

## Tesis de Posgrado

# Marcadores genéticos ligados al gen del factor VIII de coagulación : Su utilidad diagnóstica en hemofilia y en el estudio del mecanismo molecular de la recombinación homóloga en meiosis humanas

De Brasi, Carlos Daniel

2001

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

#### Cita tipo APA:

De Brasi, Carlos Daniel. (2001). Marcadores genéticos ligados al gen del factor VIII de coagulación : Su utilidad diagnóstica en hemofilia y en el estudio del mecanismo molecular de la recombinación homóloga en meiosis humanas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_3380\\_DeBrasi.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3380_DeBrasi.pdf)

#### Cita tipo Chicago:

De Brasi, Carlos Daniel. "Marcadores genéticos ligados al gen del factor VIII de coagulación : Su utilidad diagnóstica en hemofilia y en el estudio del mecanismo molecular de la recombinación homóloga en meiosis humanas". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2001.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_3380\\_DeBrasi.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3380_DeBrasi.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

MARCADORES GENETICOS LIGADOS AL GEN DEL FACTOR VIII DE COAGULACION.  
SU UTILIDAD DIAGNOSTICA EN HEMOFILIA A Y EN EL ESTUDIO DEL MECANISMO  
MOLECULAR DE LA RECOMBINACION HOMOLOGA EN MEIOSIS HUMANAS

Carlos Daniel De Brasi

Director: Dra. Irene Beatriz Larripa

Lugar de Trabajo: Instituto de Investigaciones Hematológicas *Mariano R Castex*,  
Academia Nacional de Medicina

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires  
Orientación: Ciencias Biológicas

2001

Nº 3 3 8 0 4

*Dedicado a mi esposa, a mi hijo y a la memoria de mi madre.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero expresar mi agradecimiento a todos los que hicieron posible este trabajo de tesis y en particular a las siguientes personas e instituciones.

A mi esposa la Lic. María de los Angeles Curto, por su ayuda específica, paciencia, compañía y comprensión.

A la Dra. Irene Larripa, por su tiempo, su paciencia, su cercana dirección y el estímulo permanente a las alternativas que fueron surgiendo en el transcurso de este trabajo de investigación.

Al Dr. Derrick Bowen, por su atenta dirección externa y por ser tan generoso con su conocimiento y su tiempo.

Al Acad. Miguel de Tezanos Pinto, por su apoyo y por planear la realización del proyecto de Genética Molecular de la Hemofilia en la Argentina y a la Acad. Christianne Dosne Pasqualini, por su calidez y ayuda permanente.

A las autoridades del Instituto, Dr. Raúl Pérez Bianco, Dra. María Marta Bracco y Dra. María Lazzari, por su respaldo y entusiasmo.

Al Dr. Héctor Targovnik y la Dra. Viviana Varela por su gran ayuda en la fase inicial de este proyecto.

A todos los miembros del Departamento de Genética y de Hemoterapia y Hemofilia del Instituto y en particular a la Dra. Irma Slavutsky por sus consejos permanentes y por enseñarme a ordenar y clarificar la información científica, al Dr. Miguel Candela, por su entusiasmo y el envío de muestras, al Lic. Marcelo de Campos Nebel, por las valiosas discusiones sobre recombinación homóloga, a la Bioq. Isabel Giere, por su ayuda en las fases iniciales, a la Lic. Alejandra Cottliar, Lic. Luciano Vellón, Dra. Estela Pedrazzini, Bioq. Carolina Belli, Dra. Aníela Fundia, Bioq. Marta Palumbo, Bioq. Roxana Cerretini, Dra. Marcela Gonzalez Cid, Lic. Cristian Chena, Bioq. Patricia Gargallo, Bioq. María Teresa Cuello, Dra. Susana Acevedo, Prof. Jorge Austin, Bioq. María Fernanda Noriega y Sra.

Ana Burgos de Gómez, por todo el entusiasmo, ayuda, colaboración y camaradería brindadas.

Al Dr. John Pasi del *Royal Free Hospital* de Londres y el Dr. Peter Collins de la *University of Wales College of Medicine* de Cardiff, Reino Unido, por abrirme las puertas de los Centros de Hemofilia que dirigen y permitir parte de mi formación específica y a la Dra. Carol Kasper del *Orthopaedic Hospital* de Los Angeles, Estados Unidos y la Federación Mundial de la Hemofilia por su contagioso entusiasmo y su interés en mi trabajo.

Al Dr. Alberto Kornblihtt, por su colaboración como consejero de estudios.

Al Dr. Gabriel Stemik, por sus consejos, a la Dra. Susana Fink y a la Dra. Graciela Salanewby, por su desinteresada ayuda y a la Dra. Catalina Kempfer, por su paciencia y generosidad para compartir los equipos de su laboratorio.

A mis amigos del Grupo de la Pecera, Hugo Labate, José Alvarez, Raquel Katovsky, Eduardo Reciulschi, Fabiana Krongold, Diego Katzeff, Ariel Blatman, Daniel Sznycer, Roxana Toriano, Susana Besuschio y Martín Lavrik, por compartir discusiones científicas, meta-científicas y de las otras que siempre resultaron fuente de inspiración para mí.

A todos aquellas personas que me han ayudado de alguna u otra forma para la realización de esta tesis y estoy olvidando incluir en estos agradecimientos.

A los siguientes organismos e instituciones: al Instituto de Investigaciones Hematológicas *Mariano R Castex*, Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires y a la *University of Wales College of Medicine*, Reino Unido de Gran Bretaña, por el apoyo económico y permitir el desarrollo de este trabajo de tesis en sus instalaciones; y a la Fundación *Alberto J Roemmers*, Fundación *Adolfo H. Aztiria*, Fundación *René Barón*, Comisión Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET), y la Agencia Nacional para la Promoción Científica y Tecnológica, por el apoyo económico al proyecto.

## DECLARACION DE PUBLICACIONES

Los datos del presente trabajo de tesis han sido parcialmente publicados en las citas que figuran más abajo. Sin embargo, estos datos publicados pueden estimarse en menos del 50% del trabajo total.

- Carlos De Brasi, Miguel Cardela, Mónica Cermelj, Irma Slavutsky, Irene Larripa, Raúl Pérez Bianco and Miguel de Tezanos Pinto (2000). Intron 22 factor VIII gene inversions in Argentine families with severe haemophilia A. *Haemophilia*, 6, 21-22.
- Carlos D. De Brasi, Derrick J. Bowen, Peter W. Collins and Irene B. Larripa (1999). Specific analysis of the intron 22 *Xba*I polymorphism of the human factor VIII gene using long distance PCR. *British Journal of Haematology*, 107,566-568.
- Derrick J. Bowen, Carlos D. De Brasi, Irene B. Larripa, Peter W. Collins (2000). A new polymorphism in the human factor VIII gene: implications for linkage analysis in haemophilia A and for the evolution of *int22h* sequences. *British Journal of Haematology*, 111, 544-548.

## RESUMEN

La hemofilia A (HA) es una enfermedad hemorrágica hereditaria, ligada al sexo, causada por deficiencia del factor VIII de coagulación (FVIII). La ruta preferida para la provisión de datos para diagnóstico molecular es la detección directa de mutaciones. Entre las mutaciones que afectan al gen del FVIII, la inversión del intrón 22 (Inv22) constituye la causa de casi la mitad de las HA severas (SHA). Mediante análisis de *Southern blot* fueron estudiadas 47 familias Argentinas con SHA. En cercano acuerdo a lo reportado series internacionales, 19 de ellas (40%) resultaron informativas para la Inv22 y pudo proveerse diagnóstico molecular por el método directo. Dentro de éstas, 14 (79%) resultaron Inv22 tipo distal y las restantes 5 (21%), proximal. No fueron encontradas significativas asociaciones entre la presencia o no de la Inv22 en SHA, y el origen de la enfermedad (esporádica o familiar), ni tampoco con la propensión o no a desarrollar anticuerpo inhibidor neutralizante contra el FVIII terapéutico.

El camino alternativo para el diagnóstico es por vía indirecta usando polimorfismos ligados a la enfermedad. Entre los polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) ubicados dentro del gen del FVIII, el marcador *Xba*I A del intrón 22 a pesar de proveer una alta informatividad en los distintos grupos étnicos analizados, fue casi excluido de la rutina diagnóstica por la lentitud y laboriosidad de su detección. Aquí se describen dos métodos rápidos, no-radioactivos, basados en PCR de larga distancia (LD PCR), para genotipificación del RFLP *Xba*I A. Los amplímeros de 6,6 y 6,9 kb incluyen el sitio polimórfico y un sitio constante de *Xba*I que provee control de digestión. La especificidad del método fue desafiada en experimentos a ciegas de muestras previamente genotipificadas por *Southern blot*, obteniéndose una perfecta correlación entre ambos métodos. Mediante este método, 53 cromosomas X de la población Argentina general fueron genotipificados para *Xba*I A, lo que permitió proyectar una informatividad de aproximadamente el 47%. Los estudios de asociaciones alélicas entre *Xba*I A (X) y el polimorfismo *Bcl*I (B) del intrón 18 del gen del FVIII, determinaron un alto, pero no-completo desequilibrio de ligamiento entre los marcadores, proyectando una informatividad combinada (X+B) del 55%.

A 737 bp río abajo del RFLP *Xba*I, fue localizado y caracterizado un nuevo polimorfismo bialélico, de cambio de nucleótido que afecta el sitio de reconocimiento de la enzima *Msp*I (CCG/aG). La genotipificación específica del RFLP *Msp*I A se realiza utilizando la LD PCR específica para *Xba*I A como primera vuelta, seguida por una PCR anidada de 176 bp que incluye al sitio polimórfico y uno constante de *Msp*I para proveer control de digestión. Su

análisis en las poblaciones normales Argentina y Británica permitió estimar una heterocigocidad de 49 y 46%, respectivamente. A pesar de su proximidad física y su desequilibrio de ligamiento, X y M proyectan una informatividad conjunta del 62% para población Argentina y 59% para la Británica. Ambos RFLPs (X y M) están incluidos en una región de 9,5 kb dentro del intrón 22 del gen del FVIII (*int22h-1*), que se encuentra repetida por lo menos 2 veces fuera del gen del FVIII, también sobre Xq28 (*int22h-2* y *-3*). Para investigar los sitios correspondientes de X y M sobre los homólogos extragénicos fueron diseñados abordajes específicos similares a aquellos usados para los sitios intragénicos. Los sitios *MspI* extragénicos (B y C) resultaron polimórficos en población Argentina y Británica aunque con frecuencias del alelo [+] mucho menores a las intragénicas.

La Inv22 es originada por un evento de entrecruzamiento recíproco intracromosómico por recombinación homóloga entre las secuencias *int22h* descritas resultando en la interrupción inactivante del gen del FVIII en su intrón 22. Debido a (1) que los marcadores X y M ubicados dentro de *int22h* permiten mediante sus frecuencias alélicas diferenciar las copias intra de las extragénicas y (2) que en el cromosoma X de varones de la población normal podemos estimar el estado de estos marcadores **antes** del evento y en los hemofílicos con la Inv22 podemos analizar el estado de estos marcadores **después** del evento; se diseñó una estrategia para recabar datos del mecanismo molecular que origina la Inv22 como modelo de entrecruzamiento recíproco en meiosis humanas. La aplicación del método planteando nueve hipótesis de posibles intermediarios moleculares de la Inv22 asociadas a la predicción de resultados numéricos utilizando las estimaciones sobre población de varones normales y su comparación con los datos obtenidos en el grupo de afectados con la Inv22, permitió determinar que el evento molecular de recombinación meiótica está acoplado a la conversión génica del marcador *XbaI*, con la secuencia extragénica como dadora de la información. El mismo análisis sobre *MspI* si bien proyecta resultados similares, no permite determinarlo con significación estadística. El aumento de la población hemofílica para la obtención de resultados más precisos además de los estudios de mapeo de puntos calientes para rupturas meióticas de doble cadena dentro de las secuencias *int22h* permitirá la elucidación específica del mecanismo de la Inv22 como modelo de recombinación homóloga en meiosis humanas.



## ABSTRACT

GENETIC MARKERS LINKED TO THE COAGULATION FACTOR VIII GENE. THEIR UTILITY FOR MOLECULAR DIAGNOSIS IN HAEMOPHILIA A AND FOR THE STUDY OF THE MOLECULAR MECHANISM OF HOMOLOGOUS RECOMBINATION IN HUMAN MEIOSIS.

Haemophilia A (HA) is a sex linked inherited haemorrhagic disorder characterised by deficiency in the coagulation factor VIII (FVIII). Direct mutation detection in the gene is the best choice to obtain data for molecular diagnosis. Intron 22 FVIII gene inversion (Inv22) is involved in almost half of severe HA (SHA). It has been studied by Southern blot 47 Argentinean families with SHA and found inversions in 19 (40%), 15 (32%) with distal and 4 (8%) with proximal pattern. In this group of Inv22 informative families definitive information for molecular diagnosis could be provided. No significant correlation between the inheritance of the disease (either familiar or sporadic haemophilia) and the presence of inversions was found. The development of therapeutic-FVIII inhibitor in Inv22-positive SHA-affected families was found increased but not significantly.

The alternative route to obtain molecular information for genetic counselling is gene tracking using DNA polymorphisms. Among the restriction fragment length polymorphisms (RFLPs) in the FVIII gene, the *Xba*I A (intron 22) (X) despite its high informativity in almost all ethnic groups analysed, has not been frequently used in the routine because its reliable detection is tedious and labour-intensive. Two rapid, non-radioactive, long distance PCR-based methods (LD PCR) to genotype the X RFLP are described. The amplimers of 6.6 and 6.9 kb long include both the polymorphic and a constant *Xba*I site, which provides a digestion control. The specificity of the method was challenged by a blind experiment with genomic DNA samples previously genotyped using Southern blot analysis: a perfect correlation was obtained using both approaches. Fifty-three alleles from the Argentinean normal population were *Xba*I A genotyped. The results predict an informativity of 47%. Despite the high degree of allelic associations found between X and *Bcl*I (intron 18) (B), they predicts a combined heterozygosity (X+B) of 55%.

A new polymorphism in the human FVIII gene has been localised and characterised. It is a bi-allelic single nucleotide polymorphism which affects an *Msp*I site (CCg/aG) located 737 bp downstream from the *Xba*I marker. The specific genotyping of the so termed *Msp*I A RFLP (M) requires a nested PCR approach using the X-specific LD PCR as first round and

a 176 bp-long second round which includes both the polymorphic and a constant control-digestion *MspI* site. M genotyping from the Argentinean and the British normal population estimate an informativity of 49 and 46%, respectively. Despite their close proximity, the X and M polymorphisms are not in complete linkage disequilibrium: haplotype analysis from Argentinean and British population predict a combined informativity (X+M) of 62 and 59%, respectively. The markers X and M are located in intron 22 of the FVIII gene within a 9.5 kb *int22h-1* segment. *Int22h* is duplicated at least twice extragenically at Xq28. Both extragenic copies (*int22h-2* and *-3*) are also polymorphic with respect to X. There have been designed LD PCR-based methods to specifically genotype these extragenic X and M sites. The extragenic sites of both X and M resulted also polymorphic in Argentinean and British normal populations but with much lower frequencies of the [+] allele than those obtained from *int22h-1*.

Inv22 originates by an intrachromosomal crossing over due to homologous recombination between *int22h-1* and *int22h-2* or *-3*. The molecular inversion interrupts the normal sequence of the intron 22 of the FVIII gene causing SHA. Due to (1) X and M enable the discrimination of the intra from the extragenic copies of *int22h* by means of differences in their allelic frequencies, and (2) that there can be estimated these frequencies **before** the event in males from the normal population and the frequencies **after** the event in the Inv22-SHA population; it was possible to design an genetic testing strategy to address the molecular mechanism of the Inv22 as a model for homologous recombination in human meiosis. The inspection of the literature prompts the design of 9 possible hypothesis of the intermediaries of the mechanism involved. Each hypothesis was associated with numerical values calculated from the parameters estimated in the normal populations, to predict the results to be obtained from the Inv22-affected population. This analysis allowed us to conclude that the molecular inversion is coupled to the gene conversion from a DNA segment including the *XbaI* extragenic site to its intragenic homologue. The results obtained using *MspI*, although similar than those using *XbaI*, are not statistically significant. The increase in the number of the haemophilic population in order to gain precision in the test and the investigation of meiotic double-strand-breaks hot spots within *int22h* would allow further insights in the molecular mechanism of the Inv22 as a model for homologous recombination in human meiosis.

|  | Página |
|--|--------|
| 1. INTRODUCCION .....  | 1      |
| 1.1 Historia de la Hemofilia .....   | 1      |
| 1.2 Aspectos Clínicos y Genéticos de la Hemofilia .....  | 2      |
| 1.3 Estructura y función del factor VIII de coagulación .....  | 5      |
| 1.4 Aspectos Genético-Moleculares de la HA .....   | 6      |
| 1.5 Inversión del intrón 22 del gen del factor VIII .....  | 11     |
| 1.6 Polimorfismos de DNA en el gen del factor VIII .....   | 14     |
| 1.7 Polimorfismo múltiple de la enzima de restricción <i>Xba</i> I .....   | 16     |
| 1.8 Recombinación homóloga e inversión del intrón 22 .....   | 17     |
| <br>   |        |
| 2. OBJETIVOS .....   | 23     |
| <br>   |        |
| 3. MATERIALES Y METODOS .....  | 24     |
| 3.1 Poblaciones estudiadas .....   | 24     |
| 3.1.1 Familias con Hemofilia A severa .....  | 24     |
| 3.1.2 Colección Galesa de DNA de individuos normales no relacionados .....   | 25     |
| 3.1.3 Grupo de individuos para validación del nuevo método de análisis<br>del RFLP <i>Xba</i> I por PCR de larga distancia ..... | 25     |
| 3.2 Extracción y purificación de DNA a partir de sangre periférica .....   | 25     |
| 3.2.1 Método de fenol / cloroformo .....   | 25     |
| 3.2.2 Método de <i>salting out</i> .....   | 26     |
| 3.3 Preparación de la sonda para <i>Southern blot</i> .....  | 26     |
| 3.4 Digestión de DNA genómico y plasmídico con enzimas de restricción .....  | 28     |
| 3.5 Electroforesis y transferencia ( <i>Southern blot</i> ) .....  | 28     |
| 3.6 Hibridación con sondas radioactivas .....  | 29     |
| 3.7 Reacciones PCR de larga distancia (LD PCR) .....   | 30     |
| 3.8 Reacciones PCR de corta distancia (S PCR) .....  | 31     |
| 3.8.1.PCR simple para amplificación del RFLP <i>Bcl</i> I .....  | 31     |
| 3.8.2 PCR simple para amplificación en conjunto de los RFLPs <i>Msp</i> I<br>intragénico (A ) y extragénicos (B y C) .....       | 31     |

|  |    |
|--|----|
| 3.8.3 PCR anidada para amplificación específica de los RFLPs <i>MspI</i> A<br>y BC por separado <i>BclI</i> .....                                  | 32 |
| 3.8.4 PCR anidada para amplificación del RFLP <i>XbaI</i> .....  | 32 |
| 3.9 Digestión y análisis de productos PCR con enzimas de restricción .....   | 32 |
| 3.10 Caracterización del RFLP <i>MspI</i> A: secuenciación automática de<br>productos PCR .....  | 33 |
| 3.11 Prueba de especificidad de <i>MspI</i> A .....  | 34 |
| 3.12 Notación para el análisis de frecuencias .....  | 34 |
| 3.13 Fórmulas, análisis estadístico de los datos, cálculo y propagación<br>de errores .....  | 34 |
| <br>   |    |
| 4. CAPITULO PRIMERO .....  | 37 |
| 4.1 Resultados .....   | 37 |
| 4.1.1 Determinación de la frecuencia de la Inv22 en población<br>Argentina con SHA .....   | 37 |
| 4.1.2 Correlación entre la presencia de la Inv22 y el origen de la<br>enfermedad (condición esporádica o familiar) en familias con SHA .....       | 37 |
| 4.1.3 Análisis de portadoras .....   | 37 |
| 4.1.4 Correlación entre la presencia de la Inv22 y el desarrollo de<br>anticuerpo inhibidor contra el FVIII terapéutico, en familias con SHA ..... | 38 |
| 4.2 Discusión .....  | 45 |
| <br>   |    |
| 5. CAPITULO SEGUNDO .....  | 48 |
| 5.1 Resultados .....   | 48 |
| 5.1.1 LD PCR intragénica <i>downstream</i> (DI) para el RFLP <i>XbaI</i> A .....   | 48 |
| 5.1.1.1 Validación de la DI LD PCR para genotipificación<br>del RFLP <i>XbaI</i> A .....   | 49 |
| 5.1.2 LD PCR intragénica <i>upstream</i> (UI) para el RFLP <i>XbaI</i> A .....   | 49 |
| 5.1.2.1 Análisis del RFLP <i>XbaI</i> A en población Argentina normal<br>con la UI LD PCR .....  | 51 |
| 5.1.3 Análisis del desequilibrio de ligamiento entre los RFLPs <i>XbaI</i> A<br>y <i>BclI</i> en población Argentina normal .....                  | 51 |
| 5.1.4 LD PCR extragénica <i>downstream</i> (DE) para el RFLP <i>XbaI</i> BC.....   | 51 |

|         |   |     |
|---------|---|-----|
| 5.1.4.1 | Análisis del RFLP <i>Xba</i> I BC en población Argentina normal<br>con la DE LD PCR .....   | 52  |
| 5.2     | Discusión .....   | 63  |
| 6.      | CAPITULO TERCERO .....  | 67  |
| 6.1     | Resultados .....  | 67  |
| 6.1.1   | Investigación de un candidato a polimorfismo dentro de las<br><i>int22h</i> .....   | 67  |
| 6.1.2   | Análisis específico de sitios <i>Msp</i> I y hallazgo de polimorfismos .....  | 67  |
| 6.1.3   | Genotipificación del RFLP <i>Msp</i> I A .....  | 69  |
| 6.1.4   | Genotipificación conjunta de los RFLPs <i>Msp</i> I A, B y C .....  | 69  |
| 6.1.5   | Genotipificación de los RFLPs <i>Msp</i> I B y C .....  | 69  |
| 6.1.6   | Estimación de heterocigocidad del RFLP <i>Msp</i> I A y asociaciones<br>alélicas con otros polimorfismos del gen del FVIII en población<br>normal Argentina y Británica .....   | 70  |
| 6.1.7   | Caracterización del RFLP <i>Msp</i> I A .....   | 71  |
| 6.1.8   | Investigación del nucleótido polimórfico en <i>Msp</i> I A, B y C .....   | 71  |
| 6.2     | Discusión .....   | 81  |
| 7.      | CAPITULO CUARTO .....   | 85  |
| 7.1     | Resultados .....  | 85  |
| 7.1.1   | Descripción del abordaje de análisis del mecanismo molecular<br>de la <i>Inv22</i> .....  | 85  |
| 7.1.2   | Requerimientos específicos para la validación del abordaje<br>presentado .....  | 91  |
| 7.1.3   | Aplicación de la metodología descrita al análisis del evento<br>de recombinación homóloga en meiosis humanas: Comparación<br>de los valores obtenidos en la población de hemofílicos A severos,<br>no relacionados, con la <i>Inv22</i> ; con los esperados bajo cada una de<br>las hipótesis ..... | 94  |
| 7.1.4   | Análisis estadístico de la asociación de la <i>Inv22</i> con la conversión<br>génica marcadores <i>Xba</i> I y <i>Msp</i> I .....   | 100 |
| 7.2     | Discusión .....   | 102 |

|                            |     |
|----------------------------|-----|
| 8. DISCUSION GENERAL ..... | 109 |
| 9. CONCLUSIONES .....      | 114 |
| 10. BIBLIOGRAFIA .....     | 116 |
| 11. ABREVIATURAS .....     | 127 |

## 1. INTRODUCCION

La hemofilia es una enfermedad hemorrágica hereditaria, recesiva, ligada al cromosoma X, que afecta 1-2 de cada 10.000 varones en todas las poblaciones humanas (McKusic, 1995). La enfermedad también ha sido observada en murinos, caninos, porcinos y equinos, entre otras especies.

### 1.1 Historia de la Hemofilia

A pesar que el tratamiento de esta condición ha sido efectivo recién en las últimas décadas, la hemofilia es una enfermedad conocida desde la antigüedad. Las referencias más tempranas de una enfermedad que podría tratarse de hemofilia son encontradas en los textos judíos del siglo dos después de Cristo. Hay evidencia que hubo fallos rabínicos exceptuando a ciertos niños varones de la circuncisión, si dos de sus hermanos habían muerto previamente por sangrado después de este procedimiento. El médico judío Moses Maimonides (1135-1204) aplicó este fallo a los hijos de una mujer que se había casado por segunda vez, por lo que, aparentemente, habría apreciado la naturaleza hereditaria de la enfermedad. El médico árabe Albucasis (1013-1106) describió también una familia donde los varones morían después de heridas triviales.

La primera descripción moderna de hemofilia se atribuye al Dr. John Conrad Otto, un médico de Filadelfia, quién en 1803 publicó un tratado titulado: "*An account of an haemorrhagic disposition existing in certain families*" (Informe de la disposición hemorrágica existente en ciertas familias). En este informe, se aprecian claramente las tres características principales de la hemofilia: la tendencia *hereditaria* de ciertos *varones* a *sangrar*.

Sin embargo, el uso de la palabra hemofilia aparece por primera vez en un informe de la enfermedad escrito por Hopff, un alumno de la Universidad de Zürich, en 1928.

La hemofilia es a veces referida como la enfermedad Real. La Reina Victoria, a pesar de no haber tenido ancestros afectados, tuvo en 1853 a su octavo hijo, Leopold, con evidentes rasgos de hemofilia. Este es un claro ejemplo de como la hemofilia puede aparecer por mutación espontánea. La condición médica de Leopold fue reportada en el *British Medical Journal* en 1868, señalando la ocurrencia de episodios de sangrado, al menos una vez por mes. Leopold pudo casarse antes de morir a los 31 años por una hemorragia cerebral después de una caída. Su hija Alice, portadora obligatoria, tuvo un hijo hemofílico, Rupert,

quién también murió por hemorragia cerebral a la edad de 21 años. Luego se hizo evidente que dos de las hijas de la Reina Victoria, Alice y Beatrice, fueron portadoras de hemofilia. La condición fue transmitida a través de ellas a muchas familias Reales de Europa, incluyendo España y Rusia. Quizás el hemofílico más famoso de la historia fue el hijo del Zar Nicolas II de Rusia, Tsarevich Alexis, quién ha sido sujeto de obras literarias y cinematográficas. Se ha especulado que esta enfermedad creó una severa tensión en la familia Real rusa, permitiendo que Rasputin ganara una gran influencia en la corte. Alexis y su familia fueron asesinados por la revolución bolchevique en 1917. El gen causante de la hemofilia de los descendientes de la Reina Victoria, se ha perdido, no afectando hoy a las familias Reales europeas, hecho que enfatiza la severidad de la condición en ausencia de un tratamiento médico efectivo. Por esta causa, hoy no se tiene evidencia si la enfermedad que los afectó fue hemofilia A o B.

A pesar que la hemofilia fue descrita desde la antigüedad, y que los síntomas y el patrón de herencia fueron entendidos a principios del siglo XX, las bases bioquímicas de la enfermedad no fueron elucidadas sino hasta recién entrada la década de 1950. En 1937, Patek y Taylor en Harvard, observaron que una fracción de la precipitación de plasma normal con ácido débil, podía corregir el defecto en la coagulación de la sangre de los hemofílicos. En 1944, el Dr. Alfredo Pavlovsky del Instituto de Investigaciones Hematológicas *Mariano Castex* de la Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires, describió un experimento donde se observaba una mutua corrección de las pruebas de coagulación *in vitro* cuando se mezclaba el plasma de dos hemofílicos. Esto fue explicado en 1952 cuando Macfarlane y Biggs en Oxford, describieron el primer caso de hemofilia B, llamada entonces enfermedad de Christmas, por ser éste el apellido del paciente con deficiencia en el factor IX. Subsecuentemente, fueron descubiertos numerosos factores proteicos involucrados funcionalmente en el fenómeno de coagulación. En 1962, un Comité Internacional asignó el nombre de factor VIII, al factor deficiente en la hemofilia A. Macfarlane y Ratnoff en 1964, diseñaron independientemente el esquema de eventos que desencadenan la coagulación sanguínea y la nombraron *cascada* o *catarata* de coagulación.

## 1.2 Aspectos Clínicos y Genéticos de la Hemofilia A

Como fue señalado arriba, la hemofilia es una entidad heterogénea que se clasifica en dos tipos clínicamente indistinguibles: La hemofilia A (HA) o hemofilia clásica caracterizada por el



déficit o ausencia de la globulina antihemofílica denominada factor VIII de coagulación (FVIII) y la hemofilia B (HB) o enfermedad de *Christmas* con déficit o ausencia del factor IX de coagulación (FIX). La HA se presenta con una frecuencia de 5 a 7 veces mayor que la HB (Mc Kusic, 1995).

La gravedad de las manifestaciones clínico-hemorrágicas de los pacientes con HA está en relación con los valores de actividad del FVIII plasmático en comparación con un plasma patrón de individuos de coagulación normal. Así, la HA puede subclasificarse según un criterio bioquímico en severa (SHA) (con actividad del FVIII menor al 1%), moderada (MHA) (entre un 1 y 5%) y leve (LHA) (desde el 5 al 25%) (Hoyer, 1994).

El tratamiento específico de la Hemofilia se basa en la terapia de reemplazo o administración de la globulina antihemofílica deficiente, desde distintas fuentes. En la década del ochenta la utilización de concentrados de factor extraídos desde numerosos donadores voluntarios de sangre, trajo aparejado un alto riesgo de contaminación con infecciones por virus tales como HBV, HCV, HIV (virus de la hepatitis B, C y de la inmunodeficiencia humana, respectivamente), etc. por lo que muchos hemofílicos tratados con ellos resultaron infectados. Desde hace más de una década, se dispone de métodos sensibles para la detección y descarte del material contaminado con estos agentes infecciosos por lo que el riesgo de contaminación ha sido prácticamente abolido. Afortunadamente, por medio de la tecnología del DNA recombinante o ingeniería genética fue lograda la producción libre de riesgos de infección del factor humano recombinante para su administración terapéutica. Actualmente hay una tendencia creciente a la administración periódica en pequeñas dosis del factor como prevención de episodios clínicos severos, lo que permite una mejora significativa de la calidad de vida de los hemofílicos severos.

Una de las complicaciones más serias que comprometen el tratamiento de la HA es el desarrollo de inhibidores neutralizantes del FVIII. En HB el desarrollo de anticuerpo inhibidor es un evento raro (<1%). Aunque existe cierta disparidad de los datos provenientes de distintos países, se considera que entre el 20 y el 30% de los pacientes con SHA desarrollan anticuerpos contra el FVIII administrado con fines terapéuticos (Schwaab *et al*, 1995). Sobre base teórica, las mutaciones de falso sentido, donde sólo cambia un aminoácido (aa) por otro, con pocas chances de afectar significativamente la estructura de la proteína y sus características inmunológicas, no deberían asociarse a un alto riesgo de inhibidor. Sin embargo, se han reportado desarrollo de inhibidor asociado a ciertas mutaciones puntuales específicas de falso sentido, quizás por alteración de epitopes clave en el desarrollo del estado de tolerancia inmunológica. La profundización en el conocimiento de estos epitopes

permitirá quizás, el diseño de moléculas recombinantes de FVIII, con actividad funcional conservada pero con inmunogenicidad restringida.

En una enfermedad recesiva ligada al cromosoma X como la hemofilia, la condición se manifiesta en el varón que es descrito como hemicigota, mientras que la mujer heterocigota o portadora es generalmente no afectada. Sin embargo, estas mujeres portadoras pueden presentar ocasionalmente sutiles anormalidades bajo exámenes clínicos rigurosos y/o análisis bioquímicos específicos.

Cuando una mujer es portadora, cada uno de sus hijos varones tiene 50% de riesgo de resultar hemofílico y cada una de sus hijas tiene 50% de chance de ser portadora. En la descendencia de un varón hemofílico, todas sus hijas serán portadoras ya que heredarán su cromosoma X con el gen del FVIII afectado, mientras que todos sus hijos varones resultarán no afectados por heredar su cromosoma Y. En la mayoría de los casos reportados de hemofilia en mujeres ellas eran hijas de un padre hemofílico y una madre portadora. La probabilidad de que una mujer hemofílica homocigota surja de un apareamiento casual en la población general es muy pequeña (menor a 1 en 100 millones). También se han registrado casos de hemofilia en individuos fenotípicamente femeninos pero con anomalías en el par de cromosomas sexuales que las hacían hemicigotas (mujeres XY, XO o síndrome de Turner, etc).

La mayoría de las portadoras de hemofilia tienen niveles de actividad plasmática del factor de coagulación correspondiente a un valor medio teórico del 50% respecto de un individuo de coagulación sanguínea normal. Este hecho se relaciona con el proceso celular de inactivación del cromosoma X que sufren las mujeres cromosómicamente normales (XX) para compensar fisiológicamente la dosis de sus genes ligados al X, con los varones normales XY. Este fenómeno de compensación de dosis entre mujeres y varones de genes ligados al cromosoma X fue descubierto por la citogenetista Mary Lyon, 1961, por lo que se le a dado el nombre de lyonización. Más recientemente, se determinó que esta inactivación está mediada por la actividad de un gen, llamado Xist (*X inactive specific transcript*) transcripto específico del X inactivo, que se ubica sobre Xq13. En resumen, durante el desarrollo temprano de un embrión femenino XX, se produce en cada célula, la inactivación al azar de uno de los dos cromosomas X. Así, a partir de este evento, el individuo resultará un mosaico donde la mitad de sus células porta inactivo el cromosoma X paterno mientras que la otra mitad, en cambio, tienen inactivo el cromosoma X materno. A partir de allí, la lyonización se mantiene clonalmente durante toda la vida de la mujer. Cuando alguna anomalía bloquea el proceso de inactivación al azar, de cualquiera de los dos

cromosomas X, puede producirse un sesgo en los porcentajes de lyonización. Si este fenómeno de inactivación sesgada ocurre en una mujer portadora encontramos dos posibilidades: (a) que se inactive específicamente el X afectado, por lo tanto aumenta la actividad de la globulina antihemofílica correspondiente ( $>>50\%$ ) provocando errores en el diagnóstico de portadora cuando estos se basan en los niveles del factor en plasma; (b) que se inactive preferentemente el X no afectado en la mayoría de las células, en consecuencia disminuya la actividad del factor de coagulación ( $<< 50\%$ ) y por lo tanto se manifiesten síntomas de hemofilia. Sin embargo antes de analizar estas posibilidades debe descartarse la asociación con: (1) enfermedad de von Willebrand (vWD) tipo 2 Normandie (donde se resiente la función de unión al FVIII del factor de von Willebrand reduciendo significativamente la estabilidad del FVIII en plasma) y (2) anomalías numéricas o estructurales que involucren al cromosoma X que determinen que estas portadoras funcionen como hemicingotas.

Según predijo el genetista inglés Haldane para una enfermedad hereditaria severa ligada al cromosoma X, cuyos afectados tienen una muy reducida o nula eficacia biológica o *fitness*, las mutaciones que provocan esta enfermedad tienen una alta tasa de aparición *de novo*. Específicamente, un tercio de las mutaciones que causan hemofilia aparecerían *de novo* en cada generación para compensar la pérdida del tercio de mutaciones que se pierden con los cromosomas X de los varones hemofílicos (los dos tercios restantes de los cromosomas X con genes del FVIII afectados se encuentran en las portadoras y éstas tienen una capacidad reproductiva no afectada apreciablemente) (Haldane, 1935). En los últimos años con el advenimiento de las terapias seguras de reemplazo del factor ausente, la probabilidad de que un afectado alcance la edad reproductiva y pueda dejar descendencia ha aumentado significativamente y con ella, el *fitness*, sin embargo, esta modificación en hemofílicos severos alcanza a minoritarios segmentos de la población mundial y sólo se restringe a un lapso relativamente pequeño de tiempo comparado con tiempos evolutivos. Por lo expuesto, la tasa de aparición *de novo* de mutaciones asociadas a SHA sería aún suficientemente alta como para que no se produzcan, por efecto fundador, asociaciones alélicas entre polimorfismos de DNA ligados al gen del FVIII y mutaciones causales específicas.

### 1.3 Estructura y función del factor VIII de coagulación

El FVIII circula en plasma como una gran glicoproteína unida en complejo no-covalente al factor de von Willebrand (vWF). El vWF es una proteína multimérica de gran tamaño que

actúa como portadora del FVIII tanto durante su secreción como en la circulación general. La determinación de la secuencia nucleotídica del cDNA (DNA copia del RNA mensajero, mRNA) predice una proteína madura de 2332 aminoácidos (aa) con una masa molar relativa estimada, de 265 kilo Daltons (kD) (sin carbohidratos). El FVIII es sintetizado principalmente en hepatocitos y células endoteliales entre otras células. La estructura primaria del FVIII muestra 3 tipos distintos de dominios incluyendo una región triplicada de aproximadamente 330 aa (dominios A), una región única de 980 aa (dominio B) y una región carboxi-terminal duplicada de 150 aa (dominios C), en el orden: NH<sub>2</sub>.A<sub>1</sub>-A<sub>2</sub>-B-A<sub>3</sub>-C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>.COOH (figura 1) (Vehar *et al*, 1984 y Tuddenham *et al*, 1991). Esta estructura presenta un alto grado de homología con el factor V de coagulación (A<sub>1</sub>-A<sub>2</sub>-B-A<sub>3</sub>-C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>, sólo sus dominios B no están relacionados), con la proteína plasmática ceruloplasmina (A<sub>1</sub>-A<sub>2</sub>-A<sub>3</sub>) y con la ferroxidasa (dominio A) (figura 1) (Vehar *et al*, 1984). Sus dominios C también presentan homologías, pero de grado menor, con proteínas de otras especies (figura 1).

El FVIII es altamente sensible a la proteólisis antes y después de su secreción y sólo una pequeña fracción de FVIII circulante está como cadena única: la mayoría consiste en cadenas pesadas de longitud heterogéneas (dominios A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> y segmentos de longitud variable de B) unidas en forma no-covalente (por medio de cationes divalentes) a cadenas livianas constituidas por los dominios A<sub>3</sub>, C<sub>1</sub> y C<sub>2</sub> (Vehar *et al*, 1984). La actividad normal del FVIII recombinante con delección total del segmento B, confirma que este dominio no es necesario para la actividad coaguladora (Eaton *et al*, 1986).

La función del FVIII es actuar como co-factor esencial para la activación del factor X (FX), que produce el FIX activado (FIXa) sobre una adecuada superficie fosfolipídica, amplificando varias veces el estímulo de coagulación (van Dieijen *et al*, 1981). Tanto la generación como la destrucción de la actividad del FVIII es mediada por clivajes proteolíticos específicos. La conversión a la forma activa requiere el clivaje de dos uniones peptídicas Arg-Ser. Las peptidasas trombina (factor IIa) y factor Xa pueden hidrolizar estas uniones Arg-Ser. La proteína C activada (PCA), inactiva el FVIII por un único clivaje en Arg336-Met337 (Pittman y Kaufman, 1988).

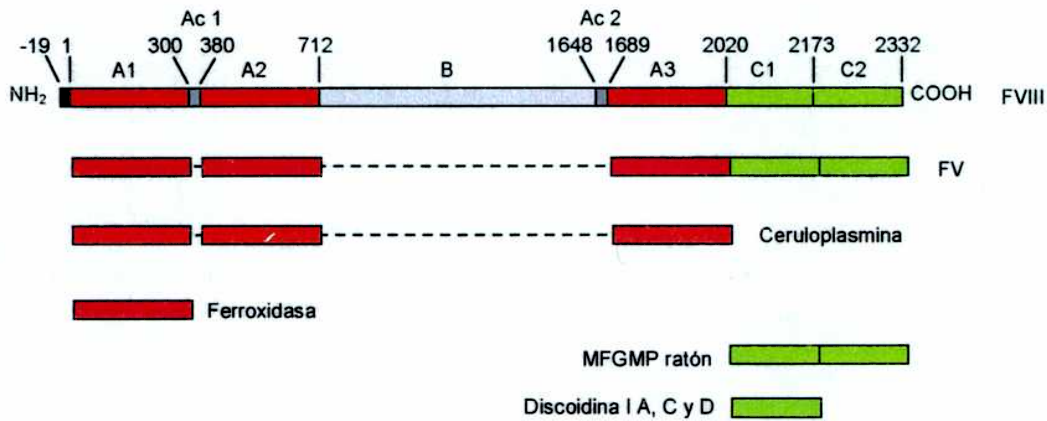
#### 1.4 Aspectos Genético-Moleculares de la HA

El gen que codifica para el factor VIII, localizado en la región Xq28 del cromosoma X, es uno de los genes de mayor tamaño caracterizado en humanos hasta el presente (186 kilobases, kb) (Figura 2). Contiene 26 exones con tamaños comprendidos entre 69 y 3106 pares de

bases (bp) que se transcriben a un ARN mensajero (mRNA) de 9 kb. Las secuencias correspondientes a los intrones ocupan 177 kb del gen, y entre ellos, el intrón 22 es el de mayor tamaño (Gitschier *et al*, 1984).

