gametos del abuelo materno (aunque no sea hemofílico) y la madre lo ha heredado. Otra opción es que el cambio se hubiera generado en los gametos de la madre de forma que uno o varios óvulos sean portadores de la mutación (mosaicismo germinal). En esta situación podría tener el riesgo de transmitirlo en más de una ocasión, aunque en estos casos, resulta prácticamente imposible determinar el riesgo. Por estas dificultades, se aplica un criterio conservador en el asesoramiento y se maneja en la práctica como si la madre fuera portadora con el riesgo de transmitir el gen defectuoso en el 50% de sus embarazos<sup>(117,119)</sup>.

Dentro de las familias sin antecedentes familiares encontramos 4 familias (17,4%) en las que no hallamos la alteración genética en las madres. En las serie internacionales se estima que en un 10-15% de los casos de familias con casos esporádicos nos encontramos ante esta situación<sup>(117)</sup>. En estos casos se podría concluir que se tratan de mutaciones de novo en el óvulo materno o de mosaicismo germinal en varios óvulos maternos, aunque no se puede asegurar que el riesgo de volver a tener otro afectado se ha descartado<sup>(119)</sup>. Ante un caso esporádico puede ser imposible detectar si la nueva mutación ocurrió en el embrión, en la línea germinal de la madre, en la línea germinal del abuelo materno, en las células embrionarias de fases muy precoces del desarrollo embrionario de su madre o del abuelo materno. Nos obstante, lo más probable es que se haya originado en la línea germinal del abuelo materno, durante las meiosis que se producen en la espermatogénesis, donde existe un mayor número de replicaciones y es más posibles la aparición de alteraciones en el DNA<sup>(63,119)</sup> (Figura 35).



**Figura 35.** Descripción del posible origen de un caso de esporádico en Hemofilia.

El estudio de la distribución de las portadoras en las diferentes familias de pacientes con Hemofilia B nos reveló la existencia de un predominio de familias con varias portadoras, pero todos los casos de portadoras únicas se asociaban a HBG y sin antecedentes familiares. En una de estas familias no se consiguió detectar la mutación en el gen F9 en la madre portadora, cabiendo la posibilidad de mosaicismo germinal o mutación de novo. Como en HA, existen casos de mosaicismo germinal y de mutaciones de novo, siendo importante confirmar el estado de portador incluso en aquellos casos en los que se asume que la portadora es obligada. Esto puede tener importantes implicaciones en el momento del consejo genético pues puede darse el caso de que el origen de la mutación se de en el abuelo materno y que se manifestara en él de forma leve, pero en el nieto puede manifestarse como forma grave<sup>(120,121)</sup>.

En las 102 portadoras confirmadas hemos encontrado un predominio discreto de las portadoras posibles con respecto a las obligadas (52,9% y 47% respectivamente). La

## Discusión

distribución familiar de ambos tipos es similar. La distribución de las portadoras obligadas está repartida equilibradamente entre todos los tipos de Hemofilia estudiados. La distribución de las portadoras posibles está repartida también de forma similar entre todos los tipos de Hemofilia y gravedad.

Dado el predominio de portadoras en edad fértil, sería relevante hacer hincapié en la importancia de la realización de diagnóstico de portadoras posibles en estas edades para realizar un consejo genético eficaz y eficiente. Dada la heterogeneidad mutacional, el diagnóstico de portadoras y prenatal no se puede basar en un limitado número de mutaciones, precisando estudios comparativos de diferentes frecuencias de mutaciones en diferentes poblaciones, siendo muy importante el registro de las distintas mutaciones estudiadas<sup>(100)</sup>.

El primer paso de este sistema consistiría en identificar a las portadoras mediante un adecuado estudio familiar y genético y hacer una base datos con los datos familiares obtenidos. De esta forma se podría dar mayor información sobre opciones reproductivas (identificación de sexo fetal precoz, selección de embriones, diagnóstico prenatal) y de riesgo de desarrollo de inhibidores en función de la alteración genética que produce la enfermedad. Las mutaciones como grandes deleciones, mutaciones sin sentido o inversión del intrón 22 que implican defectos importantes de la proteína se asocian con mayor riesgo. En nuestra serie registramos las distintas mutaciones que se asocian con riesgo aumentado para el desarrollo de inhibidor, que se describen con más detalle más adelante<sup>(100,121,122)</sup>.

Por otra parte, es importante detectar a las portadoras para poder evaluar y manejar de una forma correcta el posible riesgo hemorrágico que puedan presentar ante procedimientos invasivos, extracciones dentales, intervenciones quirúrgicas y el parto. En muchas ocasiones, no se tiene en cuenta que estas pacientes pueden presentar complicaciones hemorrágicas en tales circunstancias y que por lo tanto, requieren una preparación hemostática adecuada. Por esta razón es importante ofrecer a las posibles portadoras una información adecuada sobre los estudios genéticos y un estudio de nivel de factor VIII/IX en plasma para conocer la tendencia hemorrágica. La intensidad de los síntomas hemorrágicos en portadoras de Hemofilia A están altamente relacionados a la gravedad del afectado en la familia y a la mutación causante de la

## Discusión

enfermedad, es decir, portadoras de mutaciones asociadas a fenotipos graves de enfermedad como inversión del intrón 22, mutaciones sin sentido o grandes deleciones tendrían más riesgo de sangrado que aquellas portadoras de mutaciones missense que se asocian a formas moderadas-leves<sup>(101,123)</sup>.

En el caso de Hemofilia B, sin embargo, los niveles de factor en portadoras son independientes de la gravedad dentro de la familia y pueden variar entre miembros de la familia y no existen suficientes estudios de correlación como ocurre con Hemofilia A<sup>(101,123,124)</sup>. En nuestra serie, aunque no realizamos de forma sistemática una medición del nivel de factor en plasma de las portadoras halladas, encontramos la familia número 30 con HAG donde la portadora es portadora de la inversión del intrón 22 y niveles de FVIII entre el 33-40%, habiendo precisado la administración de DDAVP como preparación de varias intervenciones quirúrgicas por sangrados anteriores procesos invasivos , y de concentrado de FVIII recombinante en una mastectomía por adenocarcinoma de mama por antecedentes de sangrado. En la familia 26, con HAG encontramos otra portadora obligada de la mutación (p.Pro2153Leu) y un nivel basal de FVIII de 60% que presentó una hemorragia postparto importante que requirió administración de hemoderivados y posterior histerectomía.

### 3. MUTACIONES ENCONTRADAS

Las mutaciones en el gen F8 descritas en la Hemofilia A pueden ocurrir en diversos sitios de dicho gen y pueden ser estructurales (inversiones) o de variación de la secuencia (inserciones, deleciones y mutaciones puntuales). Dentro de las mutaciones puntuales podemos encontrar mutaciones sin sentido (o nonsense), missense y frameshift. Más de 1200 tipos de mutaciones del gen F8 están descritas en el registro The Haemophilia A Mutation Database and FVIII Resource Site (HAMSTeRS/HADB)<sup>(33)</sup>.