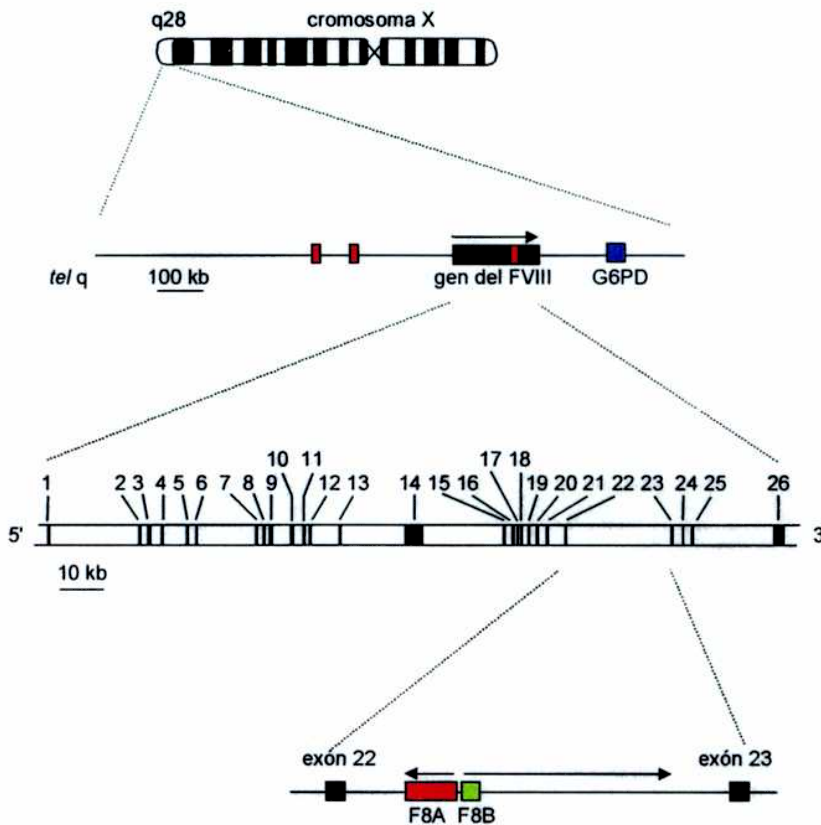
Después del clonado y caracterización del gen del FVIII (Gitschier *et al*, 1984; Toole *et al*, 1984; Wood *et al*, 1984), numerosos estudios detectaron mutaciones causales de HA severa (SHA), moderada (MHA) y leve (LHA), incluyendo casi todo tipo de mutaciones: deleciones grandes (> 0,2 kb), deleciones pequeñas e inserciones (de 1 bp, en motivos repetidos, o del retrotransposón *LINE-1*, *long interspersed nuclear elements*, o debido a duplicaciones) que producen un cambio del marco de lectura (*frameshift*), mutaciones puntuales que causan falso sentido (*missense*), o aparición prematura de codones de terminación, llamadas mutaciones de no-sentido (*nonsense*), o mutaciones que afectan secuencias clave (sitios donador, aceptor o secuencias consenso) para el proceso de maduración del transcrito primario de RNA en mRNA (*splicing*) (Gitschier *et al*, 1985; Gitschier *et al*, 1988; Kazazian *et al*, 1988, Kogan y Gitschier, 1990; Tuddenham *et al*, 1991; Higuchi *et al*, 1991a; Higuchi *et al*, 1991b, revisión en De Brasi *et al*, 1996) (tabla 1). Actualmente todas las mutaciones asociadas a HA se encuentran registradas y permanentemente actualizadas en la base de datos llamada HAMSTeRS, libremente accesible en internet en la dirección: <http://www.hamsters.rpms.ac.uk> (Wacey *et al*, 1996).

Figura 1: Homología de aminoácidos y estructura de dominios del factor VIII de coagulación.



Los números sobre el primer esquema señalan las posiciones aminoácidas de unión entre los distintos segmentos del FVIII de coagulación. Desde el extremo amino (NH<sub>2</sub>) hasta el carboxilo (COOH) terminal: péptido líder (-19 a 1, negro), dominio A1 (1 a 300, rojo), dominio ácido 1, Ac. 1 (300 a 380, gris oscuro), dominio A2 (380 a 712, rojo), dominio B (712 a 1648, gris claro), dominio ácido 2, Ac 2 (1648 a 1689, gris oscuro), dominio A3 (1689 a 2020, rojo), dominio C1 (2020 a 2173, verde) y dominio C2 (2173 a 2332, verde). Los dominios A y C del FVIII presentan homología significativa con el FV de coagulación. Los dominios A, también reconocen homología con la ceruloplasmina y la ferroxidasa. Por su parte, los dominios C son homólogos a las lectinas de *Dictyostelium discoides*, discoidina A, C y D y a la proteína murina de membrana de los glóbulos grasos de la leche (MFGMP).

Figura 2: Representación esquemática de la localización cromosómica y la estructura del gen del factor VIII de coagulación humano.



El gen del FVIII se localiza en Xq28 aproximadamente a 1000 kb del telómero q (*tel q*) y transcribe en dirección centromérica. El gen codificante para la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD, azul) se encuentra a menos de 200 kb río abajo (*downstream*) del gen del FVIII. Un segmento que se encuentra dentro del intrón 22 del gen del FVIII (*int22h*, en rojo, Naylor *et al*, 1995) se encuentra repetida 2 veces a 300-400 río arriba (*upstream*). El gen del FVIII contiene 26 exones sobre una región de 186 kb de DNA genómico. Su exón más grande, el exón 14, codifica para el dominio B. Su intrón más largo, IVS22, contiene dentro de la región repetida *int22h* mostrada arriba, dos genes anidados llamados: F8A, un gen sin intrones que transcribe en dirección opuesta al gen del FVIII, y el exón 1 del gen F8B (verde) que transcribe en igual dirección que el gen del FVIII y comparte con éste los exones 23 a 26.

Tabla 1: Mutaciones involucradas en hemofilia A severa, moderada y leve.

| Tipo de mutación        | Severa <sup>1</sup><br>FVIII:C < 1% | Moderada <sup>1</sup><br>1 < FVIII:C < 5% | Leve <sup>1</sup><br>5% < FVIII:C < 25% |
|-------------------------|-------------------------------------|---|---|
| Inversiones<br>Inv22    | dístral                             | 7%  |   |
|                         | proximal                            | 35%                                       |   |
|                         | raros                               | < 0.5%                                    |   |
|                         | Total                               | 42% <sup>2</sup>                          |   |
| Mutaciones<br>Puntuales | falso sentido                       | 19%                                       | falso sentido > 95%                     |
|                         | no-sentido                          | 7%  |   |
|                         | sitio <i>splicing</i>               | 4%  | sitio <i>splicing</i>                   |
|                         | Total                               | 30%                                       |   |
| Deleciones              | grandes (> 0,2kb)                   | 16%                                       | grandes (> 0,2kb)                       |
|                         | pequeñas (< 0,2kb)                  | 4%  |   |
|                         | Total                               | 20%                                       |   |
| Inserciones             | de una bp                           | 2%  |   |
|                         | <i>LINE-1</i>                       | < 1%                                      |   |
|                         | Total                               | 3%  |   |

<sup>1</sup>Estimada de la información publicada en internet en la base de datos *HAMSTeRS* (<http://www.hamsters.rpms.ac.uk>) (Wacey *et al*, 1996). <sup>2</sup>Información publicada por Antonarakis *et al*, 1995.

Estas mutaciones heterogéneas sólo se han observado raramente en individuos no relacionados lo cual sugiere, en general, que cada familia afectada posee su propia alteración (mutaciones privadas).

Como puede observarse en la tabla 1, las mutaciones descritas permiten explicar la causa de la casi totalidad de las MHA y LHA pero sólo de algo más de la mitad de las SHA. Dos grupos de investigación (Naylor *et al*, 1993; Lackich *et al*, 1993) en forma independiente demostraron que un tipo inusual de mutación se observaba en la mitad de los casos de SHA. Se trata de una disrupción del gen del FVIII, debida a una inversión (inapreciable citogenéticamente) que separa a los exones 1-22 de los exones 23-26, aproximadamente 400 kb. Esta disrupción inactivante del gen del FVIII es llamada inversión del intrón 22 (Inv22) y es la causa de casi la mitad de las SHA en todo el mundo (tabla 1).



## 1.5 Inversión del intrón 22 del gen del factor VIII

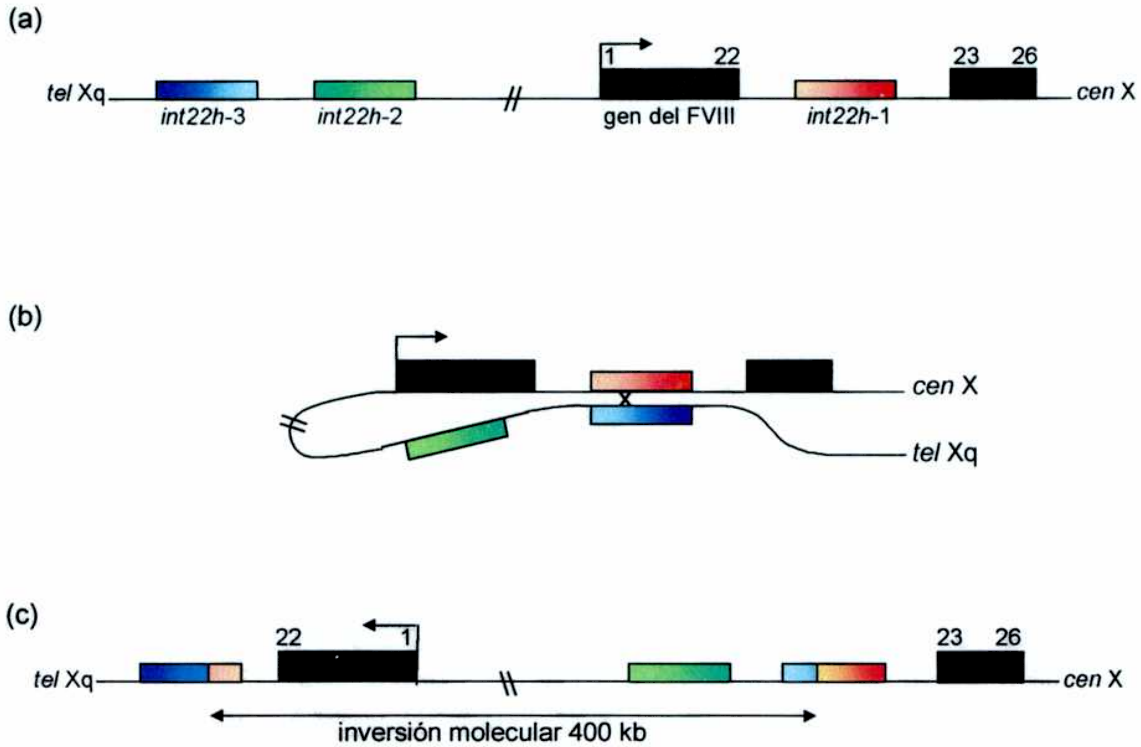
Como se ha mencionado, sólo la mitad de los pacientes con SHA tiene mutaciones privadas heterogéneas (Higuchi *et al*, 1991a) ya que la otra mitad de hemofílicos A severos tienen largas inversiones recurrentes, indetectables citogenéticamente. Estas inversiones fueron descubiertas después de observar que el 50% de los pacientes con SHA no mostraban mutaciones en las regiones genómicas esperadas y todos compartían la imposibilidad de detectar un mRNA que uniera los exones 22 y 23 del gen del FVIII (Naylor *et al*, 1993, Lakich *et al*, 1993). Naylor *et al*, 1995, demostraron que la inversión resulta por intercambio recíproco entre secuencias homólogas de 9,5 kb (*int22h*) ubicada una dentro del intrón 22 del gen del factor VIII (*int22h-1*) y otra que pertenece a un grupo de al menos dos copias adicionales de *int22h* (*int22h-2* o proximal e *int22h-3* o distal), ubicadas en posición más telomérica, en Xq28, ambas en orientación opuesta a la intragénica y aproximadamente 300-400 kb río arriba (*upstream*) del gen del FVIII (figura 3). Como resultado de esta Inv22, el gen del FVIII queda truncado a nivel de su intrón 22 y las nuevas secuencias que quedan yuxtapuestas aportan 4 exones espúreos llamados a, b, c y d (Naylor *et al*, 1993). Lakich *et al*, 1993, describieron un método para estudiar la Inv22 basado en la técnica de *Southern blot*, con una sonda específica de la secuencia *int22h*, ya conocida por su utilización en la investigación del polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) de la enzima *XbaI* en el intrón 22 (Wion *et al*, 1986). La figura 3 esquematiza el mecanismo de la Inv22 donde se muestra como ejemplo, la interacción molecular, por recombinación homóloga, entre las secuencias *int22h-1* (intragénica) e *int22h-3* (extragénica distal). Este tipo de inversión se denomina Inv22 tipo 1 o distal, en cambio cuando el evento sucede entre *int22h-1* e *int22h-2* (copia extragénica proximal) el resultado es Inv22 tipo 2 o proximal. Se ha reportado, un escaso porcentaje (<1% de la Inv22) de casos donde existen más de 2 copias extragénicas de la secuencia *int22h*, dando distintos patrones de bandas de hibridación, llamados patrones raros o patrones tipo 3a y 3b, según se encuentren señales adicionales de la copia distal o proximal, respectivamente (Naylor *et al*, 1996).

Rossiter *et al*, 1994, investigaron el origen de la Inv22 en un grupo de familias con hemofilia esporádica y observaron que ella ocurría con muy alta probabilidad en la meiosis del abuelo materno y no en la madre, ni la abuela materna, demostrando que la inversión ocurría casi exclusivamente en células germinales masculinas. Esto también fue observado por Tizzano *et al*, 1995, al reportar que en casos aislados de SHA asociada a

la Inv22, sorpresivamente, todas las madres eran portadoras cuando se esperaba que una proporción de ellas no lo sea (ya que *a priori*, se esperaba que las tasas de mutación *de novo* de la inversión en varones y en mujeres, fueran comparables). Por su parte, Rossiter *et al*, 1994, proponen que la presencia de dos cromosomas X en las meiosis femeninas inhibiría la interacción intracromosómica entre secuencias homólogas como *int22h*.

Como se discutió más arriba, el desarrollo de anticuerpo-inhibidor contra el FVIII terapéutico representa una de las complicaciones clínicas más serias en el tratamiento contra la SHA. Aunque con un rango amplio de variación, aproximadamente el 20-30 % de los pacientes con SHA desarrollan inhibidor (Scharrer *et al*, 1993, Antonarakis *et al*, 1995). La disparidad de los datos provenientes de distintos países pueden, además de las razones fisiopatológicas, deberse a razones asociadas a la prueba de laboratorio utilizada para su detección. No pocos expertos consideran que los porcentajes de desarrollo de inhibidor que se han reportado, están en general subestimados y según sus hipótesis alrededor de 40% de los hemofílicos con SHA desarrollarían anticuerpo inhibidor en alguna fase de su tratamiento. A pesar de esta controversia, dentro de las mutaciones que causan el fenotipo severo, se asocia a la Inv22, las grandes deleciones y las mutaciones de no-sentido con un alto riesgo de inhibidor mientras que a las mutaciones de falso sentido y pequeñas deleciones, a bajo riesgo (Schwaab *et al*, 1995). Sin embargo, este fenómeno reconoce causas complejas y hasta el presente, poco entendidas. Entre otros factores predisponentes al desarrollo de inhibidor, han sido nombrados además del tipo específico de mutación, ciertos haplotipos del sistema de antígenos leucocitarios humanos (HLA), la edad de comienzo del tratamiento, el tipo, la dosis y la periodicidad de administración del FVIII (Oldenburg *et al*, 1997).

Figura 3: Mecanismo de la inversión del intrón 22



(a) En el esquema (fuera de escala) se muestra el gen del FVIII (negro) orientado con dirección de transcripción hacia el centrómero X (*cen X*), los números indican la posición de los exones, dentro del intrón 22, la secuencia *int22h-1* (rojo) orientada relativamente opuesta a sus copias *int22h-2* (verde) y -3 (azul), que se encuentran ubicadas en posición proximal y distal, respectivamente del gen del FVIII, hacia el telómero Xq (*tel Xq*). La homología de las copias de *int22h* se nota con el cambio de la tonalidad del color (en *int22h-1* el extremo oscuro se orienta hacia *downstream* respecto de la dirección de transcripción del gen del FVIII). (b) En este ejemplo, las copias 1 y 3 se aparean y recombinan por recombinación homóloga (Naylor *et al*, 1995). (c) Como resultado de este evento, el segmento comprendido originalmente entre *int22h-1* y 3, de 400 kb, queda invertido en su orientación, truncando al gen del FVIII. El ejemplo descrito corresponde a la Inv22 tipo 1 o distal, la interacción con la otra copia extragénica (*int22h-2*), hubiera originado la Inv22 tipo 2 o proximal, sin embargo, ambos tipos reducen igualmente la actividad resultante del FVIII, a menos del 1%.

## 1.6 Polimorfismos de DNA en el gen del factor VIII

El análisis molecular de las mutaciones causales de HA en pacientes Inv22 negativos ha resultado y resulta aún difícil y económicamente costoso debido a las características ya mencionadas del gran tamaño y complejidad del gen del FVIII y a la heterogeneidad mutacional detectada en los distintos individuos. Por esta razón, el diagnóstico prenatal y de portadoras en familias no informativas para la Inv22 se apoya en el uso de polimorfismos de DNA ligados al gen del factor VIII como trazadores indirectos del alelo afectado dentro del árbol genealógico.

La estrategia se basa en el análisis alélico de varios *loci* polimórficos en miembros clave de la familia tales como el probando (hemofílico), su madre, familiares de su madre y el propósito (a quién se propone diagnosticar) y también la recolección de información clínica de importancia para trazar el árbol familiar, determinar si la enfermedad es esporádica o familiar y el origen étnico de la familia materna para señalar *a priori* que marcadores tienen alta probabilidad de resultar informativos (heterocigotas). El haplotipo del probando es considerado el haplotipo-en-riesgo (en fase) o ligado genéticamente a la hemofilia en esa familia y su presencia en otros miembros indica indirectamente la presencia del gen del FVIII afectado. En hemofilias familiares (con antecedentes familiares de la enfermedad) el diagnóstico resulta sencillo, en cambio en los casos esporádicos sólo puede ofrecerse exclusión del haplotipo-en-riesgo y cuando esto no es posible sólo podrán determinarse riesgos relativos apoyándose en datos estadísticos recogidos de la experiencia acumulada en genética clínica. En estos casos, un punto de importancia por sus consecuencias en el diagnóstico y asesoramiento genéticos es la presencia de mosaicismos germinales. Este fenómeno se relaciona con la aparición de la mutación causal de la hemofilia durante el desarrollo de las células germinales en individuos sanos y no portadores. Así, este individuo llamado mosaico germinal puede tener una población celular (parcial o total de acuerdo al grado de afectación de la gónada) de gametas con la mutación. Por lo tanto este individuo tiene altas probabilidades de producir más de un caso de hemofilia en su descendencia.

En un caso esporádico de hemofilia, cuando la madre no es portadora existen dos posibilidades: (1) que la madre haya sufrido la mutación sólo en la gameta que dá origen al hemofílico (neomutación o mutación *de novo*) o (2) que la mutación haya ocurrido en el desarrollo embrionario de las células germinales de la madre (mosaico germinal), con el aumento en el riesgo de recurrencia de hemofilia para nuevos embarazos que esto implica. En base teórica, dos tercios de las madres de casos aislados de hemofilia severa serían

portadoras (Haldane, 1935), sin embargo en estudios basados en el fitness y el origen de la mutación, se estima que este porcentaje se elevaría al 85% (Peake *et al*, 1993). Dentro del 15% restante, sólo una escasa minoría representaría mosaicos germinales, sin embargo, hay varios casos reportados (por ejemplo Gitschier *et al*, 1989). Este fenómeno complica el análisis de riesgo en hermanas/os de estos hemofílicos.

Este abordaje diagnóstico indirecto, que se denomina en inglés *gene tracking* conlleva cierto riesgo de error de asignación como resultado de una eventual recombinación (meiótica en mujeres) entre el marcador y la mutación. Sin embargo este riesgo es mínimo o nulo cuando se usan polimorfismos genéticos dentro del gen en cuestión.

Otro inconveniente del diagnóstico por el método indirecto está relacionado con la falsa paternidad. Esta abre la posibilidad de errores diagnósticos (por falsa asignación de haplotipos) cuando no hay aparente contradicción. Por lo tanto cuando la asignación de estatus genético depende exclusivamente de los datos de un haplotipo paterno así como en los casos de paternidad incompatible, es aconsejable el análisis de paternidad usando los marcadores específicos para ese fin.

Dentro del gen del FVIII encontramos distintos tipos de polimorfismos de DNA: (a) de una base (SNP, *single nucleotide polymorphism*) sin afectar ningún sitio de reconocimiento de enzimas de restricción, (b) de longitud de fragmentos de restricción (RFLP, *restriction fragment length polymorphism*) cuando la/s modificaciones sí afectan un fragmento de restricción y (c) de número variable de repeticiones directas (VNTR, *variable number of tandem repeats*) que en el caso del gen del FVIII son 2 microsatélites con repetición de motivos de 2 pares de bases (bp).

La tabla 2 muestra polimorfismos ubicados dentro del gen del FVIII, que presentan una alta heterocigocidad en la mayoría de los grupos étnicos analizados y por ende, tienen gran utilidad clínica para diagnóstico prenatal y detección de portadoras de HA (Kogan y Gitschier, 1990, Lalloz *et al*, 1991, Gitschier *et al*, 1985, Wion *et al*, 1986, Lalloz *et al*, 1992, Antonarakis *et al*, 1985, revisión en Peake *et al*, 1993). A pesar de encontrarse físicamente próximos y genéticamente ligados, estos marcadores no presentan completo desequilibrio de ligamiento, lo que hace posible la elaboración de una estrategia de análisis que resulte informativa en un alto porcentaje de familias afectadas por HA.

Tabla 2: Polimorfismos de DNA en el gen del factor VIII de alto valor diagnóstico en hemofilia A.

| Ubicación <sup>1</sup><br>(TIPO) | Clase            | Heterocigocidad <sup>2</sup> |
|----------------------------------|------------------|------------------------------|
| Intrón 7<br>SNP                  | [G / A]          | 0.25                         |
| Intrón 13<br>VNTR                | [(CA)n]          | 0.69                         |
| Intrón 18<br>RFLP                | <i>Bcl</i> [+/-] | 0.46                         |
| Intrón 22<br>RFLP                | <i>Xba</i> [+/-] | 0.49                         |
| Intrón 22<br>VNTR                | [(GT)n (AG)n]    | 0.45                         |
| Intrón 25<br>RFLP                | <i>Bgl</i> [+/-] | 0.35                         |

<sup>1</sup>Ubicación física dentro del gen del factor VIII de coagulación. <sup>2</sup>Heterocigocidad reportada internacional, Peake *et al*, 1993.

### 1.7 Polimorfismo múltiple de la enzima de restricción *Xba*

El RFLP *Xba* localizado en el intrón 22 del gen del FVIII (Wion *et al*, 1986) ha mostrado la más alta heterocigocidad para un *locus* bialélico (0,47-0,49) en casi todos los grupos étnicos analizados (incluyendo caucásicos, asiáticos, etc) y sólo se han reportado valores algo menores en la población negra del Brasil y en India (Peake *et al*, 1993; Shetty *et al*, 1997).

Este RFLP reside a 4,3 kb del extremo *upstream* de la secuencia *int22h-1* de 9,5 kb que se encuentra repetida al menos dos veces fuera del gen del FVIII, en Xq28. Estas secuencias homólogas *int22h* ya han sido descritas más arriba y son aquellas que Naylor *et al*, 1995, definieron como mediadoras del evento de recombinación homóloga que resulta en la Inv22. Los sitios residentes en las copias extragénicas (*int22h-2* y -3) también son polimórficas respecto a la enzima *Xba*, sin embargo, su valor diagnóstico en estudios de ligamiento no es

significativo debido a su localización extragénica (aproximadamente a 2 centi Morgan, cM, del gen del FVIII) y a su baja frecuencia de heterocigocidad reportada (en conjunto 5-19%) (Chan *et al*, 1989; Lillicrap *et al*, 1990). Chan *et al*, 1989, designaron al polimorfismo intragénico residente en *int22h-1* como *XbaI* A y a los extragénicos residentes en *int22h-2* y -3, *XbaI* B y C. El método de detección de este RFLP basado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, Saiki *et al*, 1980) no resulta satisfactorio ya que los oligonucleótidos iniciadores o *primers* reconocen total homología con las tres copias de *int 22h* y amplifican sin distinción los RFLP *XbaI* A, B y C (Kogan *et al*, 1987). Por lo tanto, la genotipificación confiable y discriminada de los tres RFLPs de *XbaI* requiere de la aplicación de la técnica de *Southern blot* (Lillicrap *et al*, 1990). Numerosos laboratorios consideran a esta metodología como muy laboriosa además de requerir el uso de material radioactivo, razón por la cual, la utilización del RFLP *XbaI* A para análisis de portadoras y diagnóstico prenatal, ha sido casi descartada a pesar de su alta informatividad.

#### 1.8 Recombinación homóloga meiótica e inversión del intrón 22

La recombinación genética en eucariotas ha sido estudiada en detalle en ascomicetes ya que estos organismos permiten recuperar para su análisis en estructuras llamadas ascos, las esporas producto específico de una meiosis (con posibles eventos de recombinación homóloga asociados). Con excepción de los abordajes puramente bioquímicos, la recombinación es detectada por el análisis de la segregación de marcadores genéticos diferenciales entre las secuencias homólogas. Estos estudios, particularmente realizados en ascomicetes inferiores como las levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces pombe*, etc.) han permitido la elaboración y proposición de numerosos modelos moleculares para explicar el mecanismo de la recombinación homóloga meiótica y sus fenómenos genéticos asociados: el intercambio recíproco o *crossing over* (CO), la conversión génica o intercambio no recíproco y la segregación post-meiótica (PMS). Todos estos fenómenos pueden suceder asociados o individualmente; en células germinales o somáticas; entre cromosomas homólogos, cromátides hermanas o entre secuencias repetidas homólogas presentes en el mismo o distintos cromosomas. Las consecuencias de tales eventos son muy diferentes según el caso específico. Sin embargo la variedad de enzimas que las lleva a cabo es compartido por todos ellos y con procesos tales como la recombinación en células somáticas y la reparación del DNA (revisión en Solari, 1996). Estas enzimas se encuentran muy conservadas filogenéticamente en eucariotas.

La conversión génica consiste en la segregación alélica no-Mendeliana caracterizada por proporciones meióticas desbalanceadas (3:1) de un individuo heterocigota. Como ejemplo podemos citar la secuencia de genotipos (A A a a a a a) en las ocho esporas ordenadas del asco del ascomicete superior *Neurospora crassa*.

El otro fenómeno que se encontró asociado a recombinación homóloga es el de PMS que consiste en la segregación alélica anómala, caracterizada por proporciones meióticas balanceadas o desbalanceadas según el caso, donde se pone en evidencia una falta de reparación de posiciones con bases mal apareadas (*mismatches*) y denotan la formación de especies intermediarias heterodúplex. De este modo, un individuo heterocigota Aa, mediante PMS con segregación balanceada (4:4) podría presentar por ejemplo la secuencia A A a A A a a a y, con segregación desbalanceada, por ejemplo 5:3, podría presentar A A a A a a a a. Cada una de estas secuencias u órdenes de alelos de las esporas de los ascos, y su probabilidad de ocurrencia asociada, aportaron evidencia de alta significación cuali-cuantitativa para la discusión del mecanismo molecular de la recombinación homóloga meiótica. Por lo tanto no es sorprendente que sea con la evidencia obtenida en estos eucariotas inferiores que se discute la validez de los modelos teóricos para explicación del mecanismo de la recombinación homóloga meiótica.

Debido a la evidencia recogida en los numerosos experimentos realizados en levaduras que indican entre otros resultados que en tales eventos de recombinación homóloga, la conversión génica está fuertemente asociada al entrecruzamiento recíproco; fueron diseñados una serie de modelos moleculares culminando con los modelos de reparación de rupturas de doble cadena o de Szostak (Szostak *et al*, 1983). Estos modelos fueron basados en las propuestas pioneras de Holliday (1964) y más tarde de Messelson y Radding (1975). La características más importantes del modelo de Szostak son: (1) la iniciación del evento por una ruptura de doble cadena de DNA (DSB) y (2) la formación de dos uniones de Holliday (estructura cruciforme y desplazable de 4 cadenas de DNA asociadas por homología de secuencia) cuya resolución puede rendir 4 resultados distintos dos de ellos asociados a CO y los otros 2, no. La formulación original del modelo de Szostak incluía la formación y reparación de espacios sin información genética (*gaps*) formados por degradación de los extremos 3' del DSB, que resultaban en conversión génica obligatoria desde el dúplex no dañado (figura 4). Sin embargo, la evidencia indica que sólo los extremos 5' son degradados produciendo regiones de heterodúplex asimétricos (sobre segmentos a veces mayores a 1 kb) y que los *gaps* entre los extremos 3' son naturalmente de unas muy pocas bases o nulos alrededor del punto de DSB inicial (figura 4).



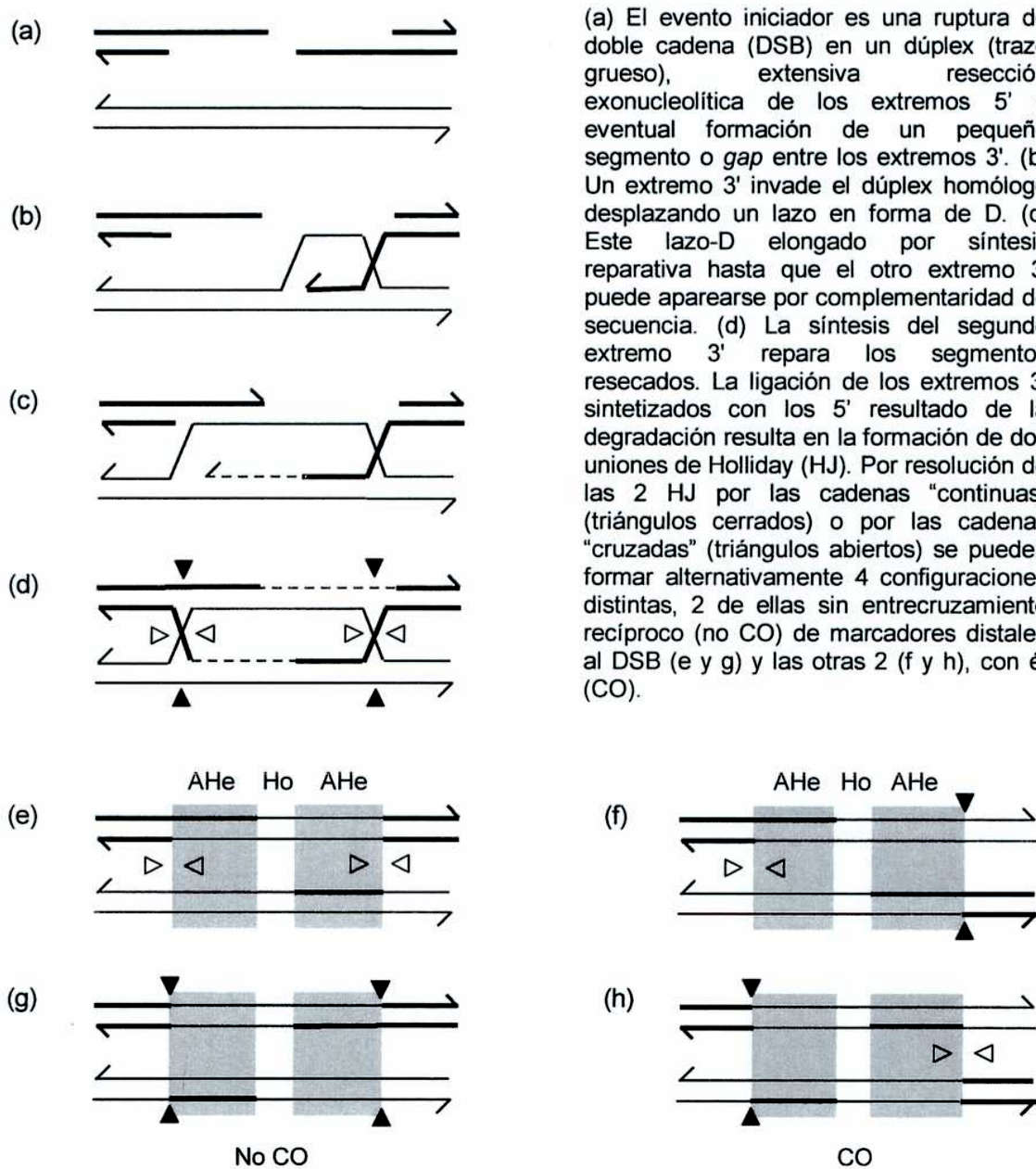
Si bien la gran mayoría de los datos recogidos pueden ser explicados bajo las suposiciones provenientes del modelo citado, algunas excepciones requirieron la elaboración de modelos alternativos. Uno de ellos, lo constituye una modificación del modelo de apareamiento de secuencias de cadena simple dependiente de la síntesis (SDSA) con CO propuesta inicialmente por Ferguson y Holloman, 1996, que incluye la presencia de una o 2 uniones de Holliday de un lado del DSB inicial cuya resolución puede dar con similar probabilidad, CO y no-CO y permite explicar la presencia de una especie heterodúplex asimétrico ubicado en una única orientación (figura 5) (revisión completa de modelos en Pâques y Haber, 1999). Una variante de este último modelo es llamado de captura de horquilla o de replicación de DNA dependiente de la recombinación e independiente del origen, que también puede resultar en CO y no-CO, asociado o no a conversión génica hacia el dúplex que sufrió el DSB, por resolución de un heterodúplex asimétrico, pero difiere de todos los mecanismos anteriores en que incluye síntesis de la cadena retrasada (*lagging strand*) además de la líder (*leading strand*).

Como se ha mencionado, la gran mayoría de los datos reportados en este campo proviene de estudios en bacterias (*Escherichia coli*), levaduras (*Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*), hongos superiores (*Ascobolus*, *Neurospora*, *Sordoria*) y células de mamífero (murinas, humanas); sin embargo ha sido recogida muy poca evidencia molecular que nos permita reconstruir eventos de recombinación homóloga ocurridos *in vivo* en meiosis humanas. Numerosos trabajos reportaron la ocurrencia de conversión génica asociado a recombinación homóloga (revisión en Klein, 1993). Es importante señalar que bajo cualquiera de los modelos explicados el fenómeno de conversión génica puede tener lugar en la región interna cualquiera sea el resultado final de los marcadores ubicados en los extremos de las secuencia involucradas (asociado o no a intercambio recíproco o *crossing over*).

La conversión génica alcanzó gran interés en el área de las ciencias médicas cuando se demostró que algunas mutaciones en la región del gen de la globina fetal humana (Powers y Smithies, 1986) eran causadas por la "transferencia" molecular de un segmento de DNA mutado desde su ubicación en una región homóloga, así como también entre secuencias nucleotídicas de genes y pseudogenes ( $\psi$ ) del vWF (Eikenboom *et al*, 1994).

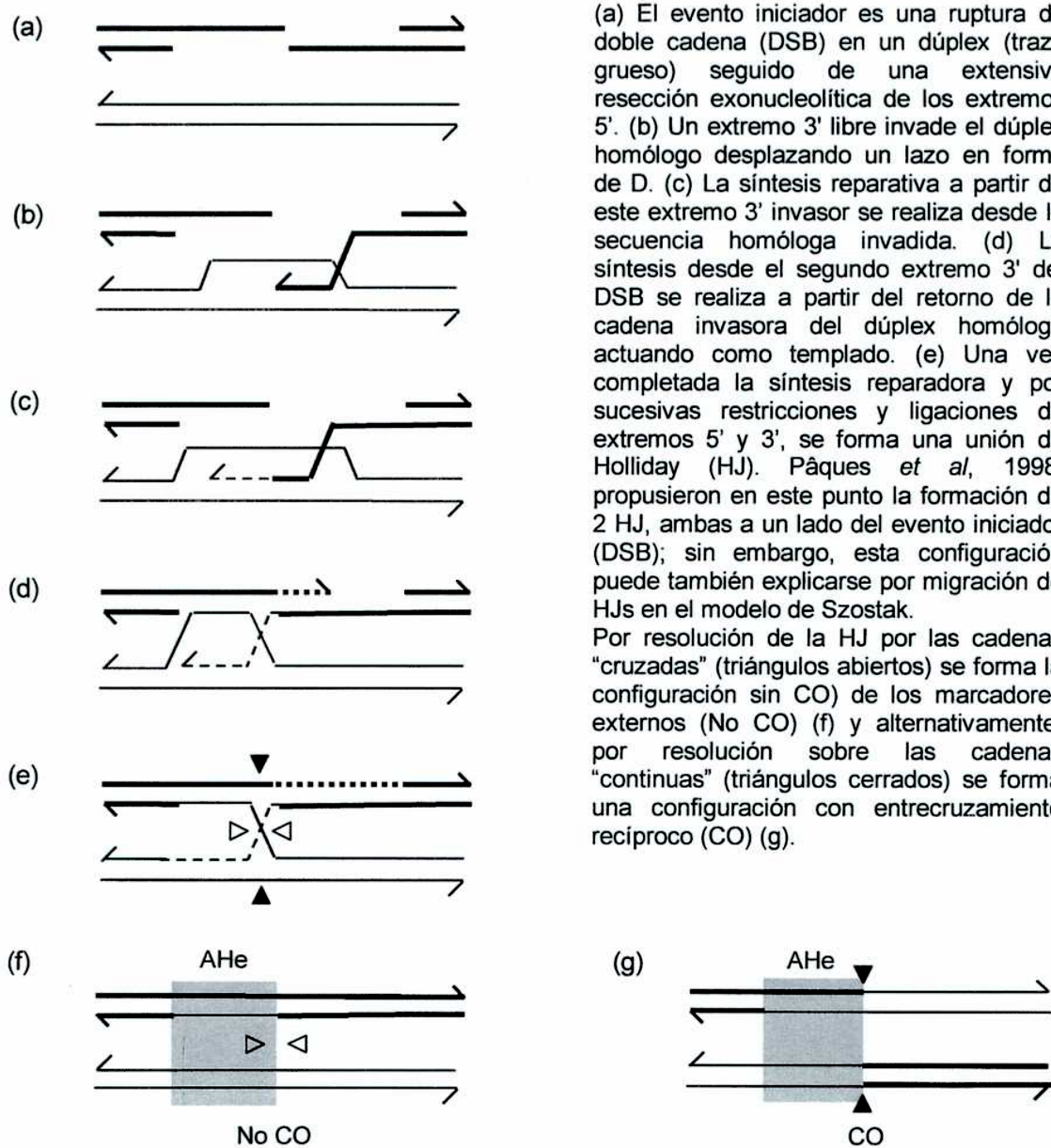
Como se mencionó más arriba, Naylor *et al*, 1995, aportaron evidencia conclusiva para demostrar que la inversión del intrón 22, es causada mediante recombinación homóloga meiótica intracromosómica, entre secuencias repetidas e invertidas sobre Xq28 (figura 3).

Figura 4: Modelo de Szostak o de ruptura de doble cadena y reparación.



Nótese que en [e y f] y en [g y h], a pesar de tratarse de arreglos distintos (no CO y CO), la región central es compartida debido a la orientación de la resolución las dos HJs. La formación de un segmento central definido por el *gap* entre extremos 3' degradados de DNA homodúplex (Ho) asociado a la conversión génica obligatoria hacia el dúplex que sufrió el DSB, no es requerida en la formulación actual del modelo pero está graficado debido a su presencia en el diseño original de Szostak *et al*, 1983. Este segmento estaría flanqueado por 2 segmentos de heterodúplex asimétrico (AHe) (asociado al 50% de conversión génica hacia el dúplex que sufrió el DSB) cuya orientación depende de la ubicación y resolución de las HJs y su extensión depende de la longitud de resección de los extremos 5'. Por migración de las HJs el modelo permite explicar por ejemplo la presencia eventual de heterodúplex simétricos yuxtapuestos a las regiones de AHe descritas.

Figura 5: Modelo de apareamientos de cadena simple dependiente de la síntesis con entrecruzamiento recíproco (SDSS).



Nótese que (f) y (g), a pesar de tratarse de arreglos distintos (no CO y CO) debido a la resolución de la HJ, ambos arreglos comparten una región central de heterodúplex asimétrico (AHe) (asociado al 50% de conversión génica hacia el dúplex que sufrió el DSB). La ubicación y orientación exactas de este segmento de AHe depende en este ejemplo de la coincidencia entre el DSB inicial y la posición final de la HJ. Por migración y resolución de la HJ, por la longitud de la resección 5' y la posibilidad de síntesis reparativa a partir de diferentes templados, el modelo adquiere una gran plasticidad para proveer explicación a evidencia diferente.

La secuencia *int22h*, contiene numerosos elementos genéticos, algunos de los cuales han sido reportados como puntos calientes (*hot spots*) para el intercambio molecular (repeticiones de la secuencia *alu*, secuencias *LINE-1*, promotores de genes de expresión constitutiva y una secuencia similar al consenso *Chi*) (Rüdiger *et al*, 1995). La obtención de evidencia a partir de individuos hemofílicos con la inversión es valiosa ya que permite estudiar en el cromosoma X anómalo todas las secuencias que han estado involucradas en el evento. Esto es posible por la singular capacidad de las inversiones de conservar ambas secuencias homólogas sobre las mismas moléculas afectadas. En paralelo, el estudio de un grupo de varones sin la inversión nos va a presentar, el "estado" de esas secuencias antes de producirse el evento de recombinación. La *Inv22* reúne las condiciones teóricas necesarias para la constitución de un modelo experimental para estudiar el intercambio recíproco y sus fenómenos asociados, sin embargo, la escasez de diferencias entre las copias intra y extragénicas de *int22h* reportadas por Naylor *et al*, 1995, hacen difícil la elaboración de estrategias que permitan analizar el evento.

La presencia de marcadores polimórficos dentro de *int22h*, tales como el RFLP *XbaI*, que presenta una gran diferencia entre las frecuencias alélicas de sus copias intra y extragénicas, permitirá por comparación poblacional de frecuencias, sacar conclusiones sobre la interacción molecular asociada a la *Inv22*, como si utilizáramos diferencias netas o consistentes entre las copias interactuantes. Asimismo, la ventaja del uso de la *Inv22* como modelo experimental radica en que se observan directamente las evidencias de un evento genético real sin el uso de estrategias *in vitro*, ni constructos moleculares.

## 2. OBJETIVOS

Dado que la información existente sobre la genética molecular de la hemofilia A y sus consecuencias clínico-diagnósticas proviene de otros países y que a menudo ésta no puede ser extrapolada a poblaciones con distinta composición étnica y realidad socio-económica; el primer objetivo de esta tesis es sentar las bases para el desarrollo de una estrategia para análisis de portadoras en Argentina. Asimismo, la Inv22 y los polimorfismos de DNA del intrón 22 del gen del FVIII, nos permiten la presentación de un modelo experimental para el estudio del mecanismo molecular de la recombinación homóloga en humanos y sus fenómenos moleculares asociados. Estos objetivos se detallan punto por punto a continuación.

- Determinar la frecuencia de la Inv22 en familias Argentinas con SHA.
  - a. Diagnóstico de portadoras por el método directo, en familias informativas para la Inv22.
  - b. Análisis de correlación entre la Inv22 y el desarrollo de anticuerpo inhibidor neutralizante y la condición esporádica o familiar de la enfermedad.
- Diseñar nuevas estrategias más rápidas y sencillas que las actuales para la genotipificación de polimorfismos de DNA en el intrón 22 del gen del FVIII.
  - a. Análisis del RFLP *Xba*I del intrón 22 aplicando la metodología de PCR de larga distancia.
- Investigar nuevos marcadores en el intrón 22 del gen del FVIII.
  - a. Monitoreo de sitios de restricción, candidatos a ser polimórficos en la región *int22h*.
  - b. Caracterización del RFLP *Msp*I en población normal sin hemofilia.
- Estudiar el mecanismo de recombinación homóloga en humanos mediante el uso de polimorfismos de DNA y la inversión del intrón 22.
  - a. Diseño y caracterización del modelo experimental usando la Inv22 y los RFLPs de *int22h* (*Xba*I y *Msp*I), como marcadores moleculares.
  - b. Aplicación del modelo experimental propuesto comparando las frecuencias alélicas de los marcadores en poblaciones humanas con y sin la Inv22.

### 3. MATERIALES Y METODOS

#### 3.1 Poblaciones estudiadas

##### 3.1.1 Familias con Hemofilia A severa

Se recolectaron muestras de 8-12 ml de sangre periférica de 103 miembros de 47 familias Argentinas con hemofilia A severa (SHA) incluyendo 49 hemofílicos, 23 madres y 31 parientes mujeres. La SHA fue diagnosticada en el Departamento de Medicina Transfusional, Hemoterapia y Hemofilia del Instituto de Investigaciones Hematológicas *Mariano R. Castex* de la Academia Nacional de Medicina (IIHema-ANM), Buenos Aires, Argentina, según los criterios médico-clínicos y bioquímicos corrientes (FVIII:C < 1%). Se recabaron datos acerca de los antecedentes de la enfermedad en cada familia lo que nos permitió clasificarla en hemofilia esporádica o familiar, y el desarrollo de anticuerpo inhibidor neutralizante contra el FVIII en los hemofílicos. La hemofilia fue considerada de origen familiar en aquellas familias con 2 o más generaciones clínicamente afectadas y esporádica o aislada cuando no se ajustaron a esa definición. Bajo este criterio, 22 de las 47 familias con SHA fueron clasificadas como esporádicas. Para estudiar la presencia de anticuerpo anti-FVIII, las familias con SHA (cada una con su mutación causal específica) fueron asociadas a dos categorías según el título de inhibidor: negativo (-) o indetectable y positivo (+), agrupando en esta clase, familias con al menos un hemofílico con bajo o alto título de inhibidor (menos de 5 Unidades Bethesda, BU, o más de 5 BU, respectivamente). Diecisiete familias con SHA mostraron positividad para inhibidor y 30, no. En este último grupo, 5 de los 30 fueron HIV (virus de la inmunodeficiencia humana) seropositivos, mientras que 1 de los 17 en el grupo con inhibidor. Dentro del grupo con inhibidor, 4 familias mostraron discordancia (familias con hemofílicos que presentan distinto estatus de inhibidor). Se dispuso también de un grupo de 11 pacientes hemofílicos A severos con la inversión del intrón 22 (Inv22) de la población de Gales del Sur, diagnosticados y estudiados en el Departamento de Hematología de la *University of Wales College of Medicine (UWCM)*, Cardiff, Reino Unido de Gran Bretaña.

##### 3.1.2 Colección Argentina de DNA de Individuos Normales no relacionados

Fueron procesadas 73 muestras de sangre o bien concentrado de glóbulos blancos (*buffy coat*) de individuos Argentinos, dadores voluntarios no relacionados, del banco de sangre del IIHema-ANM, incluyendo 18 mujeres y 55 varones, representando una colección de 91

cromosomas X no relacionados. Además del sexo, fueron recolectados datos de edad (comprendida entre 18 y 63 años) y grupo sanguíneo ABO: (40 individuos del grupo O, 28 del grupo A y 5 del grupo B).

### 3.1.3 Colección Galesa de DNA de Individuos Normales no relacionados

Fueron utilizadas 85 muestras de sangre de donadores voluntarios tomados al azar de una colección de 150 varones no relacionados del banco de sangre de la UWCM, Cardiff, Reino Unido de Gran Bretaña. Este grupo constituye una muestra representativa de la población caucásica de Gales del Sur previamente descrita (Bowen *et al*, 1998).

### 3.1.4 Grupo de individuos para la validación del nuevo método de análisis del RFLP XbaI por PCR de larga distancia

Dieciséis individuos (4 varones y 12 mujeres) de estatus del RFLP XbaI A (intragénico) B y C (extragénicos) previamente genotipificados por análisis de *Southern blot* fueron seleccionados por proveer múltiples representaciones de una variedad de genotipos (tabla 7, capítulo segundo).

## 3.2 Extracción y purificación de DNA a partir de sangre periférica

La sangre anticoagulada con etilen-diamin-tetra acetato de sodio (EDTA) al 5% fue centrifugada por 10 minutos a 300 g y el plasma fué descartado. El remanente fue homogeneizado por inversión con un volumen de buffer de lisis de glóbulos rojos (RCLB) (tris/HCl 10 mM pH 8, NaCl 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM), centrifugado por 10 min. a 300 g. El *pellet* de leucocitos fue lavado 3-4 veces en 7 ml de RCLB hasta la obtención de un sobrenadante límpido. La muestra fue luego homogeneizada en tris/HCl 10 mM pH 7,8, 5 mM EDTA, 0,5 % dodecil sulfato de sodio (SDS) y digerida con proteinasa K (200 ug/ml) durante una noche a 37° C, o alternativamente, 3 horas a 55° C.

### 3.2.1 Método de fenol/cloroformo

Se continuó con una extracción de la fase acuosa con un volumen de fenol (saturado en Tris/HCl 0,5 M pH 8), otra en un volumen de fenol : cloroformo - alcohol isoamílico (IAC) (25 : 24 - 1) y una extracción final en un volumen de IAC (Sambrook *et al*, 1989). El DNA de alto peso molecular fue precipitado con NaCl en concentración de 60 mM y 1,5 volúmenes de alcohol etílico absoluto (100%).

### 3.2.2 Método de *salting out*

Alternativamente, se adicionaron 0,4 volúmenes de solución saturada en NaCl (6 M), se homogeneizó, incubó en hielo por 15 minutos, centrifugó a 500 g por 10 min. y el DNA de alto peso molecular en el sobrenadante (libre de proteínas) fue precipitado con 1,5 volúmenes de alcohol etílico absoluto (100%) (Lahiri y Nuremberg, 1991).

El precipitado fue lavado con etanol 70%, luego 100%, se lo dejó secar a temperatura ambiente 15-20 min., y se lo resuspendió en 150-1000 ul de buffer TE (tris/HCl 10 mM, EDTA 1 mM).

La concentración del DNA obtenido fue estimada por espectrofotometría UV (Spectronic 21) a 260 y 280 nm, considerando  $1 \text{ OD}_{260} = 50 \text{ ug DNA doble cadena (DS) / ml}$ . La estimación de pureza de ácidos nucleicos relativa a proteínas se realizó mediante la relación  $\text{OD}_{260} / \text{OD}_{280}$  y fue considerada aceptable cuando resultó mayor a 1,5. La calidad del DNA en términos de alto peso molecular fue estimada mediante minielectroforesis en gel de agarosa al 1% y bromuro de etidio (EtBr) a 0,25 ug/ml.

### 3.3 Preparación de la sonda para *Southern blot*

Se dispuso del plásmido p482.6 (Catálogo.# 57203, American Type Culture Collection, ATCC) gentileza del Prof. Dr. Héctor Targovnik (FFyB-UBA) y de un subclon de p482.6 que sólo incluye el fragmento *EcoRI-SacI* de 0,9 kb de p462.6 (sonda F8A o IVS22 F8A) gracias al aporte del Dr. Eduardo Tizzano (Hospital *SANT PAU*, Barcelona, España). Ambos plásmidos recombinantes derivan del vector pUC19 (2,7 kb).

Fabricación de bacterias competentes para transformación de cultivos en medio líquido, *Luria-Bertani*, LB (bacto-triptona 1 % p/v, extracto de bacto-levadura 0,5 % p/v NaCl 1 % p/v, pH 7) en fase exponencial ( $\text{OD}_{550} \cong 0,48$ ) de la cepa DH5 $\alpha$  de *Escherichia coli* por el método de coprecipitación con CaCl<sub>2</sub>, incubando en hielo usando solución TLB I (KAcO 30 mM, KCl 100 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, MnCl<sub>2</sub> 50 mM, glicerol 5%, pH 5,8, esterilizada por filtración) y luego, TLB II (CaCl<sub>2</sub> 75 mM, KCl 10 mM, glicerol 5%, pH 6,5, esterilizada por filtración) a -70° C. Entre otras características genéticas, DH5 $\alpha$  [*supE44*, *lac* $\Delta$ U169 ( $\phi$ 80 *lacZ*  $\Delta$ M15), *hsd* R17, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *relA1*] tiene abolida la capacidad para degradación de DNA exógeno y permite complementación- $\alpha$  de la  $\beta$ -galactosidasa con vectores del tipo pUC.

La transformación de las bacterias competentes con diluciones de los plásmidos p482.6 y F8A (menos de 25 ng), en paralelo con vector no-recombinante (pUC19) y un control sin



DNA (prueba del antibiótico) fue realizada en hielo durante 30 min., luego un *shock* térmico a 42° C, 90 segundos, 2 min. en hielo e incubados a 37° C en medio LB sin antibiótico. Los transformantes fueron plaqueados a 37° C en medio semisólido LB-agar (bacto-agar 1,5 % p/v en LB), con presión selectiva (ampicilina 60 ug/ml) durante una noche en presencia de 20 mg/ml X-gal (5-bromo, 4-cloro, 3-indol, β-D galactósido) en dimetilformamida (DMF) y 200 mg/ml de IPTG (iso-propil- tio, β-D galactósido) para monitoreo por el método de complementación-α (Ullman *et al*, 1967).

Las colonias recombinantes (colonias blancas, por la inserción inactivante de la complementación-α de la actividad β-galactosidasa entre vector-huésped, Horwitz *et al*, 1964) fueron almacenadas en punciones en medio semisólido (*stabs*) a temperatura ambiente y al abrigo de la luz, y en solución de glicerol al 15% en agua a -70° C. El DNA plasmídico de clones recombinantes fué extraído por el método de lisis rápida con álcali y SDS (Sambrook *et al*, 1989) y monitoreado estructuralmente (inserto de longitud específica de 0,9 kb) por doble digestión con las enzimas de restricción *EcoRI* y *SacI* y análisis en minielectroforesis en gel de agarosa al 1 %, EtBr 0,25 ug/ml.

Para las minipreparaciones de los plásmidos recombinantes fue utilizado un *kit* comercial (Wizard Miniprep, Promega) y se procedió siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, los clones recombinantes fueron cultivados en medio líquido, centrifugados y resuspendidos con solución conteniendo RNAsa (100 ug/ml) y el DNA plasmídico es extraído por lisis alcalina (NaOH 0,2 M, 1 % SDS), neutralizado y purificado en minicolumnas con resina de 66,9 % de clorhidrato de guanidina (Wizard Miniprep DNA purification Resin, Promega) eluidas en TE 10:1 a 65° C. Luego se verificó la extracción por minielectroforesis en gel de agarosa al 1%, EtBr 0,25 ug/ml.

El inserto aislado para ser usado como sonda fue obtenido en forma preparativa por doble digestión del plásmido recombinante con las enzimas de restricción *SacI* y *EcoRI* (ver digestión de DNA plasmídico), con evaluación de concentración del fragmento de 0.9 kb por comparación con bandas de DNA lineal de masa molecular semejante valoradas del bacteriófago lambda/*HindIII*. El inserto de 0.9 kb fue aislado por minielectroforesis en gel de agarosa de bajo punto de fusión al 0,7%, escisión de la banda electroforética, dilución en agua destilada para obtención de una concentración específica y división en alícuotas (25) conteniendo cada una aproximadamente 40 ng de sonda en 25 ul de LMP agarosa (< 0,5 %), listas para servir de templado específico para la marcación isotópica por el método de *random priming*.

### 3.4 Digestión de DNA genómico y plasmídico con enzimas de restricción

Para análisis por *Southern blot* fueron digeridos 5 -8 ug de DNA genómico por cada muestra, en el buffer de restricción recomendado por el fabricante. Para *BclI*, en 1x buffer C (Promega) (10 mM tris/HCl pH 7,9, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub> y 1 mM de ditioneitol, DTT), para *XbaI*, 1x buffer *MultiCore*, MC (Promega) (25 mM tris/acetato pH 7,8, 100 mM acetato de potasio, 10 mM acetato de magnesio y 1 mM DTT) con albúmina sérica bovina acetilada, (BSA), 0,1 mg/ml y para *KpnI* 1 x buffer reactivo 4 (Gibco BRL) (20 mM tris/HCl pH 7,4, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl o bien 1 x buffer MC (Promega). Se utilizó una actividad específica de 7 U de enzima por ug de DNA. La enzima *BclI* fue agregada en 3 pulsos a intervalos de 1 hora e incubada a 50° C durante 16 hs, las demás fueron agregadas en un pulso e incubadas a 37° C durante 16 hs.

Para restricción de DNA plasmídico 1-2 ug del vector recombinante fueron doblemente digeridos con 7 unidades/ug de las enzimas *EcoRI* y *SacI* en un volumen final de 50 ul en buffer 1 x MC (Promega) y BSA 0,1 mg/ml, a 37° C, durante 16 hs.

### 3.5 Electroforesis y transferencia (*Southern blot*)

Una alícuota de 1 ul de los digestos de restricción fueron electroforetados en minigeles de agarosa al 1% para verificar digestión completa y luego separados analíticamente mediante electroforesis en geles (11 x 14 cm) de agarosa al 0,7%, EtBr 0,25 ug/ml en buffer 0,5 x TBE (TBE 1 x: tris/borato 89 mM, EDTA 1 mM) a 2-5 V/cm y a temperatura ambiente. El buffer de siembra 6 x contenía 30% de glicerol, 0,25% de azul de bromofenol y 0,25% de xylene cyanol en agua deionizada. Junto a las muestras se sembró un marcador de tamaño molecular, el bacteriófago lambda digerido con la enzima de restricción *HindIII*. Los geles fueron visualizados sobre transiluminador UV de 300 nm y fotografiados utilizando una cámara Polaroid GelCam con filtros Kodak (Wratten filter No 22 y 2A) y película blanco y negro Polaroid 667.

Luego de la electroforesis se realizó la transferencia del DNA a soporte sólido (membranas de nylon, ZetaProbe GT, Bio-Rad) en condiciones de alta fuerza iónica (Sambrook *et al*, 1989). Para ello se incubó los geles 15 minutos en HCl 0,25N (depuración), se los desnaturizó 30 min. en solución de NaOH 0,4M (con cambio de solución a los 15 min.), se lo neutralizó 45 min. en Tris/HCl 0,5 M, NaCl 1,5 M (con cambio de solución a los 25 minutos) y lavado en 2 x solución salina citrato (SSC) (1,5 M cloruro de sodio y 0,15 M

citrato de sodio). Las transferencias se realizaron por capilaridad en 10 x SSC durante la noche, como fue descrito por Southern, 1975. Al día siguiente las membranas fueron lavadas en 2 x SSC y el DNA transferido fue fijado covalentemente (*crosslinked*) por homeado a 80° C durante 2 horas o por exposición a luz UV (300 nm), 10 minutos.

### 3.6 Hibridación con sondas radioactivas

La pre-hibridación fue realizada durante más de 4 hs. a 42° C en estufa hibridadora (Techne) en solución de pre-hibridación: 5 x SSC, 5 x Denhardt (ficoll 0,5 g, polivinilpirrolidona 0,5 g y BSA 0,5 g), 0,5% SDS, 100 ug/ml DNA de esperma de salmón sonificado y desnaturalizado, sulfato de dextrán 75 mg/ml, 50% v/v de formamida deionizada. Una alícuota de 40 ng de la sonda preparada en 25 ul de agarosa de bajo punto de fusión (< 0,5%) fue marcada en un volumen final de 50 ul con 50 uCi de [ $\alpha^{32}$ P] dCTP (3.000 Ci/mmol), 20 uM de dATP, dGTP, y dTTP; en buffer *RP*: 0,2 M HEPES, 51 mM tris/HCl, 5,1 mM MgCl<sub>2</sub>, 9,9 mM 2-mercaptoetanol, 0,4 mg/ml BSA, 5,4 unidades OD<sub>260</sub>/ml de oligodesoxiribonucleótidos (hexámeros degenerados) a pH 8, durante 3 hs a temperatura ambiente (25° C), con 3 unidades del fragmento *Kleanow* de la DNA polimerasa I, por la reacción de *random priming* (Gibco BRL). La reacción fue detenida por agregado de 5 ul de solución de EDTA 0,2 M pH 7,5 y la sonda aislada por cromatografía de exclusión molecular en *Sephadex-G50*. La sonda obtenida (fracción eluida con el volumen muerto de aproximadamente 1 ml) fue incorporada para la hibridación de las membranas, sobre la solución de pre-hibridación, incubando a 42° C en la estufa hibridadora (Techne) durante una noche. Luego, se realizaron secuencialmente: 1 lavado a temperatura ambiente, 15 min en 2 x SSC y 1% SDS, 1 lavado a 50° C, 30 min en 1 x,SSC y 0,1% SDS y 1 o 2 lavados a 50-65° C, 30 min en 0,1 x SSC y 0,1% SDS. Las membranas hibridadas y lavadas fueron expuestas a película radiográfica (CURIX ORTHO ST-G2, AGFA) en chasis de 25 x 30 cm entre pantallas intensificadoras, a -70° C durante 24 -72 hs. Las placas autoradiográficas fueron reveladas, fijadas, lavadas y secadas en procesador automático.

La investigación por *Southern blot* de la *Inv22* usando la sonda F8A y la enzima de restricción *Bcl*I, muestra señales normales de hibridación en individuos sin la inversión (N), de 21,5; 16 y 14 kb que corresponden a las copias intragénica, y extragénicas distal y proximal de la secuencia *int22h*, respectivamente. Los hemofílicos A severos con la *Inv22* distal o tipo 1 presentan un patrón específico (D) de 20; 17,5 y 14 kb mientras que aquellos

con la Inv22 proximal o tipo 2 (P) muestran señales a 20; 16 y 15,5 kb. Las mujeres portadoras de la Inv22 presentan patrones combinados N/D o N/P según el caso.

Por su parte, el análisis de *Southern blot* del RFLP *XbaI* usando la sonda F8A y la doble digestión *XbaI-KpnI* muestra señales de hibridación en 6,2 y 4,8 kb para los alelos [-] y [+], respectivamente para el polimorfismo intragénico o A, mientras que los *loci* extragénicos B y C dan señales en 6,8/5,4 kb y 6,6/5,2 kb para los alelos [-]/[+], respectivamente (Lillicrap *et al*, 1990).

### 3.7 Reacciones PCR de larga distancia (LD PCR)

Las reacciones PCR de larga distancia fueron diseñadas por adaptación de la publicada originalmente por Barnes, 1994.

Los datos de las secuencias nucleotídicas para elaboración de los mapas de restricción y para el diseño de los oligonucleótidos iniciadores o *primers* para todas las reacciones PCR fueron obtenidos de la base de datos GenBank. La tabla 3 muestra las características asociadas a cada oligonucleótido utilizado como *primer* para las reacciones: secuencia de bases, clave de acceso al GenBank o *locus*, posición específica del *primer* dentro de ese archivo de secuencia, en que PCR es utilizado y en que orientación.

Fueron diseñadas 3 LD PCR: (1) UI LD PCR con los *primers* PSF y CLR (tabla 3) definen un amplímero de 6792 bp específico de la región río arriba (*upstream*) del intrón 22 del gen del FVIII incluyendo parte de *int22h-1*. (2) DI LD PCR con los *primers* XEF y XER (tabla 3) definen un producto de 6573 bp específico de la región río abajo (*downstream*) del intrón 22 del gen del FVIII incluyendo parcialmente a *int22h-1*. (3) DE LD PCR con los *primers* XEF y BSR que enmarcan un producto de 6574 bp específico de la región río abajo (*downstream*) de las dos copias extragénicas de *int22h* (*int22h-2* y 3) de ubicación telomérica al gen del FVIII, también sobre Xq28. Los productos de estas 3 reacciones LD PCR fueron analizados directamente (con la enzima de restricción *XbaI*) o bien utilizadas como "primera vuelta", para amplificación de la copia y región específica de *int22h*, en un abordaje de PCR anidada o *nested* (N PCR).

Las condiciones óptimas para las LD PCRs fueron similares: 20 ng/ul de DNA genómico, 50 mM tris/HCl pH 9,2 a 25° C, 1,75 mM  $MgCl_2$ , 5% dimetil sulfóxido (DMSO), 16 mM  $(NH_4)_2SO_4$ , 0,4 - 1 de cada uno de los *primers* según cada LD PCR específica (DI, 1; UI, 0,4 y DE, 0,6 uM de cada *primer*), 140 uM de 7-deaza dGTP (40% del total de dGTP), 210 uM de dGTP, 350 uM de cada uno de dCTP, dTTP y dATP, y 0,104 U/ul de la combinación de

DNA polimerasas *Taq/Pwo* (Expand long template DNA polimerases, Boehringer Mannheim). Estas concentraciones fueron ajustadas a volúmenes totales de 25, 15, 10 o 5 ul, según las cantidades de producto necesarias para cada tipo de análisis. Las reacciones fueron realizadas en 2 termocicladores, Tecne (Cambridge, UK) con tapa activa térmicamente (*hot bonnet*) y en el modelo 480 PE-ABI (Perkin Elmer-Applied Biosystem) sin este dispositivo, por lo que fue necesario cubrir las reacciones con una fase superior de aceite mineral para evitar la convección de la fase acuosa, por gradiente térmico.

Las condiciones de termociclado comprendieron una desnaturalización a 94° C por 30 segundos, hibridación específica a 65° C por 1 minuto y elongación a 68° C por 15 min. en los primeros 10 ciclos, seguidos por 20 ciclos como los descritos pero con la diferencia de la adición de 20 segundos por ciclo en el paso de elongación a 68° C. El termociclado fue precedido por una incubación de 4 min. a 94° C y finalizado por una extensión adicional de 7 min. a 68° C.

### 3.8 Reacciones PCR de corta distancia (S PCR)

Las reacciones PCR de corta distancia fueron diseñadas por adaptación de la publicada originalmente por Saiki *et al*, 1988.

#### 3.8.1 PCR simple para amplificación del RFLP *BclI*

Las condiciones de reacción utilizadas fueron, 12ng/ul de DNA genómico, 10 mM tris/HCL pH 9 (a 25° C), 50 mM KCl, 0,1% triton X-100, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 uM de cada uno de los 4 dNTPs, 0,8 uM de los primers BC1 y BC2 (tabla 3, Kogan *et al*, 1987), 0,04 U/ul de Taq DNA polimerasa (Promega) en un volumen final de 25 o 15 ul.

Las condiciones de ciclado comprenden 35 ciclos de 30 seg. a 94° C, 30 seg. a 55° C y 1 min. a 72° C, con una desnaturalización inicial de 2 min. a 94° C y una extensión final de 10 min. a 72° C en un termociclador con *hot bonnet* (Techne). Este producto PCR de 157 bp fue utilizado para genotipificación directa del RFLP *BclI* del intrón 18 del gen del FVIII.

#### 3.8.2 PCR simple para amplificación en conjunto de los RFLPs *MspI* intragénico (A) y extragénicos (B y C)

Las condiciones de reacción fueron, 10 ng/ul de DNA genómico, 10 mM tris/HCL pH 8,5, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 uM de cada uno de los 4 dNTPs, 0,4 uM de los *primers* DWF y

DWR (tabla 3), 0,02 U/ul de Taq DNA polimerasa (Perkin Elmer o Promega) en un volumen final de 25 ul.

Las condiciones de ciclado comprenden 35 ciclos de 30 seg. a 94° C, 1 min. 58° C y 1 min. a 72° C, con una desnaturalización inicial de 2 min. a 94° C y una extensión final de 10 min. a 72° C en un termociclador PE-ABI modelo 480 o Techne con *hot bonnet*. Como el templado de esta amplificación fué DNA genómico conteniendo las 3 copias de *int22h*, este producto PCR de 176 bp definido por DWF y DWR (DW PCR) fue utilizado para genotipificación indiscriminada de los 3 RFLPs de *MspI* juntos (RFLP *MspI* A, B y C).

### 3.8.3 PCR anidada para amplificación específica de los RFLPs *MspI* A y BC por separado

Las condiciones de esta reacción usada como "segunda vuelta" fueron iguales a las descritas en el párrafo anterior salvo que se efectuaron 30 ciclos en lugar de 35 y que el sustrato de esta N PCR fué: 0,04 ul de una dilución 1:200 de LD PCR (primera vuelta) en lugar de DNA genómico. La primera vuelta se utilizó para darle especificidad al producto obtenido. Así pudieron analizarse los productos definidos por los *primers* DW (176 bp); resultando UI, DI o DE específicos según se utilizaran como primera vuelta las LD PCRs UI, DI o DE, respectivamente.

### 3.8.4 PCR anidada para amplificación del RFLP *XbaI*

Las condiciones de la reacción utilizada como "segunda vuelta" fueron: 0,12 ul de LD PCR (primera vuelta) por ul de N PCR, 10 mM tris/HCl. pH 8,5, 50 mM KCl, 1,75 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 uM de cada uno de los 4 dNTPs, 0,5 uM de los *primers* XIF y XIR (tabla 3), 0,02 U/ul de Taq DNA polimerasa (Perkin Elmer o Promega) en un volumen final de 25 ul.

Las condiciones de ciclado comprenden 30 ciclos de 30 seg. A 94° C, 30 seg. A 67° C y 1 min. a 72° C, con una desnaturalización inicial de 2 min. a 94° C y una extensión final de 10 min. a 72° C en un termociclador PE-ABI modelo 480 o Techne con *hot bonnet*. Este producto de 181 bp, obtenido por N PCR (1ra vuelta: DI LD PCR) fue utilizado para genotipificación del RFLP *XbaI* A del intrón 22 del gen del FVIII.

## 3.9 Digestión y análisis de productos PCR con enzimas de restricción

Los productos PCR obtenidos fueron primero monitoreados por minielectroforesis en gel de agarosa para verificar su especificidad y estimar su concentración. De acuerdo a la concentración un volumen de 3-7 ul de reacción PCR fueron digeridos con 5-7 unidades (U)

de enzima de restricción en un volumen final de 10-15 ul bajo las condiciones recomendadas por el fabricante. Para *BclI* se utilizaron 7 U para 5-7 ul de producto PCR en 1x buffer C (Promega) (10 mM tris/HCl pH 7,9, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub> y 1 mM de ditioneitol, DTT) incubando 16 hs. a 50° C, para *XbaI*, 5 U para 4-7 ul de LD PCR, en 1x buffer MC (Promega) (25 mM tris/acetato pH 7,8, 100 mM acetato de potasio, 10 mM acetato de magnesio y 1 mM DTT) con AcBSA, 0,1 mg/ml, incubando 16 hs. a 37° C y para *MspI* 7 U para 5-7 ul de N PCR en 1 x buffer B (Promega) (6 mM tris/HCl pH 7,5, 50 mM NaCl, 6 mM MgCl<sub>2</sub> y 1 mM DTT) o en reactivo 1 (Gibco BRL) (50 mM tris/HCl pH 8, 10 mM MgCl<sub>2</sub>) incubando 16 hs. a 37° C. Para la enzima *AvaI* y *HaeIII* se utilizaron 6 U para 7 ul de producto en 1 x *buffer* reactivo 2 (Gibco BRL) (50 mM tris/HCl pH 8, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>) incubando 16 hs. a 37° C. Para la enzima *BstXI*, 5 U fueron usadas para digestión de 5 ul de producto PCR en 1 x *buffer* E (Promega) (6 mM tris/HCl pH 7,5, 100 mM NaCl, 6 mM MgCl<sub>2</sub> y 1 mM DTT) incubando 16 hs. a 37° C.

Los digestos de los productos de LD PCR fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa 0,8% y EtBr 0,25 ug/ml y aquellos de S PCRs mediante agarosa 1,5-3% o bien en geles de poliacrilamida no desnaturizante, al 6% (acrilamida:bis-acrilamida 19:1). Los geles fueron visualizados sobre transiluminador UV de 300 nm y fotografiados utilizando una cámara Polaroid GelCam con filtros Kodak (*Wratten filter* N° 22 y 2A) y película blanco y negro Polaroid 667. Alternativamente, los geles de poliacrilamida fueron coloreados por tinción con plata coloidal y visualizados sobre transiluminador de luz blanca y fotografiados con las mismas cámara y película, pero sin filtro.

### 3.10 Caracterización del RFLP *MspI* A: secuenciación automática de productos PCR

Fue utilizada una N PCR compuesta por una primera vuelta de DI LD PCR y una segunda de DW PCR, descritas más arriba para la obtención del producto de 176 bp conteniendo el sitio polimórfico *MspI* A [+]. Los productos PCR fueron purificados usando minicolumnas de cromatografía específicas para productos PCR (fragmentos mayores a 100 bp) (High Pure PCR Purification columns, Boehringer Mannheim) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, 95 ul de PCR fueron sembrados con 500 ul de solución de unión a la matriz de la columna, luego se pasaron soluciones de lavado 1 y 2 (500 ul), por último el DNA fue eluído en 50 ul de agua a 60° C. La concentración relativa y especificidad del producto PCR templado para la reacción de secuenciación fueron valoradas por mini-electroforesis en gel de agarosa. La reacción de secuenciación por el método de Sanger o de terminadores de

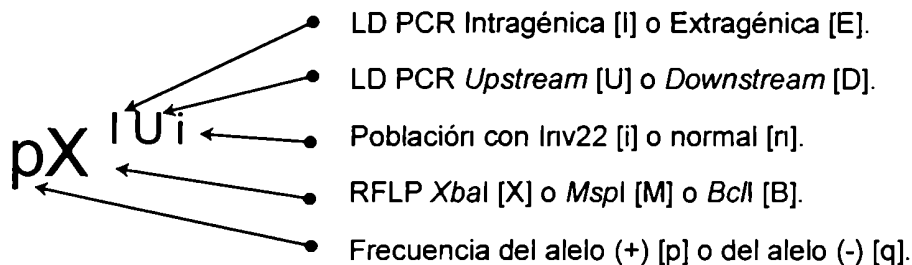
cadena fue llevada a cabo usando media reacción del *kit* BIG DYE (Perkin Elmer-Applied Biosystem). Cinco  $\mu$ l del eluato final de producto PCR fueron secuenciados en un volumen final de 10  $\mu$ l, en ambas direcciones usando 3,2 pmoles de los primers DWF y DWR, con mezclas de dNTPs y ddNTPs-conjugados cada uno con un fluorocromo específico y 0,5 U de Ampli-Taq DNA Polimerasa (Perkin Elmer) y sometidos a 25 ciclos de 30 seg. a 95° C, 30 seg. a 50° C y 4 min. a 60° C. El producto de la reacción de 10  $\mu$ l (más 50  $\mu$ l de agua) fue precipitado con 6  $\mu$ l de acetato de sodio (3 M pH 4,8) y 2 volúmenes de etanol absoluto en hielo. La electroforesis analítica de la reacción de secuenciación fue realizada en el secuenciador automático ABI PRISM 377 Version 3.0 (Perkin Elmer-Applied Biosystem).

### 3.11 Prueba de especificidad de *MspI* A

Esta fue realizada mediante la comparación del genotipo *MspI* A obtenido por análisis directo de la N PCR (1era vuelta: DI LD PCR, 2da vuelta: DW PCR, digestión *MspI* del producto y electroforesis) y el mismo abordaje pero cambiando el templado de la segunda vuelta, en este caso una dilución 1:100 de la banda electroforética específica (6,6 kb) de la primera vuelta. Esta prueba de especificidad fue extendida a 14 individuos no seleccionados.

### 3.12 Notación para el análisis de frecuencias

Para la notación precisa de las frecuencias asociadas a los 3 polimorfismos, a las reacciones de amplificación específicas y a las distintas poblaciones del análisis, se utilizó la siguiente nomenclatura:



### 3.13 Fórmulas, análisis estadístico de los datos, cálculo y propagación de errores

Para estimación del desequilibrio de ligamiento (LD, *linkage disequilibrium*), fue utilizada la fórmula  $D' = (p_{ab} \cdot p_{AB} - p_{aB} \cdot p_{Ab}) / (p_{ab} \cdot p_{AB} + p_{aB} \cdot p_{Ab})$  (Maynard Smith, 1997). Este



parámetro  $D'$ , no-dependiente de frecuencias alélicas, es un número que indica el alejamiento del equilibrio de ligamiento y puede variar desde (-1) a (1), donde el desequilibrio es máximo,  $D' = 0$  indica perfecto equilibrio.

Para el análisis de asociación estadística entre las distintas variables estudiadas se utilizó preferentemente el ensayo de Chi cuadrado ( $\chi^2$ ) o alternativamente la prueba exacta de Fisher cuando el tamaño muestral no permitió abordar el primero.

Para calcular los intervalos de confianza del 95% de frecuencias alélicas estimadas fue utilizada la fórmula de error asociada a la distribución binomial:  $\pm 1,96 (p (1-p) / N)^{1/2}$ , donde  $p$  es la proporción alélica observada y  $N$  el número de genes examinados o tamaño muestral.

El error (95%) esperado asociado a cada una de las hipótesis del mecanismo molecular de la Inv22 (capítulo cuatro), fue calculado usando la ecuación de Gauss para propagación de errores:  $eF = ((\partial F / \partial X_1)^2 (eX_1)^2 + (\partial F / \partial X_2)^2 (eX_2)^2 + \dots + (\partial F / \partial X_n)^2 (eX_n)^2)^{1/2}$  para  $F = F(X_1, X_2, \dots, X_n)$ .

La mayoría de las hipótesis están asociadas al caso trivial, por ejemplo, cuando  $U = U(I) = I \Rightarrow \partial U / \partial I = 1 \Rightarrow eU = ((1)^2 (eI)^2)^{1/2} = eI$ .

Los parámetros  $D$  o  $U$  de algunas hipótesis son calculados a partir de más de una variable con error de estimación. En estos casos debe operarse la propagación de errores usando la fórmula de Gauss como sigue. Por ejemplo cuando el parámetro  $U$  (o  $D$ ) =  $U(I, P_I, E, P_E) = P_I I + P_E E \Rightarrow \partial U / \partial I = P_I; \partial U / \partial P_I = I; \partial U / \partial E = P_E; \partial U / \partial P_E = E \Rightarrow eU = (P_I^2 eI^2 + I^2 eP_I^2 + P_E^2 eE^2 + E^2 eP_E^2)^{1/2}$ . Los parámetros  $P_I$  y  $P_E$  representan la probabilidad de reparación de un heterodúplex tomando la información desde la cadena intra o extragénica, respectivamente.  $P_I$  y  $P_E$  son estimados en  $1/2$  y sus errores son los asociados a la distribución binomial con el tamaño muestral ( $N$ ) utilizado en la estimación de  $I$  y  $E$ , respectivamente.

Tabla 3: Oligonucleótidos *primers*.

| Nombre | Secuencia (5' → 3') <sup>1</sup>                                    | Longitud (nts.) | Fuente o # GenBank (nts. 5' → 3') <sup>2</sup> | PCR/s (dirección/es) <sup>3</sup> |
|--------|---|-----------------|--|-----------------------------------|
| XEF    | agtac ttctc caggg tctgg gcgtg ctc                                   | 28              | X86012 (1044 → 1072)                           | DI, DE LD PCR (F, F)              |
| XER    | ctgga gaatc taaga ggata gagga caaca ttac c                          | 36              | X86012 (7457 ← 7581)                           | DI LD PCR (R)                     |
| PSF    | <u>gccct</u> gcctg tccat tacac tgatg acatt atgct gac <sup>4</sup>   | 38              | AF062514 (157 → 191)                           | UI LD PCR (F)                     |
| CLR    | ctgcg ccacc ccttt gtctt tccca cgg                                   | 28              | X86012 (3543 ← 3571)                           | UI LD PCR (R)                     |
| BSR    | <u>cccca</u> aacta taacc agcac ctgga agttc ccctc tcata <sup>4</sup> | 40              | AF062516 (31 ← 68)                             | DE LD PCR (R)                     |
| BC1    | taaaa gcttt aaatg gtcta ggc   | 23              | Kogan <i>et al</i> , 1987                      | S PCR B (F)                       |
| BC2    | ttcga attct gaaat tatct tgttc                                       | 25              | Kogan <i>et al</i> , 1987                      | S PCR B (R)                       |
| XIF    | accca aacga aactc <u>tagac</u> cctaa <sup>4</sup>                   | 25              | X86012 (2280 → 2305)                           | N PCR X (F)                       |
| XIR    | gcagt gttgc gacag gacgg   | 20              | X86012 (2441 ← 2461)                           | N PCR X (R)                       |
| DWF    | ggtgc tcagt agcct gtcgt tgtg  | 24              | X86012 (2964 → 2988)                           | N, S PCR DW (F, F)                |
| DWR    | gccac tacgc tcagg <u>tcctg</u> agtc <sup>4</sup>                    | 24              | X86012 (3116 ← 3140)                           | N, S PCR DW (R, R)                |

<sup>1</sup>Todas las secuencias oligonucleotídicas fueron monitoreadas usando el programa BLAST (<http://www.ncbi.nih.gov/blast>) y no fueron encontradas homologías significativas en el genoma humano fuera de las esperadas. <sup>2</sup>Fuente significa la cita de donde fue obtenida la secuencia del *primer*, # GenBank indica el nombre-clave del archivo del GenBank desde donde fue diseñado el *primer*. <sup>3</sup>Dirección del *primer* en la PCR es una convención que toma como sentido F a la misma dirección de transcripción del gen del FVIII y contrario a la dirección de transcripción del gen F8A (para tener una referencia dentro de la secuencia homóloga a 9,5 kb del intrón 22 del gen del FVIII, *int22h*). <sup>4</sup>Las bases subrayadas no corresponden a la secuencia publicada y fueron introducidas para: elevar la Tm específica de los *primers* PSF y BSR y para introducir sitios control de digestión de la enzimas de restricción *Xba*I [tctaga] en XIF y *Av*all [gg(t/a)cc] en DWR.

#### 4. CAPITULO PRIMERO

##### ***Análisis de la inversión del intrón 22 (Inv22) y diagnóstico directo de portadoras en familias Argentinas con hemofilia A severa.***

#### 4.1 RESULTADOS

El análisis por *Southern blot* de la Inv22 se basa en la demostración de la existencia de reordenamientos entre las secuencias homólogas del intrón 22 del gen del FVIII, *int22h-1*, *int22h-2* e *int22h-3*, utilizando la sonda F8A para poner en evidencia los eventuales cambios que pudieran sufrir los fragmentos de restricción de la enzima *BclI* asociados a esas secuencias Lakich *et al*, 1993. La figura 6 muestra los patrones de señal de hibridación obtenidos en individuos varones y mujeres con la Inv22, en las dos variantes significativamente prevalentes, y sin la inversión.

##### 4.1.1 Determinación de la frecuencia de la Inv22 en población Argentina con SHA

Fueron estudiadas 47 familias Argentinas con SHA (tabla 4). Sólo fueron incluidas aquellas familias en las que se pudo estudiar muestras de uno o más probandos, o cuando se dispuso de un familiar femenino que haya sido asignada con estatus de portadora obligatoria. Este estatus fue asignado a la madre de un hemofílico A severo de una familia con antecedentes de la enfermedad (SHA familiar) (familia 11, tabla 4) o asignado a la hija de un hemofílico con SHA (familias 15, 16, 25 y 35, tabla 4).

En 19 (40%) de las 47 familias la SHA fue causada por la Inv22, 15 de ellas (32% de las SHA y 79% del total de las Inv22) mostraron inversión tipo 1 o distal (D), mientras que las restantes 4 (8% de las Inv22 y 21% de las Inv22) patrón tipo 2 o proximal (P). No se registraron casos con patrones raros de la Inv22.

##### 4.1.2 Correlación entre la presencia de la Inv22 y el origen de la enfermedad (condición esporádica o familiar) en familias con SHA

La clasificación de una familia como esporádica fue realizada mediante el siguiente criterio: un solo hemofílico o varios hermanos hemofílicos pero en la última generación y en un solo núcleo familiar en la familia bajo estudio.

En 22 (47%) de las 47 familias con SHA, el origen de la hemofilia era esporádico (S), mientras que en las restantes 25 (53%), familiar (F).