Dentro de las diferentes mutaciones existentes, tal vez la más interesante por su frecuencia es la inversión del intrón 22, cuya incidencia es de aproximadamente 40-50% en HAG, sin diferencia étnica significativa<sup>(21)</sup>. Las mutaciones más frecuentemente encontradas en la población estudiada por nosotros han sido las de tipo missense (59%), seguidas por la inversión del intrón 22 en el gen F8 (19%). Si consideramos sólo los casos con HAG, entonces la frecuencia de la inversión del intrón 22 asciende al 39,1%. De la misma forma, predominan las familias con mutaciones de tipo missense, seguidas por las que presentan la inversión del intrón 22 en el gen F8. Dicha distribución es similar a la publicada en diversos estudios internacionales<sup>(100,115,122)</sup>.

Las pequeñas deleciones o inserciones suelen traducirse en cambios en el marco de lectura que frecuentemente se originan en la meiosis de los óvulos. Por otro lado, las mutaciones puntuales suelen originarse en la meiosis de los espermatozoides<sup>(125)</sup>, como ocurre también con la inversión del intrón 22<sup>(70)</sup>. En nuestra serie encontramos que los casos esporádicos predominan en las familias portadoras de inversión del intrón 22 y mutaciones puntuales (56% y 41% respectivamente) y en las que la mutación pudo originarse durante la espermatogénesis del abuelo materno<sup>(63)</sup>.

Hay que destacar que si bien la incidencia de aparición de inhibidores está en torno a al 30% (en los casos de HAG)<sup>(126)</sup>, en nuestra serie hemos detectado sólo esta complicación en el 11%, similar a la incidencia reportada por Aznar et al. 2009<sup>(115)</sup>, que era del 10% en las formas graves de Hemofilia A, mientras que en el registro británico consultado en el año 2012 existe una incidencia en torno al 20%, aunque los datos publicados por Rizza et al. en 2001 del registro británico eran de 12%<sup>(127)</sup>. Los datos publicados por Windyga et al. en 2006<sup>111</sup> presentan una incidencia del 13.5%, datos siempre referidos a formas graves de HA. En el registro italiano se muestra una

## Discusión

incidencia del 19%<sup>(128)</sup>. La diversidad de resultados puede estar debida a que la mayoría de los estudios son retrospectivos, la heterogeneidad de la población estudiada en cuanto a número de pacientes y diferencias en las modalidades de tratamiento como proporción de pacientes en profilaxis versus tratamiento a demanda o la frecuencia de tratamientos intensivos con concentrado de factor en edades tempranas, aspectos claramente relacionados con el riesgo de aparición de inhibidor<sup>(129)</sup>. En nuestro caso, posiblemente, el menor número de pacientes estudiado pueda influir en la baja incidencia registrada si se compara con otras grandes series internacionales, así como el hecho de que el 100% de la población infantil con Hemofilia grave, en nuestra serie, está en programa de profilaxis con administraciones regulares de concentrado de factor.

El riesgo de aparición de inhibidor en relación al tratamiento está claramente relacionada con el tipo de mutación, siendo el principal factor de riesgo en Hemofilia A, mientras que en Hemofilia B no se ha determinado con claridad la influencia del tipo de mutación a la hora de desarrollar el inhibidor. Pacientes con grandes deleciones, mutaciones sin sentido tienen más riesgo de desarrollar inhibidores que las inversiones del intrón 22, mientras que el riesgo para la inversión del intrón 1 y las mutaciones de splicing es similar. El riesgo en el caso de mutaciones missense y de pequeñas deleciones/inserciones es más bajo<sup>(35,99)</sup>. En cuanto a la incidencia de aparición de inhibidor entre los diferentes tipos de mutaciones, nuestros resultados coinciden con las grandes series publicadas, existiendo una mayor tasa en el caso de las grandes deleciones y mutaciones sin sentido (50%) y una menor tasa en el caso de las mutaciones missense<sup>(99,130,131)</sup>.

En nuestra serie predominan las mutaciones puntuales de tipo missense, en las que no obstante, se registró el antecedente de dos casos de inhibidor transitorios, estando descrito en distintas publicaciones casos de aparición de inhibidor asociados a este tipo de mutaciones cuando afectan sobre todo a los dominios A3, C1 o C2 del factor VIII<sup>(99,130,131)</sup>. Dentro de estos tipos de mutaciones, destacan la p.Arg593Cys, p.Tyr2105Cys, p.Arg2150His, p.Trp229Cys y p.Pro2300Leu. En nuestra serie tenemos el caso de una familia portadora de la mutación Arg593Cys, con fenotipo leve y que sin embargo no ha desarrollado un inhibidor, posiblemente por la baja exposición a

## Discusión

concentrado de factor y la ausencia de requerimientos invasivos y quirúrgicos. No obstante, estos hallazgos nos permitirían planificar futuras intervenciones en vistas de reducir el riesgo de aparición de esta complicación. El resto de los casos de inhibidores se asociaron a mutaciones de alto riesgo como inversión del intrón 22, grandes deleciones y mutaciones de tipo sin sentido; tratándose en todos los casos de HAG. Todos estos datos nos lleva a aseverar la importancia de un adecuado diagnóstico molecular que nos permita predecir el riesgo de aparición de inhibidor como complicación relacionada con el tratamiento<sup>(99,131)</sup>.

Está descrito cómo algunos tipos de mutaciones missense tiene una influencia marcada a al hora de la respuesta a desmopresina en los casos de hemofilia A moderada-leve. Existen mutaciones con mala respuesta a desmopresina y es conveniente tenerlas etiquetadas para adecuar el tratamiento en estos pacientes y establecer el grado de respuesta a desmopresina. En nuestra serie no encontramos ninguna de las mutaciones descritas en el grupo de malos respondedores a desmopresina. Por otra parte, existen otras que responden bien a la desmopresina y que como la p.Arg593Cys, tienen riesgo de desarrollar inhibidor, pero que responde bien al tratamiento con desmopresina, siendo ésta una alternativa en estos pacientes para evitar el desarrollo de inhibidor al no tener que administrar FVIII exógeno<sup>(132)</sup>.

En Hemofilia B, se han descrito mas de 1000 mutaciones en el gen F9 HAGta el momento en la Haemophilia B Mutation Database<sup>58</sup>. En dicha base de datos, los tipos más frecuentes corresponden a las mutaciones missense/sin sentido (aproximadamente el 64% de todas las mutaciones), seguidas por las de tipo frameshift (aproximadamente 17%). A diferencia de la HA, no se han descrito inversiones en HB.

En el caso de Hemofilia B, aunque están descritas diferentes mutaciones asociadas al riesgo de desarrollar inhibidor como mutaciones sin sentido (p.Trp194Stop, p.Arg248Stop y p.Arg252Stop) y grandes deleciones, en nuestra serie no detectamos ninguna de las mutaciones descritas<sup>(131)</sup>.

Por otra parte, el hecho de conocer en la población con HA el riesgo de desarrollar inhibidor en virtud del tipo de mutación nos permitiría establecer una estratificación del pronóstico de respuesta al tratamiento erradicador del inhibidor mediante inmunotolerancia y el tipo de régimen a emplear. En el caso de mutaciones de

## Discusión

alto riesgo de desarrollar inhibidor la tasa de respuesta será mucho menor que en el caso de mutaciones con bajo riesgo de desarrollo de inhibidor<sup>(133)</sup>.

La inversión del intrón 22, inversión del intrón 1, deleciones y mutaciones sin sentido producen una ausencia del producto del gen y se expresan como formas graves. En nuestra serie aparecen exclusivamente en los casos con HAG. En HBG no hemos encontrado deleciones ni mutaciones sin sentido, posiblemente por el hecho de la pequeña población con HB estudiada. No obstante, en diferentes estudios se muestra la aparición de grandes deleciones, mutaciones sin sentido en HBG, aunque en una menor proporción que en HAG. La incidencia de estas alteraciones encontradas en nuestros pacientes coinciden con las descritas en las diferente publicaciones, constituyendo una forma de diagnóstico en casos dudosos de dicho tipo de Hemofilia<sup>(13,130)</sup>.

Las mutaciones de tipo missense son más frecuentes en HAL y HAM y en HBG. Dicha distribución está también descrita en diversas publicaciones, suponiendo la mayoría de las formas no graves de Hemofilia A. En Hemofilia B, sin embargo son también las predominantes en las formas graves, coincidiendo nuestros resultados con los descritos en la Haemophilia B Mutation Database y en diversos estudios<sup>(58,131,134,135)</sup>.

No es un hecho especialmente novedoso hallar mutaciones no descritas (sobre todo en el gen F8) en el registro HADB. Existen varias publicaciones sobre registros de diferentes países que así lo describen<sup>(100,122,136,137)</sup>, indicando la gran capacidad mutacional del gen F8. La importancia de su descripción radica en detectar aquellas nuevas mutaciones que son capaces de desarrollar casos de inhibidor. Hemos encontrado 11 mutaciones no descritas en la registro internacional The Haemophilia A Mutation Database and FVIII Resource Site (HAMSTeRS/HADB)<sup>(33)</sup>, todas ellas afectando a HA y la mayoría en HAG. Las más frecuentes son las de tipo missense, como ocurre en diferentes registros de mutaciones nuevas, y los exones del gen F8 más frecuentemente afectados fueron el 3 y 23. Un aspecto importante ha sido el hallazgo de dos casos de aparición de inhibidor en dos mutaciones puntuales de tipo missense (p.Trp585Cys y p.Pro2153Leu). Existen varias publicaciones (incluida la base de datos The Haemophilia A Mutation Database and FVIII Resource Site (HAMSTeRS/HADB)<sup>(33)</sup> donde se describen casos de mutaciones que han desarrollado inhibidor, incluidas mutaciones de bajo riesgo

## Discusión

a desarrollarlos como las de tipo missense, por lo que cobra especial importancia el estudio del estado mutacional de nuestros pacientes, incluidas las formas leves, para determinar correctamente el riesgo de desarrollo de inhibidores<sup>(26,100,115,121)</sup>.

Respecto a las mutaciones recurrentes encontradas, como se mencionó anteriormente, la más frecuente es la inversión del intrón 22 del gen F8, como está descrito en los diferentes registros y publicaciones<sup>(35)</sup>. Encontramos otras 4 mutaciones recurrentes, todas ellas de tipo missense. Todas estas mutaciones se encontraron dentro del grupo de HA. Existen otros casos descritos en diversas publicaciones de mutaciones repetidas en familias en principio no relacionadas, siendo más frecuentes las mutaciones puntuales, existiendo la posibilidad de compartir el mismo haplotipo y un antecesor común<sup>(138)</sup>.

#### 4. DESCRIPCIÓN FAMILIAR DE CADA GRUPO DE MUTACIÓN

La inversión del intrón 22 se encontró de forma exclusiva en las familias con HAG. En la población estudiada hay tres familias donde existe antecedentes de aparición de inhibidor de alta respuesta. Estos datos se corresponden con los publicados en cuanto a la frecuencia y riesgo de aparición de inhibidores<sup>(99)</sup>. En más de la mitad de las familias no hemos hallado antecedentes de enfermedad, detectándose en todos los casos de portadora la alteración genética, lo que puede implicar la presencia de mutaciones nuevas en dicha portadora. La mayoría de las portadoras se encuentran en el grupo de edades de 16 a 45 años, existiendo una distribución similar de portadores obligadas y posibles, indicando la importancia del seguimiento y detección de las mismas para un futuro consejo genético.

En el caso de la inversión del intrón 1, aunque varios estudios han establecido su prevalencia sobre el 1-5%, sigue permaneciendo controvertida, presentando un riesgo de desarrollo de inhibidor similar al de la inversión del intrón 22<sup>(139,140)</sup>. En nuestra población sólo hallamos una familia (con HAG), que es de origen marroquí y con antecedentes de casos de Hemofilia en la familia y sin desarrollo de inhibidor. No ha habido otros casos con esta mutación, posiblemente por la pequeña población estudiada, aunque podría influir el hecho de que el único caso de este tipo de mutación se haya dado en una familia de origen extranjero con diferente origen racial.

En nuestra serie se detectaron dos familias con grandes deleciones, pero en una de ellas no existían antecedentes y no se pudo encontrar la mutación causante de la enfermedad en el análisis de sangre periférica, indicando posibilidad de mosaicismo germinal. En estas familias, dado el alto riesgo de desarrollo de inhibidor y su asociación con formas graves de la enfermedad, es preciso tenerlas identificadas a las posibles portadoras para un correcto consejo genético. La frecuencia encontrada en nuestra serie es similar a los datos ya publicados en diversos trabajos y del registro The Haemophilia A Mutation Database and FVIII Resource Site (HAMSTeRS/HADB)<sup>(33,35,100,115,122)</sup>.

El conjunto de mutaciones puntuales (mutaciones missense y sin sentido) constituye el grupo más numeroso en nuestra serie, como ocurre en diferentes registros, estando repartidas por todos los tipos y gravedad de Hemofilia; predominando los casos

## Discusión

con antecedentes familiares (16 con antecedentes versus 12 sin ellos)<sup>(99,131)</sup>. Las mutaciones sin sentido aparecen en los casos graves y se asociaron a la aparición de un caso de inhibidor, correspondiéndose con el alto riesgo a desarrollar esta complicación<sup>(35,115,141)</sup>.

En este grupo también se encontraron casos sin antecedentes, en dos madres portadoras no se encontró la alteración genética existiendo la posibilidad de mosaicismo germinal en ellas.

En el caso de las familias con mutaciones de splicing, los casos esporádicos son las más frecuentes, predominando las portadoras en el grupo de edades de 16 a 45 años. Este hecho y el riesgo de desarrollo de inhibidores nos lleva a tener delimitada esta alteración en nuestra serie a fin de conseguir aportar el adecuado consejo genético y manejo terapéutico en los pacientes portadores de esta mutación<sup>(99)</sup>. En una familia sin antecedentes no se consigue hallar la alteración genética en la madre del afectado, existiendo la posibilidad de mosaicismo germinal. Aunque este tipo de mutación está descrito en ambos tipos de Hemofilia, en nuestra serie predomina en el caso de Hemofilia B, coincidiendo con este hecho con lo descrito en varios registros<sup>(58,141)</sup>.