La tabla 5 resume la ocurrencia de la Inv22 su asociación con la condición esporádica o familiar de la enfermedad.

Entre las 22 familias con SHA esporádica, 9 de ellas resultaron con la Inv22 (7 con patrón distal, D y 2, proximal, P), representando el 47% de todas las familias con la inversión (19) y las restantes 13 tenían otra mutación distinta de la inversión.

En el grupo de 25 afectadas por SHA familiar, 10 familias resultaron con la Inv22 (8 Inv22 D y 2, P) representando el 53% de todas las familias con la inversión.

Como resulta obvio a primera vista, el análisis estadístico de estas frecuencias observadas entre la distribución de SHA familiar o esporádica, con respecto a la presencia o no de la Inv22, no arroja diferencias significativas ( $\chi^2 = 0,055$ ; NS;  $p = 0,815$ ) (tabla 5).

#### 4.1.3 Análisis de portadoras

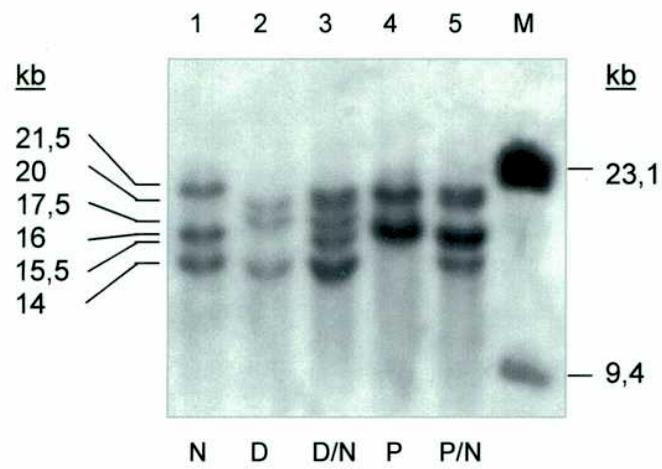
En las 19 familias informativas para la Inv22, fueron estudiadas 12 madres de hemofílico/s. Todas ellas (12/12) resultaron portadoras de la inversión (en acuerdo al tipo de Inv22 del probando, 10 con patrón D/N y 2 con patrón P/N) (tabla 4).

En esas familias fue ofrecido el análisis de portadoras en aquellas parientes mujeres que lo requirieron. Se estudiaron 13 mujeres relacionadas (10 hermanas y 3 tías maternas del probando), cuatro de ellas pertenecientes a familias con SHA de origen esporádico. Ocho de las 13 mujeres resultaron portadoras de SHA causada por la Inv22 (6/10 hermanas y 2/3 tías) (2/4 de SHA esporádica y 6/9, familiar) (tabla 4).

La figura 7 muestra dos ejemplos de familias con la Inv22 (número 23 y 45, tabla 4) donde se realizó el diagnóstico de no-portadora de hemofilia en la tía materna de una SHA esporádica y en la hermana de un caso familiar.

#### 4.1.4 Correlación entre la presencia de la Inv22 y el desarrollo de anticuerpo inhibidor neutralizante contra el FVIII terapéutico, en familias con SHA

La presencia de anticuerpo inhibidor neutralizante contra el FVIII en hemofílicos de las familias con SHA, con o sin la Inv22 se muestra en la tabla 4 y se resume en las tablas 6a (incluyendo los casos HIV positivos) y 6b (excluyendo las 6 familias con hemofílicos HIV<sup>+</sup>).

Figura 6: Señales de hibridación específicas del análisis de la Inv22 por *Southern blot*.

Autorradiogramas correspondientes a: calle 1, patrón normal (N) o sin la inversión del intrón 22 (Inv22) (21,5; 16 y 14 kb), calle 2, Inv22 tipo 1 o distal (D) (20; 17,5 y 14 kb), calle 3, patrón combinado (N / D) de la portadora de la Inv22 D (21,5; 20; 17,5; 16 y 14 kb), calle 4, Inv22 tipo 2 o proximal (P) (20; 16 y 15,5 kb), calle 5, patrón combinado (N / P) de la portadora de la Inv22 P (21,5; 20; 16; 15,5 y 14 kb). M significa marcador de longitud molecular (DNA del bacteriófago  $\lambda$  / *HindIII*).

La presencia de inhibidor no fue sub-clasificada en anticuerpos de desarrollo transiente o de largo término, y tanto los pacientes con alto (>5 BU), como con bajo título (<5 BU) fueron considerados como positivos para inhibidor.

El desarrollo de inhibidor en la población estudiada de hemofílicos A severos, fue de 34% (19/56). Una proporción algo superior de casos con inhibidor, de 37% (9/24) fue encontrada asociada a la Inv22 (tabla 6a). Sin embargo, estas diferencias no son suficientes para alcanzar significación estadística ( $\chi^2 = 0,041$ ; NS;  $p = 0,839$ ) (tabla 6a).

Dentro del grupo de 50 hemofílicos A severos sin compromiso inmunitario conocido por el virus de la inmunodeficiencia humana (excluyendo los 6 casos HIV seropositivos), el 36% (18/50) desarrolló inhibidor, una proporción muy similar a la asociada a la Inv22 (37%, 9/24) (tabla 6b). En concordancia con lo observado en la serie incluyendo a los hemofílicos HIV seropositivos, no se encontraron diferencias significativas para sostener la hipótesis de asociación de la Inv22 al desarrollo de inhibidor con respecto a las otras mutaciones que causan SHA ( $\chi^2 = 0,007$ ; NS;  $p = 0,934$ ) (tabla 6b).

En 4 familias con más de un hemofílico estudiado, el estatus de desarrollo de inhibidor resultó discordante (tabla 4). En 2 de esas 4 familias con inhibidor discordante la causa de la SHA fue la Inv22 (tipo distal) y en las 2 restantes, no.

Tabla 4: Estudio de la Inv22 en familias Argentinas con SHA.

| ESTATUS FAMILIAR |       |       |        |           | ESTATUS INDIVIDUAL                               |
|------------------|-------|-------|--------|-----------|--|
| #                | CLAVE | INV22 | ORIGEN | INHIBIDOR | MIEMBRO (PATRON INV22)                           |
| 1.               | HER   | D     | S      | +         | H1(D), H2(D), M(D/N)                             |
| 2.               | SOS   | D     | S      | -         | H1(D), H2(D), M(D/N), S(N)                       |
| 3.               | CAM   | N     | S      | +         | H(N)   |
| 4.               | DOM   | D     | S      | -         | H(D), M(D/N)                                     |
| 5.               | ACO   | D     | F      | -         | H(D), M(D/N), MS(D/N)                            |
| 6.               | GOY   | N     | S      | -         | H1(N), H2(N), M(N)                               |
| 7.               | BEL   | D     | F      | -         | H(D), M(D/N), MS(N)                              |
| 8.               | BAR   | N     | F      | +         | H(N), MS(N)                                      |
| 9.               | LEZ   | N     | S      | -         | H(N), M(N)                                       |
| 10.              | BUL   | N     | F      | -(HIV)    | H(N), M(N), MS(N)                                |
| 11.              | PAN   | N     | F      | -         | M(N), S(N)                                       |
| 12.              | ALM   | N     | F      | +(-)      | H(N), M(N)                                       |
| 13.              | MAR   | D     | F      | -         | H(D), M(D/N), S(D/N)                             |
| 14.              | ALZ   | D     | F      | +(-)      | H1(D), H2(D), M1(D/N), M2(D/N), S1(D/N), S2(D/N) |
| 15.              | VIL   | N     | F      | -(HIV)    | D(N)   |
| 16.              | BAL   | N     | F      | -(HIV)    | D(N), D(N)                                       |
| 17.              | LOP   | D     | F      | -         | H(D), M(D/N), S(D/N)                             |
| 18.              | SOT   | N     | S      | -         | H(N), M(N)                                       |
| 19.              | GUI   | P     | S      | -         | H(P), M(P/N), S(P/N)                             |
| 20.              | VEN   | N     | S      | -         | H(N), S(N), MS(N)                                |
| 21.              | VAS   | D     | S      | -         | H(D), M(D/N)                                     |
| 22.              | MON   | N     | S      | -         | H1(N), H2(N), M(N)                               |
| 23.              | DAL   | D     | S      | +(-)      | H1(D), H2(D), M(D/N), MS(N)                      |
| 24.              | BRT   | N     | F      | -(HIV)    | H(N), MS(N)                                      |
| 25.              | DUT   | N     | F      | -         | D(N)   |
| 26.              | THI   | N     | F      | -         | H(N)   |
| 27.              | NEG   | P     | F      | -         | H(P), S(N)                                       |
| 28.              | FER   | N     | F      | -         | H(N)   |
| 29.              | GAR   | N     | S      | -         | H(N), M(N)                                       |
| 30.              | MOR   | D     | S      | +         | H(D)   |
| 31.              | JUR   | N     | S      | +         | H(N)   |
| 32.              | ALC   | N     | S      | -(HIV)    | H(N), S(N)                                       |
| 33.              | FRR   | N     | S      | -         | H(N), M(N)                                       |
| 34.              | PAR   | D     | F      | -         | H(D)   |
| 35.              | CHI   | N     | F      | +         | D(N), DD(N)                                      |
| 36.              | BRB   | N     | S      | +         | H(N)   |
| 37.              | BAI   | N     | S      | +         | H(N), S(N)                                       |
| 38.              | LEG   | N     | F      | +(-)      | H(N), S(N)                                       |
| 39.              | TAV   | N     | S      | +(HIV)    | H(N), MSD(N)                                     |
| 40.              | MEN   | N     | F      | -         | H(N), S(N)                                       |

| ESTATUS FAMILIAR |       |       |        |           | ESTATUS INDIVIDUAL     |
|------------------|-------|-------|--------|-----------|------------------------|
| #                | CLAVE | INV22 | ORIGEN | INHIBIDOR | MIEMBRO (PATRON INV22) |
| 41.              | ASE   | D     | F      | -         | H(D)                   |
| 42.              | LUG   | D     | S      | +         | H(D), S(D/N)           |
| 43.              | PIO   | N     | F      | +         | H(N), S(N)             |
| 44.              | SIE   | N     | F      | -         | H(N), M(N)             |
| 45.              | SAN   | P     | F      | +         | H1(P), H2(P), S(N)     |
| 46.              | GAE   | P     | S      | -         | H(P), M(P/N)           |
| 47.              | PER   | D     | F      | +         | H(D), S(N)             |

N: no informativo para la Inv22 o patrón normal, D: Inv22 distal o tipo 1, P: Inv22 proximal o tipo 2. S: hemofilia esporádica, F: familiar. [-]: sin inhibidor, [+]: con inhibidor, (HIV): asociado a infección con el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV). [+(-)]: discordancia entre el estatus de inhibidor en hemofílicos de la misma familia, se considera a la familia como inhibidor [+]. H: hemofílico A severo, M: su madre, S: su hermana, MS: hermana de su madre, MSD: hija de la hermana de su madre, D: su hija, DD: hija de su hija.

Tabla 5: Presencia de la Inv22 versus SHA esporádica o familiar.

|           | Esporádica | Familiar |
|-----------|------------|----------|
| Inv22 (+) | 9 (47%)    | 10 (53%) |
| Inv22 (-) | 13 (46%)   | 15 (54%) |
| Total     | 22 (47%)   | 25 (53%) |

$$\chi^2 = 0,055; \text{NS}; p = 0,815$$



Tabla 6: Presencia de la Inv22 *versus* desarrollo de anticuerpos contra el FVIII en hemofílicos con SHA.

(a) Serie de casos incluyendo casos positivos para el HIV (N = 56).

|           | Con Inhibidor | Sin Inhibidor |
|-----------|---------------|---------------|
| Inv22 (+) | 9 (37%)       | 15            |
| Inv22 (-) | 10 (31%)      | 22            |
| Total     | 19 (34%)      | 37            |

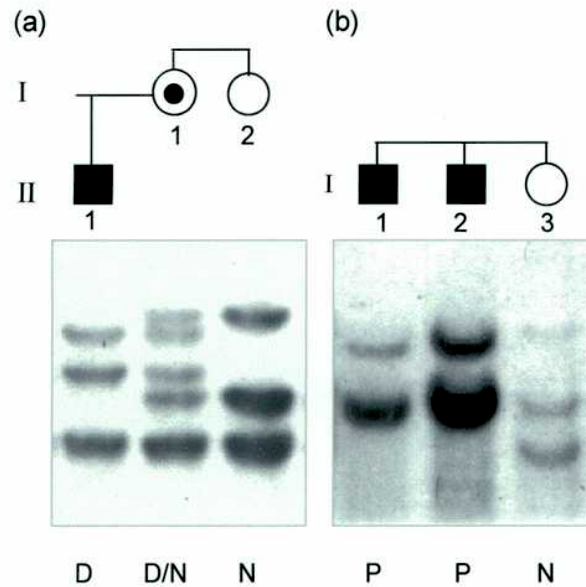
$\chi^2 = 0,041$ ; NS;  $p = 0,839$

(b) Excluyendo los 6 casos HIV seropositivos (N = 50).

|           | Con Inhibidor | Sin Inhibidor |
|-----------|---------------|---------------|
| Inv22 (+) | 9 (37%)       | 15            |
| Inv22 (-) | 9 (35%)       | 17            |
| Total     | 18 (36%)      | 32            |

$\chi^2 = 0,007$ ; NS;  $p = 0,934$

Figura 7: Análisis directo de portadoras en dos familias con SHA.



En la parte superior se esquematizan los árboles familiares y abajo los autorradiogramas con la interpretación correspondiente. (a) Familia número 23 con SHA esporádica (tabla 4). El probando (II.1) muestra un patrón de Inv22 distal (D), su madre (I.1) es portadora (D/N) y su tía, no-portadora (N). (b) Familia número 45 con SHA familiar (tabla 4). Los hermanos hemofílicos (I.1 y I.2) muestran un patrón de Inv22 proximal (P), su hermana (I.3) resultó no-portadora (N).

## 4.2 DISCUSION

La presente es la primera serie de familias con hemofilia A estudiadas a nivel genético molecular en la Argentina.

La frecuencia global observada del 40% para la Inv22 en SHA y las parciales de 32 y 8% para los patrones distal y proximal, respectivamente, coinciden con las reportadas en series anteriores (42/102 casos con la Inv22, 42%, de SHA de España, Tizzano *et al*, 1994a) y con la estimada por el consorcio internacional donde 2.093 pacientes con SHA, no relacionados, de todo el mundo (Europa, América del Norte y Asia) mostraron un 43% de Inv22 (con 35 y 7% para patrones D y P, respectivamente) (Antonarakis *et al*, 1995). En nuestra serie, no fueron encontrados patrones raros de la Inv22, tales como los tipos 3a, 3b y otros (Antonarakis *et al*, 1995, Naylor *et al*, 1996), reportados en conjunto con una prevalencia menor al 1% de todas las inversiones. La causa de no haber encontrado estos tipos raros de inversión puede relacionarse al tamaño de la muestra (47 familias) y a su baja frecuencia reportada (con la frecuencia estimada de 40% de Inv22 en SHA, calculamos una frecuencia esperada para patrones no-D y no-P de la Inv22, de uno por cada más de 250 hemofílicos A severos).

El genetista inglés Haldane, postuló para el caso de una enfermedad hereditaria recesiva, ligada al sexo, cuyos afectados tengan una eficacia biológica o *fitness* muy reducida o nula, que se alcanzará el equilibrio (proporción de afectados constante en la población), cuando un tercio de las mutaciones que la producen se renueven por generación.

No haber encontrado diferencias entre la condición esporádica o familiar de la enfermedad con respecto a la presencia de la Inv22 en familias asociadas a mutaciones causales de fenotipo severo (FVIII:C < 1%) está en acuerdo con la hipótesis que la Inv22 aparece *de novo* con alta tasa de mutación y debido a la condición de equilibrio, a su severidad y a su prevalencia (casi la mitad de las SHA), esta tasa podría ser similar al promedio de las tasas asociadas a las otras mutaciones causales de SHA que constituyen la otra mitad (grandes y pequeñas deleciones, mutaciones de no-sentido, de falso sentido, de cambio de fase del marco de lectura, etc). Esta hipótesis encuentra sustento en el hecho que la eficacia biológica o *fitness* de los pacientes hemofílicos, que es la variable clave para estimar la proporción de hemofilias *de novo* (Haldane, 1935), depende en condiciones de equilibrio, de la severidad de su fenotipo (en este caso, homogénea por la definición bioquímica de la SHA) más que, cualitativamente, de la mutación específica que la causa; razón por la cual, no eran esperables variaciones en las poblaciones con y sin la

Inv22. Estos datos del origen de la enfermedad concuerdan con los publicados por Lakich *et al*, 1993 y muchos otros, pero contrastan con lo observado por Tizzano *et al*, 1994a, quién reporta que sus datos no soportan que la Inv22 aparezca *de novo* en una alta proporción de familias.

En nuestra serie, todas las madres analizadas en familias informativas para la inversión (14), y en particular las 7 pertenecientes a SHA esporádicas e Inv22 positivas, resultaron portadoras. Esto implica que la Inv22 no ocurrió en células germinales de la madre y en todos los casos fue heredada de alguno de sus padres: como mutación *de novo* o bien mosaicismo germinal desde su padre, el abuelo materno o bien desde su madre por vía femenina. Según esta observación, la Inv22 no se originaría en meiosis femeninas sino en masculinas. La evidencia obtenida en nuestra serie está en acuerdo con lo observado por Rossiter *et al*, 1994, y por Tizzano *et al*, 1995, donde se indica que la Inv22 ocurre casi exclusivamente en células germinales masculinas.

Los resultados presentados de Argentina, señalan la utilidad de abordar en primera línea, el análisis de la Inv22, aún en países en vías de desarrollo, ya que provee información segura para diagnóstico de portadoras en el  $40\pm 14\%$  de las familias afectadas con SHA, sin las limitaciones de los análisis basados en polimorfismos de DNA y los altos costos que implica la búsqueda directa de las mutaciones en un gen tan largo y complejo como el codificante para el FVIII.

Dentro de los factores que controlan la inducción de inhibidor, Oldenburg *et al*, 1997, han incluido: el tipo de mutación causal de hemofilia, alelos específicos del sistema de antígenos leucocitarios humanos (HLA) y los distintos regímenes de tratamiento (edad de comienzo, intervalos, dosis de administración y tipo de FVIII). Entre cierta controversia sobre el mayor riesgo de desarrollar inhibidor en pacientes con la Inv22 respecto de las otras mutaciones no discriminadas asociadas a SHA. Goodeve *et al*, 1994, observaron en una serie pequeña que la presencia de la Inv22 correlacionaba con ausencia de inhibidor, sin embargo, estos fueron rápidamente contrastados, asociando aún las inversiones con alto riesgo de desarrollar inhibidor en los reportes de Ljung, 1994, Tizzano *et al*, 1994a, Tizzano *et al*, 1994b, Antonarakis *et al*, 1995, o bien a un riesgo similar al de las otras mutaciones que conducen a SHA y ausencia de correlación, Jenkins *et al*, 1994, y Weinmann *et al*, 1996. Schwaab *et al*, 1995, lograron asociar la Inv22, grandes deleciones y mutaciones de no-sentido, a un riesgo incrementado de inhibidor (aproximadamente 35%) y a pequeñas deleciones y mutaciones de falso sentido, a un menor riesgo (5%).

El desarrollo global de inhibidor en nuestra serie de 56 pacientes con SHA de 34% (37% en pacientes Inv22 positivos y 31% en negativos) está ligeramente incrementado respecto a lo reportado por Antonarakis *et al*, 1995, 18% de inhibidor (20% en pacientes Inv22 positivos y 16% en negativos) en una serie de 1463 casos y también respecto a lo reportado por Weinmann *et al*, 1996, 17% de inhibidor (20% en pacientes Inv22 positivos y 14% en negativos) en 110 pacientes con SHA. Antonarakis recopiló estudios de diferentes centros de diagnóstico de la hemofilia del mundo. Es importante señalar que el promedio de desarrollo de inhibidor en este estudio resultó más representativo de aquellos centros que presentaron más casos al estudio, probablemente de países con sistemas de salud más desarrollados. Sin embargo, si tomamos en cuenta los rangos publicados en el mismo trabajo internacional (0-60% de inhibidor para SHA Inv22 positivas y 6-36%, para las negativas), concluimos que nuestra serie no se aleja significativamente de lo reportado.

El intento por excluir los casos HIV positivos para estudiar la serie libre de compromiso inmunológico de causa conocida (50 casos), no representó un cambio en la tendencia observada en la serie completa.

En resumen, nuestros datos indican una tendencia incrementada (pero no significativa) a desarrollar inhibidor por parte de los pacientes con la Inv22, respecto de aquellos sin la Inv22 y con SHA. Esto podría deberse al hecho que este último grupo es cualitativamente heterogéneo respecto al tipo de mutación e incluye cambios asociados a un alto riesgo de inhibidor tales como grandes deleciones y también a un bajo riesgo, como son las mutaciones de falso sentido. De acuerdo a la opinión actual mayoritaria, no consideramos a la Inv22 como un factor predisponente para el desarrollo de inhibidor dentro del heterogéneo grupo no discriminado de SHA.

En este sentido, la discordancia en el estatus de inhibidor observada por nosotros en 4 familias donde había 2 o más pacientes con SHA (2 casos correspondientes a la Inv22 y 2 a otra mutación específica de SHA) y por otros (Tizzano *et al*, 1994b), indicaría que factores distintos del tipo de mutación serían indispensables para comprender el cuadro etiológico.

## 5. CAPITULO SEGUNDO

### ***Análisis específico de los polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción XbaI del intrón 22 del gen del factor VIII humano y extragénicos ligados mediante PCR de larga distancia***

#### 5.1 RESULTADOS

El abordaje clásico para genotipificación de RFLPs por técnicas basadas en PCR consiste en la amplificación específica del segmento de DNA que incluye al sitio polimórfico y, eventualmente, otro sitio de reconocimiento de la misma enzima de restricción para contar con un control interno. El análisis del amplímero se realiza por digestión enzimática y electroforesis en gel de agarosa. Como se describió más arriba el RFLP XbaI es múltiple ya que se localiza en la secuencia repetida *int22h* (9,5 kb) a 4,4 kb de su extremo *upstream*. Estos RFLPs son llamados XbaI A, B y C según se encuentren, dentro de la copia intragénica (intrón 22 del gen del FVIII) o dentro de las copias extragénicas proximal o distal de *int22h*, respectivamente. Para la amplificación específica de cualquiera de ellos, es necesario colocar en el diseño de la PCR, por lo menos un *primer* que provea especificidad sobre una región de copia única por fuera de *int22h*. Todas las reacciones PCR de larga distancia (LD PCR) que figuran a continuación fueron diseñadas según este principio de un *primer locus* específico fuera de *int22h* y otro dentro. Por otra parte, la obtención exitosa de amplímeros de longitud mayor a 1,5-2 kb se basa en dos requerimientos: (1) la longitud y el contenido CG de sus *primers* deben asegurar temperaturas de disociación media ( $T_m$ ) mayores a 70-75° C y (2) la actividad de polimerización debe ser provista por la mezcla de la Taq DNA polimerasa con otra DNA polimerasa termoestable proveniente de otras fuentes (por ejemplo *Pwo*, *Cfo*, *Pfu*, etc.) (Barnes, 1994).

##### 5.1.1 LD PCR intragénica *downstream* (DI) para el RFLP XbaI A

Fue diseñada una PCR de larga distancia con un *primer* específico (XER, tabla 3) para la región *downstream* e intragénica del intrón 22 del gen del FVIII (DI) y otro (XEF, tabla 3) localizado dentro de *int22h* (figura 8a). El amplímero resultante consta de 6,6 kb y contiene el sitio polimórfico XbaI A a 1,3 kb de un extremo y otro sitio XbaI pero no-polimórfico a 0,5 kb del otro extremo (figura 8a). La digestión del producto con XbaI

correspondiente al alelo [+] da fragmentos de 4,8; 1,3 y 0,5 kb; y el alelo [-], fragmentos de 6,1 y 0,5 kb (figura 8b).

Para la detección sensible de eventual contaminación por amplificación inespecífica de las secuencias homólogas extragénicas, donde se ubican los sitios polimórficos B y C del RFLP *Xba*I (figura 9), la DI LD PCR fue aplicada a casos de mujeres con genotipo A [+/+], B [-/-], C [-/-] (tabla 7, muestra 6, 7, 10 y 16). La DI LD PCR mostró consistentemente la señal [+], sin trazas de los alelos extragénicos [-] (por ejemplo figura 8b, calle 6).

Para analizar la especificidad para el RFLP *Xba*I A de la DI LD PCR con alta sensibilidad fue diseñado un abordaje, usando una PCR anidada (N PCR) con *primers* internos específicos de todas las copias de la secuencia homóloga *int22h*, XIF y XIR (tabla 3) sobre la DI LD PCR utilizada como primera vuelta. La genotipificación por N PCR de las muestras 6 y 7 (tabla 7) dió como resultado señal [+], confirmando la ausencia de cualquier amplificación contaminante de los alelos extragénicos [-] y la especificidad de la DI LD PCR para el RFLP *Xba*I A.

La tabla 8 muestra los resultados del desempeño de la DI LD PCR, intensidad del producto y especificidad (presencia de señales inespecíficas), bajo las diversas condiciones de optimización que fueron ensayadas. No fue obtenido producto específico cuando el paso correspondiente a la elongación fue de tiempo constante sin el agregado de 20 segundos por ciclo en los últimos 20 ciclos; o cuando no se utilizó DMSO o 7-deaza dGTP en la reacción; o cuando se utilizaron concentraciones de *primers* menores a 0,8  $\mu$ M. La DI LD PCR resultó altamente reproducible cuando fue ensayada sobre templados de DNA genómico de alto peso molecular (verificada por minielectroforesis en gel de agarosa) obtenido por los métodos de fenol/cloroformo o de *salting out*, pero falló consistentemente cuando se utilizaron muestras de DNA de baja calidad obtenido por el método de lisis rápida (materiales y métodos).

Ocasionalmente, se observaron señales inespecíficas, sin embargo, por no interferir con la región crítica para una correcta genotipificación (> 4 kb), no se realizaron esfuerzos de optimización para eliminarlas.

#### 5.1.1.1 Validación de la DI LD PCR para genotipificación del RFLP *Xba*I A

La metodología de amplificación por DI LD PCR seguida de digestión enzimática con *Xba*I para investigación del RFLP *Xba*I A fue validada para su utilización en el diagnóstico indirecto de HA mediante un experimento de comparación a ciegas de los genotipos

obtenidos por esta técnica y por análisis de *Southern blot*. La figura 10a muestra los mapas de restricción correspondientes a los RFLPs *Xba*I A, B y C; y 10b muestra diversos autorradiogramas correspondientes a individuos con múltiples representaciones alélicas del polimorfismo. El experimento de comparación a ciegas se realizó en 16 individuos no relacionados, representando ambos sexos (12 mujeres y 4 varones) y distinta composición alélica y resultó en una concordancia perfecta entre los genotipos obtenidos con ambos métodos (tabla 7). Aunque este experimento sólo representa el estudio de 28 alelos, la probabilidad de obtener este resultado por azar podría estimarse en menos de 1 cada  $8 \times 10^6$ , considerando un *locus* bialélico, ligado al cromosoma X con frecuencias alélicas aproximadas de 0,5 como es el caso estudiado (RFLP *Xba*I A).

#### 5.1.2 LD PCR intragénica *upstream* (UI) para el RFLP *Xba*I A

Con el objetivo de mejorar el rendimiento de la LD PCR para investigación del RFLP *Xba*I A (copia intragénica, I) y de contar con una metodología que permita la amplificación específica de las secuencias flanqueantes *upstream* (U) (en lugar de las secuencias *downstream* que dan especificidad a la DI LD PCR) se diseñó una LD PCR, llamada UI LD PCR, con PSF (tabla 3) como *primer* específico *upstream* del intrón 22 del gen del FVIII, y CLR dentro de la región repetida *int22h* (figura 9).

El producto resultante de la amplificación consta de 6,8 kb y contiene el sitio polimórfico *Xba*I A a 1,3 kb de un extremo y un sitio *Xba*I no-polimórfico a 0,7 kb del otro. La digestión del alelo [+] con *Xba*I da fragmentos de 4,8; 1,3 y 0,7 kb; y el alelo [-] da fragmentos de 6,1 y 0,7 kb. Los individuos heterocigotas [+/-] muestran los patrones de señal combinados. Estos patrones de digestión *Xba*I obtenidos tanto con la DI como con la UI LD PCR simulan a los patrones de señales autorradiográficas obtenidos por *Southern blot* (figura 10) para genotipificación del RFLP *Xba*I A.

La puesta a punto de la UI LD PCR se realizó mediante el ensayo de distintas concentraciones de *primers* (0,4; 0,6; 0,8 y 1  $\mu$ M) utilizando las mismas condiciones de reacción y de termociclado que la DI LD PCR. La concentración de *primers* de 0,6  $\mu$ M mostró una cosecha máxima de producto de 6,8 kb sin contaminación con señales inespecíficas. La UI LD PCR fue desafiada para amplificación específica del RFLP *Xba*I A, en muestras de 2 mujeres de genotipo A [+/+], B [-/-], C [-/-] (tabla 7, muestra 6 y 7) en paralelo con la DI LD PCR que ya fue validada en experimentos previos. La figura 11



muestra la genotipificación correcta de las muestras 6 y 7 mediante ambas LD PCR. Nótese la ausencia de señales inespecíficas en los productos no digeridos.

#### 5.1.2.1 Análisis del RFLP XbaI A en población Argentina normal con la UI LD PCR

Muestras de DNA de 45 individuos normales del banco de dadores de sangre del departamento de Hemoterapia del IIHema (8 mujeres y 37 varones) representando 53 alelos XbaI A fueron genotipificadas utilizando el método de UI LD PCR para determinación de la frecuencia en población Argentina normal. Treinta y tres de los 53 alelos resultaron XbaI A [+] ( $pX^{UI^n} = 0,62 \pm 0,13$ ) y una heterocigocidad estimada (2pq) de  $0,47 \pm 0,16$ .

Diez individuos (7 varones y 3 mujeres) del grupo de 45 estudiados para XbaI A mediante la UI LD PCR, representando 13 alelos, fueron genotipificados simultáneamente usando la DI LD PCR en un experimento a ciegas. La perfecta correlación obtenida por las dos LD PCRs en los casos estudiados permitió la validación de la UI LD PCR para genotipificación del RFLP XbaI A (tabla 9, muestras CN 3, 6, 9, 10, 11, 14, 16, 19, 20, y 67).

#### 5.1.3 Análisis del desequilibrio de ligamiento entre los RFLPs XbaI A y BclI en población Argentina normal

Los 37 varones estudiados para el RFLP XbaI A fueron también genotipificados para el RFLP de la enzima BclI del intrón 18 del gen del FVIII con el objetivo de estimar el desequilibrio de ligamiento (*l.d.*) entre ellos. La tabla 10 muestra la distribución de las frecuencias de los 4 haplotipos analizados. El parámetro que evalúa el *l.d.*  $D'_{XB}$  resultó 0,97 lo que representa un alto, significativo desequilibrio de ligamiento (prueba exacta de Fisher, S,  $p < 0,001$ ). Sin embargo, en Argentina, según la estimación realizada suponiendo equilibrio de Hardy-Weinberg, XbaI A y BclI aportarían una informatividad combinada del 60% y por lo tanto significaría un aporte efectivo a la informatividad global del grupo de polimorfismos del gen del FVIII útiles en el diagnóstico molecular de la HA (figura 12).

#### 5.1.4 LD PCR extragénica downstream (DE) para el RFLP XbaI BC

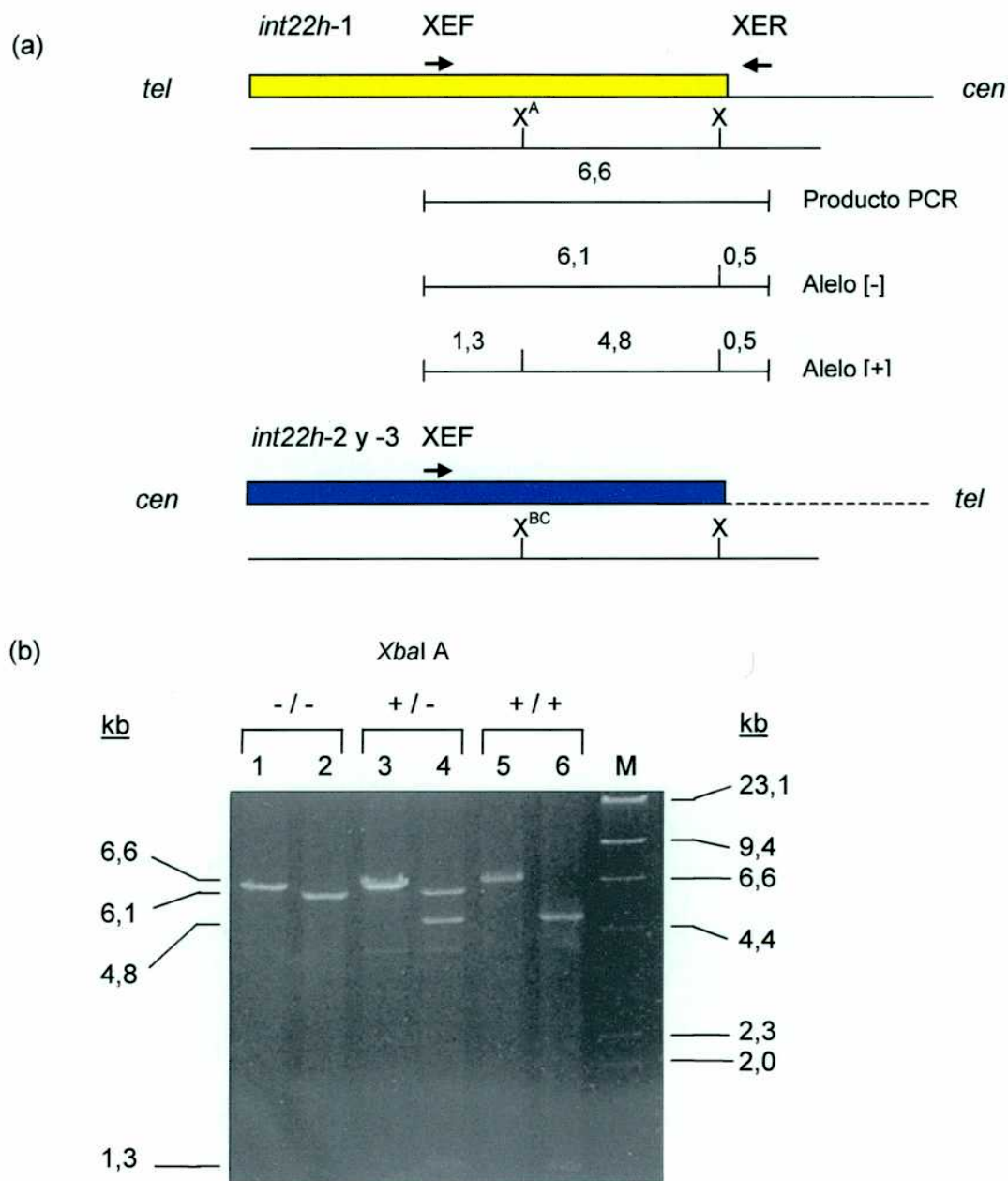
Para la genotipificación simultánea del RFLP XbaI B y C (BC) correspondiente a las copias extragénicas de *int22h*, fue diseñada una LD PCR con un primer específico de ambas regiones extragénicas *downstream* (DE) (BSR, tabla 3) y otro en orientación

opuesta que localiza dentro de *int22h* (XER) (figura 9). El producto resultante de la amplificación consta de 6,6 kb y contiene el sitio polimórfico *Xba*I A a 1,3 kb de un extremo y un sitio *Xba*I no-polimórfico a 0,5 kb del otro. La digestión del alelo [+] con *Xba*I da fragmentos de 4,8; 1,3 y 0,5 kb mientras que el alelo [-] da fragmentos de 6,1 y 0,5 kb. Los individuos heterocigotas [+/-] muestran los patrones de señal combinados.

La puesta a punto de la DE LD PCR se realizó mediante el ensayo de distintas concentraciones de *primers* (0,2; 0,4; 0,6; 0,8 y 1  $\mu$ M) utilizando las mismas condiciones de reacción y de termociclado que la DI LD PCR. La concentración de *primers* óptima fue la de 0,4  $\mu$ M mostrando una cosecha máxima de producto específico sin contaminación con señales inespecíficas. La DE LD PCR fue estudiada para amplificación específica del RFLP *Xba*I BC, en muestras de mujeres de genotipo A [+/+], B [-/-], C [-/-] (tabla 7, muestra 6 y 7) obteniéndose sólo las señales correspondientes a los alelos [-].

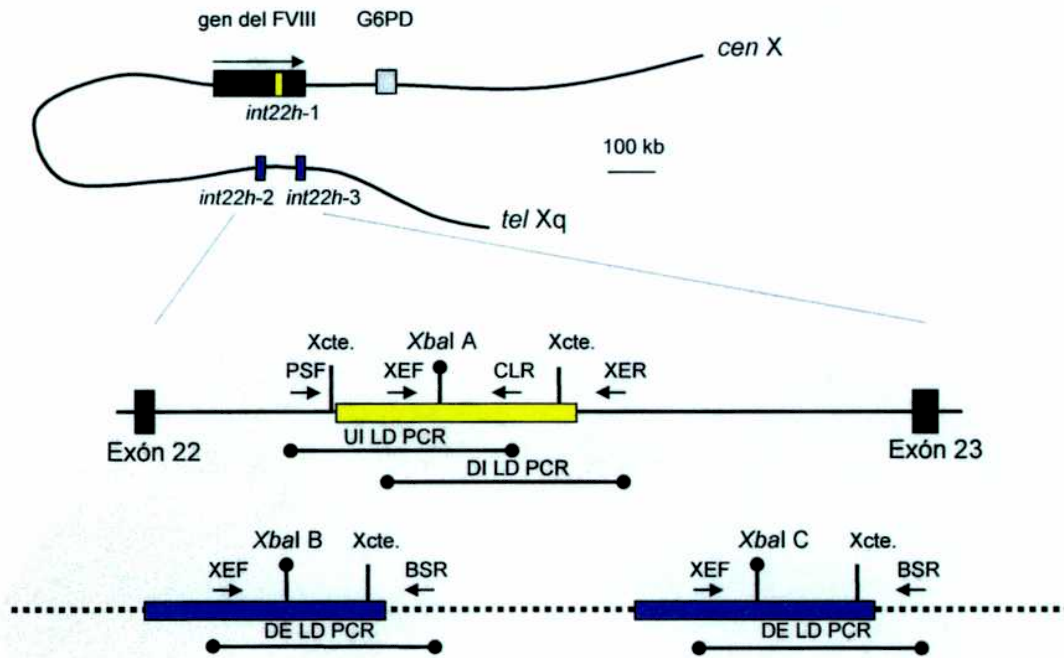
#### 5.1.4.1 Análisis del RFLP *Xba*I BC en población Argentina normal con la DE LD PCR

Muestras de DNA de 42 individuos varones normales del banco de dadores de sangre del departamento de Hemoterapia del IIHema representando 84 alelos *Xba*I BC fueron genotipificadas utilizando el método de DE LD PCR para determinación de la frecuencia en población Argentina normal. Dos de los 84 alelos resultaron *Xba*I B o C [+] ( $pX^{DE\ n} = 0,02 \pm 0,03$ ) y una heterocigocidad estimada suponiendo equilibrio de Hardy-Weinberg (2pq), muy baja, de  $0,04 \pm 0,04$  (tabla 9).