Hemos encontrado sólo una familia portadora de una duplicación en el gen F8 , con un afectado y una portadora posible y aunque no presentaba antecedentes de Hemofilia, se ha podido hallar la alteración en la portadora. Las mutaciones que cursan con una duplicación constituyen el grupo menos frecuentes dentro de las mutaciones causantes de Hemofilia, apareciendo más frecuentemente en las formas graves de Hemofilia A, aunque están descritos casos en formas leves y moderadas como en nuestra serie<sup>(33)</sup>.

**F** >>> **Conclusiones**

## Conclusiones

1. En la población estudiada, las mutaciones más frecuentes son las de tipo missense, seguidas de la inversión del intrón 22. En la Hemofilia A grave, la inversión del intrón 22 es la mutación más frecuente, mientras que en el resto de los tipos de Hemofilia A y en la Hemofilia B son las de tipo missense.

2. Hemos descubierto 11 mutaciones no descritas en las bases de datos internacionales, todas en pacientes con Hemofilia A y con un claro predominio de tipo missense.

3. La proporción de familias con casos esporádicos es del 52%, siendo más frecuentes en las familias con HAG. En el 82.6% de estas familias se ha podido detectar la alteración molecular en las madres y confirmar así el estado de portadora.

4. El grupo de edad con mayor número de portadoras es el comprendido entre los 16 y 45 años.

5. El algoritmo de estudio diseñado para este estudio ha sido efectivo el análisis molecular en los 73 pacientes estudiados, permitiendo determinar la patología molecular en todos ellos y el diagnóstico de 102 portadoras.

6. La incidencia de inhibidor contra el FVIII en nuestra serie fue del 11%, siendo más frecuente en los pacientes con inversión del intrón 22. No se ha encontrado ningún caso de antecedentes de inhibidor en los afectados de con HAM o HAL.



# Bibliografía

## Bibliografia

1. Kessler CM, Mariani G. Clinical manifestations and therapy of the hemophilias. In: Collman RW, Marder VJ, Clowes AW, George JN, Goldhaber SZ, editors. Hemostasis and Thrombosis: Basic principles and clinical practice. 5<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006. p. 887-904.

2. Strauss HS. The perpetuation of hemophilia by mutation. *Pediatrics*. 1967 Feb; 39(2):186–93.

3. Vogel F. A probable sex difference in some mutation rates. *Am. J. Hum. Genet.* 1977 May;29(3):312–9.

4. Mannucci PM, Tuddenham EG. The hemophilias: from royal genes to gene therapy. *N Engl J Med*. 2001 Jun;344(23):1773–9.

5. Choo KH, Gould KG, Rees DJ, Brownlee GG. Molecular cloning of the gene for human anti-haemophilic factor IX. *Nature*. 1982 Sep;299(5879):178–80.

6. Gitschier J, Wood WI, Goralka TM, Wion KL, Chen EY, Eaton DH, et al. Characterization of the human factor VIII gene. *Nature*. 1984 Nov;312(5992):326–30.

7. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. 1985 Dec;230(4732):1350–4.

## **Bibliografia**

8. White GC2, Rosendaal F, Aledort LM, Lusher JM, Rothschild C, Ingerslev J. Definitions in hemophilia. Recommendation of the scientific subcommittee on factor VIII and factor IX of the scientific and standardization committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *Thromb Haemost.* 2001 Mar;85(3):560-75.
9. Furie B, Furie BC. Mechanisms of thrombus formation. *N Engl J Med.* 2008 Aug; 359(9):938–49.
10. Shen BW, Spiegel PC, Chang C-H, Huh J-W, Lee J-S, Kim J, et al. The tertiary structure and domain organization of coagulation factor VIII. *Blood.* 2008 Feb;111(3): 1240–7.
11. Acharya SS. Exploration of the pathogenesis of haemophilic joint arthropathy: understanding implications for optimal clinical management. *British Journal of Haematology.* 2012 Jan;156(1):13–23.
12. Raffini L, Manno C. Modern management of haemophilic arthropathy. *British Journal of Haematology.* 2007 Mar;136(6):777–87.
13. Oldenburg J, Schröder J, Brackmann H, Müller-Reible C, Schwaab R, Tuddenham E. Environmental and Genetic Factors Influencing Inhibitor Development. *Seminars in Hematology.* 2004 Mar;41(Supp. 1):82–8.
14. Coppola A, Cerbone AM, Mancuso G, Mansueto MF, Mazzini C, Zanon E. Confronting the psychological burden of haemophilia. *Haemophilia.* 2011 Jan;17(1):21–7.

## **Bibliografia**

15. Verbruggen B, Meijer P, Novakova I, Van Heerde W. Diagnosis of factor VIII deficiency. *Haemophilia*. 2008 Jul;14 Suppl 3(Suppl. 3):76–82.
16. Fay PJ, Jenkins PV. Mutating factor VIII: lessons from structure to function. *Blood Reviews*. 2005 Jan;19(1):15–27.
17. Poustka A, Dietrich A, Langenstein G, Toniolo D, Warren ST, Lehrach H. Physical map of human Xq27-qter: localizing the region of the fragile X mutation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991 Oct;88(19):8302–6.
18. Toole JJ, Knopf JL, Wozney JM, Sultzman LA, Buecker JL, Pittman DD, et al. Molecular cloning of a cDNA encoding human antihemophilic factor. *Nature*. 1984 Nov;312(5992):342–7.
19. Wood WI, Capon DJ, Simonsen CC, Eaton DL, Gitschier J, Keyt B, et al. Expression of active human factor VIII from recombinant DNA clones. *Nature*. 1984 Nov;312(5992):330–7.
20. Levinson B, Kenwick S, Gamel P, Fisher K, Gitschier J. Evidence for a third transcript from the human factor VIII gene. *Genomics*. 1992 Nov;14(3):585–9.
21. Bowen DJ. Hemophilia A and hemophilia B: molecular insights. *Mol Pathol*. 2002 Apr;55(2):127–44.
22. Shetty S, Bhave M, Ghosh K. Challenges of multiple mutations in individual patients with hemophilia. *Eur J Haematol*. 2011 Mar;86(3):185–90.

## Bibliografia

23. Levinson B, Kenwrick S, Lakich D, Hammonds GJ, Gitschier J. A transcribed gene in an intron of the human factor VIII gene. *Genomics*. 1990 May;7(1):1–11.
24. Lakich D, Kazazian HHJ, Antonarakis SE, Gitschier J. Inversions disrupting the factor VIII gene are a common cause of severe haemophilia A. *Nat Genet*. 1993 Nov;5(3):236–41.
25. Lenting PJ, Donath MJ, van Mourik JA, Mertens K. Identification of a binding site for blood coagulation factor IXa on the light chain of human factor VIII. *J Biol Chem*. 1994 Mar;269(10):7150–5.
26. Vencesla A, Corral-Rodriguez MA, Baena M, Cornet M, Domenech M, Baiget M, et al. Identification of 31 novel mutations in the F8 gene in Spanish hemophilia A patients: structural analysis of 20 missense mutations suggests new intermolecular binding sites. *Blood*. 2008 Apr;111(7):3468–78.
27. Wion KL, Kelly D, Summerfield JA, Tuddenham EG, Lawn RM. Distribution of factor VIII mRNA and antigen in human liver and other tissues. *Nature*. 1985 Oct;317(6039):726–9.
28. Hollestelle MJ, Thinnes T, Crain K, Stiko A, Kruijt JK, van Berkel TJ, et al. Tissue distribution of factor VIII gene expression in vivo--a closer look. *Thromb Haemost*. 2001 Sep;86(3):855–61.
29. Bontempo FA, Lewis JH, Gorenc TJ, Spero JA, Ragni MV, Scott JP, et al. Liver transplantation in hemophilia A. *Blood*. 1987 Jun;69(6):1721–4.

## Bibliografía

30. Lewis JH, Bontempo FA, Spero JA, Ragni MV, Starzl TE. Liver transplantation in a hemophiliac. *N Engl J Med*. 1985 May;312(18):1189–90.
31. Figueiredo MS, Brownlee GG. cis-acting elements and transcription factors involved in the promoter activity of the human factor VIII gene. *J Biol Chem*. 1995 May; 270(20):11828–38.
32. Kemball-Cook G. and Gomez K. Molecular basis of hemophilia A. In: Lee CA, Berntop EE, Hoots WK, editors. *Textbook of Hemophilia*. 2<sup>nd</sup> ed. Wiley-Blackwell; 2010. 24-32.
33. The Haemophilia A Mutation Database and FVIII Resource Site (HAMSTeRS/HADB)[[www.hadb.org.uk](http://www.hadb.org.uk)] (Última consulta en enero de 2012)
34. Kemball-Cook G, Tuddenham EG, Wacey AI. The factor VIII Structure and Mutation Resource Site: HAMSTeRS version 4. *Nucleic Acids Res*. 1998 Jan;26(1):216–9.
35. Bogdanova N, Markoff A, Pollmann H, Nowak-Gottl U, Eisert R, Wermes C, et al. Spectrum of molecular defects and mutation detection rate in patients with severe hemophilia A. *Hum Mutat*. 2005 Sep;26(3):249–54.
36. Naylor JA, Green PM, Rizza CR, Giannelli F. Analysis of factor VIII mRNA reveals defects in everyone of 28 haemophilia A patients. *Hum Mol Genet*. 1993 Jan;2(1):11–7.
37. Rossiter JP, Young M, Kimberland ML, Hutter P, Ketterling RP, Gitschier J, et al. Factor VIII gene inversions causing severe hemophilia A originate almost exclusively in male germ cells. *Hum Mol Genet*. 1994 Jul;3(7):1035–9.

## Bibliografia

38. Antonarakis SE, Rossiter JP, Young M, Horst J, de Moerloose P, Sommer SS, et al. Factor VIII gene inversions in severe hemophilia A: results of an international consortium study. *Blood*. 1995 Sep;86(6):2206–12.
39. Liu Q, Nozari G, Sommer SS. Single-tube polymerase chain reaction for rapid diagnosis of the inversion hotspot of mutation in hemophilia A. *Blood*. 1998 Aug;92(4):1458–9.
40. Rossetti LC, Radic CP, Larripa IB, De Brasi CD. Genotyping the hemophilia inversion hotspot by use of inverse PCR. *Clin Chem*. 2005 Jul;51(7):1154–8.
41. Bagnall RD, Waseem N, Green PM, Giannelli F. Recurrent inversion breaking intron 1 of the factor VIII gene is a frequent cause of severe hemophilia A. *Blood*. 2002 Jan;99(1):168–74.
42. Kaufman RJ, Antonorakis SE, Fay PJ . Factor VIII and Hemophilia A. In: Colman RJ, Clowes AW, Goldhaber SZ, Marder VJ, George JN., editors. *Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice*, 5<sup>th</sup> edition. Lippincott Williams and Wilkins; 2006. p. 151-175.
43. Bajaj S.P., Thompson A.R. Molecular and structural biology of factor IX. In: Collman RW, Marder VJ, Clowes AW, George JN, Goldhaber SZ, editors. *Hemostasis and Thrombosis: Basic principles and clinical practice*. 5<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lippincott Willimas & Wilkins; 2006. p. 131-150.

## **Bibliografia**

44. Gomez K. Hemophilia B-molecular basis. Lee C.A., Berntop E.E., Hoots W.K. Editors. Textbook oh Hemophilia. 2<sup>nd</sup> ed. Wiley-Blackwell. 2010. p. 88-93.
45. Chance PF, Dyer KA, Kurachi K, Yoshitake S, Ropers HH, Wieacker P, et al. Regional localization of the human factor IX gene by molecular hybridization. *Hum Genet.* 1983;65(2):207–8.
46. Purrello M, Alhadeff B, Esposito D, Szabo P, Rocchi M, Truett M, et al. The human genes for hemophilia A and hemophilia B flank the X chromosome fragile site at Xq27.3. *EMBO J.* 1985 Mar;4(3):725–9.
47. Anson DS, Choo KH, Rees DJ, Giannelli F, Gould K, Huddleston JA, et al. The gene structure of human anti-haemophilic factor IX. *EMBO J.* 1984 May;3(5):1053–60.
48. Choo KH, Gould KG, Rees DJ, Brownlee GG. Molecular cloning of the gene for human anti-haemophilic factor IX. *Nature.* 1982 Sep;299(5879):178–80.
49. Kurachi K, Davie EW. Isolation and characterization of a cDNA coding for human factor IX. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1982 Nov;79(21):6461–4.
50. Yoshitake S, Schach BG, Foster DC, Davie EW, Kurachi K. Nucleotide sequence of the gene for human factor IX (antihemophilic factor B). *Biochemistry.* 1985 Jul;24(14):3736–50.
51. Roberts HR. Molecular biology of hemophilia B. *Thromb Haemost.* 1993 Jul;70(1):1–9.

## Bibliografía

52. Cheung WF, Hamaguchi N, Smith KJ, Stafford DW. The binding of human factor IX to endothelial cells is mediated by residues 3-11. *J Biol Chem.* 1992 Oct; 267(29):20529–31.

53. Handford PA, Mayhew M, Baron M, Winship PR, Campbell ID, Brownlee GG. Key residues involved in calcium-binding motifs in EGF-like domains. *Nature.* 1991 May; 351(6322):164–7.

54. Smith SB, Gailani D. Update on the physiology and pathology of factor IX activation by factor XIa. *Expert Rev. Hematol.* 2008 Oct;1(1):87–98.

55. Agarwala KL, Kawabata S, Takao T, Murata H, Shimonishi Y, Nishimura H, et al. Activation peptide of human factor IX has oligosaccharides O-glycosidically linked to threonine residues at 159 and 169. *Biochemistry.* 1994 May;33(17):5167–71.

56. Green PM, Naylor JA, Giannelli F. The hemophilias. *Adv Genet.* 1995;32:99–139.

57. Noyes CM, Griffith MJ, Roberts HR, Lundblad RL. Identification of the molecular defect in factor IX Chapel Hill: substitution of histidine for arginine at position 145. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1983 Jul;80(14):4200–2.