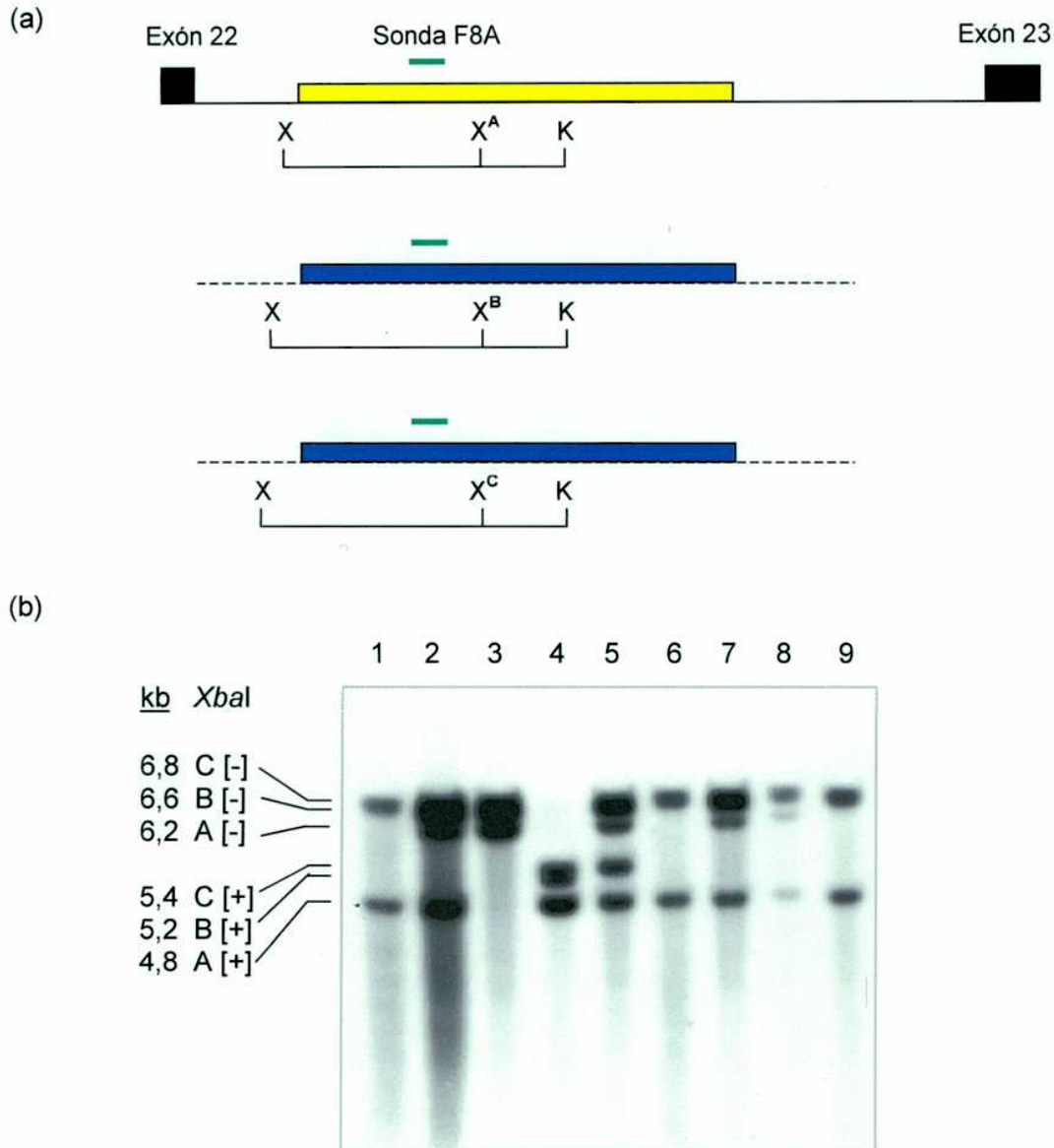
Figura 8: Genotipificación del RFLP *Xba* I A por LD PCR intragénica *downstream* (DI)

(a) Esquema de la DI LD PCR para el RFLP *Xba* I A y mapa de restricción *Xba* I del producto PCR. Las secuencias *int22h-1* y sus homólogas extragénicas (*int22h-2* y *-3*) (Naylor *et al*, 1995) son representados como cajas amarilla y azul, respectivamente. El *primer* XER es específico del intrón 22 del gen del FVIII por lo que sólo la copia intragénica es amplificada. *tel* y *cen* indican telómero y centrómero. (b) Análisis por electroforesis en gel de agarosa de los productos de la DI LD PCR digeridos con *Xba* I. Las calles 1, 3 y 5 corresponden al amplímero no digerido y las 2, 4 y 6 al producto digerido de individuo homocigota [-/-], heterocigota [+/-] y homocigota [+/+], respectivamente. M significa a un marcador de tamaño molecular (DNA  $\lambda$ HindIII).

Figura 9: Ubicación de las secuencias *int22h*, los RFLPs *Xba*I A, B y C, y sus LD PCR específicas.

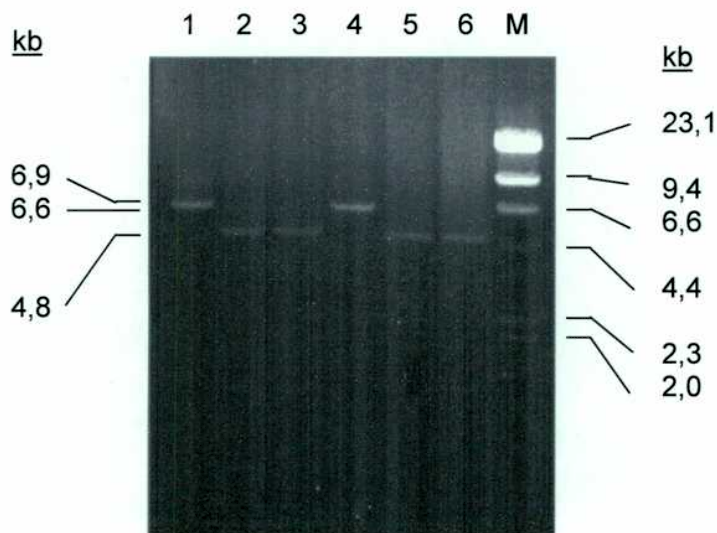


Arriba: representación esquemática y ubicación relativa de las secuencias *int22h* respecto al gen del FVIII, caja negra (la flecha indica su dirección de transcripción) y el codificante para la enzima glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PD), caja gris. Abajo: esquema en detalle de la copia intragénica de *int22h* (caja amarilla) y las extragénicas (cajas azules), mostrando la posición de cada uno de los *primers* y los amplimeros de larga distancia que definen. También se muestra la posición de los sitios de restricción de *Xba*I (polimórficos, *Xba*I A, B y C, y no-polimórficos, Xcte.). Las regiones no repetidas o de copia única se representan como líneas llenas y punteadas, correspondiendo a intra y extragénicas, respectivamente.

Figura 10: Genotipificación de los RFLPs *Xba*I A, B y C por análisis de *Southern blot*.

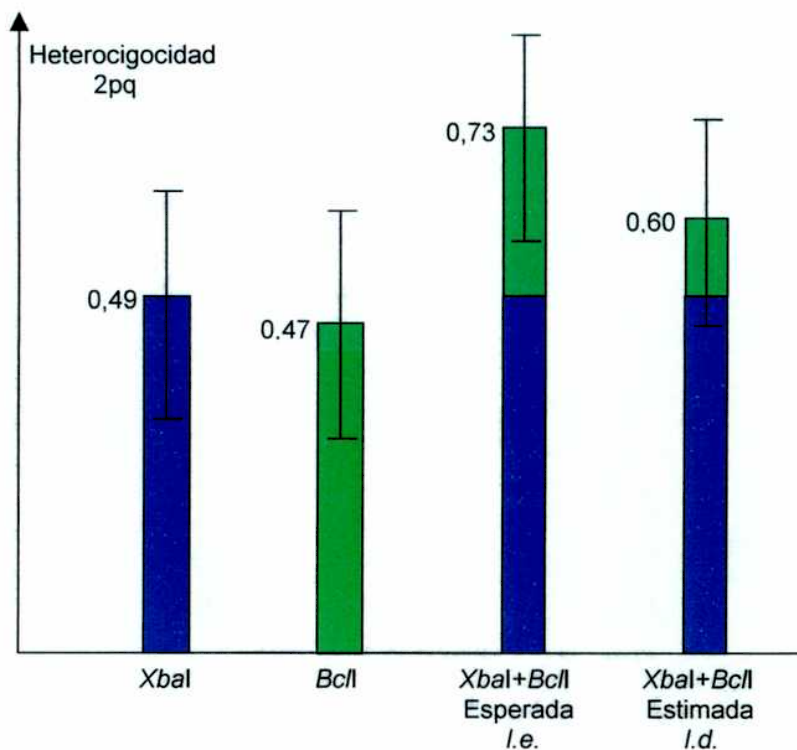
(a) Esquema de las copias de *int22h* (intragénica, caja amarilla y extragénicas, cajas azules) indicando la región específica de la sonda F8A (segmentos verdes) y los mapas de restricción de las enzimas *Kpn*I (K) y *Xba*I (sitios polimórficos: X<sup>A</sup>, X<sup>B</sup> y X<sup>C</sup>, y no-polimórficos: X). (b) Autorradiograma del análisis de *Southern blot* para genotipificación de los RFLPs *Xba*I A, B y C (sonda F8A y digestión con *Xba*I-*Kpn*I) mostrando múltiples representaciones alélicas del polimorfismo en las calles 1-9. El tamaño molecular asociado a cada alelo específico corresponde a la ubicación de las señales de hibridación correspondiente.

Figura 11: Comparación entre UI y DI LD PCRs para genotipificación del polimorfismo *Xba*I A.



Experimento comparativo por electroforesis en gel de agarosa de los productos de las LD PCR UI y DI digeridos con *Xba*I sobre dos individuos previamente genotipificados por *Southern blot* como *Xba*I A [+/+] y BC [(-/-) (-/-)]: número 6 (tabla 9) (calles 2 y 5) y 7 (calles 3 y 6) (tabla 9) Las calles 1 y 4 corresponden al amplímero UI y DI no-digerido, respectivamente. Las calles 1, 2 y 3 corresponden a la UI LD PCR, mientras que 4, 5 y 6, a DI LD. M indica marcador de tamaño molecular (DNA  $\lambda$  /*Hind*III).

Figura 12: Heterociguidad de los RFLPs *Xba*I A (IVS22) y *Bcl*I (IVS18) en población Argentina normal.



La altura de las barras indica la heterociguidad estimada suponiendo equilibrio de Hardy-Weinberg (2pq). Las primeras dos barras indican la heterociguidad por separado de cada uno de los polimorfismos *Xba*I A (X), en azul y *Bcl*I (B) en verde. En la tercera barra se grafica la heterociguidad conjunta (X+B) esperada suponiendo completo equilibrio de ligamiento (l.e.) entre X y B, en la cuarta columna se grafica el aumento estimado real de la informatividad combinada (X+B) que es calculado a partir de las asociaciones alélicas observadas. Nótese que estos polimorfismos aportarían entre ambos una informatividad aproximada del 60%.

Tabla 7: Experimento de comparación a ciegas entre los genotipos del RFLP *Xba*I A obtenidos por *Southern blot* y DI LD PCR.

| Muestra N° | Sexo      | Método de extracción de DNA | <i>Southern blot</i> |                |                | DI LD PCR      |
|------------|-----------|-----------------------------|----------------------|----------------|----------------|----------------|
|            |           |                             | <i>Xba</i> I A       | <i>Xba</i> I B | <i>Xba</i> I C | <i>Xba</i> I A |
| 1          | F         | P/C                         | +/-                  | -/-            | -/-            | +/-            |
| 2          | F         | P/C                         | -/-                  | +/-            | -/-            | -/-            |
| 3          | F         | P/C                         | +/-                  | -/-            | -/-            | +/-            |
| 4          | F         | P/C                         | +/-                  | -/-            | -/-            | +/-            |
| 5          | F         | P/C                         | -/-                  | -/-            | -/-            | -/-            |
| 6          | F         | P/C                         | +/+                  | -/-            | -/-            | +/+            |
| 7          | F         | P/C                         | +/+                  | -/-            | -/-            | +/+            |
| 8          | F         | P/C                         | -/-                  | -/-            | -/-            | -/-            |
| 9          | F         | P/C                         | +/-                  | -/-            | -/-            | +/-            |
| 10         | F         | P/C                         | +/+                  | -/-            | -/-            | +/+            |
| 11         | T (45;X0) | P/C                         | +                    | +              | +              | +              |
| 12         | M         | P/C                         | -                    | -              | -              | -              |
| 13         | M         | P/C                         | -                    | -              | -              | -              |
| 14         | M         | S/O                         | +                    | -              | -              | -              |
| 15         | F         | S/O                         | +/-                  | -/-            | -/-            | +/-            |
| 16         | F         | P/C                         | +/+                  | -/-            | -/-            | +/+            |

M: masculino, F: femenino, T: síndrome de Turner (45; X0), P/C: fenol/cloroforno, S/O: *salting out*.



Tabla 8: Variables y optimización de la reacción DI LD PCR.

| Variable<br>(unidad)  | Valor<br>Optimo | Rango positivo          |                         |
|---|-----------------|-------------------------|-------------------------|
|   |                 | Alta<br>especificidad   | Baja<br>especificidad   |
| Ciclos<br>(#)   | 30              | 25 - 30                 |                         |
| Extensión de síntesis<br>(seg / ciclo)                              | 20              | 20                      |                         |
| DNA templado<br>(ng)  | 500             | 300 - 500               | 500 - 1000              |
| 7-deaza dGTP / dGTP<br>(%)  | 40              | 40 - 60                 | 20 - 40, 60 - 80        |
| DMSO<br>(%, v / v)  | 5               | 5 - 7,5                 | 2,5 - 5                 |
| MgCl <sub>2</sub> / dNTPs<br>(mM / μM)                              | 1,75 / 350      | 1,75 / 350 - 2,25 / 500 | 2,25 / 500 - 2,75 / 500 |
| Primers XEF y XER<br>(μM c/u)                                       | 1               | 0,8 - 1                 | ..                      |
| Mezcla enzimática<br>DNA pol. <i>Taq</i> / <i>Pwo</i><br>(U / 25μl) | 2,6             | 1,3 - 2,6               |                         |

Tabla 9: Genotipificación de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción asociados al gen del factor VIII en población Argentina normal.

| CN | Sexo | ABO | BclI | XbaI A<br>UI (DI) | MspI A<br>UI (DI) | XbaI BC<br>DE | MspI BC<br>DE |
|----|------|-----|------|-------------------|-------------------|---------------|---------------|
| 1  | F    | O   | +/-  | +/-               | +/-               |               |               |
| 2  | F    | B   | +/+  | +/+               | +/+               |               |               |
| 3  | F    | O   | +/-  | +/- (+/-)         | +/- (+/-)         |               |               |
| 4  | M    | A   | +    | +                 | +                 | -,-           | -,-           |
| 5  | M    | B   | -    | -                 | -                 | -,-           | +,-           |
| 6  | M    | O   | +    | +(+)              | -(-)              | -,-           | -,-           |
| 9  | M    | O   | +    | -(-)              | -(-)              | -,-           | -,-           |
| 10 | M    | O   | +    | +(+)              | +(+)              | -,-           | -,-           |
| 11 | M    | A   | -    | -(-)              | -(-)              | -,-           | -,-           |
| 14 | F    | O   | +/-  | +/- (+/-)         | +/- (+/-)         |               |               |
| 16 | F    | O   | +/+  | +/+ (+/+)         | +/+ (+/+)         |               |               |
| 17 | M    | O   | +    | +                 | +                 | -,-           | -,-           |
| 18 | M    | O   | -    | -                 | -                 | -,-           | -,-           |
| 19 | M    | O   | -    | -(-)              | -(-)              | -,-           | -,-           |
| 20 | M    | A   | +    | +(+)              | +(+)              | -,-           | -,-           |
| 23 | M    | O   | +    | +                 | +                 | -,-           | -,-           |
| 26 | M    | O   | -    |                   |                   |               | -,-           |
| 28 | M    | A   | -    | -                 | -                 | -,-           | -,-           |
| 29 | M    | O   | +    | +                 | +                 | -,-           | -,-           |
| 30 | M    | O   | +    | +                 | +                 | -,-           | -,-           |
| 31 | F    | A   | +/-  |                   |                   |               |               |
| 32 | M    | A   | +    | +                 | +                 | -,-           | -,-           |
| 36 | M    | B   | +    |                   |                   |               |               |
| 39 | M    | O   | +    | +                 | +                 | -,-           | -,-           |
| 40 | F    | O   | +/+  |                   |                   |               |               |
| 43 | M    | O   | -    | -                 | -                 | -,-           | -,-           |
| 45 | M    | A   | +    |                   |                   |               |               |
| 47 | F    | A   | +/-  |                   |                   |               |               |
| 50 | M    | O   | -    | -                 | -                 | -,-           | -,-           |
| 54 | M    | O   | -    |                   |                   | -,-           | -,-           |
| 55 | M    | A   | +    | +                 | +                 | -,-           | +,-           |
| 56 | M    | O   | +    |                   |                   |               |               |
| 57 | M    | O   | +    |                   | +                 | -,-           | -,-           |
| 59 | M    | A   | +    |                   |                   |               |               |
| 60 | F    | A   | +/+  |                   |                   |               |               |
| 61 | M    | O   | +    |                   |                   |               | -,-           |
| 63 | M    | A   | +    |                   |                   | -,-           | -,-           |
| 64 | M    | A   | +    |                   |                   |               | -,-           |
| 65 | M    | A   | -    | -                 | -                 | -,-           | +,-           |
| 66 | M    | O   | +    |                   | -                 | -,-           | -,-           |
| 67 | M    | A   | +    | +(+)              | +(+)              | -,-           | -,-           |
| 68 | M    | B   | +    | +                 | +                 | -,-           | +,-           |

|     |   |   |     |     |     |     |     |
|-----|---|---|-----|-----|-----|-----|-----|
| 69  | M | O | +   |     |     |     |     |
| 70  | M | O | +   | +   | -   | -,- | -,- |
| 71  | M | A | +   | -   | +   | -,- | -,- |
| 72  | F | A | +/+ | +/- | +/+ |     |     |
| 73  | F | A | +/- |     |     |     |     |
| 74  | M | O | +   | +   | +   | -,- | -,- |
| 75  | F | A | +/+ | +/+ | +/+ |     |     |
| 76  | F | A | +/+ |     |     |     |     |
| 77  | M | A | +   |     |     |     | -,- |
| 78  | M | O | +   | -   | +   | -,- | +,- |
| 79  | M | O | +   |     |     |     |     |
| 80  | M | A | +   |     |     |     |     |
| 84  | M | O | +   |     |     |     | -,- |
| 86  | F | O | +/+ |     |     |     |     |
| 87  | M | O | -   | -   | -   | -,- | -,- |
| 88  | M | O | +   |     | +   | -,- | -,- |
| 94  | M | O | +   | +   | +   | -,- |     |
| 95  | M | O | -   | -   | -   | -,- | -,- |
| 96  | M | O | -   | -   | -   | -,- | -,- |
| 97  | F | A | +/- |     |     |     |     |
| 98  | M | A | -   | -   | -   | -,- | -,- |
| 99  | F | A | -/- |     |     |     |     |
| 100 | M | A | +   | +   | +   | -,- | -,- |
| 101 | M | O | +   | +   | +   | +,- | -,- |
| 102 | F | O | +/+ |     |     |     |     |
| 103 | M | B | -   | +   | -   | -,- | -,- |
| 104 | M | O | -   | -   | -   | -,- | -,- |
| 105 | M | O | +   | +   | +   | -,- | +,- |
| 106 | M | O | +   | +   | -   | -,- | -,- |
| 107 | F | A | +/+ | +/+ | +/+ |     |     |
| 108 | M | A | +   |     |     |     | -,- |

M significa masculino, F, femenino, A, B o O, grupo sanguíneo. [+] y [-], indica presencia o ausencia del sitio de restricción polimórfico correspondiente. UI y DE, indican la especificidad dada por la LD PCR utilizada para la genotipificación.

Tabla 10: Frecuencia de haplotipos de los RFLPs *Xba*I A (IVS22) y *Bcl*I (IVS18) en varones de población Argentina normal para cálculo de  $D'_{XB}$ .

| <i>Xba</i> I A | <i>Bcl</i> I | Frecuencia absoluta | Frecuencia relativa |
|----------------|--------------|---------------------|---------------------|
| +              | +            | 20                  | 0,54                |
| -              | -            | 13                  | 0,35                |
| +              | -            | 1                   | 0,03                |
| -              | +            | 3                   | 0,08                |
| Total          |              | 37                  | 1                   |

$D'_{XB} = 0,97$  Fisher exacta, S,  $p < 0,001$

## 5.2 DISCUSION

El diseño y puesta a punto de las LD PCRs aplicadas a las amplificaciones específicas de los RFLPs *Xba*I A (UI y DI LD PCR) y *Xba*I BC (DE LD PCR) surgieron a partir de la inspección de la LD PCR superpuesta-multiplex para detección de la *Inv22* que ha sido reportada recientemente (Liu *et al*, 1998 y Liu y Sommer, 1998).

El ensayo de PCR para amplificación específica de esta región ha constituido un importante desafío debido a: (1) la enorme variación en el contenido de GC a lo largo del segmento templado de DNA (30% - 80%), (2) la longitud de la secuencia específica a ser amplificada (*int22h*, 9,5 kb), y (3) las restricciones que surgen respecto a la resolución de los fragmentos obtenidos para interpretación de las variantes alélicas del polimorfismo después de la digestión enzimática del amplímero. La solución de estos inconvenientes se basó en algunas modificaciones inusuales: para el punto (1) del párrafo anterior se utilizaron altas concentraciones de DMSO y la adición del nucleótido trifosfato modificado, 7-deaza dGTP, que también apareja específicamente con la base citosina pero con formación de 2 uniones puente de hidrógeno en lugar de 3, produciendo un descenso sesgado de las temperaturas medias de disociación de los dúplex de DNA en los dominios de alto contenido de GC. La otra modificación que contribuyó a la obtención exitosa de amplímeros específicos desde las secuencias *int22h* fue la inclusión de un *primer* dentro de la secuencia repetida ya que permitió la reducción del tamaño de los productos PCR (desde > 9,5 kb a < 7 kb), además de posibilitar una fácil, segura (por la presencia de sitios control) y elegante resolución electroforética de los fragmentos correspondientes a los alelos [+] y [-] (porque imitan a los patrones obtenidos por *Southern blot*) para genotipificación de los RFLPs *Xba*I A y BC.

El procedimiento de LD PCR con un *primer* específico, descrito, representa un nuevo abordaje basado en PCR, para la amplificación específica de polimorfismos incluidos en largas secuencias repetidas de DNA. Como se describió, el método aplicado utiliza un *primer* dentro de la región homóloga y otro fuera de ella sobre una región de secuencia única que define el amplímero específico desde sólo una de las copias.

La genotipificación del RFLP *Xba*I A por DI o bien por UI LD PCR mostrada aquí, incluyendo la amplificación por LD PCR seguida de digestión enzimática *Xba*I y electroforesis en gel de agarosa, provee una herramienta útil para ser incorporada en la rutina de diagnóstico molecular en HA. A pesar de su alta heterocigocidad en la mayoría de los grupos étnicos estudiados (Peake *et al*, 1993) el uso del RFLP *Xba*I estaba siendo

restringido debido a que su genotipificación se basaba en la aplicación de la técnica de *Southern blot* que resulta lenta y laboriosa cuando se necesita información rápida para la provisión de asesoramiento genético. En este sentido, otra razón por la cual suele ser evitado el análisis de *Southern blot* es que éste requiere el uso de sondas marcadas isotópicamente y personal formado para su manipulación segura.

Por su diseño cada una de las reacciones LD PCR (UI y DI LD PCR) genotifican el RFLP *Xba*I que se encuentra asociado a las regiones de copia única del intrón 22 del gen del FVIII (río arriba y abajo, respectivamente) vecinas a la región repetida homóloga de 9,5 kb (*int22h*). Esta genotipificación doble del *locus* intragénico resultará redundante o coincidente en individuos normales ya que el mismo sitio polimórfico *Xba*I A estará asociado a ambas secuencias vecinas del intrón 22. Sin embargo en hemofílicos con la inversión del intrón 22 (Inv22) la recombinación de una de las copias extragénicas con la copia intragénica, resulta en la interrupción de la continuidad de las secuencias únicas del intrón 22 y su separación por más de 300 kb, resultando en que los *primers* específicos de la UI e DI LD PCR amplifiquen por separado los 2 *loci Xba*I involucrados en el evento intercambio recíproco causal. Esta información diferencial que brinda la genotipificación de los 2 *loci Xba*I de las secuencias interactuantes, resultará de gran utilidad en el estudio de los eventos moleculares asociados a la Inv22 (capítulo cuarto del presente trabajo de tesis). Asimismo, la genotipificación conjunta de los RFLP extragénicos *Xba*I B y C encuentra aplicación no sólo en estudios de ligamiento en HA por ser marcadores ligados al gen del FVIII (Chan *et al*, 1989), sino también cuando se la aplica a una población de individuos sin la Inv22, para la estimación de una de las secuencias interactuantes, en su estado anterior al evento de recombinación que termina en la inversión molecular.

Las islas CpG son regiones de DNA, de longitud variable (0,5 - 3 kb) donde no hay disminución sesgada del dinucleótido hipermutable 5'- CG -3' (CpG) como en el resto del genoma, que resulta en un alto contenido de CG y en una proporción equivalente de CpG comparado con GpC (Bird, 1986). Estas islas suelen estar asociadas a regiones promotoras de genes de expresión constitutiva. En los autosomas estas islas exhiben hipometilación de citosinas en el dinucleótido CpG lo que explicaría porque hay una supresión específica de su hipermutabilidad (5-metil CpG a TpG). En el cromosoma X, el estado y patrón de metilación de las islas CpG está altamente conservado en diferentes individuos y tejidos (Maestrini *et al*, 1992) y muestra una fuerte correlación entre la actividad génica y la hipometilación en las islas asociadas a los X activos de las mujeres o los de los varones hemicigotas e hipermetilación en los X inactivos o Lyonizados (Lyon,

1961). Dentro de las secuencias repetidas *int22h* que contienen el RFLP *Xba*I, se encuentra una isla CpG de 3,5 kb que promueve transcripción de 2 genes de expresión constitutiva (F8A y F8B) (Levinson *et al*, 1990, Levinson *et al*, 1992a). Esta isla está casi totalmente contenida dentro de los productos de amplificación de las LD PCR presentadas lo que nos permitió diseñar una técnica para el análisis de sesgo en el estado de Lyonización del cromosoma X, con la adaptación del ensayo para investigación del polimorfismo *Xba*I sólo desde aquellas copias de la isla CpG que presenten completa metilación. Este ensayo incluye: (1) la digestión del DNA genómico de la mujer *Xba*I A heterocigota [+/-] con una enzima de restricción sensible a metilación (MSRE), (2) inactivación de la actividad enzimática y aplicación de la DI o UI LD PCR y (3) análisis del producto PCR resultante (proveniente sólo desde DNA sustrato completamente metilado bloqueando los sitios de reconocimiento de las MSRE) por digestión con la enzima *Xba*I y electroforesis en gel de agarosa. Dependiendo de la perfecta correlación entre la metilación de la isla CpG en *cis* sobre el cromosoma X inactivo, el resultado del análisis densitométrico comparativo de las señales [+] y [+ y -] en la mujer *Xba*I A heterocigota analizada, reflejará la proporción de células donde el alelo [+] está asociado al X inactivo. De este modo una mujer con inactivación al azar presentará un resultado cercano al 50%, mientras que otra con inactivación sesgada extrema, presentará valores cercanos al 0% o 100%. Este tipo de ensayos basados primero en la técnica de *Southern blot* y después, preferentemente en la técnica de PCR, que podríamos denominar como de "genotipificación de polimorfismos sensible a metilación en el cromosoma X", han sido de gran utilidad tanto en el estudio de clonalidad en enfermedades proliferativas (tumores sólidos, leucemias, linfomas, entidades fronterizas como mielodisplasias, etc) (Vogelstein *et al*, 1985, Gilliland *et al*, 1991) así como en la explicación de sintomatología severa inesperada en mujeres portadoras de ciertas enfermedades recesivas ligadas al sexo (hemofilia A, B, inmunodeficiencias ligadas al cromosoma X, etc) (Puck y Willard, 1998). Debido a que la correlación referida (metilación de CpGs sobre el X-inactivo) se apoya sólo en elementos teóricos y que la isla CpG asociada al RFLP *Xba*I tiene algunas características inusuales tales como su gran tamaño y que se encuentra repetida por lo menos tres veces en el cromosoma X; la validación del ensayo propuesto debe incluir experimentos donde se demuestre claramente que el producto LD PCR obtenido proviene únicamente del X-inactivo y no del X-activo. Tales experimentos fueron ensayados por nosotros aplicando las técnicas de genotipificación del RFLP *Xba*I por *Southern blot* y DI LD PCR sensible a metilación (usando numerosas MSREs) sobre muestras de DNA

genómico extraído de leucocitos de sangre periférica de varones y mujeres. Asumiendo que el cromosoma X activo de mujeres tiene el mismo estado de metilación CpG que el único X de varones (Hendriks *et al*, 1992), según el dogma de Lyon aplicado a nuestro sistema, sólo debiera obtenerse señal específica en mujeres proveniente del cromosoma X inactivo y no en varones. Sorpresivamente, a pesar de numerosos controles de completitud de digestión por las MSREs, del descarte de eventuales cambios polimórficos que impidan la digestión y las numerosas confirmaciones de los resultados por repetición del experimento, fueron obtenidas señales específicas de similar intensidad en varones y en mujeres indicando una evidente falta de correlación entre el estado de metilación de la isla CpG asociada a las secuencias *int22h* y su asociación sobre el X-inactivo (De Brasi *et al*, manuscrito en preparación). Este resultado indica que la isla CpG asociada a la copia intragénica de *int22h*, se encuentra inesperadamente metilada al menos en alguna proporción de células de los varones, de lo que se infiere que también lo estará en el X activo de las mujeres. Este hallazgo podría relacionarse al hecho que la isla CpG estudiada se encuentra repetida sobre el mismo cromosoma X y que cualquiera de las copias podría aportar a la expresión total de los genes asociados (Levinson *et al*, 1990). Sin embargo, más allá de las especulaciones que puedan explicar el fenómeno, éste inhabilita el uso de este abordaje para estudio del balance o sesgo en la Lyonización del cromosoma X.



## 6. CAPITULO TERCERO

### ***Nuevo polimorfismo en el gen del factor VIII humano: hallazgo, caracterización y estimación de informatividad en población Argentina y Británica para estudios de ligamiento en hemofilia A.***

#### 6.1 RESULTADOS

Naylor *et al* (1995) demostraron que la Inv22 era causada por un evento de recombinación homóloga, determinando tanto la secuencia nucleotídica como la extensión de los segmentos de DNA interactuantes (*int22h*). Estas secuencias *int22h* se ubican una, dentro del intrón 22 del gen del FVIII (*int22h-1* o intragénica) y las otras dos, en orientación opuesta, a 300-400 kb fuera del gen del FVIII, hacia el telómero Xq (*int22h-2* y *-3* o extragénicas). Mediante la sensible técnica de monitoreo de mutaciones CCM (clivaje químico de dúplex con bases mal apareadas o *mismatch*) compararon las secuencias *int22h-1* contra las copias extragénicas *-2* y *-3*, hallando sorpresivamente sólo 8 diferencias a lo largo de sus 9,5 kb divididas en 14 productos PCR superpuestos (A - N). Después de analizar un número pequeño de casos (individuos normales y hemofílicos con la Inv22) sobre muestras de DNA genómico concluyeron que sólo 3 de éstas podrían resultar diferencias consistentes entre las copias intra y extragénicas de *int22h*. Uno de estos puntos que se encontró en la región central de *int22h*, en el amplímero H, como diferencia consistente entre *int22h-1* e *int22h-2* y *-3*, podría encontrar utilidad en estudios de mapeo posicional del punto de ruptura involucrado en la Inv22.

Trabajando sobre la hipótesis que la evidencia encontrada por Naylor *et al* (1995) podría alternativamente deberse a polimorfismos de DNA sobre las copias intra y/o extragénicas, nos propusimos localizar y caracterizar esta diferencia en el segmento H (GenBank X86012, nucleótidos 2502-3174).

##### 6.1.1 Investigación de un candidato a polimorfismo dentro de las secuencias *int22h*

La referida diferencia entre los homólogos de *int22h* fue detectada aproximadamente a 150 bp dentro del segmento de amplificación H (672 bp) del estudio citado (Naylor *et al*, 1995). Para investigar esta diferencia fue diseñada una reacción PCR de 176 bp (GenBank X86012, nucleótidos 2964 - 3140) definida por los *primers* DWF y DWR (tabla 3). Según su ubicación

estimada a partir de la secuencia publicada, la diferencia reportada podría potencialmente afectar sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción *Avall*, *HaeIII* o *MspI*. Por lo tanto estas endonucleasas representan enzimas candidatas para la detección de estas secuencias variantes entre los homólogos *int22h*. El producto PCR DW contiene 2 sitios para cada una de las 3 restrictasas citadas, uno, de presencia constante útil como control de la digestión enzimática y el otro correspondiente al sitio potencialmente afectado por la diferencia (en el caso de *Avall*, el sitio constante fue introducido artificialmente por mutagénesis dirigida por la secuencia del *primer* DWR, tabla 3, materiales y métodos).

La digestión separada con *Avall*, *HaeIII* y *MspI* del producto PCR DW obtenido desde muestras de DNA genómico de una mujer (6 *loci*: 2 intra y 4 extragénicos) indicaron que la secuencia diferencial coincidía con el sitio candidato *MspI*, mientras que los fragmentos observados con *Avall* y *HaeIII* fueron consistentes con los predichos por la secuencia publicada (figura 13). Estos resultados permitieron asociar el nucleótido diferencial reportado a un sitio específico de la enzima *MspI*, sin embargo, no permite deducir si se trata de una diferencia "entre" las copias de *int22h* o bien "dentro" de cada uno de ellas como polimorfismo/s de DNA.

Para investigar estas posibilidades, se diseñó una PCR anidada (N PCR) para el análisis específico de los sitios intragénicos y extragénicos por separado.

### 6.1.2 Análisis específico de sitios *MspI* y hallazgo de polimorfismos

Este abordaje de investigación específica del sitio *MspI* desde *int22h-1* e *int22h-2 -3* por separado, fue diseñado acoplado en una N PCR, las LD PCRs (UI o DI para la copia intra y DE para las extragénicas) (figura 14a y 14b) como primera vuelta aportando especificidad de copia (validadas en el capítulo segundo) a la PCR DW, que actúa como segunda vuelta permitiendo el análisis seguro y sensible del sitio *MspI*.

Los dos ensayos para estudio de los sitios *MspI* intra y extragénicos fueron aplicados a muestras de DNA genómico correspondiente a 5 mujeres no relacionadas obteniéndose señales *MspI* [+] en 4 de los 10 sitios estudiados en el *locus* intragénico y 1, 2 o 3 de los 20 extragénicos (figura 14c). Esta evidencia permite predecir que el *locus* intragénico llamado *MspI* A, por analogía al RFLP vecino *XbaI* A, constituye un polimorfismo que se proyecta como de alta heterocigocidad. Asimismo, los resultados obtenidos en los *loci* extragénicos de *MspI* llamados *MspI* BC, también permiten proyectarlos como RFLPs aunque con una heterocigocidad menor.

### 6.1.3 Genotipificación del RFLP *MspI* A

El producto PCR de 176 bp obtenido mediante el abordaje de N PCR usando DI o UI LD PCR como 1º vuelta y DW PCR como 2º, permite la amplificación específica del RFLP *MspI* A. La digestión del amplímero con *MspI* y su análisis por electroforesis en gel de agarosa (2-3%) permite la genotipificación del polimorfismo: las señales de 141 y 35 bp corresponden al alelo *MspI* [-] y las señales 96, 45 y 35 bp, a *MspI* [+]. El sitio *MspI* que define la banda de 35 bp constituye un control para la digestión enzimática. Sin embargo, es la diferencia que se obtiene por comparación entre el amplímero no digerido (176 bp) y el digerido con *MspI*, lo que permite distinguir entre un verdadero alelo [-] (141 bp) y un falso alelo [-] obtenido por digestión parcial (176 bp).

En población Británica (caucásicos de Gales del Sur, Reino Unido) fueron estudiados 85 cromosomas X, obteniéndose frecuencias alélicas *MspI* A +/- de 0,65/0,35  $\pm$  0,10 (figura 15a).

En población Argentina (dadores normales del IIHema, ANM, Argentina) fueron estudiados 57 cromosomas X, obteniéndose frecuencias alélicas *MspI* A +/- de 0,58/0,42  $\pm$  0,13 (tabla 9, figura 16).

### 6.1.4 Genotipificación conjunta de los RFLPs *MspI* A, B y C

El producto PCR DW obtenido de DNA genómico representa una mezcla equimolar de los 3 sitios *MspI*. El sitio *MspI* constante está presente en igual posición, 35 bp río arriba del extremo 3' y los fragmentos asociados a los sitios polimórficos que también son idénticos a los obtenidos en *MspI* A. Por lo tanto, los patrones de digestión obtenidos representan los genotipos combinados de los 3 *loci* (figura 15b).

### 6.1.5 Genotipificación de los RFLPs *MspI* B y C

La genotipificación de los RFLPs *MspI* B y C en muestras de DNA de varones fue obtenida mediante 2 vías alternativas: (i) por inferencia, sustrayendo el genotipo *MspI* A de los resultados obtenidos por genotipificación conjunta de los RFLPs *MspI* A, B y C teniendo en cuenta la densidad relativa de las señales (figura 15), o (ii) por análisis de la digestión *MspI* del producto de la N PCR (DE LD PCR + PCR DW) que es específico para las copias extragénicas (figura 14).

Aunque los cuatro genotipos distintos son posibles { [- -], [+ -], [- +] y [+ +] }, en la práctica [+ -] y [- +] son indistinguibles. En consecuencia, estos 2 últimos serán referidos colectivamente como [(+ -)].

Como resultado de los 85 cromosomas X (170 alelos) estudiados mediante el abordaje (i) en población Británica, se obtuvieron las siguientes frecuencias alélicas *MspI* BC: [- -] = 0,77, [(+ -)] = 0,14 y [+ +] = 0,09.

En población Argentina se estudiaron por la técnica de N PCR, (abordaje ii), 47 cromosomas X (94 alelos extragénicos), obteniéndose frecuencias alélicas *MspI* BC: [- -] = 0,87, [(+ -)] = 0,09 y [+ +] = 0,04 (tabla 9, figura 16b).

#### 6.1.6 Estimación de heterocigocidad del RFLP *MspI* A y asociaciones alélicas con otros polimorfismos del gen del FVIII en población normal Argentina y Británica

Las frecuencias alélicas,  $pM^{Un}$  o  $pM^{Dn}$  permiten estimar la heterocigocidad (2pq, suponiendo equilibrio de Hardy-Weinberg) del RFLP *MspI* A (M):  $0,49 \pm 0,13$  y  $0,46 \pm 0,11$  para las poblaciones Argentina y Británica, respectivamente (tabla 9, figura 16).

Para estimar la informatividad adicional que aporta este nuevo polimorfismo en el contexto de los RFLPs del gen del FVIII, más usados para diagnóstico molecular en HA [*BclI*, (B) y *XbaI* A (X) de los intrones 18 y 22, respectivamente] se estudiaron las asociaciones alélicas estableciendo las frecuencias haplotípicas por investigación de muestras de varones de las colecciones de DNA representativas de las poblaciones Argentina y Británica.

En población Argentina fueron genotipificados 37 cromosomas X (haplotipos B X M). Las frecuencias obtenidas de los 8 haplotipos posibles permiten estimar un *I.d.*,  $D'_{B/M} = 0,99$  y  $D'_{X/M} = 0,93$  (tabla 11). Estos parámetros obtenidos representan diferencias significativas respecto al equilibrio entre los 2 pares de marcadores analizados, en ambas poblaciones (prueba exacta de Fisher, S,  $p < 0,01$ ). Sin embargo, el no-completo *I.d.* entre los 2 pares de marcadores estudiados, considerando las frecuencias haplotípicas observadas, permite estimar una informatividad conjunta del 55% para B + M, y del 62% para X + M (figura 17 y 18). Específicamente, en población Argentina M aporta a B una informatividad adicional de 15% {correspondiendo todo el 15% a los individuos homocigotas B [+ +]} (figura 17) y M aporta a X una heterocigocidad adicional de 15% {correspondiendo el 12% a los homocigotas X [+ +] y 3% a los X [- -]} (figura 18).

En población Británica se estudió el *I.d.* entre X y M en 85 cromosomas X, obteniéndose un  $D' = 0,97$ , que coincidiendo con los datos Argentinos, si bien difieren significativamente respecto al equilibrio de ligamiento (prueba exacta de Fisher, S,  $p < 0,01$ ), *MspI* A aporta a *XbaI* A una informatividad adicional del 12% {7% para los individuos homocigotas X [+ / +] y 5% para los homocigotas X [- / -]} que sumada a la heterocigocidad (2pq) propia de X (47%) permite estimar una informatividad conjunta del 59% (tabla 12, figura 19).

Fueron estudiados los haplotipos *MspI* A BC. En los 85 cromosomas X estudiados en población Británica se observaron para los 3 loci M: [A / (BC)], [+ / - -] = 0,47, [- / - -] = 0,30, [+ / (+ -)] = 0,12, [+ / ++] = 0,07, [- / (+ / -)] = 0,02 y [- / ++] = 0,02. Estos resultados son consistentes con los estimados a partir de las frecuencias individuales de *MspI* A y *MspI* (BC) ( $\chi^2_{2DF} = 2,467$ , NS,  $p = 0,291$ ). Las frecuencias haplotípicas encontradas en los 40 cromosomas X de población Argentina si bien no permiten el análisis estadístico, sugieren que no hay diferencias respecto de lo encontrado en población Británica: [A / (BC)], [+ / - -] = 0,43, [- / - -] = 0,46, [+ / (+ -)] = 0,11, [+ / ++] = 0, [- / (+ / -)] = 0 y [- / ++] = 0.

#### 6.1.7 Caracterización del RFLP *MspI* A

El análisis de la secuencia nucleotídica de los productos PCR derivados de los alelos *MspI* A [+] y [-] muestran que el RFLP es debido a una transición G a A en el dinucleótido CG que forma parte del sitio de reconocimiento de la enzima de restricción *MspI* {CCGGG, la G subrayada representa el cambio encontrado en el alelo M [-]}, correspondiendo a la posición G98 del producto PCR DW de 176 bp y a la G3062 de la secuencia # X86012 del GenBank).

#### 6.1.8 Investigación del nucleótido polimórfico en *MspI* A B y C

*MspI* A [-] parece ser debido a la transición G a A, en el dinucleótido CG citado. Los dinucleótidos CG presentan una probabilidad aumentada de sufrir transiciones, de C a T en la posición 5', o de G a A en 3' (Duncan y Miller, 1980). Por lo tanto, existe la posibilidad que algunos alelos *MspI* [-] ya sea en A, B o C correspondan a la mutación alternativa (C a T). Esto fue investigado usando la enzima de restricción *BstXI*: la transición G a A asociada al alelo *MspI* [-] crea un sitio de reconocimiento de *BstXI*, CCAN<sub>6</sub>TGG (la A subrayada representa al nucleótido estudiado), mientras que la

mutación alternativa C a T, no crea el sitio *Bst*XI. Por lo tanto, la digestión *Bst*XI de los aplímeros DW de los alelos *Msp*I [-], producirá fragmentos de 110 y 66 bp cuando el polimorfismo sea debido a la transición G a A, mientras que permanecerá resistente a la digestión (176 bp) cuando sea debido al cambio C a T.

Mediante este abordaje fueron monitoreados 156 alelos *Msp*I [-] correspondientes a 30 alelos intragénicos y a 126 extragénicos. En todos los casos, fue obtenido el patrón *Bst*XI [+], indicando que los alelos *Msp*I [-] derivan de la transición G a A en los 3 *loci* polimórficos (A, B y C).

Tabla 11: Frecuencia de haplotipos de los RFLPs *Bcl*I (IVS18) *Xba*I A (IVS22) y *Msp*I (IVS22) en varones de población Argentina normal para cálculo de  $D'_{B/M}$  y  $D'_{X/M}$ .

| <i>Bcl</i> I<br>B | <i>Xba</i> I A<br>X | <i>Msp</i> I A<br>M | Frecuencia<br>absoluta | Frecuencia<br>relativa |
|-------------------|---------------------|---------------------|------------------------|------------------------|
| +                 | +                   | +                   | 17                     | 0,46                   |
| +                 | +                   | -                   | 3                      | 0,08                   |
| +                 | -                   | +                   | 2                      | 0,05                   |
| +                 | -                   | -                   | 1                      | 0,03                   |
| -                 | +                   | +                   | 0                      | 0                      |
| -                 | +                   | -                   | 1                      | 0,03                   |
| -                 | -                   | +                   | 0                      | 0                      |
| -                 | -                   | -                   | 13                     | 0,35                   |
| Total             |                     |                     | 37                     | 1                      |

$$D'_{B/M} = 0,99$$

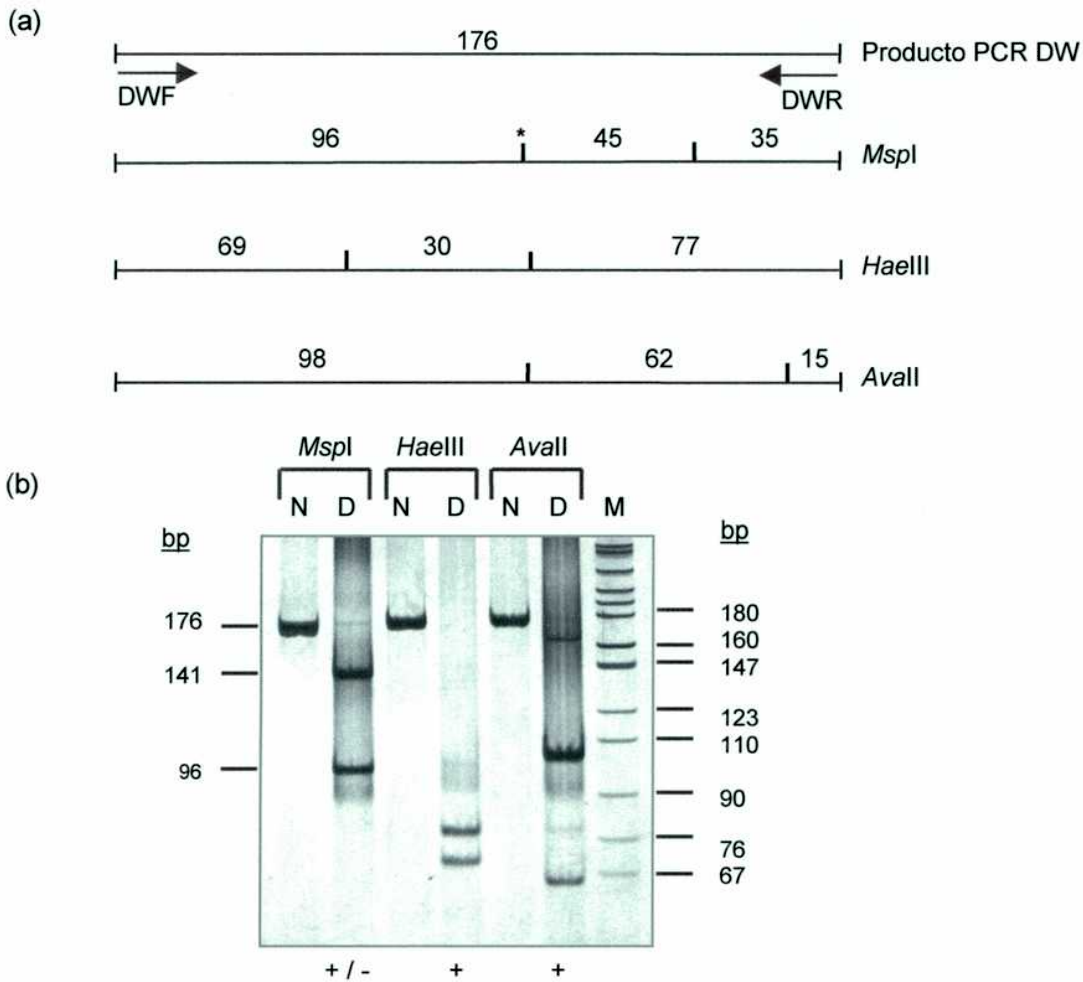
$$D'_{X/M} = 0,93$$

Tabla 12: Frecuencia de haplotipos de los RFLPs *Xba*I A (IVS22) y *Msp*I (IVS22) en varones de población Británica normal para cálculo de  $D'_{B/M}$  y  $D'_{X/M}$ .

| <i>Xba</i> I A<br>X | <i>Msp</i> I A<br>M | Frecuencia<br>absoluta | Frecuencia<br>relativa |
|---------------------|---------------------|------------------------|------------------------|
| +                   | +                   | 48                     | 0,57                   |
| +                   | -                   | 7                      | 0,08                   |
| -                   | +                   | 5                      | 0,06                   |
| -                   | -                   | 25                     | 0,29                   |
| Total               |                     | 85                     | 1                      |

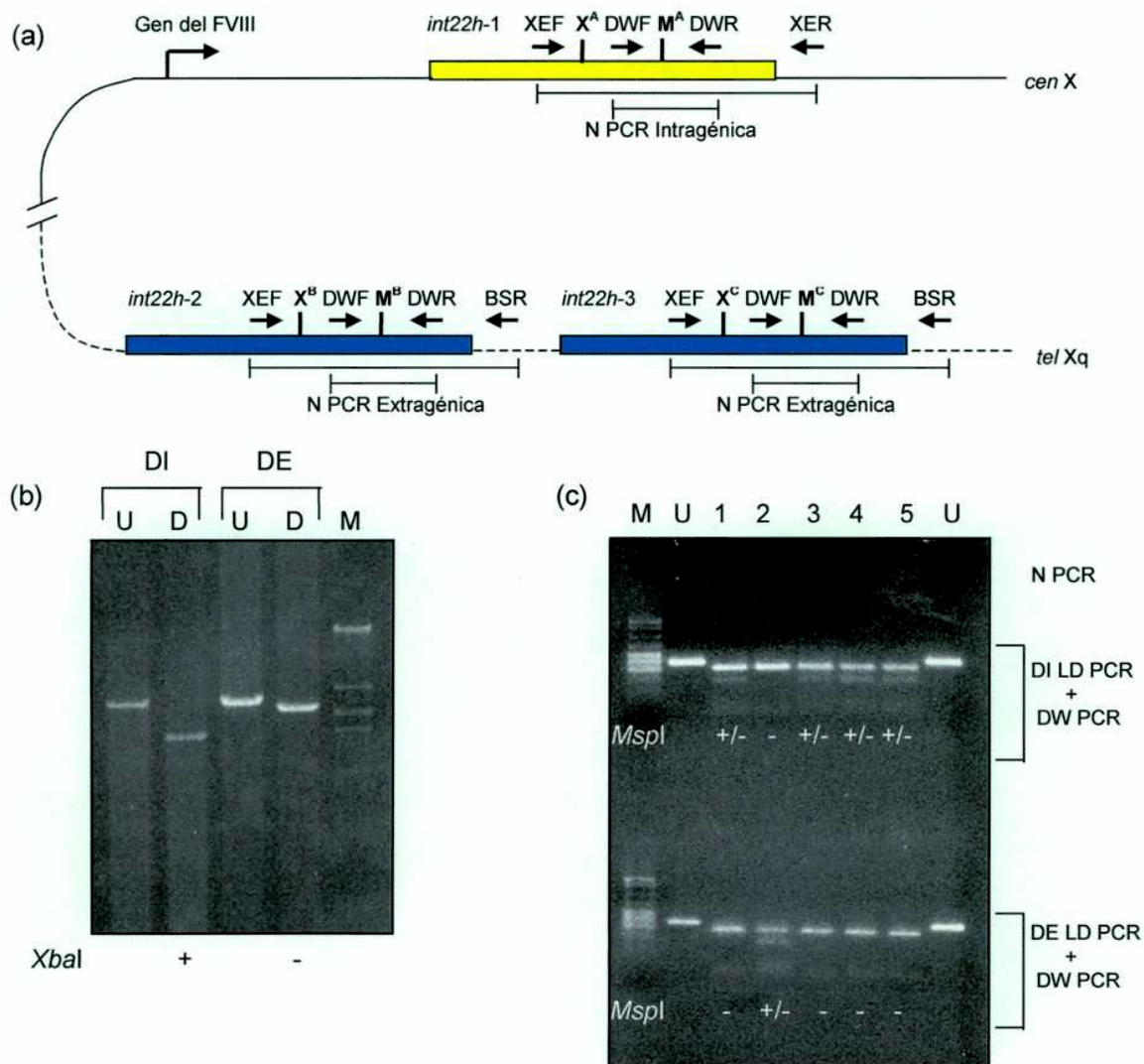
$$D'_{X/M} = 0,94$$

Figura 13: Monitoreo del sitio variable mediante análisis de restricción del producto PCR DW.



(a) Mapa de restricción del producto PCR DW (en bp) de las enzimas indicadas. Los tamaños graficados son los esperados de acuerdo a las secuencias publicadas (GenBank X86012, Naylor *et al*, 1995). El símbolo \* corresponde al sitio de restricción que después del análisis resultó de presencia variable. (b) Análisis electroforético en gel de poliacrilamida no-desnaturalizante de los amplímeros DW de DNA genómico (de una mujer normal) digerido (D) y no digerido (N) con las restrictasas indicadas. Nótese que sólo *MspI* muestra un patrón de restricción combinado [+/-] mientras que *HaeIII* y *AvalI* muestran los patrones predichos [+]. M significa marcador de longitud molecular (DNA pBR322/*MspI*).

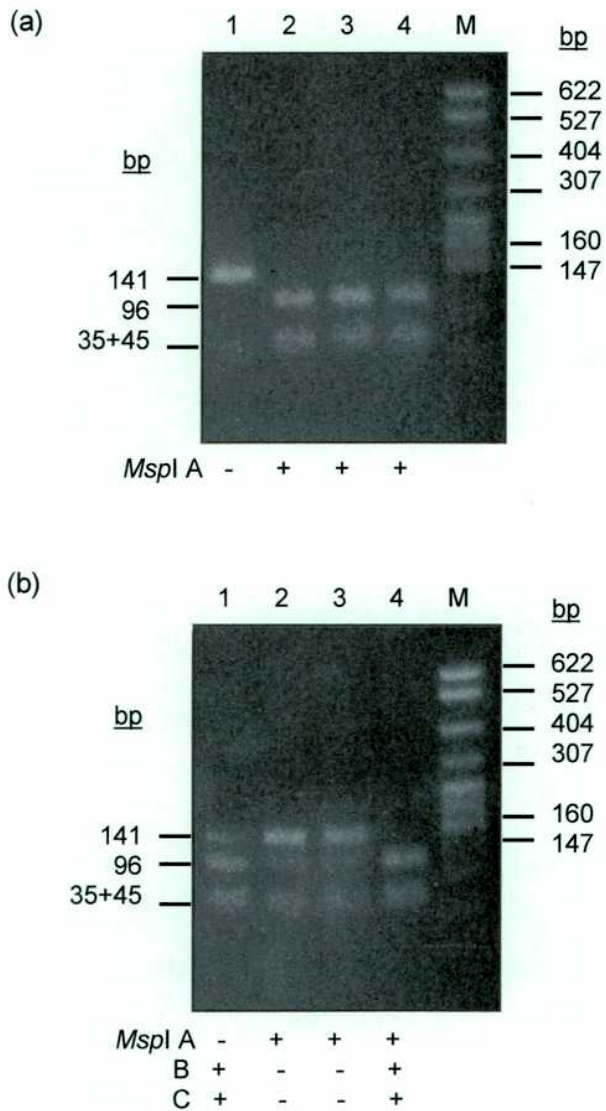


Figura 14: Determinación de genotipos *MspI* en población Argentina.

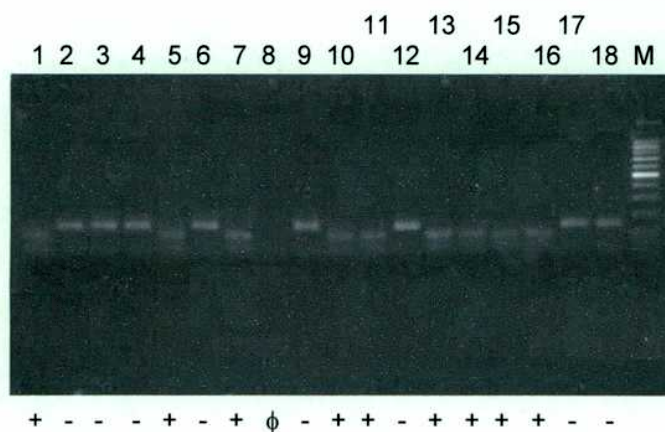
(a) Esquema del diseño de las N PCR para genotipificación de *MspI* A ( $M^A$ ) y *MspI* BC ( $M^B$  y  $M^C$ ). Para *MspI* A: 1ra vuelta DI LD PCR específica de *int22h-1* (caja amarilla) (primers XEF y XER) y 2da vuelta, DW PCR (primers DWF y DWR). Para *MspI* BC: 1ra vuelta DE LD PCR específica de *int22h-2* y *-3* (cajas azules) (primers XEF y BSR) y 2da, DW PCR.

(b) Prueba de especificidad de copia de las 1ras vueltas (DI y DE LD PCRs) utilizando el ensayo de genotipificación de *XbaI* A y BC en un individuo [A / BC] [+ / - -]. Nótese la ausencia de contaminación con señal [-] en el genotipo *XbaI* A obtenido con DI LD PCR y de señal [+], en *XbaI* BC obtenido usando la DE LD PCR. U indica amplímero no digerido, D, digerido con la enzima de restricción *XbaI* y M, marcador de longitud molecular (DNA  $\lambda$ /HindIII).

(c) Aplicación del abordaje de N PCR (la 1ra y la 2da vuelta están indicadas) y digestión *MspI* para análisis de 5 muestras de DNA de mujeres normales (calles 1-5). U corresponde al producto no digerido (176 bp) y M al marcador de longitud molecular (pBR 322/*MspI*). Arriba: genotipificación *MspI* A {10 alelos estudiados, 4 [+]} y abajo: *MspI* BC (20 alelos estudiados,  $\leq 3$  [+]).

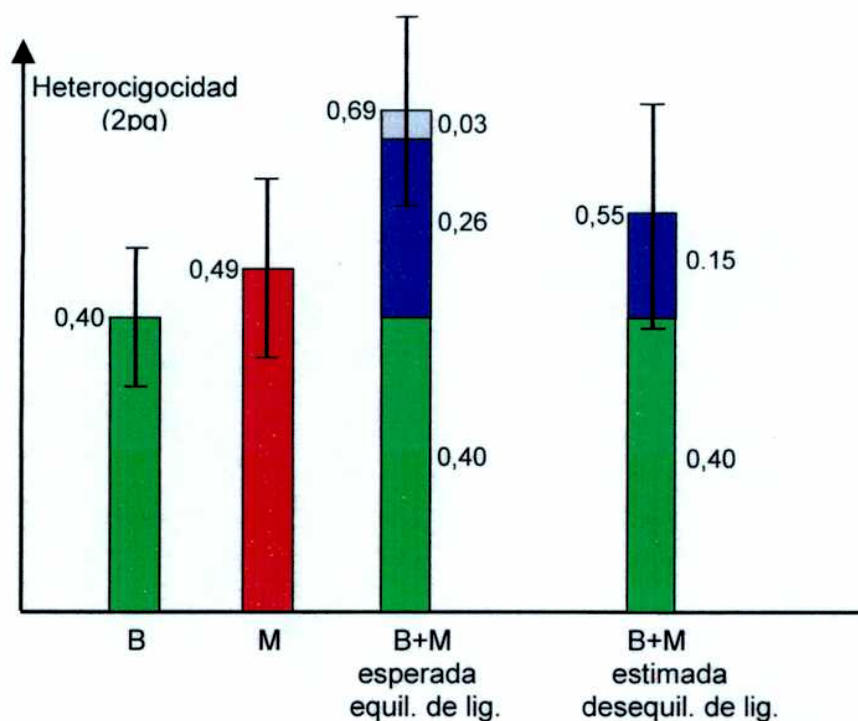
Figura 15: Determinación de los genotipos *MspI* en población Británica.

(a) Genotipificación específica del *locus MspI* A por N PCR (DI LD PCR + DW PCR) en muestras de 4 varones normales. (b) Genotipificación conjunta de los 3 *loci MspI* A, B y C por aplicación directa de la PCR DW sobre DNA genómico de los individuos analizados en (a). El estatus de los alelos correspondientes a *MspI* BC permite ser inferido mediante la sustracción de lo obtenido en (a) de los resultados combinados obtenidos en (b). En estos 4 ejemplos se muestran los resultados obtenidos mediante esta inferencia *MspI* [A / BC]: caso 1, [- / ++]; caso 2, [+ / - -]; caso 3, [+ / - -] y caso 4, [+ / ++].

Figura 16: Genotipificación del locus *MspI* A en muestras de la colección Argentina normal.

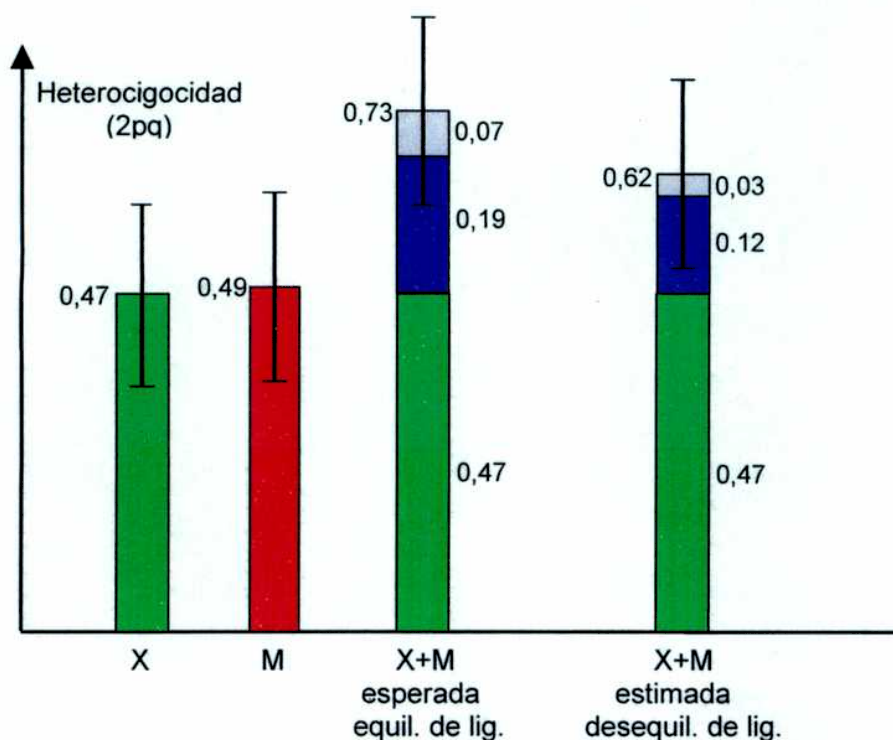
Análisis por electroforesis en gel de agarosa (2%) de los productos N PCR (UI LD PCR + PCR DW) digeridos con *MspI* para genotipificación del polimorfismo *MspI* A. El símbolo  $\phi$  indica ausencia de producto PCR para genotipificación y M corresponde al marcador de tamaño molecular (100 bp, Promega). Nótese que en esta serie 9 de las 17 muestras que pudieron ser genotificadas resultaron *MspI* A [+].

Figura 17: Heterocigocidades estimadas, simples y combinadas entre los RFLPs *Bcl* I y *Msp* I A en población Argentina.



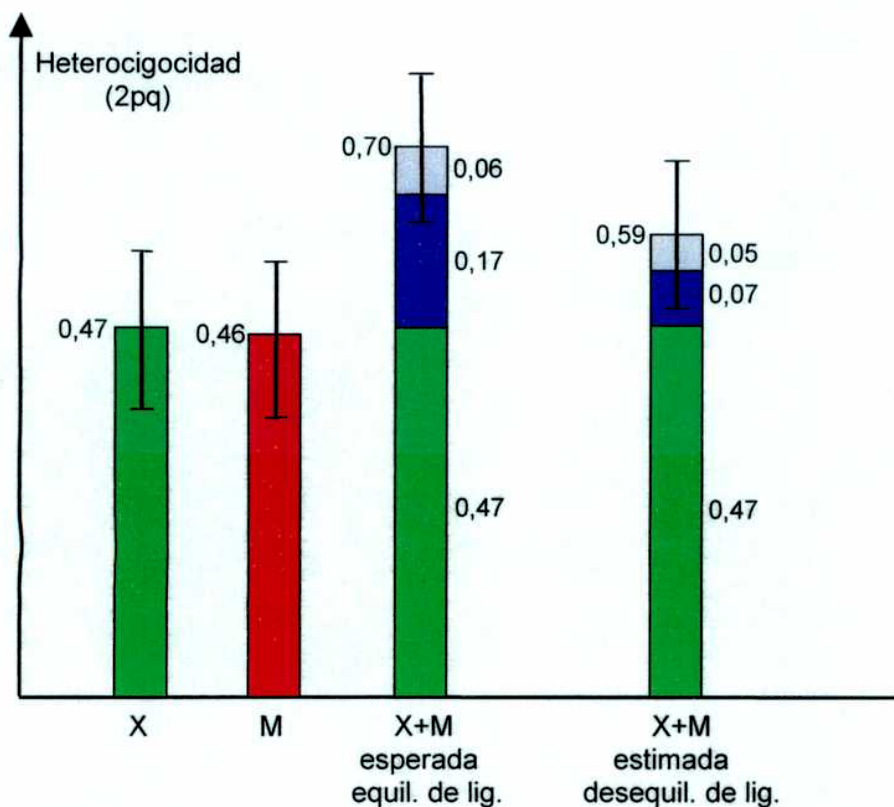
La altura de las barras indica la heterocigocidad estimada suponiendo equilibrio de Hardy-Weinberg ( $2pq$ ). B corresponde al polimorfismo *Bcl* I y M, a *Msp* I A. Heterocigocidad esperada supone el cálculo asumiendo equilibrio de ligamiento entre B y M, en la cuarta columna se grafica el aumento de la informatividad estimada utilizando las asociaciones alélicas observadas en población Argentina. En las tercera y cuarta columnas se discriminaron los aportes de heterocigocidad provenientes de los B no-informativos [+/+], en azul y [-/-], en gris.

Figura 18: Heterocigocidades estimadas, simples y combinadas entre los RFLPs *Xba*I A y *Msp*I A en población Argentina.



La altura de las barras indica la heterocigocidad estimada suponiendo equilibrio de Hardy-Weinberg (2pq). X corresponde al polimorfismo *Xba*I A y M, a *Msp*I A. Heterocigocidad esperada supone el cálculo asumiendo equilibrio de ligamiento entre X y M, en la cuarta columna se grafica el aumento de la informatividad estimada utilizando las asociaciones alélicas observadas en población Argentina. En las tercera y cuarta columnas se discriminaron los aportes de heterocigocidad provenientes de los X no-informativos [+/+], en azul y [-/-], en gris.

Figura 19: Heterocigidades estimadas, simples y combinadas entre los RFLPs *Xba*I A y *Msp*I A en población Británica.



La altura de las barras indica la heterocigidad estimada suponiendo equilibrio de Hardy-Weinberg ( $2pq$ ). X corresponde al polimorfismo *Xba*I A y M, a *Msp*I A. Heterocigidad esperada supone el cálculo asumiendo equilibrio de ligamiento entre X y M, en la cuarta columna se grafica el aumento de la informatividad estimada utilizando las asociaciones alélicas observadas en población Británica. En las tercera y cuarta columnas se discriminaron los aportes de heterocigidad provenientes de los X no-informativos [+/+], en azul y [-/-], en gris.

## 6.2 DISCUSION

La extensión y el grado de homología de las secuencias *int22h* ha sido previamente investigada por otros autores (Naylor *et al*, 1995). Sorprendentemente, a lo largo de las 9,5 kb de secuencia homóloga fueron encontradas sólo 3 posiciones candidatas que podrían ser diferencias consistentes entre las copias de *int22h*-1, -2 y -3. Estas diferencias fueron encontradas en experimentos de monitoreo mediante la técnica de CCM que presenta la máxima eficiencia en la detección de dúplex de DNA con bases mal apareadas, por lo que puede descartarse que hayan quedado otras posiciones diferenciales no puestas en evidencia.

La posición aproximada de una de esas 3 diferencias, vecina al RFLP *Xba*I, para cuya genotipificación se habían diseñado y validado 3 PCRs de larga distancia específicas de las copias intra y extragénicas de *int22h* (UI, DI y DE LD PCR, capítulo segundo) permitió la continuación y ampliación de los estudios de Naylor *et al*, 1995. Esta diferencia de secuencia encontrada, fue caracterizada en este capítulo como el RFLP *Msp*I A de alta heterocigocidad.

Los datos del nuevo RFLP *Msp*I contribuyen con 2 líneas de evidencia al sustento de la hipótesis propuesta que considera a la conversión génica entre las secuencias *int22h* como el fenómeno más importante para mantener la evolución concertada, medida por el alto grado de homología existente entre las 3 copias, que han atravesado en forma independiente, por lo menos, los 5 millones de años de la evolución humana (Levinson *et al*, 1992b, Naylor *et al*, 1995). Primero, sólo la transición G a A, fue detectada en los 156 alelos *Msp*I [-] analizados. Esta observación es compatible con la conversión génica como una fuente de expansión de alelos [-] pero es difícil de conciliar con la mutación reiterada del dinucleótido CpG como fuente. Segundo, si en base a las frecuencias haplotípicas observadas tanto en población Británica como Argentina, se asume un haplotipo ancestral *Msp*I A / BC, [+ / - -], entonces conversiones génicas bidireccionales que surgen de la interacción molecular entre los sitios *Msp*I A / B y A / C, ya sea intra o inter cromátide, podrían explicar tanto las frecuencias actuales obtenidas de los haplotipos *Msp*I A y BC como la ausencia de un significativo desequilibrio de ligamiento como fue reportado a pesar de encontrarse A de BC a una distancia genética menor a los 2 cM (Chan *et al*, 1989). Otra vez, la hipermutabilidad del sitio CpG no permitiría explicar la introducción de alelos [+] en B y C, ya que sólo provee explicación para la mutación reversa {del alelo [+] al [-]}. Sin embargo, podrían presentarse hipótesis alternativas o complementarias para

explicar la alta homología observada entre las secuencias *int22h*, por ejemplo, partir de otros haplotipos ancestrales y trazar otras rutas evolutivas incluyendo fenómenos como el efecto fundador y/o ventajas selectivas no sospechadas asociadas a ciertos haplotipos, etc (Vogel y Motulsky, 1997).

Además de estas consideraciones teóricas, el nuevo RFLP *MspI* A presentado aquí, tiene utilidad práctica en el diagnóstico molecular de la hemofilia A. Para la detección de portadoras y diagnóstico prenatal mediante análisis indirecto, los marcadores polimórficos utilizados deben reunir 2 características: alta informatividad y confiabilidad diagnóstica (Peake *et al*, 1993). Desde una perspectiva práctica, para un polimorfismo de importancia clínica, son importantes la rapidez, la posibilidad de concatenar ensayos, la ausencia de artefactos técnicos y la presencia de controles internos que permitan detectar claramente eventuales fallas en el proceso de genotipificación. La informatividad puede ser optimizada por el análisis de *loci* polimórficos que muestren alto grado de heterocigocidad y a la vez, un bajo grado de desequilibrio de ligamiento. La confiabilidad diagnóstica, por su parte, adquiere mayor solidez por la investigación simultánea de varios *loci*, para que el diagnóstico se base en resultados informativos provenientes de más de un *locus*. Asimismo, es un ejercicio de buena práctica confirmar los resultados obtenidos con metodologías que pueden presentar artefactos técnicos, con resultados obtenidos con técnicas más robustas. Por ejemplo, los microsatélites de los intrones 13 y 22 del gen del FVIII (Lalloz *et al*, 1991, Lalloz *et al*, 1992) a pesar de presentar alta informatividad, pueden aumentar o disminuir de tamaño entre generaciones (sumar o restar una o más unidades de repetición, por ejemplo el motivo dinucleotídico CA del microsatélite del intrón 13) como resultado de eventos moleculares relativamente frecuentes (deslizamiento o *slippage* de la DNA polimerasa, o bien, apareamiento y recombinación desigual) que pueden llevar a una equívoca asignación y finalmente, a errores diagnósticos.

Por lo tanto, para estudios de ligamiento es valioso contar con un arreglo de polimorfismos dentro del gen del FVIII. El nuevo RFLP *MspI* A constituye un aporte productivo a este arreglo. Por compartir la primera amplificación específica por LD PCR (UI o DI LD PCR) el ensayo de genotipificación del RFLP *MspI* A puede ser concatenado con el de *XbaI* A disminuyendo costos (enzimas, *primers*, reactivos, etc), tiempos y cantidades de muestra de DNA, a menudo muy escasa (por ejemplo DNA extraído de biopsias de vellosidades coriónicas para diagnóstico prenatal).

Además, el análisis combinado del marcador *MspI* A con *XbaI* A permite por un lado respaldar un resultado *XbaI* A informativo, como proveer informatividad adicional cuando



*Xba*I A no es informativo. Desde el punto de vista técnico, el análisis del RFLP *Msp*I A, así como el del RFLP *Xba*I A presentado en el capítulo segundo, no presentan artefactos y ambos cuentan con sitios de restricción para el control del proceso de digestión enzimática del amplímero para genotipificación del polimorfismo.

La interpretación de datos provenientes del estudio de RFLPs con métodos basados en la reacción PCR y digestión enzimática del amplímero resultante, puede eventualmente presentar dudas si no se toma en consideración cierta característica de orden teórico. Los individuos heterocigotas para un RFLP producirán similares cantidades de amplímeros con la secuencia [+] y con la secuencia [-]. Si distinguimos a cada cadena de los dúplex de DNA producidos por PCR como Watson y Crick (W y C), a partir de los heterocigotas [+/-] obtendremos consecuentemente cantidades equivalentes de cada una de las 4 cadenas distintas (W+, C+, W- y C-). Cuando cada una de las cadenas de polaridad W aparee libremente con cada una de las cadenas C, se obtendrán 4 tipos distintos de dúplex de DNA: 2 homodúplex (W+/C+ y W-/C-) y 2 heterodúplex (W+/C- y W-/C+). Por combinación estrictamente al azar serán obtenidas iguales cantidades de los 4 dúplex descritos. Nótese que de las cuatro especies obtenidas sólo el sitio de restricción del homodúplex W+/C+ será reconocido por la enzima y rendirá señal específica del alelo [+], mientras que las restantes 3 especies no serán reconocidas y sólo sumarán para el alelo [-], resultando en una relación de intensidades de señal [+]:[-] de 3:1. Este fenómeno, que podríamos denominar como "efecto 3:1 del heterocigota", adquiere importancia cuando en reacciones PCR de productos de pequeña talla (a menudo amplímeros de longitud menor a 300 bp), es aumentado el número de ciclos más allá de la resistencia y capacidad de la DNA polimerasa. En los últimos ciclos de una serie demasiado larga cuando la actividad enzimática de síntesis se redujo significativamente, los cambios de temperatura sólo desnaturalizan y renaturalizan los productos asegurando la citada asociación al azar de cadenas rindiendo cantidades similares de cada una de las 4 especies que originan el efecto. Sin embargo, a pesar de estas consideraciones que son aplicables tanto al ensayo de genotipificación del RFLP *Msp*I A del intrón 22 como al *Bcl*I del 18, este efecto 3:1 no ha traído en estos marcadores ningún problema en la asignación de alelos.

En resumen, fue hallado un nuevo RFLP en el intrón 22 del gen del FVIII humano con una heterocigocidad estimada (suponiendo equilibrio de Hardy-Weinberg) de 49% y 46% para las poblaciones Argentina y Británica, respectivamente. Teniendo en cuenta el desequilibrio de ligamiento observado, el estudio combinado del RFLP *Msp*I A con el *Xba*I A, a pesar de su cercana proximidad física (734 bp), alcanzó una informatividad conjunta

estimada del 62% en población Argentina y 59% en la Británica; y con el RFLP *BclI* del intrón 18 del 55% en población Argentina, cifra que constituye un aporte significativo considerando que *BclI* presenta por sí solo, una heterocigocidad del 40%.

Las razones expuestas justifican la inclusión del RFLP *MspI* A en la rutina de diagnóstico molecular para asesoramiento genético en familias con hemofilia A.

En contraste, pero de acuerdo a la opinión unánime referida al caso de los RFLPs *XbaI* B y C de características similares, no se recomienda el uso de los RFLPs *MspI* B y C para el diagnóstico molecular en HA debido a: (1) su baja heterocigocidad conjunta (estimada en 0,09 y 0,16 en población Argentina y Británica, respectivamente), (2) a la imposibilidad práctica de resolver la genotipificación de los *loci* B y C por separado; y (3) a la probabilidad de recombinación y rotura del ligamiento entre estos marcadores y el gen del FVIII (estimada en 2 cM).

## 7. CAPITULO CUARTO

***La inversión del intrón 22 del gen del factor VIII está asociada a la conversión génica del marcador polimórfico Xbal: descripción y aplicación de un nuevo modelo para el estudio de la recombinación homóloga en humanos.***

### 7.1 RESULTADOS

La inversión del intrón 22 (Inv22) es una mutación inactivante del gen del FVIII, causada por un evento de recombinación homóloga con entrecruzamiento (*crossing over*) entre secuencias repetidas e invertidas de 9,5 kb (llamadas *int22h*) (Naylor *et al*, 1995). Estas secuencias *int22h* contienen a los RFLPs *Xbal* (X) y *MspI* (M) a 4,3 y 5,1 kb de su extremo río arriba (*upstream*), respectivamente. En el presente capítulo se propone explorar aspectos asociados al mecanismo molecular de la recombinación homóloga en meiosis humanas, mediante el análisis de las frecuencias alélicas de los marcadores polimórficos *Xbal* y *MspI*, comparando los valores obtenidos en la población de hemofílicos con la Inv22, con datos de la población normal (sin la Inv22) transformados bajo la suposición de diversas hipótesis mecanísticas alternativas.

#### 7.1.1 Descripción del abordaje de análisis del mecanismo molecular de la Inv22

El análisis consta de las siguientes fases:

(i) La estimación de las frecuencias alélicas de X y M **antes del evento**, se realiza genotipificando individuos normales. Esto se realiza estudiando las frecuencias correspondientes a la copia intragénica (I o *int22h-1*) ( $pX^{UIn}$  y  $pM^{UIn}$  o bien  $pX^{DIn}$  y  $pM^{DIn}$  que en individuos sin la inversión dan igual resultado de manera inequívoca, figura 20a) y a las copias extragénicas (E o *int22h-2 / -3*) ( $pX^{DEn}$  y  $pM^{DEn}$ , figura 20a).

(ii) Planteo de distintas hipótesis sobre la presencia y ubicación de los intermediarios moleculares del mecanismo de la Inv22 y estimación en consecuencia de las frecuencias alélicas de los marcadores después del evento. El cálculo se realiza mediante la aplicación de las ecuaciones que surgen a partir de suponer verdaderas cada una de las hipótesis, sobre las variables estimadas en la fase (i) (I y E). En la figura 21 se muestran cada una de las hipótesis sobre el origen de la Inv22 y las ecuaciones asociadas que permiten calcular las

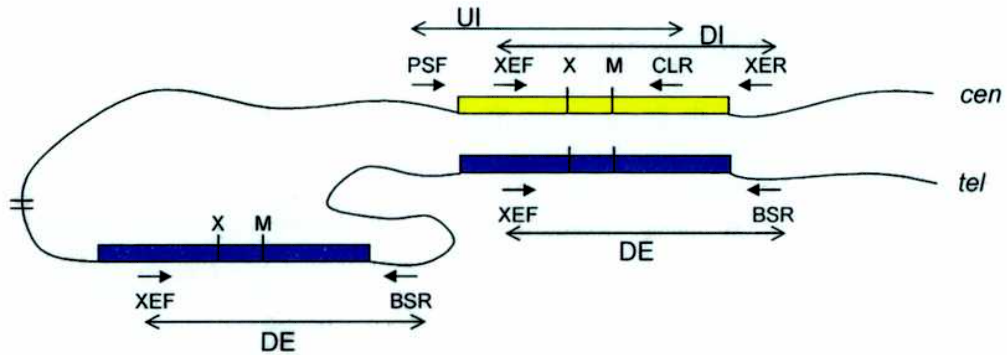
frecuencias alélicas **esperadas después del evento** bajo cada una de esas hipótesis mediante la genotipificación por LD PCR UI y DI en la población de hemofílicos con la Inv22 (valores esperados U y D, hipótesis  $h_1, h_2, \dots, h_9$ , figura 21). En la figura 4 y 5 (introducción) se muestran como se forman las distintas regiones con referencia al evento iniciador de la recombinación, la ruptura de doble cadena (DSB), bajo las distintas hipótesis diseñadas para explicar el mecanismo de la recombinación homóloga meiótica. Los errores de estos valores esperados bajo cada una de las hipótesis, son calculados por propagación usando las ecuaciones de Gauss (materiales y métodos) sobre los errores de muestreo de las variables estimadas en (i).

(iii) Genotipificación de las frecuencias alélicas de ambos *loci*, **observadas después del evento** sobre aquellos cromosomas X que sufrieron la inversión por recombinación homóloga (evidenciada por sus consecuencias geno y fenotípicas en la población de hemofílicos A severos informativos para la Inv22). Nótese que el hecho de tratarse de una inversión permite la recuperación de la información a partir de las 2 secuencias involucradas después de ocurrido el evento molecular de recombinación, en la misma molécula de DNA que lo sufrió. Desde el punto de vista práctico la genotipificación del *estatus* del marcador (de cada uno de los marcadores) en ambas secuencias interactuantes, se logra mediante la aplicación de las 2 LD PCRs hemi-específicas de *int22h-1* (un *primer* específico): (1) UI LD PCR, específica del intrón 22 del gen del FVIII sobre la región vecina *upstream* de la secuencia repetida *int22h*, (frecuencias U, notadas con el error del intervalo de confianza del 95% de la distribución binomial como  $pX^{U_i} \pm E95$  y  $pM^{U_i} \pm E95$ ) y (2) DI LD PCR, específica del intrón 22 del gen del FVIII sobre la región vecina *downstream* de la secuencia repetida *int22h*, (frecuencias D, también notadas con el error del 95%,  $pX^{D_i} \pm E95$  y  $pM^{D_i} \pm E95$ ) (figura 20b).

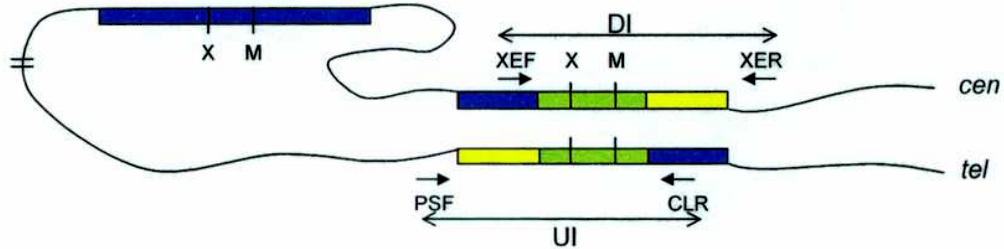
(iv) Para evaluar por comparación, la probabilidad relativa de cada uno de los intermediarios moleculares propuestos, las frecuencias esperadas bajo cada una de las 10 hipótesis, calculadas en (ii), son graficadas junto con las observadas después del evento (iii).

Figura 20: Esquema y bases teóricas del abordaje de análisis del mecanismo molecular de la Inv22.

(a) Antes del evento: Población normal, cromosomas X sin la Inv22.



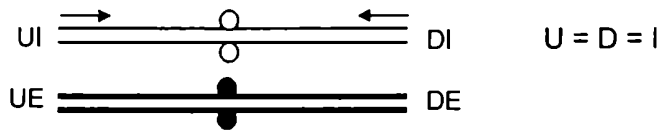
(b) Después del evento: Población hemofílica positiva para la Inv22, cromosomas X con la Inv22.



(a) Estimación de frecuencias alélicas antes del evento. Para genotipificar el estado de los marcadores *Xba*I (X) y *Msp*I (M) en la primera de las secuencias *int22h* involucradas en la recombinación (*int22h-1* o intragénica) se utilizan indistintamente la LD PCR UI (primers PSF y CLR) o DI (primers XEF y XER), y para la segunda secuencia (una de las copias extragénicas, *int22h-2* o *int22h-3*), se utilizó la LD PCR DE (primers XEF y BSR); ambas en población normal (sin la Inv22). Los oligonucleótidos primers subrayados son específicos de regiones de DNA de copia única, mientras que los no-subrayados pertenecen a *int22h*. (b) Después de producida la Inv22, el análisis de los genotipos X y M involucrados (marcadores que pudieren sufrir cambios de estado detectables durante el evento de recombinación homóloga, región verde en el esquema), se realiza en la población de hemofílicos A severos, informativos para la Inv22; mediante la UI LD PCR para estudiar el alelo que queda ligado a la región intragénica/upstream y la DI LD PCR para estudiar el alelo que queda ligado a la otra región de copia única, intragénica/downstream. Cen y tel indican la posición del centrómero y telómero. Las flechas señalan la posición de los primers y los segmentos (doble flecha) representan los amplímeros para las LD PCRs indicadas.