58. Haemophilia B Mutation Database (<http://www.kcl.ac.uk/ip/petergreen/hemBdatabase.html>) (Última consulta en enero de 2012)

## **Bibliografia**

59. Stenson PD, Ball E, Howells K, Phillips A, Mort M, Cooper DN. Human Gene Mutation Database: towards a comprehensive central mutation database. *J Med Genet.* 2008 Feb;45(2):124–6.
60. Saunders RE, Perkins SJ. CoagMDB: a database analysis of missense mutations within four conserved domains in five vitamin K-dependent coagulation serine proteases using a text-mining tool. *Hum Mutat.* 2008 Mar;29(3):333–44.
61. Giannelli F, Green PM, Sommer SS, Poon M, Ludwig M, Schwaab R, et al. Haemophilia B: database of point mutations and short additions and deletions-eighth edition. *Nucleic Acids Res.* 1998 Jan;26(1):265–8.
62. Green PM, Saad S, Lewis CM, Giannelli F. Mutation rates in humans. I. Overall and sex-specific rates obtained from a population study of hemophilia B. *Am. J. Hum. Genet.* 1999 Dec;65(6):1572–9.
63. Ljung RC, Sjörin E. Origin of mutation in sporadic cases of haemophilia A. *British Journal of Haematology.* 1999 Sep;106(4):870–4.
64. Wulff K, Bykowska K, Lopaciuk S, Herrmann FH. Molecular analysis of hemophilia B in Poland: 12 novel mutations of the factor IX gene. *Acta Biochim Pol.* 1999;46(3):721–6.
65. Zell R, Fritz HJ. DNA mismatch-repair in *Escherichia coli* counteracting the hydrolytic deamination of 5-methyl-cytosine residues. *EMBO J.* 1987 Jun;6(6):1809–15.

## **Bibliografia**

66. Green PM, Montandon AJ, Bentley DR, et al. The incidence and distribution of CpG-TpG transitions in the factor IX gene. A fresh look at CpG mutational hotspots. *Nucl Acids Res.* 1990 Jul;18(13):4051.

67. Becker J, Schwaab R, Moller-Taube A, Schwaab U, Schmidt W, Brackmann HH, et al. Characterization of the factor VIII defect in 147 patients with sporadic hemophilia A: family studies indicate a mutation type-dependent sex ratio of mutation frequencies. *Am. J. Hum. Genet.* 1996 Apr;58(4):657–70.

68. Reitsma PH, Bertina RM, Ploos Van Amstel JK, Riemens A, Briet E. The putative factor IX gene promoter in hemophilia B Leyden. *Blood.* 1988 Sep;72(3):1074–6.

69. Croosley M, Brownlee GG. Disruption of a C/EBP binding site in the factor IX promoter is associated with hemophilia B. *Nature.* 1990; 345:444-6.

70. Peake IR, Lillicrap DP, Boulyjenkov V, Briet E, Chan V, Ginter EK, et al. Haemophilia: strategies for carrier detection and prenatal diagnosis. *Bull World Health Organ.* 1993;71(3-4):429–58.

71. Lyon MF. Sex chromatin and gene action in the mammalian X-chromosome. *Am. J. Hum. Genet.* 1962 Jun;14:135–48.

72. Kasper CK, Buzin CH. Mosaics and haemophilia. *Haemophilia.* 2009 Nov;15(6): 1181–6.

## Bibliografía

73. Taylor SA, Deugau KV, Lillicrap DP. Somatic mosaicism and female-to-female transmission in a kindred with hemophilia B (factor IX deficiency). *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991 Jan;88(1):39–42.
74. Carriers and women with hemophilia. *WFH*. 2012 May 29; p.1–12.
75. Hwang SH, Kim H J and Kim HS. Profiling of Mutaitons in the F8 and F9, causative genes of hemophilia A and hemophilia B. In: Batorova A. editor. *Hemophilia*. Intechopen. com. 2012. p1-14.
76. Tizzano E., Domènech M., Baiget M. Inversion of the intron 22 in isolated cases of hemophilia A. *Thromb Haemost* 1995 Jan; 73(1):6-9.
77. Tizzano EF, Cornet M, Baiget M. Inversion of intron 1 of the factor VIII gene for direct molecular diagnosis of haemophilia A. *Haematológica* 2003 Jan; 88(1):118-120.
78. Goodeve AC. Advances in carrier detection in haemophilia. *Haemophilia*. 1998 Jul;4(4):358–64.
79. Goodeve, A.C. Laboratory methods for the genetic diagnosis of bleeding disorders. *Clin Lab Haematol*. 1998 Feb; 20(1):3-19.
80. Gallegos RM., Aranda HB., Navarrete CP, Espinoza R., Gomez FS., Aranda DA. Polymorphism distribution of Int13, Int22, and St14 VNTRs in a Mexican population and their application in carrier diagnosis of hemophilia A. *Am J Hematol*. 2004 Sep; 77 (1): 1-6.

## **Bibliografia**

81. Dangerfield BT, Manga P, Field SP, Hartman E, Jenkins T, Krause A. Feasibility of prenatal diagnosis and carrier detection in South African haemophilia A patients. *British Journal of Haematology*. 1997 Jun;97(3):558–60.
82. Yip B, Chan V, Chan TK. Intragenic dinucleotide repeats in factor VIII gene for the diagnosis of haemophilia A. *British Journal of Haematology*. 1994 Dec;88(4):889–91.
83. da Silva Junior WA, Figueiredo MS. Analysis of factor VIII gene polymorphisms in Brazilian blacks reveals further differences in the black population. *Hum Hered*. 1994 Sep;44(5):252–60.
84. Peake IR, Lillicrap DP, Boulyjenkov V, Briet E, Chan V, Ginter EK, et al. Report of a joint WHO/WFH meeting on the control of haemophilia: carrier detection and prenatal diagnosis. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 1993 Apr;4(2):313–44.
85. De Brasi CD, Bowen DJ, Collins PW, Larripa IB. Specific analysis of the intron 22 XbaI polymorphism of the human factor VIII gene using long-distance PCR. *British Journal of Haematology*. 1999 Dec;107(3):566–8.
86. Keeney S, Mitchell M, Goodeve A. The molecular analysis of haemophilia A: a guideline from the UK haemophilia centre doctors' organization haemophilia genetics laboratory network. *Haemophilia*. 2005 Jul;11(4):387–97.
87. Mitchell M, Keeney S, Goodeve A. The molecular analysis of haemophilia B: a guideline from the UK haemophilia centre doctors' organization haemophilia genetics laboratory network. *Haemophilia*. 2005 Jul;11(4):398–404.