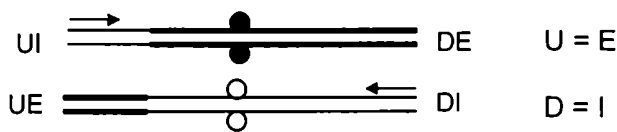
Figura 21: Hipótesis moleculares del origen de la Inv22 y sus respectivas frecuencias alélicas esperadas de los polimorfismos de *int22h*.

(H0) Antes del evento de recombinación homóloga.

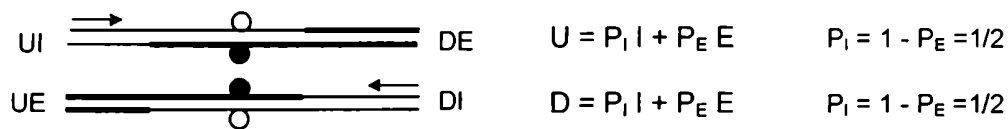


Hipótesis asociadas a la ausencia de conversión génica neta.

(H1) COUP. Entrecruzamiento neto río arriba del marcador. Homodúplex E ligado a U y homodúplex I ligado a D.



(H2) SHIE. Heterodúplex ligado a U e I. Conversión génica alternativamente posible en ambas direcciones  $I \Rightarrow E$  y  $E \Rightarrow I$ .



(H3) CODW. Entrecruzamiento neto río abajo del marcador. Homodúplex I ligado a U y homodúplex E ligado a D.

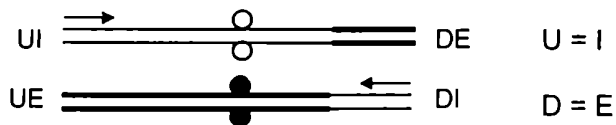
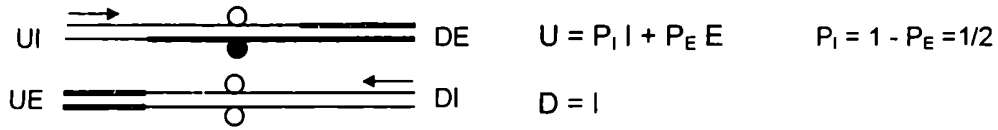


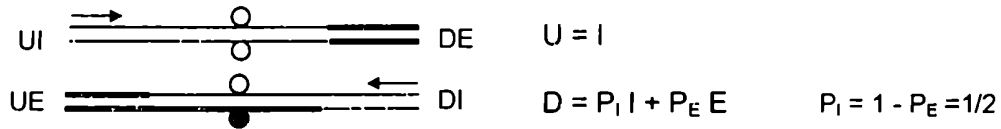
Figura 21, continuación.

Hipótesis asociadas a conversión génica orientada I => E.

(H4) AHIU. Heterodúplex ligado a U y homodúplex I ligado a D. Conversión génica eventual I => E.



(H5) AHID. Heterodúplex ligado a D y homodúplex I ligado a U. Conversión génica eventual I => E.



(H6) OGCI. Homodúplex I ligado a U y a D. Conversión génica obligatoria I => E.

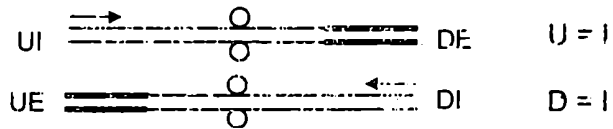
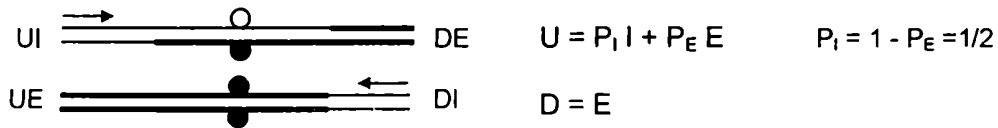


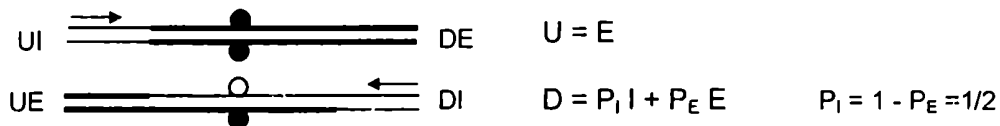
Figura 21, continuación.

Hipótesis asociadas a conversión génica orientada E => I.

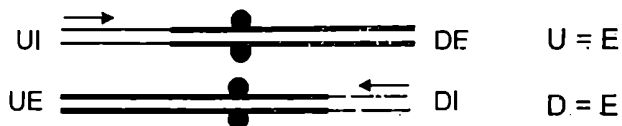
(H7) AHED. Heterodúplex ligado a U y homodúplex E ligado a D. Conversión génica eventual E => I.



(H8) AHEU. Heterodúplex ligado a D y homodúplex E ligado a U. Conversión génica eventual E => I.



(H9) OGCE. Homodúplex E ligado a U y a D. Conversión génica obligatoria E => I.



H0: esquema de las secuencias interactuantes antes del evento de recombinación que origina la Inv22. A continuación, las hipótesis H1, H2, ..., H9 conteniendo: una sigla identificatoria, un título auto-explicativo con descripción de la presencia y ubicación de los intermediarios moleculares del mecanismo que origina la Inv22, representación esquemática y las frecuencias esperadas U y D asociadas a cada una de las hipótesis. Las hipótesis H1, H2 y H3 corresponden a eventos no asociados a la ocurrencia de conversión génica sobre el sitio del marcador, mientras que H4-H9 si se asocian. H4, H5 y H6 se asocian a conversión génica en dirección I => E y H7, H8 y H9, en la dirección inversa E => I. Las frecuencias U y D son calculadas a partir de las frecuencias intra (I) y extragénicas (E) estimadas en población normal, y la asunción teórica de que un heterodúplex es finalmente resuelto tomando la información al azar de cualquiera de las 2 cadenas (esto implica que  $P_I = 1 - P_E = 1/2$ ). UI y DI corresponden a los extremos intragénicos, de DNA de copia única *upstream* y *downstream*, respectivamente; mientras que UE y DE, a los extragénicos. Las flechas indican la posición de aquellos *primers* sobre los cuáles recae la especificidad de cada una de las UI y DI LD PCRs. Las líneas de trazo fino y los círculos abiertos corresponden a las secuencias y las proporciones alélicas intragénicas y los trazos gruesos y los círculos cerrados, a las extragénicas.



### 7.1.2 Requerimientos específicos para la validación del abordaje presentado

Debido a que el abordaje experimental propuesto se basa, en definitiva, en el análisis de asociaciones alélicas entre marcadores polimórficos ligados al gen del FVIII y la Inv22, su validación como instrumento de estudio de la recombinación homóloga requiere la previa demostración empírica de la afirmación teórica (tratada más abajo en la discusión de este capítulo): en una enfermedad severa ligada al sexo, (tal como la SHA asociada a la Inv22) no son esperados significativos desequilibrios de ligamiento entre la mutación (Inv22) y los polimorfismos que no se encuentren relacionados a las secuencias involucradas directamente en el evento genético que originó la mutación. Para este análisis de haplotipos asociados a la Inv22, se utilizó el RFLP *BclI* del intrón 18 del gen del FVIII, no involucrado en las secuencias *int22h* y ubicado aproximadamente a 20 kb del intrón 22 (figura 2, introducción); y se compararon varones de la población normal (no-Inv22) con hemofílicos A severos con la Inv22. En el grupo de cromosomas X sin la Inv22, 39 de 55 ( $pB^n = 0,71 \pm 0,12$ ) resultaron portadores del alelo [+], mientras que en el grupo con la Inv22, 11 de 19 ( $pB^i = 0,58 \pm 0,22$ ). Las diferencias halladas resultaron no-significativas ( $\chi^2_{1DF} = 0,578$ ; NS;  $p = 0,447$ ) lo que indica ausencia de desequilibrio de ligamiento entre la mutación (Inv22) y el polimorfismo (*BclI*) (tabla 13).

Tabla 13: Análisis de la asociación alélica entre la Inv22 y el RFLP *BclI* (IVS18).

| <i>BclI</i> | No-Inv22 | Inv22 |
|-------------|----------|-------|
| [+]         | 39       | 11    |
| [-]         | 16       | 8     |

$$\chi^2_{1DF} = 0,578; p = 0,447, NS$$

Con el objetivo de reunir los datos obtenidos de la población Argentina y Británica fue necesario previamente investigar eventuales diferencias entre las frecuencias alélicas observadas de los distintos *loci* que forman parte del análisis propuesto. Sin embargo, se subraya que salvo ligeras desviaciones en población negra del Brasil y series de población asiática, no han sido reportadas significativas diferencias ni en la prevalencia de la Inv22 (ni de sus diferentes tipos) en SHA, ni de las frecuencias alélicas de los marcadores

polimórficos utilizados en este estudio, entre los distintos grupos étnicos estudiados hasta el presente (Peake *et al*, 1993). Las tablas 14a, 14b y 14c muestran la frecuencias alélicas de *Xba*I A, *Msp*I A y *Msp*I BC, respectivamente, en población normal, no encontrándose en ningún caso diferencias significativas entre las poblaciones mencionadas (pruebas estadísticas al pie de cada tabla). Esta ausencia de diferencias posibilitó computar los datos en grupos únicos sin diferenciación del origen poblacional. Este análisis no fue realizado sobre *Xba*I BC por carecerse de datos de origen Británico por lo que en este caso sólo serán computados los de la población Argentina.

Tabla 14: Análisis de eventuales diferencias entre las poblaciones Argentina y Británica.

(a) Polimorfismo *Xba*I A

| <i>Xba</i> I | Arg. | Brit. |
|--------------|------|-------|
| [+]          | 33   | 55    |
| [-]          | 28   | 30    |

$$\chi^2_{1DF} = 1,255; p = 0,263, NS$$

(b) Polimorfismo *Msp*I A

| <i>Msp</i> I | Arg. | Brit. |
|--------------|------|-------|
| [+]          | 33   | 53    |
| [-]          | 24   | 32    |

$$\chi^2_{1DF} = 0,128; p = 0,721, NS$$

(c) Polimorfismo *Msp*I BC

| <i>Msp</i> I | Arg. | Brit. |
|--------------|------|-------|
| [++]         | 2    | 8     |
| [(+ -)]      | 4    | 12    |
| [- -]        | 41   | 65    |

$$\chi^2_{2DF} = 2,284; p = 0,319, NS$$

En consecuencia, la estimación de los valores intragénicos (I) y extragénicos (E) de los marcadores X y M sobre población normal que serán luego utilizados en el cálculo de las frecuencias esperadas bajo cada una de las hipótesis, fue determinada sobre grupos únicos y resulta:  $pX^{In} = 88/138 = 0,64 \pm 0,08$ ;  $pX^{En} = 2/84 = 0,02 \pm 0,21$ ;  $pM^{In} = 86/142 = 0,61 \pm 0,08$  y  $pM^{En} = 34/262 = 0,13 \pm 0,04$ .

Esta ausencia de diferencias significativas entre las frecuencias alélicas de los polimorfismos X y M en la población Argentina y Británica, se extienden también a la frecuencia de la Inv22 en SHA y a la frecuencia relativa de los distintos tipos de inversión (evidencia presentada en el capítulo primero del presente trabajo de tesis), lo que permite también agrupar en una única población los datos obtenidos de los hemofílicos A severos con la Inv22.

Otro punto que debe ser analizado es el desequilibrio de ligamiento o asociación alélica entre los *loci* intra y extragénicos de marcadores X y M. Este es un punto crítico, ya que el abordaje requiere que cualquier alelo de la secuencia intragénica pueda asociarse al azar en el mismo cromosoma X, con cualquier alelo extragénico (probabilidad independiente o igual al producto de las frecuencias individuales de cada *locus*). Debido a la muy baja prevalencia de los alelos [+] de *XbaI* BC y a no disponer de datos Británicos para aumentar la población estudiada, este análisis sólo pudo realizarse en *MspI*. En forma similar a las anteriores, al provenir de 2 fuentes distintas (poblaciones normales Argentina y Británica), los datos primero debieron ser analizados en cuanto a diferencias para habilitar su computación dentro de un sólo grupo (tabla 15a), lo que resultó posible por no encontrarse diferencias significativas ( $\chi^2_{3DF} = 4,345$ ; NS;  $p = 0,303$ ). Entonces se analizó en un grupo único, la eventual presencia de asociaciones alélicas entre los *loci MspI* A y *MspI* BC (tabla 15b) y no se encontraron diferencias que permitan determinar un significativo desequilibrio de ligamiento entre los *loci* involucrados ( $\chi^2_{2DF} = 3,092$ ; NS;  $p = 0,213$ ).

Tabla 15: Análisis de haplotipos *MspI* A y BC.

(a) Análisis de diferencias entre las poblaciones Argentina y Británica

| <i>MspI</i>         | Arg. | Brit. |
|---------------------|------|-------|
| [+/+ <sub>-</sub> ] | 3    | 16    |
| [+/- <sub>-</sub> ] | 17   | 40    |
| [-/+ <sub>-</sub> ] | 2    | 4     |
| [-/- <sub>-</sub> ] | 18   | 25    |

 $\chi^2_{3DF} = 4,345$ ;  $p = 0,303$ , NS. [ /+<sub>-</sub> ] corresponde a [ /++ ] y [ /+<sub>-</sub> ]
(b) Análisis del desequilibrio de ligamiento entre los loci *MspI* A y *MspI* BC en conjunto

| <i>MspI</i> [BC] | [++] | [(+ <sub>-</sub> )] | [- <sub>-</sub> ] |
|------------------|------|---------------------|-------------------|
| <i>MspI</i> [A]  |      |                     |                   |
| [+]              | 6    | 10                  | 57                |
| [-]              | 4    | 2                   | 43                |

 $\chi^2_{2DF} = 3,092$ ;  $p = 0,213$ , NS

7.1.3 Aplicación de la metodología descrita al análisis del evento de recombinación homóloga en meiosis humanas : Comparación de los valores obtenidos en la población de hemofílicos A severos, no relacionados, con la Inv22; con los esperados bajo cada una de las hipótesis mecanísticas moleculares.

La tabla 16 muestra los genotipos individuales de los hemofílicos con la Inv22, de los RFLPs *BclI*, *XbaI* y *MspI*, estos 2 últimos obtenidos mediante las LD PCRs UI y DI (resumidas como U y D, respectivamente) específicas de las regiones de copia única flanqueantes de la secuencia homóloga *int22h-1*, cada una de las cuales investiga una de las dos secuencias involucradas en el evento de recombinación. En la figura 22 son mostrados ejemplos de genotipificación *XbaI* y *MspI* (U específica) de la población Inv22. La figura 21 muestra cada una de las 9 hipótesis de presencia y ubicación de intermediarios propuestas, para el mecanismo de la Inv22, incluyendo: un número de cada hipótesis (H1, H2, etc.), un título explicativo y una sigla de cuatro letras asociada (COUP, SHIE, CODW, etc.), un esquema

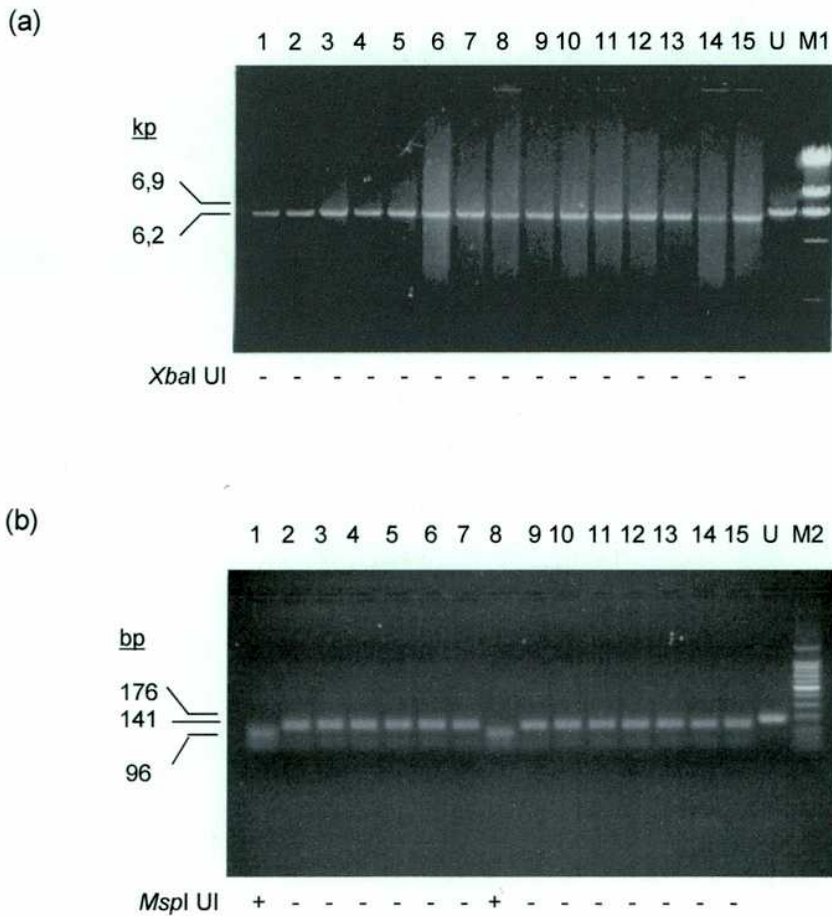
gráfico de los intermediarios moleculares específicos eventualmente involucrados y ecuaciones sencillas mediante las cuales pueden calcularse las frecuencias alélicas esperadas bajo cada una de las hipótesis cuando se genotipifique la población con la *Inv22* mediante las LD PCRs UI y DI. La clave de este análisis múltiple de hipótesis recae en que este último cálculo se realiza usando los parámetros I y E estimados en la población general (sin la *Inv22*), que corresponden a las frecuencias alélicas de los RFLPs dentro de *int22h* en las secuencias intra y extragénicas, respectivamente. Las frecuencias alélicas U y D esperadas bajo cada una de las hipótesis, con su error asociado (calculado por propagación mediante las ecuaciones de Gauss, materiales y métodos) fueron graficadas en un plano U *versus* D donde estas 9 hipótesis representan puntos que pueden distinguirse entre sí por su distinta ubicación en las figuras 23 y 24 para X y M, respectivamente. Sobre estos gráficos bidimensionales la ubicación sobreimpuesta de los valores obtenidos en la población de hemofílicos con la *Inv22* permite un análisis rápido de cuál o cuales intermediarios moleculares del mecanismo (planteados en las hipótesis) estarían relacionados al origen de la inversión molecular. En la figura 23 se analiza la evidencia del RFLP *Xba*I ( $pX^{Ui} = 0,03 \pm 0,07$  y  $pX^{Di} = 0,23 \pm 0,15$ ) mientras que en la figura 24, los de *Msp*I ( $pM^{Ui} = 0,16 \pm 0,16$  y  $pM^{Di} = 0,40 \pm 0,18$ ), (datos obtenidos de la tabla 16, del grupo de hemofílicos con la *Inv22*). La observación de la evidencia de la figura 23 indica que los valores  $pX^i$  obtenidos son compatibles con sólo una de las diez hipótesis planteadas, AHEU, relacionada a la conversión génica del marcador *Xba*I desde los alelos de los *loci* extragénicos hacia los intragénicos (E  $\Rightarrow$  I). Esto significa que el RFLP *Xba*I A ubicado a 4,3 kb del extremo río arriba de la secuencia *int22h* se encuentra incluido en un segmento de DNA que sufre conversión génica. Esta región estaría caracterizada por un heterodúplex asimétrico donde las cadenas extragénicas son dadoras de información sobre las intragénicas, predominando en relación 3:1 para liderar la conversión.

El análisis independiente del marcador *Msp*I se presenta en la figura 24. La magnitud de los intervalos de error de los datos obtenidos debido al número acotado de individuos analizado, permite establecer solamente relaciones de asociación más laxas que para el caso de *Xba*I. Sin embargo, la ubicación de las frecuencias alélicas medias obtenidas para *Msp*I permite la asociación de la región de DNA que incluye a este marcador (5,1 kb del extremo río arriba de *int22h*) con 3 hipótesis: en orden de probabilidad decreciente, (1) AHEU, y con probabilidad evidentemente menor (2) COUP y (3) SHIE (figura 24).

Tabla 16: Genotipificación general de hemofílicos A severos con la Inv22 en población Argentina y Británica (Gales del Sur).

| Identificador Familiar | Origen | Inv22 | BclI            | XbaI U                      | MspI U                      | XbaI D                      | MspI D                      |
|------------------------|--------|-------|-----------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| ACO                    | Arg    | T1    | +               | -                           | +                           | +                           | +                           |
| ALZ                    | Arg    | T1    | -               | -                           | -                           | -                           | -                           |
| ASE                    | Arg    | T1    | +               | -                           | -                           | +                           | +                           |
| BEL                    | Arg    | T1    | -               | -                           | -                           | -                           | -                           |
| BIG                    | Bri    | T1    |                 |                             |                             | -                           | -                           |
| CHE                    | Bri    | T1    |                 |                             |                             | -                           | -                           |
| DAL                    | Arg    | T1    | -               | -                           | -                           | -                           | -                           |
| DOM                    | Arg    | T1    | -               | -                           | -                           | -                           | -                           |
| EVA                    | Bri    | T1    |                 |                             |                             | -                           | +                           |
| GAR                    | Bri    | T2    |                 |                             |                             | +                           | -                           |
| GAE                    | Arg    | T2    | +               | -                           | -                           | -                           | -                           |
| GUI                    | Arg    | T2    | -               | -                           | -                           | -                           | -                           |
| HAR                    | Bri    | T1    |                 |                             |                             | -                           | +                           |
| HER                    | Arg    | T1    | -               | -                           | -                           | -                           | -                           |
| LOP                    | Arg    | T1    | +               | -                           | +                           | +                           | +                           |
| LUG                    | Arg    | T1    | -               | -                           | -                           | -                           | -                           |
| MAJ                    | Bri    | T1    |                 |                             |                             | -                           | -                           |
| MAR                    | Arg    | T1    | +               | -                           | +                           | -                           | -                           |
| MOR                    | Arg    | T1    | +               | -                           | -                           | -                           | -                           |
| NEG                    | Arg    | T2    | +               | -                           | -                           | -                           | -                           |
| PAR                    | Arg    | T1    | +               | -                           | -                           | +                           | +                           |
| PER                    | Arg    | T1    | +               | -                           | -                           | +                           | +                           |
| POW                    | Bri    | T2    |                 |                             |                             | -                           | +                           |
| REE                    | Bri    | T1    |                 |                             |                             | -                           | +                           |
| SAN                    | Arg    | T2    | +               | -                           | -                           | -                           | -                           |
| SOS                    | Arg    | T1    | -               | -                           | -                           | -                           | -                           |
| T-J                    | Bri    | T1    |                 |                             |                             | -                           | -                           |
| T-P                    | Bri    | T1    |                 |                             |                             | +                           | +                           |
| VAS                    | Arg    | T1    | +               | -                           | -                           | -                           | +                           |
| WIL                    | Bri    | T1    |                 |                             |                             | -                           | +                           |
| p = [+]/ Total         |        |       | 11/19           | 0/19                        | 3/19                        | 7/30                        | 12/30                       |
|                        |        |       | pB <sup>I</sup> | pX <sup>U<sup>I</sup></sup> | pM <sup>U<sup>I</sup></sup> | pX <sup>D<sup>I</sup></sup> | pM <sup>D<sup>I</sup></sup> |
|                        |        |       | 0,58±<br>0,22   | 0,03±<br>0,07               | 0,16±<br>0,16               | 0,23±<br>0,15               | 0,40±<br>0,18               |

Figura 22: Genotipificación de los marcadores *Xba*I y *Msp*I en hemofílicos con la Inv22 mediante la UI LD PCR.



Análisis por electroforesis en gel de agarosa para genotipificación *Xba*I y *Msp*I mediante la especificidad UI, en hemofílicos con la Inv22. (a) Amplímeros UI LD PCR digeridos con *Xba*I en una serie de 15 casos positivos para la Inv22. (b) Amplímeros del abordaje de PCR anidada (UI LD PCR + DW PCR) digeridos con *Msp*I en la misma serie de 15 casos positivos para la Inv22. M1 corresponde al marcador de longitud molecular (DNA  $\lambda$ HindIII), M2, al marcador para fragmentos de menor tamaño (DNA "escala" de 100 bp, Promega) y U indica el producto PCR no digerido. Nótese que la en la serie mostrada aquí como ejemplo, la frecuencia de alelos [+] obtenida después del evento de recombinación, resulta muy baja tanto para *Xba*I (0/15) como para *Msp*I (2/15).

Figura 23: Análisis del mecanismo de la Inv22 mediante el marcador polimórfico XbaI.

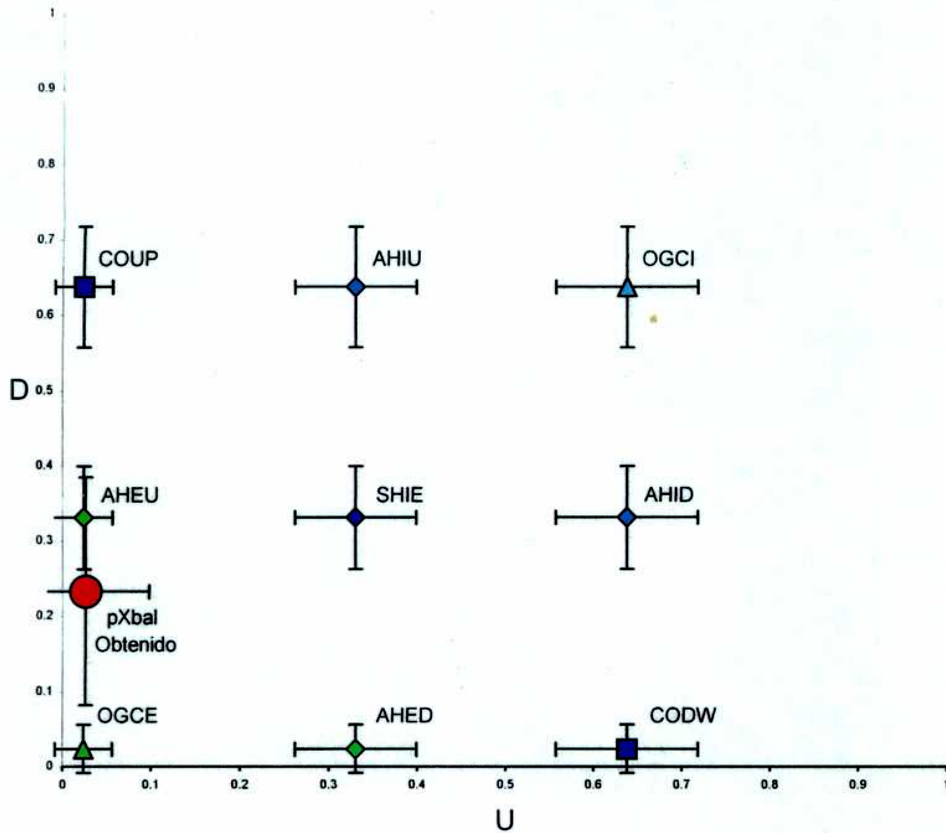


Gráfico de U vs D para análisis de los resultados de las frecuencias obtenidas en los cromosomas portadores de la Inv22 (pXbaI obtenido, círculo rojo) en comparación a 9 hipótesis de la ocurrencia de intermediarios del mecanismo molecular del evento de recombinación homóloga que origina la inversión. Las ecuaciones para calcular los valores U y D graficados en cada una de las hipótesis fueron determinadas en base teórica (figura 21). Los errores asociados a esta estimación fueron calculados a partir de los errores de estimación (error 95% de la distribución binomial) de las variables usadas ( $e_I$ ,  $e_{P_I}$ ,  $e_E$  y  $e_{P_E}$ ) utilizando la fórmula de Gauss de derivadas parciales para su propagación (materiales y métodos). Referencias de las hipótesis H1-H9 presentadas en la figura 21: como símbolos azules los mecanismos no asociados a conversión génica, COUP, significa entrecruzamiento neto río arriba del marcador; CODW, entrecruzamiento neto río abajo del marcador y SHIE, heterodúplex simétrico; como símbolos celestes los intermediarios moleculares que resultarán en conversión génica I=>E, AHIU, heterodúplex asimétrico en U y eventual conversión génica, AHID, heterodúplex asimétrico en D y eventual conversión génica y OGCI, 2 homodúplex I y conversión génica obligatoria; como símbolos verdes los intermediarios moleculares que resultarán en conversión génica E=>I, AHEU, heterodúplex asimétrico en U y eventual conversión génica, AHED, heterodúplex asimétrico en D y eventual conversión génica y OGCE, 2 homodúplex E y conversión génica obligatoria. Nótese que los resultados obtenidos con el marcador XbaI sólo presentan superposición gráfica con la hipótesis AHEU.



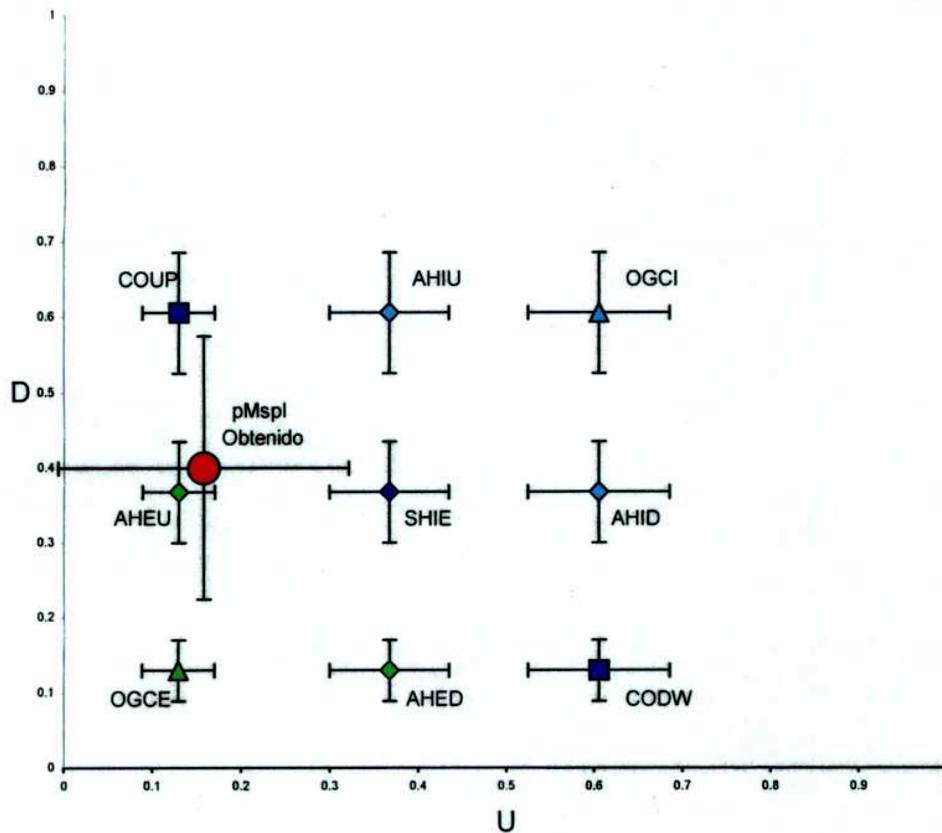
Figura 24: Análisis del mecanismo de la Inv22 mediante el marcador polimórfico *MspI*.

Gráfico de U vs D para análisis de los resultados de las frecuencias obtenidas en los cromosomas portadores de la Inv22 (pMspI obtenido, círculo rojo) en comparación a 9 hipótesis de la ocurrencia de intermediarios del mecanismo molecular del evento de recombinación homóloga que origina la inversión. Las ecuaciones para calcular los valores U y D graficados en cada una de las hipótesis fueron determinadas en base teórica (figura 21). Los errores asociados a esta estimación fueron calculados a partir de los errores de estimación (error 95% de la distribución binomial) de las variables usadas ( $e_I$ ,  $e_{P_I}$ ,  $e_E$  y  $e_{P_E}$ ) utilizando la fórmula de Gauss de derivadas parciales para su propagación (materiales y métodos). Referencias de las hipótesis H1-H9 presentadas en la figura 21: como símbolos azules los mecanismos no asociados a conversión génica, COUP, significa entrecruzamiento neto *río arriba* del marcador; CODW, entrecruzamiento neto *río abajo* del marcador y SHIE, heterodúplex simétrico; como símbolos celestes los intermediarios moleculares que resultarán en conversión génica  $I \Rightarrow E$ , AHIU, heterodúplex asimétrico en U y eventual conversión génica, AHID, heterodúplex asimétrico en D y eventual conversión génica y OGCI, 2 homodúplex I y conversión génica obligatoria; como símbolos verdes los intermediarios moleculares que resultarán en conversión génica  $E \Rightarrow I$ , AHEU, heterodúplex asimétrico en U y eventual conversión génica, AHED, heterodúplex asimétrico en D y eventual conversión génica y OGCE, 2 homodúplex E y conversión génica obligatoria.

Nótese que los resultados obtenidos con el marcador *MspI* presentan superposición gráfica con la hipótesis AHEU y sólo marginalmente con COUP y SHIE.

#### 7.1.4 Análisis estadístico de la asociación de la Inv22 con la conversión génica de los marcadores XbaI y MspI

Con el objetivo de analizar estadísticamente la conversión génica eventualmente asociada a la inversión molecular, fue planteada la siguiente hipótesis nula: "el estado global de los alelos de los marcadores polimórficos XbaI y MspI ([+] o [-]) involucrados en la interacción molecular, no cambiará en forma neta como resultado del evento de recombinación homóloga que origina la Inv22". Planteado matemáticamente:  $(I + E)_{\text{Antes}} = (U + D)_{\text{Después}}$ . Toda la información de frecuencias alélicas necesarias para plantear este análisis se encuentra resumida en la tabla 17. Sabiendo que en el evento de recombinación se encuentran alelos de las copias I y E en relación 1 a 1, se tomaron poblaciones muestrales de igual tamaño para ser sumadas. Además, para ser más estricto respecto al eventual hallazgo de significación estadística, se tomaron las poblaciones de menor tamaño para calcular estas sumas de términos iguales. En las tablas 18 y 19 se analiza la hipótesis nula planteada para cada uno de los marcadores X y M, respectivamente.

Tabla 17: Tabla del resumen total de frecuencias alélicas obtenidas de los RFLPs XbaI y MspI (X y M), en las secuencias intra y extragénicas sobre población normal (I y E), e intragénicas río arriba y abajo (U y D) sobre individuos hemofílicos con la Inv22.

|       | Antes <sup>1</sup> |     |    |     | Después <sup>2</sup> |    |    |    |
|-------|--------------------|-----|----|-----|----------------------|----|----|----|
|       | I                  |     | E  |     | U                    |    | D  |    |
|       | X                  | M   | X  | M   | X                    | M  | X  | M  |
| [+]   | 88                 | 86  | 2  | 34  | 0                    | 3  | 7  | 12 |
| [-]   | 58                 | 56  | 82 | 228 | 19                   | 16 | 23 | 18 |
| Total | 146                | 142 | 84 | 262 | 19                   | 19 | 30 | 30 |

<sup>1</sup> Datos provenientes de la tabla 9, <sup>2</sup> datos provenientes de la tabla 16.

El análisis estadístico de conversión génica sobre el marcador *Xba*I determinó la presencia de diferencias significativas con la hipótesis nula (tabla 18,  $\chi^2_{1DF} = 5,833$ ; S;  $p = 0,016 < 0,05$ ) permitiendo asociar la Inv22 a la conversión génica del marcador *Xba*I desde las secuencias extragénicas. El mismo análisis sobre *Msp*I no permitió el hallazgo de diferencias significativas (tabla 19,  $\chi^2_{1DF} = 0,558$ ; NS;  $p = 0,455$ ).

Tabla 18: Análisis de conservación de alelos (prueba de conversión génica) en la Inv22 sobre el RFLP *Xba*I.

| <i>Xba</i> I | I + E = Antes | U + D = Después |
|--------------|---------------|-----------------|
| [+]          | 51 + 2 = 53   | 0 + 4 = 4       |
| [-]          | 33 + 82 = 115 | 19 + 15 = 34    |
| Total        | 84 + 84 = 168 | 19 + 19 = 38    |

$\chi^2_{1DF} = 5,833$ ;  $p = 0,016$ ; S;  $p < 0,05$

Tabla 19: Análisis de conservación de alelos (prueba de conversión génica) en la Inv22 sobre el RFLP *Msp*I.

| <i>Msp</i> I | I + E = Antes   | U + D = Después |
|--------------|-----------------|-----------------|
| [+]          | 86 + 18 = 104   | 3 + 8 = 11      |
| [-]          | 56 + 124 = 180  | 16 + 11 = 27    |
| Total        | 142 + 142 = 284 | 19 + 19 = 38    |

$\chi^2_{1DF} = 0,558$ ;  $p = 0,455$ , NS

## 7.2 DISCUSION

La metodología de análisis presentada aquí se basa en la comparación de segmentos homólogos del cromosoma X humano, antes y después de sufrir un evento de recombinación homóloga que conduce a una inversión molecular que inactiva el gen del factor VIII de coagulación resultando fenotípicamente en hemofilia A severa. La comparación de los homólogos es posible ya que estas secuencias se encuentran en el mismo cromosoma (y en orientación opuesta), lo que implica que después de la inversión, ellas permanezcan ligadas al mismo cromosoma X afectado y puedan ser estudiadas individualmente en la población hemicigota de hemofílicos A severos con la inversión del intrón 22. La condición ideal para permitir un análisis de alta resolución del mecanismo molecular de la Inv22 requeriría la presencia de varias y equidistantes diferencias nucleotídicas consistentes entre las copias intra y extragénicas que permitan la computación directa de las variantes nucleotídicas obtenidas después del evento, sin dudas de base estadística acerca de su origen. Sin embargo, la presencia de múltiples bases mal apareadas a lo largo de los híbridos de las secuencias en interacción, disminuirían el grado de homología y con ella, se perderían artificialmente características específicas del fenómeno tales como la tasa de recombinación asociada (Waldman y Liskay, 1987), lo que implica un cambio significativo en las condiciones naturales que se quieren investigar. Este tipo de eventos con secuencias de mediana homología es llamada recombinación homeóloga y se diferencia de otros tipos de recombinación (Yang y Waldman, 1997). En el sistema estudiado aquí, los segmentos de DNA homólogo que median este evento de recombinación (*int22h*) presentan secuencias nucleotídicas prácticamente iguales a lo largo de sus 9,5 kb (Naylor *et al*, 1995) por lo que casi las únicas herramientas sensibles que permiten su diferenciación, la constituyen los polimorfismos de las enzimas de restricción *XbaI* y *MspI* (ubicados respectivamente a 4,3 y 5,1 kb del extremo río arriba de *int22h*), quienes tienen frecuencias alélicas muy diferentes sobre los *loci* homólogos. Estrictamente, las diferencias referidas son importantes cuando se comparan las frecuencias alélicas sobre las secuencias intragénicas con las extragénicas tomadas en conjunto, pero son negligibles cuando se compara las extragénicas entre sí. Esta ausencia de diferencias entre las copias extragénicas distal y proximal nos permite estimar globalmente la frecuencia de la copia E (aquella que interacciona con su copia homóloga I) sin tener que genotipificar cada una de ellas por separado. Esta frecuencia E unificada puede ser usada en la estimación del "antes" para los dos tipos inversión molecular que constituyen el "después" (Inv22 tipo 1 o distal,

80% y tipo 2 o proximal, 20%, tabla 4). Es importante subrayar que si bien el objetivo de esta metodología es recabar información del mecanismo molecular de la recombinación homóloga, la originalidad del aporte radica en que se trata de un proceso ocurrido *in vivo* en meiosis humanas donde no es posible la experimentación con uso de constructos para transfección y sólo pueden utilizarse métodos analíticos no invasivos y las herramientas genéticas (no modificadas) ya presentes en la naturaleza.

Un aspecto teórico fundamental que concierne al método utilizado lo constituye el grado de desequilibrio de ligamiento esperado entre la Inv22 y los polimorfismos de DNA del gen del FVIII. Según observó Haldane, (revisión en Vogel y Motulsky, 1997), dado que sólo una pequeña minoría de hemofílicos severos vive lo suficiente para reproducirse y un tercio de los genes afectados están presentes en varones recién nacidos, la condición desaparecería rápidamente a menos que los genes de hemofilia aparecieran por mutación compensando esa pérdida. La única alternativa sería que las mujeres heterocigotas (portadoras) fueran más fértiles que las normales (no portadoras) o bien que en sus meiosis el alelo normal fuera preferencialmente extruído hacia el cuerpo polar. La evidencia, sin embargo, no ha prestado hasta ahora, sustento a estas posibilidades por lo que en la mayoría de las grandes poblaciones humanas, la hemofilia está en un equilibrio donde la selección es balanceada por la mutación. Con estos elementos teóricos, Haldane propuso un método indirecto para estimar la tasa de mutación ( $\mu$ ), mediante la previa estimación de la fertilidad efectiva de los afectados y la incidencia de la enfermedad en la población (en hemofilia severa la incidencia es el triplo de la prevalencia ya que la esperanza de vida de los afectados es aproximadamente un tercio de la de los varones normales). De este modo surge la relación que establece que cuando la fertilidad efectiva de los afectados por una enfermedad recesiva ligada al sexo es muy reducida o nula, un tercio de las mutaciones que la causan se producen de *novo* por generación. En la hemofilia A severa asociada a la Inv22 donde la fertilidad de los varones afectados está significativamente reducida, la alta tasa de mutación resulta en que cada familia afectada (abarcando hasta la generación donde se originó la mutación) pueda ser asociada con un evento de mutación independiente. Este escenario teórico encuentra sustento en el hecho que no se hayan encontrado significativas asociaciones alélicas entre por ejemplo la Inv22 (como mutación recurrente encontrada en casi la mitad de las SHA) y distintos marcadores polimórficos del gen del FVIII, más allá de las esperadas en la población general (Antonarakis *et al*, 1995; Jenkins *et al*, 1994). Esta ausencia de desequilibrio de ligamiento resulta clave para la metodología propuesta, por lo

que fue re-investigado en las poblaciones utilizadas en este estudio usando el RFLP *BclI* (intrón 18 del gen del FVIII) con el resultado esperado.