## Bibliografia

88. Oldenburg, J., V. Ivaskevicius, S. Rost, A. Fregin, K. White, E. Holinski-Feder, C.R. Muller, and B.H. Weber. Evaluation of DHPLC in the analysis of hemophilia A. *J Biochem Biophys Methods*, 2001 Jan. 47(1-2):39-51.
89. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci* 1977; 74 (12): 5463.
90. Chan K, Sasanakul W, Mellars G, Chuansumrit A, Perry D, Lee CA, Wong MS, Chan TK, Chan V. Detection of known haemophilia B mutations and carrier testing by microarray. *Thromb Haemost.* 2005. Oct; 94(4):872-8
91. Berber E, Leggo J, Brown C, Gallo N, Feilotter H, Lillicrap D. DNA microarray analysis for the detection of mutations in hemophilia A. *J Thromb Haemost.*, 2006, Aug; 4(8):1756-62.
92. David D, Moreira I, Lalloz MRA et al. Analysis of the essential sequences of the factor VIII gene in twelve haemophilia A patients by single-stranded conformation polymorphism. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1994 Apr; 5(2):257-64.
93. Lalloz MR, Schwaab R, Mcvey JH, Michaelides K, Tuddenham EG. Haemophilia A diagnosis by simultaneous analysis of two variable dinucleotide tandem repeats within the factor VIII gene. *British Journal of Haematology.* 1994 Apr;86(4):804-9.
94. Oberle I, Camerino G, Heilig R, Grunebaum L, Cazenave JP, Crapanzano C, et al. Genetic screening for hemophilia A (classic hemophilia) with a polymorphic DNA probe. *N Engl J Med.* 1985 Mar;312(11):682-6.

## Bibliografia

95. Tizzano E., Venceslá A., Cornet M., Baena M. and Baiget M.. Utility of a (GT)<sub>n</sub> dinucleotide repeat in intron 1 of the factor 8 gene for haemophilia A carrier diagnosis. *Haemophilia* 2005 Mar;11(2): 142-4.
96. Venceslá A, Baena M, Fares Taie L, Cornet M, Baiget M, Tizzano EF. Application of intron 9 and intron 25 dinucleotide repeats of the factor VIII gene for carrier diagnosis in haemophilia A. *Haemophilia*. 2008 May;14(3):489–93.
97. Boekhorst J, Verbruggen B, Lavergne JM, Costa J-M, Schoormans SCM, Brons PPT, et al. Thirteen novel mutations in the factor VIII gene in the Nijmegen haemophilia A patient population. *British Journal of Haematology*. 2005 Oct;131(1):109–17.
98. Ay C, Thom K, Abu-Hamdeh F, Horvath B, Quehenberger P, Male C, et al. Determinants of factor VIII plasma levels in carriers of haemophilia A and in control women. *Haemophilia*. 2010 Jan;16(1):111–7.
99. Gouw SC, van den Berg HM, Oldenburg J, Astermark J, de Groot PG, Margaglione M, et al. F8 gene mutation type and inhibitor development in patients with severe hemophilia A: systematic review and meta-analysis. *Blood*. 2012 Mar;119(12): 2922–34.
100. Margaglione M, Castaman G, Morfini M, Rocino A, Santagostino E, Tagariello G, Tagliaferri AR, Zanon E, Biccocchi MP, Castaldo G, Peyvandi F, Santacroce R, Torricelli F, Grandone E, Mannucci PM, and the AICE-Genetics Study Group. The Italian AICE-Genetics hemophilia A database: results and correlation with clinical phenotype. *Haematologica* 2008 May; 93(5):722-728.

## **Bibliografia**

101. Miesbach W, Alesci S, Geisen C, Oldenburg J. Association between phenotype and genotype in carriers of haemophilia A. *Haemophilia*. 2011 Mar;17(2):246–51.

102. Rossetti LC, Radic CP, Abelleiro MM, Larripa IB, De Brasi CD. Eighteen Years of Molecular Genotyping the Hemophilia Inversion Hotspot: From Southern Blot to Inverse Shifting-PCR. *Int. J. Mol. Sci.* 2011;12(10):7271–85.

103. Liu, Q.; Thorland, E.C.; Heit, J.A.; Sommer, S.S. Overlapping PCR for bidirectional PCR amplification of specific alleles: A rapid one-tube method for simultaneously differentiating homozygotes and heterozygotes. *Genome Res.* 1997;7:389–398.

104. Liu, Q.; Sommer, S.S. Subcycling-PCR for multiplex long-distance amplification of regions with high and low GC content: Application to the inversion hotspot in the factor VIII gene. *Biotechniques* 1998;25:1022–1028.

105. Rossetti LC, Radic CP, Larripa IB, De Brasi CD. Developing a new generation of tests for genotyping hemophilia-causative rearrangements involving int22h and int1h hotspots in the factor VIII gene. *J Thromb Haemost.* 2008 May;6(5):830–6.

106. Bagnall RD, Giannelli F, Green PM. Int22h-related inversions causing hemophilia A: a novel insight into their origin and a new more discriminant PCR test for their detection. *J Thromb Haemost.* 2006 Mar;4(3):591–8.

## Bibliografía

107. Instituto nacional de estadística. [www.ine.es](http://www.ine.es). Datos consultados a enero de 2012.
108. Hemofilia: Aspectos organizativos. Comité científico para la seguridad transfusional (CCST). Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Secretaría General de Sanidad y Consumo. Noviembre 2012.
109. Larsson SA, Nilsson IM, Blombäck M. Current status of Swedish hemophiliacs. I. A demographic survey. *Acta Med Scand.* 1982;212(4):195–200.
110. Treatment of Hemophilia A and B and von Willebrand Disease. A systematic review. Swedish Council on Health Technology Assessment. ISBN 978-91-85413-44-7. 2011.
111. Windyga J, Lopaciuk S, Stefanska E, Juszynski A, Wozniak D, Strzelecki O, et al. Haemophilia in Poland. *Haemophilia.* 2006 Jan;12(1):52–7.
112. Weid von der N. Haemophilia registry of the medical committee of the Swiss Haemophilia Society. Update and annual survey 2009. *Hamostaseologie.* 2010 Nov;30 Suppl 1:S15–9.
113. Office fédéral de la statistique. <http://www.bfs.admin.ch/bfs/portal/fr/index.html>. Consultado en Enero de 2010.
114. Bleeding disorders statistics for April 2011 to March 2012. UK National Haemophilia Database of UKHCDO. <http://www.ukhcdo.org/nhd.htm>

## Bibliografía

115. Aznar JA, Lucía F, Abad-Franch L, Jiménez-Yuste V, Pérez R, Batlle J, et al. Haemophilia in Spain. *Haemophilia*. 2009 May;15(3):665–75.
116. Rezende SM, Pinheiro K, Caram C, Genovez G, Barca D. Registry of inherited coagulopathies in Brazil: first report. *Haemophilia*. 2009 Jan;15(1):142–9.
117. Kasper CK, Lin JC. Prevalence of sporadic and familial haemophilia. *Haemophilia*. 2007 Jan;13(1):90–2.
118. Rodríguez-Martorell FJ, Mingot ME, Palomo A, Nuñez R, Pérez-Garrido R, Villar A, et al. Recomendaciones sobre Portadoras en Hemofilia. Comisión Científica de la Real Fundación Victoria Eugenia. ISBN: 978-84-692-9583-0. 2010 Feb;9:1–34.
119. Kasper CK, Buzin C. Mosaics and haemophilia. *Haemophilia*. 2009 Nov;15(6):1181–6.
120. Cutler JA, Mitchell MJ, Smith MP, Savidge GF. Germline mosaicism resulting in the transmission of severe hemophilia B from a grandfather with a mild deficiency. *Am J Med Genet A*. 2004 Aug;129A(1):13–5.
121. Biccocchi MP, Pasino M, Bottini F, Lanza T, Mori PG, Acquila M. Mutation analysis impact on the genetic counseling of sporadic hemophilia B families. *Am J Med Genet A*. 2003 May;118A(4):328–31.
122. Green PM, Bagnall RD, Waseem NH, Giannelli F. Haemophilia A mutations in the UK: results of screening one-third of the population. *British Journal of Haematology*. 2008 Oct;143(1):115–28.

## Bibliografia

123. Plug I, Mauser-Bunschoten EP, Bröcker-Vriends AJT, van Amstel HKP, van der Born JG, van Diemen-Homan JM, et al. Bleeding in carriers of hemophilia. *Blood*. 2006 Jul;108(1):52–6.
124. Peyvandi F, Garagiola I, Menegatti M. Gynecological and obstetrical manifestations of inherited bleeding disorders in women. *J Thromb Haemost*. 2011 Jul; 9(Suppl. 1):236–45.
125. Ljung R, Petrini P, Tengborn L, Sjörin E. Haemophilia B mutations in Sweden: a population-based study of mutational heterogeneity. *British Journal of Haematology*. 2001 Apr;113(1):81–6.
126. Wight J, Paisley S. The epidemiology of inhibitors in haemophilia A: a systematic review. *Haemophilia*. 2003 Jul;9(4):418–35.
127. Rizza CR, Spooner RJ, Giangrande PL. Treatment of haemophilia in the United Kingdom 1981-1996. *Haemophilia*. 2001 Jul;7(4):349–59.
128. Iorio A, Oliovecchio E, Morfini M, Mannucci PM. Italian Registry of Haemophilia and Allied Disorders. Objectives, methodology and data analysis. *Haemophilia*. 2008 May;14(3):444–53.
129. Astermark J, Altisent C, Batorova A, Diniz MJ, Gringeri A, Holme PA, et al. Non-genetic risk factors and the development of inhibitors in haemophilia: a comprehensive review and consensus report. *Haemophilia*. 2010 Sep;16(5):747–66.

## Bibliografia

130. Gouw SC, Van der Bom JG, Van Den Berg HM, Zewald RA, Ploos Van Amstel JK, Mauser-Bunschoten EP. Influence of the type of F8 gene mutation on inhibitor development in a single centre cohort of severe haemophilia A patients. *Haemophilia*. 2011 Mar;17(2):275–81.
131. Oldenburg J, Pavlova A. Genetic risk factors for inhibitors to factors VIII and IX. *Haemophilia*. 2006 Dec;12 (Suppl. 6):15–22.
132. Castaman G, Mancuso ME, Giacomelli SH, Tosetto A, Santagostino E, Mannucci PM, et al. Molecular and phenotypic determinants of the response to desmopressin in adult patients with mild hemophilia A. *J Thromb Haemost*. 2009 Nov; 7(11):1824–31.
133. Coppola A, Margaglione M, Santagostino E, Rocino A, Grandone E, Mannucci PM, et al. Factor VIII gene (F8) mutations as predictors of outcome in immune tolerance induction of hemophilia A patients with high-responding inhibitors. *J Thromb Haemost*. 2009 Nov;7(11):1809–15.
134. Belvini D, Salviato R, Radossi P, Pierobon F, Mori P, Castaldo G, et al. Molecular genotyping of the Italian cohort of patients with hemophilia B. *Haematologica*. 2005 May;90(5):635–42.
135. Giannelli F, Green PM, Sommer SS, Poon M, Ludwig M, Schwaab R, et al. *Haemophilia B: database of point mutations and short additions and deletions--eighth edition*. *Nucleic Acids Res*. 1998 Jan;26(1):265–8.

## **Bibliografia**

136. Santacroce R, Aquila M, Belvini D, Castalo G, Garagiola I, Giacomelli SH, et al. Identification of 217 unreported mutations in the F8 gene in a group of 1,410 unselected Italian patients with hemophilia A. *J Hum Genet.* 2008;53(3):275–84.

137. David D, Ventura C, Moreira I, Diniz MJ, Antunes M, Tavares A, et al. The spectrum of mutations and molecular pathogenesis of hemophilia A in 181 Portuguese patients. *Haematologica.* 2006 Jun;91(6):840–3.

138. Halldén C, Nilsson D, Säll T, Lind-Hallden C, Lidén AC, Ljung R. Origin of Swedish hemophilia A mutations. *J Thromb Haemost.* 2012 Dec;10(12):2503–11.

139. Schröder J, El-Maarri O, Schwaab R, Muller CR, Oldenburg J. Factor VIII intron-1 inversion: frequency and inhibitor prevalence. *J Thromb Haemost.* 2006 May;4(5):1141–3.

140. Salviato R, Belvini D, Radossi P, Tagariello G. Factor VIII gene intron 1 inversion: lower than expected prevalence in Italian haemophiliac severe patients. *Haemophilia.* 2004 Mar;10(2):194–6.

141. Bogdanova N, Markoff A, Eisert R, Wermes C, Pollmann H, Todorova A, et al. Spectrum of molecular defects and mutation detection rate in patients with mild and moderate hemophilia A. *Hum Mutat.* 2007 Jan;28(1):54–60.



## DIFUSIÓN DE TRABAJOS CIENTÍFICOS RELACIONADOS

1. Estudio descriptivo mutacional de pacientes hemofílicos en la Región de Murcia. García-Candel F. Moreno M. Salido E. García A. Majado MJ. Moraleda JM. Morales A. Servicio de Hematología y Hemoterapia. Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca. XLIX Reunión Nacional de la Asociación Española de Hematología y Hemoterapia y XXIII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Trombosis y Hemostasia, Pamplona, 25 al 27 de Octubre de 2007.

2. Molecular analysis of hemophilia A in Murcia, Spain.

García Candel F<sup>1</sup>, Tizzano E<sup>2</sup>, Moreno M<sup>1</sup>, Salido E<sup>1</sup>, Majado M<sup>1</sup>, Moraleda J<sup>1</sup>, Funes C<sup>1</sup> and Morales A<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Haematology, Hospital Virgen de la Arrixaca, Murcia; <sup>2</sup>Genetic, Hospital Sant Pau, Barcelona, Spain. XXII Congress of The International Society on Thrombosis and Haemostasis. July 11-16 2009. Abstract PP-MO-536.

3. Retrospective study of sporadic haemophilia in the region of Murcia, Spain.

García-Candel F<sup>1</sup>, Tizzano E<sup>2</sup>, Majado MJ<sup>1</sup>, Cabañas V<sup>1</sup>, García-Candel A<sup>1</sup>, Moreno M<sup>1</sup> and Moraleda JM<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca, El Palmar (Murcia); <sup>2</sup>Hospital Sant Pau, Barcelona, Spain. XXIV Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. June 29- July 4. 2013. Abstract PO 118.