Respecto a la fase analítica del estudio, los resultados obtenidos con el marcador *XbaI* son concluyentes, el evento de entrecruzamiento recíproco por recombinación homóloga de la *Inv22*, está asociado a su conversión génica desde secuencias dadoras de información genética en los *loci* extragénicos hacia la intragénica que resulta receptora. En cambio, los resultados que se obtienen con el mismo abordaje de análisis sobre *MspI* son algo más abiertos ya que habría 1 hipótesis principal, AHEU (conversión génica  $E \Rightarrow I$ , debido a que el marcador estaría ubicado sobre un eventual heterodúplex asimétrico asociado a la secuencias intragénicas río abajo de *int22h*) y 2 hipótesis de probabilidad marginal que son COUP (dejando los rastros moleculares del evento, río arriba de la posición de *MspI* y éste queda sobre regiones de DNA homodúplex) y SHIE (heterodúplex simétrico que permite pero no asegura la conversión génica en direcciones opuestas alternativamente  $E \Rightarrow I$  o  $I \Rightarrow E$ ). Esta última hipótesis de intermediarios moleculares, SHIE si bien no puede ser descartada, sería la menos probable de las posibles pues: (1) la superposición de los datos que permite no descartarla, es sólo marginal y podría estar relacionada al escaso número de individuos de la población estudiada de hemofílicos con la *Inv22* y (2) la presencia de heterodúplex simétricos sólo ha sido presentada como un elemento teórico permitido por los modelos propuestos en la literatura, explicable mediante la migración de la o las uniones de Holliday formadas antes de su resolución, pero no cuenta con el respaldo experimental con que si cuentan otros elementos tales como la ruptura de doble cadena como evento iniciador o la presencia de las regiones de heterodúplex asimétrico.

Debido a la naturaleza espontánea y no dirigida de los experimentos y resultados obtenidos en este trabajo, no es posible el análisis profundo de la aplicabilidad en humanos de los actuales modelos moleculares de recombinación homóloga, ya que éstos han sido diseñados mayoritariamente desde evidencia de eucariotas inferiores. Según lo observado aquí, la conversión génica direccionada de E a I sobre la región que contiene a *XbaI*, surgiría a partir de un heterodúplex asimétrico cuya molécula híbrida queda ligada al extremo río abajo (detectada por la DI LD PCR) y la molécula de homodúplex extragénica, al extremo río arriba de *int22h-1* (UI LD PCR). Tanto el modelo de Szostak como el de apareamientos de simple cadena dependiente de la síntesis con entrecruzamiento recíproco (SDSA) presentan una gran plasticidad de adaptación a la evidencia, sin embargo, a menudo postulando variantes de diseño complicado con dudable soporte experimental. Estos elementos que le dan plasticidad son: (1) las posibilidades de resolución (cadenas "cruzadas" o "continuas")

que da cada una de las uniones de Holliday postuladas (HJ), (2) la posibilidad y extensión de la migración de esas HJs, (3) la incierta ubicación del DSB como evento iniciador de la recombinación y (4) la extensión de la degradación de los extremos 5' que definen la longitud de los heterodúplex asimétricos. En el modelo de Szostak, el entrecruzamiento recíproco de los extremos o CO, puede obtenerse por 2 caminos: (a) resolución cruzada-continua de las dos HJs, o bien, (b) resolución continua-cruzada; determinando que los heterodúplex asimétricos formados, aunque proclives a conversión génica de igual dirección, dejen su molécula heterodúplex ligada alternativamente a distintos extremos (U o D). A pesar que como excepción ha sido reportado cierto sesgo en la resolución de las HJs (Bennett et al, 1993), si consideramos que esta resolución se realizara al azar como fue originalmente reportada (Orr-Weaver y Szostak, 1983), se obtendría en nuestro caso una hipótesis esperada definida por la combinación lineal de las hipótesis que involucran heterodúplex asimétricos (por ejemplo AHEU y AHED). En el caso del otro modelo propuesto (SDSA con CO, figura 5, introducción) las fuentes de variación la constituyen la migración de la HJ antes de su resolución y cuál de las cadenas con extremos 3' libres es la invasora del dúplex dador. En resumen, la hipótesis de ocurrencia de una o varias de las fuentes de variación descritas bajo cada uno de los modelos requeriría la elaboración de combinaciones lineales específicas que permitan estimar los valores esperados en cada caso. Por estas razones, para no sobreestimar la evidencia presentada, no se ha discutido la aplicabilidad en humanos de un modelo sobre otro, sino sólo aportar elementos que necesariamente deban ser evaluados en conjunto con otros de distinto origen para arribar a conclusiones sobre qué modelo explicaría mejor toda la evidencia. Finalmente, es importante señalar que dos factores inherentes al método contribuyen a no poder abordar un análisis más profundo del mecanismo molecular de la inversión: (1) una población hemofílica con la Inv22 no suficientemente grande y (2) el hecho de diferenciar a las secuencias homólogas por medio de polimorfismos con diferentes frecuencias alélicas en lugar de diferencias nucleotídicas consistentes o netas.

Sin embargo, el hallazgo de una región de conversión génica (sobre el RFLP *Xba*I) vecina a otra región (que involucra al RFLP *Msp*I) donde no puede determinarse si hay un menor grado de conversión génica (en igual dirección y orientación a la del segmento anterior, AHEU) o bien que todos los rastros de la recombinación quedan en posición río abajo respecto a ella; constituyen elementos compatibles con observaciones previas indicando que la conversión génica suele configurar un gradiente de probabilidad con sus máximos valores asociados al punto iniciador de la recombinación homóloga. Nótese que bajo cualquiera de

los modelos moleculares, la ocurrencia de conversión génica ocurre por degradación y síntesis de cadenas a partir de la ruptura inicial, explicando porqué posiciones más cercanas a ella tienen mayor probabilidad de ser digeridas y sufrir segregación no-Mendeliana.

La secuencia *int22h* presenta [además de los RFLPs *Xba*I (4326) y *Msp*I (5066)] numerosos elementos de diverso origen algunos de los cuáles han sido reportados como asociados directa o indirectamente a una alta probabilidad de recombinación:

(1) Una isla CpG (2340-5858), (2) el gen F8A cuyo único exón está íntegramente contenido en *int22h* y transcribe en dirección opuesta al FVIII (2260<=4000), (3) el primer exón del gen F8B (4121=>4184), (4) el promotor bidireccional de expresión alta y no-específica-de-tejido que da origen a los transcritos de los dos genes anteriormente citados (4000-4121), con 2 elementos de unión a factores de transcripción, Ap-4 y Sp1 (ambos en la orientación de F8A, 3974<=3984 y 3994<=4005, respectivamente), (5) una repetición completa de la secuencia *Alu*I (1626-1936), una secuencia parecida al consenso de *Chi* (aCTGGTGG, que difiere sólo en el cambio de una G inicial) (6610-6618), (6) 23 repeticiones de la secuencia *core* incluida en el consenso *Chi* (CCAGC), 18 de las cuáles se encuentran dentro de la isla CpG (una de ellas, sobre la posición 4058, es parte del promotor constitutivo bidireccional de F8A y F8B, y otras, 4207, 4671, 5004 y 5058 están en la vecindad de los sitios polimórficos X y M) y 3 son parte de la repetición *Alu*I (1657, 1711 y 1764), (7) fragmentos de la secuencia codificante del gen relacionado a la histona H2A (4921-5268), (8) fragmentos que corresponden a 2 *est* de distinto origen (*expressed sequence tags*, D20256 y T28402 sobre 2576-2829 y 2883-3129, respectivamente), (9) un fragmento correspondiente a un mRNA (D16474, en 8319-9503), y (10) 6 pequeños fragmentos del elemento retrotransponible *LINE-1*, todos ellos ubicados río abajo del RFLP *Msp*I. Como fue mencionado, algunos de estos elementos han sido involucrados directamente en la recombinación genética homóloga y/o en la producción con alta probabilidad de rupturas de doble cadena como evento iniciador del mecanismo molecular de la recombinación homóloga (Lopez *et al*, 1992). Por ejemplo, después del análisis sistemático de las secuencias involucradas en rearrreglos genéticos del gen del receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDL) humano, fue encontrada repetidamente una región corta y muy conservada de las secuencias *Alu*, incluyendo una sub-secuencia homóloga al motivo *Chi* (elemento de reconocimiento del sistema de recombinación *rec BC* de procariontes) (Rüdiger *et al*, 1995). Voelkel-Meiman *et al*, 1987, determinaron en levaduras que secuencias regulatorias de la transcripción por la RNA polimerasa I (el sitio de iniciación de la transcripción del precursor del RNA ribosomal 35S y un elemento estimulador en *cis* o *enhancer*), estimulaban también la recombinación homóloga funcionando en las vecindades



del inicio de la transcripción como puntos calientes de intercambio genético. Es importante señalar que esta estimulación encontrada, resultaba dependiente de transcripción efectiva a través de ambas copias interactuantes (Voelkel-Meiman *et al*, 1987). En el mismo sentido, Ohta *et al*, 1994, demostraron mediante experimentos de hipersensibilidad a la nucleasa micrococcal, que durante las meiosis de levaduras, los sitios de iniciación de la recombinación (rupturas transientes de doble cadena) se relacionan a cambios significativos en la estructura de la cromatina.

Otra evidencia proveniente de la literatura relacionada con el presente estudio, lo constituye el hecho que en la recombinación homóloga, no existe un verdadero desplazamiento en un lazo D de una de las cadenas del dúplex invadido, sino que se forma una triple hélice constituida por la cadena invasora (desde su extremo 3') y las dos cadenas antiparalelas del dúplex invadido, evento que sería catalizado sin el requerimiento de hidrólisis de ATP por enzimas probablemente homólogas eucarióticas de RecA, tales como RAD51 y DMC1 (revisión en Camerini-Otero y Hsieh, 1993). Las cadenas potencialmente desplazables de la triple hélice resultan inaccesibles al ataque por nucleasas de simple cadena y la región del tríplex podría extenderse hasta 1000 bp (Rao *et al*, 1991).

Los resultados obtenidos respecto a la ubicación del marcador polimórfico *Xba*I dentro de una región de heterodúplex asimétrico vecina a la ruptura de doble cadena como iniciadora del evento y la asociación de promotores de genes de expresión constitutiva con "puntos calientes" para la ocurrencia de estos DSB, nos permite relacionar al promotor bidireccional de F8A y F8B como una región de alta probabilidad de sufrir estos eventos iniciadores. Es importante señalar que tal como fue presentado como requerimiento para inducir intercambio genético por Voelkel-Meiman *et al*, 1987, ambas copias de F8A (la contenida en *int22h-1*, y en -2 o -3), son transcriptas constitutivamente pero con diferentes niveles de expresión (aproximadamente 60% para la copia intragénica y 40% para las dos extragénicas en conjunto, Levinson *et al*, 1990). Esta asimetría en la actividad de las copias de F8A reportada (detectada estudiando la expresión del gen F8A en hemofílicos con distintas deleciones incluyendo al intrón 22 del gen del FVIII) permitió la evaluación de la copia intragénica como la más propensa a sufrir las DSB y por ello, resultar receptora de la conversión génica según los modelos actuales de recombinación meiótica. A los otros elementos hallados en *int22h*, tales como la repetición completa de *Alu*, la secuencia parecida a *Chi* y los numerosos pentanucleótidos *core* del consenso *Chi*, no se les asignó un rol importante como factor predisponente a "agrupar" rupturas de doble cadena en su región de influencia debido principalmente a su ubicación dentro de las secuencia homólogas en relación a nuestros

resultados y secundariamente a su alta abundancia relativa en el genoma humano más allá de regiones recombinogénicas.

La recombinación en células de mamífero puede incluir los dos tipos de intercambio: recíproco y no-recíproco. Una prueba concluyente de la asociación entre estos modos de intercambio sólo fue posible estudiando inversiones, donde pueden recuperarse en la misma molécula todos los productos del evento. Bollag y Liskay, 1988, con experimentos *in vitro* sobre líneas celulares de ratón genéticamente modificadas, determinaron que una subpoblación de los recombinantes con la inversión (intercambio de los marcadores externos) y otra sin la inversión (con la estructura parental), presentaban el intercambio no-recíproco de los marcadores internos (conversión génica interna simulando una de las dos configuraciones parentales). En nuestro conocimiento, en humanos, la conversión génica ha sido sólo reportada como evento no relacionado al intercambio recíproco, quizás debido a: (1) que intercambios desiguales conducen a rearrreglos aberrantes (duplicaciones, deleciones, translocaciones, etc) y (2) que es prácticamente imposible recuperar para su estudio todos los productos de un intercambio particular. En resumen, en humanos, la conversión génica fue reportada como huellas de la interacción homóloga alélica generadora de nuevos alelos del sistema de antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad (alelos de HLA-DPB1 detectados por análisis de muestras de esperma, Zangenberg *et al*, 1995), y no-alélica, generadora también de nuevos alelos mutantes y variantes polimórficas en la región del gen de la globina fetal humana (Powers y Smities, 1986), en genes murinos de histocompatibilidad (polimorfismos del gen H-2, Weiss *et al*, 1983), en el gen del vWF humano (mutaciones con segmentos incorporados desde los pseudogenes del vWF, Eikenboom *et al*, 1994), o la corrección (*ex vivo* con el propósito ulterior de ser utilizado en terapia génica) por recombinación homóloga (*gene targeting*) de mutaciones presentes en células troncales (*stem*) hematopoiéticas humanas (Hatada *et al*, 2000). Los resultados obtenidos aquí, representan la primera asociación del fenómeno de conversión génica con intercambio recíproco en humanos. Mediante el tipo de análisis aplicado pudieron recopilarse las huellas de un evento ocurrido *in vivo* en meiosis humanas. Por estas razones, la evidencia presentada aquí adquiere importancia en la asociación de intermediarios moleculares específicos que ayuden a elucidar, en humanos, los mecanismos y modelos propuestos a partir de estudios en eucariotas inferiores o *in vitro* en células de mamífero con el uso de constructos genéticos.

## 8. DISCUSION GENERAL

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis pueden ser evaluados bajo dos perspectivas independientes. La primera es la utilidad de los marcadores como instrumentos de diagnóstico molecular para la provisión de información crítica en el asesoramiento genético de familias con hemofilia A (HA). La segunda, se vale de los mismos marcadores pero utilizados como herramientas de investigación del proceso de recombinación homóloga meiótica, cuyo conocimiento específico en humanos ha sido mayoritariamente construido por extrapolación de la evidencia proveniente de modelos animales o de experimentos *in vitro*.

Los resultados presentados en los capítulos primero, segundo y tercero del presente trabajo constituyen aportes directos al diagnóstico molecular de la HA.

En el capítulo primero, se determina que la prevalencia de la Inv22 en nuestra población de familias afectadas por SHA es del 40%, lo que nos permite estimar la utilidad de esta herramienta directa de diagnóstico molecular, para la provisión de información segura para el profesional que brinde asesoramiento genético en esas familias informativas. En el mismo sentido, el médico hematólogo tratante de la hemofilia contará, cuando el diagnóstico molecular de la Inv22 es temprano, con un elemento pronóstico que le permitirá tomar las decisiones terapéuticas más acertadas al ubicar tempranamente al paciente en cuanto a su predisposición a desarrollar inhibidor contra el FVIII. Como perspectivas, el desafío en la detección de la Inv22 es la puesta a punto o adaptación de una técnica basada en PCR que permita su genotipificación segura y confiable, pero con tiempos y costos mucho menores a los necesarios cuando se utiliza el análisis de *Southern blot*. Actualmente, están siendo obtenidos en nuestro laboratorio resultados preliminares exitosos en esta puesta a punto. La técnica de detección por PCR de la Inv22 publicada por Liu *et al*, 1998 y Liu y Sommer, 1998; presenta dificultades de orden práctico: (a) los alelos normal intragénico, Inv22 y normal extragénico se presentan en amplímeros de 12, 11 y 10 kb, lo que dificulta su resolución mediante minielectroforesis en gel de agarosa convencional; (b) la intensidad relativa de estas tres señales se presenta muy desbalanceada en todas las condiciones de optimización ensayadas lo que dificulta el análisis de resultados sembrando dudas en la determinación. En nuestro laboratorio, a partir de este ensayo fueron diseñadas modificaciones que incluyen la investigación por separado del alelo normal intragénico y del alelo con la Inv22, analizando en cada caso sólo la presencia o ausencia de señal específica para determinar el genotipo. Además, este ensayo permite la genotipificación en línea de la

Inv22, y en casos no informativos, analizar a los RFLPs *Xba*I A y *Msp*I A sobre alícuotas de la LD PCR específica del alelo normal intragénico.

Por su parte, en el capítulo segundo se presenta un método más rápido y fácil que los utilizados hasta ahora para estudiar el RFLP *Xba*I A. El valor de este aporte radica en que a pesar de su alta heterocigocidad y su ubicación física dentro del intrón 22 del gen del FVIII, el marcador *Xba*I A había sido casi eliminado de la rutina diagnóstica por no contar con una técnica de análisis confiable basada en PCR. El capítulo tercero presenta el hallazgo y caracterización de un nuevo RFLP en el intrón 22 del gen del FVIII. Este polimorfismo de la enzima de restricción *Msp*I tiene, en población Argentina, por sí solo, la más alta heterocigocidad posible para un sistema bialélico y a pesar de encontrarse muy cercano al marcador *Xba*I aporta una informatividad adicional mucho mayor a la esperada por ese grado de cercanía física. La técnica de detección del polimorfismo *Msp*I A es confiable, rápida y sensible ya que está basada en una PCR anidada que además permite ser estudiada en-línea con *Xba*I A por compartir con éste la primera vuelta de la reacción (UI o DI LD PCR).

La evidencia presentada en los tres primeros capítulos de este trabajo permite la propuesta de un algoritmo sencillo para ofrecer diagnóstico molecular de HA en la Argentina. En SHA, se propone investigar la presencia de la Inv22 en los probandos, y proveer diagnóstico directo en las familias que resultaren informativas. En todas las familias con HA, no informativas para la Inv22, proveer análisis indirecto mediante el uso de los polimorfismos de DNA del gen del FVIII estudiados (*Msp*I A, *Xba*I A y *Bcl*I) como trazadores del alelo afectado dentro del árbol familiar.

Sin embargo, el objetivo último del diagnóstico molecular en HA, es la detección de todo el espectro de mutaciones sobre el gen del FVIII, ya que éstas podrán utilizarse como marcadores genéticos directos de la enfermedad en cada familia afectada correspondiente. Si bien la implementación de esta metodología plantea dificultades de orden económico y organizativo, constituye sin duda, el camino a ser recorrido.

Además de estas consideraciones de importancia clínica y diagnóstica en hemofilia A y debido a: (1) su ubicación dentro de *int22h* (secuencias involucradas en el evento de recombinación homóloga meiótica que origina la Inv22), (2) la posibilidad de diferenciar las frecuencias alélicas intra de las extragénicas y (3) la plasticidad metodológica que permitió diseñar múltiples LD PCRs específicas de las regiones de copia única yuxtapuestas a *int22h*; los marcadores presentaron permitieron la elaboración de un modelo para estudiar los eventos moleculares asociados al origen de la Inv22. Para este análisis fue necesario contar

con una población lo más numerosa posible de hemofílicos A severos con la Inv22 a fin de evaluar con mayor precisión el estado de los marcadores después de producido el evento mutacional.

El hallazgo de que la Inv22 se asocia a la conversión génica del marcador *Xba*I A y eventualmente a *Msp*I A, tiene ciertas consecuencias asociadas a la información que se obtiene en familias afectadas por SHA esporádica y cuya mutación fuera la Inv22. Afortunadamente, cuando se provee análisis indirecto usando marcadores polimórficos en familias con hemofilia esporádica debido a que sólo puede ofrecerse diagnóstico por exclusión del alelo en fase, no se cometerían errores porque la ausencia del alelo-en-fase indicaría o bien que está ligado a un cromosoma X no afectado en la familia, como es el razonamiento usual en este tipo de análisis, o bien, que aún siendo el cromosoma X involucrado, todavía no haya sufrido la mutación específica y por lo tanto tampoco el cambio de estatus del marcador asociado. Sin embargo, en ciertos casos podría arribarse a la sospecha de falsa paternidad en una SHA esporádica donde el probando es por ejemplo *Xba*I A [-], su madre, [-/-] y su tía materna (a quién se pretende diagnosticar como portadora o no), [+/+], indicando que la madre y la tía no serían hijas del mismo padre. La explicación posible, a la luz de la evidencia presentada, sería que el meiocito del abuelo materno que diera origen a la madre del probando, sufrió el evento molecular de la Inv22 y con ella el cambio de estatus de *Xba*I A {[+] => [-]}, simulando esta falsa paternidad. Nótese que aún en este caso anómalo, la tía materna del probando sería correctamente diagnosticada como no portadora por exclusión del alelo-en-fase con la hemofilia en esa familia {*Xba*I A [-]}.

Como fue discutido en el capítulo tercero Naylor *et al*, 1995, propusieron a la conversión génica o transferencia no recíproca como el proceso más probable para evitar la evolución independiente y explicar así, la casi identidad de las tres copias de *int22h*. La conversión génica ha sido descrita asociada a eventos intra e intercromosómicos en regiones de DNA duplicado dentro de familias génicas humanas, como la de los genes del sistema mayor de histocompatibilidad (Gorski y Mach, 1986), o en la región de los genes de la globina fetal (Powers y Smithies, 1986); así como también entre genes y pseudogenes ( $\psi$ ) causando mutaciones deletéreas asociadas a enfermedades congénitas como la hiperplasia adrenal por deficiencia del gen CYP21B (Amor *et al*, 1988), o en la enfermedad de von Willebrand (Eikenboom *et al*, 1994). La evidencia mostrada en los capítulos tercero y cuarto del presente trabajo de tesis soportan indirectamente la hipótesis propuesta por Naylor, pero no permiten excluir otros procesos eventualmente concurrentes para explicar la evolución concertada de las secuencias *int22h*.

En el capítulo cuarto, se indica al promotor constitutivo bidireccional F8A y F8B como la región de *int22h* donde ocurrirían con alta probabilidad las rupturas de doble cadena (DSBs). Estos tipos de ruptura han sido señaladas como el evento iniciador de la recombinación homóloga en general y meiótica en particular (Lopez *et al*, 1995). La elección de un promotor de activa transcripción para explicar la iniciación y favorecer la recombinación meiótica cuenta con numerosa evidencia experimental (Voelkel-Meiman *et al*, 1987). Esta asociación ha sido propuesta como mediada por cambios en la estructura de la cromatina (Ohta *et al*, 1994). En esta línea de evidencia, Baudat y Nicolas, 1997, mediante mapeos físicos a gran escala en el cromosoma III de levaduras, encontraron que los agrupamientos en regiones de alta probabilidad de DSBs ocurrían casi exclusivamente en regiones intergénicas que contenían promotores. Sin embargo, la elección de la región promotora de F8A y F8B como foco de DSBs meióticos como eventos iniciadores de recombinación debiera ser justificada mediante su demostración con experimentos específicos. Por ejemplo, Klein *et al*, 1996, diseñaron un ensayo de mapeo de DSBs meióticos sobre DNA humano clonado en cromosomas artificiales de levadura (YACs recombinantes) transfectados en cepas que no pueden reparar estas rupturas (*S. cerevisiae* mutante *rad50S*). El gen F8A (y F8B), por estar asociado a una isla CpG, por su expresión constitutiva y por la conservación filogenética de secuencia con su homólogo murino, ha sido hipotetizado como un gen de importancia crítica en el metabolismo celular o *housekeeping* (Levinson *et al*, 1990 y Levinson *et al*, 1992a). No obstante, cuando se analizaron los marcos de lectura de F8A mediante el programa de uso de codones preferenciales (Staden-McLachlan) se detectó una mutación potencial de cambio de fase o marco de lectura (*frameshift*) (Levinson *et al*, 1990). A pesar de existir varios mecanismos por los cuales puede ser corregido un *frameshift* (tales como la edición de RNA, Powel *et al*, 1987; o el cambio de fase de lectura ribosomal, Jacks *et al*, 1988) estas posibilidades no han sido investigadas, pero resultarían *a priori* muy poco probables.

En resumen, describimos a F8A como un gen de alta expresión constitutiva, conservado filogenéticamente, que según nuestros datos podría promover recombinación homóloga y cuyo producto, debido a la potencial mutación de *frameshift* parecería estar libre de presión selectiva. Esta aparente contradicción puede ser explicada con un análisis desde otra perspectiva. Es opinión unánime entre los investigadores en genética evolutiva que la recombinación meiótica de los organismos de reproducción sexual representa una significativa ventaja adaptativa (Dobzhansky, 1970). Mediante simulación en computadoras estas ventajas adaptativas fueron probadas no sólo a nivel de organismos en la población sino también a nivel molecular en regiones o dominios del genoma donde de no ser por este

proceso se acumularían rápidamente mutaciones deletéreas (hipótesis del “paso a paso del trinquete” o *ratchet* de Muller e hipótesis del “corte de hacha” o *hatchet* de Kondrashov, revisión en Maynard Smith, 1998 y Gillespie, 1998). Este mecanismo de aceleración evolutiva mediado por la recombinación, sería particularmente significativo en aquellas regiones con alta densidad génica y donde mapeen numerosas enfermedades. Tal es el caso de región cromosómica subtelomérica Xq28 donde han sido mapeados numerosos *loci* asociados a enfermedad (aunque sólo fueran aislados y caracterizados algunos pocos) (Kenwick *et al*, 1992). En conjunto, todos los elementos mencionados permiten preguntarnos si una secuencia promotora de recombinación meiótica, como podría ser F8A, puede ser considerada por sí sola suficiente para justificar su conservación filogenética. Si esta hipótesis fuera cierta, deberían encontrarse algunos ejemplos de genes donde sean demostradas dos condiciones: (a) que su alta expresión este asociada a puntos calientes de recombinación en regiones de alta densidad génica y (b) que la conservación evolutiva de su secuencia no pueda ser explicada en función de sus productos génicos (RNA o proteína). Para poner a prueba esta hipótesis, serán necesarios experimentos de mapeo de alta resolución de puntos calientes de recombinación meiótica, la utilización de los datos cruzados del Genoma y del Proteoma Humano, y verificar mediante mutantes (preferentemente deletantes de la secuencia analizada) que la ausencia de su producto génico eventual no se encuentre asociado a fenotipo enfermo alguno.

## 9. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis permiten delinear las conclusiones que siguen a continuación.

- En Argentina, en cercano acuerdo a lo reportado internacionalmente, la causa de aproximadamente el 40% de las hemofilias A severas (SHA) no relacionadas, es la inversión del intrón 22 (Inv22), y dentro de ellas la mayoría (79%) corresponde al tipo distal y el resto (21%) al tipo proximal. En este grupo pudo ofrecerse detección de portadoras por el método directo.
- Dentro de la población de familias afectadas por SHA, no se hallaron asociaciones significativas entre la Inv22 y la condición esporádica o familiar de la enfermedad, ni tampoco con el desarrollo de anticuerpo inhibidor neutralizante del factor VIII (FVIII) terapéutico.
- Fue diseñada, puesta a punto y validada, una técnica de investigación rápida del polimorfismo *Xba*I A (intrón 22 del gen del FVIII) basada en una PCR de larga distancia (LD PCR), reemplazando al lento y laborioso análisis de *Southern blot*. Esta metodología resultó ser, robusta, pues resiste amplios rangos en las condiciones de amplificación, específica de la copia intragénica, fácil de interpretar, ya que su genotipificación imita los patrones de señal del análisis por *Southern blot* y confiable, por la presencia en el amplímero de sitios control de la digestión.
- Mediante este método, muestras de la población Argentina general fueron genotipificadas para *Xba*I A, lo que permitió proyectar una informatividad esperada (2pq) de aproximadamente el 47%. Los estudios de asociaciones alélicas entre *Xba*I A y el polimorfismo *Bcl*I del intrón 18 del gen del FVIII, determinaron un alto, pero no-completo desequilibrio de ligamiento entre los marcadores.
- Fue hallado un polimorfismo de DNA que afecta la secuencia de reconocimiento de la enzima *Msp*I (alelo [+], ccgg y alelo [-], ccag) ubicado 734 bp río abajo de la posición de *Xba*I. En paralelo con *Xba*I A, *Msp*I A (sobre la copia intragénica de *int22h*) tiene polimorfismos homólogos extragénicos de baja heterocigocidad que serán llamados por



analogía, *MspI* B y C. El ensayo de genotipificación de *MspI* A se basa en una PCR anidada, con una primera vuelta específica de la copia intragénica que resulta de la aplicación de la misma LD PCR usada para *XbaI* A y una PCR interna cuyo producto incluye el sitio *MspI* polimórfico y uno de presencia constante, útil para controlar el análisis de restricción.

- La heterocigocidad estimada para el nuevo polimorfismo (*MspI* A) resultó de aproximadamente 49 y 46%, para las poblaciones normales de Argentina y Gran Bretaña (Gales del Sur), respectivamente. Sorpresivamente, a pesar de su cercana proximidad física con el marcador *XbaI* A (X), *MspI* A (M) presenta un no completo desequilibrio de ligamiento, lo que resulta en un aporte significativo a la informatividad global de los marcadores del gen FVIII. Por ejemplo X y M proyectan una heterocigocidad conjunta estimada en 62 y 59% en población Argentina y Británica, respectivamente, y entre *BclI* y M, en 55% en población Argentina.
- El abordaje de estudio del mecanismo de recombinación homóloga en humanos mediante el uso de polimorfismos de DNA involucrados en las secuencias homólogas intervinientes en la *Inv22* (utilizada como modelo de entrecruzamiento recíproco en meiosis humanas) resultó sensible para la diferenciación entre sí de hipotéticos intermediarios moleculares del mecanismo de la inversión.
- La aplicación del método planteando nueve hipótesis de intermediarios moleculares asociados a la predicción de resultados numéricos y su comparación con los datos obtenidos en el grupo de afectados con la *Inv22*, permitió determinar que el evento molecular de CO por recombinación meiótica está acoplado a la conversión génica del marcador *XbaI*, con la secuencia extragénica como dadora de la información. El análisis del marcador *MspI* presenta datos compatibles con su posición río abajo de X dentro de las secuencias *int22h*.

  
Carlos Daniel De Brasi  
Doctorando

  
Irene Beatriz Larripa  
Directora de Tesis

## 10. BIBLIOGRAFIA

Amor M, Parker KL, Globerman H, New MI, White PC (1988). Mutation in the CYP21B gene (Ile-172→Asn) causes steroid 21-hydroxylase deficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:1600-1604.

Antonarakis SE, Waber PG, Kittur SD, Patel AS, Kazazian HH, Mellis MA, Counts RB, Stamatoyannopoulos G, Bowie EGW, Fass DN, Pittman DD, Wozney JM, Toole JJ (1985). Hemophilia A. Detection of molecular defects and of carriers by DNA analysis. *N Eng J Med* 313:842-848.

Antonarakis SE, Rossiter JP, Young M, Horst J, De Moerloose P, Sommer SS, Ketterling RP, Kazazian HH, Negrier C, Vinciguerra C, Gitschier J, Goossens M, Girodon E, Ghanem N, Plassa F, Lavergne JRN, Vidaud M, Costa JM, Laurian Y, Lin SW, Lin SR, Shen MC, Lillicrap D, Taylor SAM, Windsor S, Valleix SV, Nafa K, Sultan Y, Delpech M, Vnencak-Jones CL, Phillips III JA, Ljung RCR, Koumbarelis E, Gialeraki A, Mandalaki T, Jenkins PV, Collins PW, Pasi KJ, Goodeve A, Peake I, Preston Fe, Schwartz M, Scheibel E, Ingerslev J, Cooper DN, Millar DS, Kakkar VV, Giannelli F, Naylor JA, Tizzano EF, Baiget M, Domenech M, Altisent C, Tussell J, Beneyto M, Lorenzo JI, Gaucher C, Mazurier C, Peerlinck K, Matthijs G, Cassiman, Vernylen J, Mori PG, Aquila M, Caprino D, Inaba H (1995). Factor VIII Gene Inversions in Severe Hemophilia A: Results of an International Consortium Study. *Blood* 86:2206-2212.

Barnes WM (1994). PCR amplification of up to 35-kb DNA with high fidelity and high yield from bacteriophage templates. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:2116-2220.

Baudat F, Nicolas A (1997). Clustering of meiotic double-strand breaks on yeast chromosome III. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:5213-5218.

Bennett RJ, Druderdale HJ, West SC (1993). Resolution of Holliday junctions by RuvC resolvase: cleavage specificity and DNA distortion. *Cell* 74:1021-1031.

Bird AP (1986). CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* 321:209-213.

Bollag RJ, Liskay RM (1988). Conserved intracromosomal recombination between inverted repeats in mouse cells: Association between reciprocal exchange and gene conversion. *Genetics* 119:161-169.

Bowen DJ, Bowley SJ, John M, Collins PW (1998). Factor V Leiden (G1691A), the prothrombin 3'-untranslated region variant (G20210A) and thermolabile methylene-tetrahydro-folate reductase (C677T): a single genetic test genotypes all three loci - determination of frequencies in the S. Wales population of the UK. *Thromb Haemost* 79:949-954.

Camerini-Otero R, Hsieh P (1993). Parallel DNA triplexes, homologous recombination and other homology-dependent DNA interactions. *Cell* 73:217-223.

Chan V, Tong TMF, Chan TPT, Tang M, Wan CW, Chan FY, Chu YC, Chan T (1989). Multiple XbaI polymorphisms for carrier detection and prenatal diagnosis of haemophilia A. *British J Haematol* 73:497-500.

De Brasi CD, Slavutsky IR, Larripa IB (1996). Genética Molecular de la Hemofilia A. *Medicina (Buenos Aires)* 56:509-517.

Dobzhansky T (1970). Genética del proceso evolutivo. *Editores Extemporáneos Méjico*.

Duncan BK, Miller JH (1980). Mutagenic deamination of cytosine residues in DNA. *Nature* 287:560-561.

Eaton DL, Wood WI, Eaton D, Hass PE, Hollingshead P, Wion K, Mather J, Lawn RM, Vehar GA, Gorman C (1986). Construction and characterization of an active factor VIII variant lacking the central one-third of the molecule. *Biochemistry* 25:8343-8347.

Eikenboom JC, Vink T, Briët E, Sixma JJ, Reitsma PH (1994). Multiple substitutions in the von Willebrand factor gene that mimic the pseudogene sequence. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:2221-2224.

Ferguson DO, Holloman WK (1996). Recombinational repair of gaps in DNA is asymmetric in *Ustilago maydis* and can be explained by a migrating D-loop model. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 5419-5424.

Gillespie JH (1998). Population Genetics. A concise guide. *The Johns Hopkins University Press, Baltimore and London*.

Gilliland DG, Blanchard KL, Levy J, Perrin S, Bunn F (1991). Clonality in myeloproliferative disorders: Analysis by means of the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:6848-6852.

Gitschier J, Wood WI, Goralka TM, Wion KL, Chen EY, Eaton DH, Vehar GA, Capon DJ, Lawn RM (1984). Characterization of the Human factor VIII gene. *Nature* 312: 326-330.

Gitschier J, Drayna D, Tuddenham EGD, White RL, Lawn RM (1985). Genetic mapping and diagnosis of haemophilia A achieved through a *Bcl* polymorphism in the factor VIII gene. *Nature* 314:738-740.

Gitschier J, Kogan S, Levinson B, Tuddenham EGD (1988). Mutations of factor VIII cleavage sites in Hemophilia A. *Blood* 72:1022-1028.

Gitschier J, Levinson B, Lehesjoki AE, De La Chapelle A (1989). Mosaicism and sporadic Haemophilia: Implications for carrier determination. *Lancet* 4:273-274.

Goodeve AC, Preston FE, Peake IR (1994). Factor VIII gene rearrangements in patients with severe haemophilia A. *Lancet* 343:329-330.

Gorsky J, March B (1986). Polymorphism of human Ia antigens: gene conversion between two DR beta loci results in a new HLA-D/DR specificity. *Nature* 322:67-70.

Haldane JBS (1935). The rate of spontaneous mutation in a human gene. *J Genet* 31:317-326.

Hatada S, Nikkuni K, Bentley SA, Kirby S, Smithies O (2000). Gene correction in hematopoietic progenitor cells by homologous recombination. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:13807-13811.

Hendriks RW, Chen ZY, Hinds H, Schruurman RKB, Craig IW (1992). An X chromosome inactivation assay based on differential methylation of a CpG island coupled to a VNTR polymorphism at the 5' end of the monoamine oxidase A gene. *Hum Molec Genet* 1:187-194.

Higuchi M, Kazazian HH, Kasch L, Warren TC, Mc Ginniss MJ, Phillips III JA, Kasper C, Janco R, Antonarakis SE (1991a). Molecular characterization of severe Hemophilia A suggests that about half of the mutations are not within the coding regions and splice junctions of the factor VIII gene. *Proc Natl Acad Sci Usa* 88:7405-7409.

Higuchi M, Antonarakis SE, Kasch L, Oldenberg J, Economou-Petersen E, Olek K, Arai M, Naba H, Kazazian HH (1991b). Molecular characterization of mild-to-moderate Hemophilia A: Detection of the mutation in 25 of 29 patients by denaturing gradient gel electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:8307-8311.

Holliday R (1964). A mechanism for gene conversion in fungi. *Genet Res* 5:282-304.

Horwitz JP, Chua J, Curby RJ, Thomson AJ, Darooge MA, Fisher BE, Mauricio J, Klundt I (1964). Substrates for cytochemical demonstration of enzyme activity. *J Med Chem* 7:754-576.

Hoyer LW (1994). Medical Progress: Hemophilia A. *N Engl J Med* 330:38-47.

Jacks T, Madhani HD, Masiarz FR, Varmus HE (1988). Signals for ribosomal frameshifting in the Rous sarcoma virus gag pol region. *Cell* 55:447-458.

Jenkins PV, Collins PW, Goldman E, MC Craw A, Riddell A, Lee CA, Pasi KJ (1994). Analysis of Intron 22 Inversions of the factor VIII gene in severe Hemophilia A: Implications for genetic counseling. *Blood* 84:2197-2201.

Kazazian HH, Wong C, Youssoufian H, Scott AF, Phillips DG, Antonarakis SE (1988). Haemophilia A resulting from de novo insertion of L1 sequences represents a novel mechanism for mutation in man. *Nature* 332:164-166.

Kenwrick S, Levinson B, Taylor S, Shapiro A, Gitschier J (1992). Isolation and sequence of two genes associated with a CpG island 5' of the factor VIII gene. *Hum Molec Genet* 1:179-186.

Klein HL (1993). The eucariotic genome organisation and regulation. Current issues in homologous recombination. *Cambridge University Press* 161-184.

Klein S, Zenvirth D, Sherman A, Ried K, Rappold G, Simchen G (1996). Double-strand breaks on YACs during yeast meiosis may reflect meiotic recombination in the human genome. *Nature Genet* 13:481-484.

Kogan SC, Gitschier J (1990). Mutations and a polymorphism in the factor VIII gene discovered by denaturing gradient gel electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:2092-2096.

Kogan SC, Doherty M, Gitschier J (1987). An improved method for prenatal diagnosis of genetic diseases by analysis of amplified DNA sequences. *N Engl J Med* 317:985-990.

Lahiri DK, Nuremberg JI (1991). A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* 19:5444.

Lakich D, Kazazian HH, Antonarakis SE, Gitschier J (1993). Inversions disrupting the factor VIII gene are common cause of severe Haemophilia A. *Nature Genet* 5:236-241.

Lalloz MRA, Mc Vey JH, Pattinson JK, Tuddenham EGD (1991). Haemophilia A diagnosis by analysis of a hypervariable dinucleotide repeat within the factor VIII gene. *Lancet* 338:207-211.

Lalloz MRA, McVey JH, Michaelides K, Tuddenham EGD (1992). Haemophilia A diagnosis by analysis of a novel dinucleotide tandem repeat sequence within the factor VIII gene (abstract). *British J Haematol* 80:3a.

Levinson B, Kenwick S, Lakich D, Hammonds G, Gitschier J (1990). A transcribed gene in an intron of the human factor VIII gene. *Genomics* 7:1-11.

Levinson B, Kenwick S, Gamel P, Fisher K, Gitschier J (1992a). Evidence for a third transcript from the human factor VIII gene. *Genomics* 14:585-589.

Levinson B, Bermingham Jr, Metzenberg A, Kenwick S, Chapman V, Gitschier J (1992b). Sequence of the human factor VIII-associated gene is conserved in mouse. *Genomics* 13:862-865.

Lillicrap DP, Taylor SAM, Shuringa PCR, Blanchette VS, Lovsted JK, Weiler LJ, Bridge PJ (1990). Variation of the non-factor VIII sequences detected by a probe from intron 22 of the factor VIII Gene. *Blood* 75:139-143.

Liu Q, Nozari G, Sommer SS (1998). Single-tube polymerase chain reaction for rapid diagnosis of the inversion hotspot of mutation in haemophilia A. *Blood* 92:1458-1459.

Liu Q, Sommer SS (1998). Subcycling-PCR for multiplex long-distance amplification to the inversion hotspot in the factor VIII gene. *Biotechniques* 25:1022-1028.

Ljung RCR (1994). Intron 22 Inversions and haemophilia. *Lancet* 343:791.

Lopez BS, Cortegiani E, Bertrand-Mercat P, Coppey J (1992). Directional recombination is initiated at double strand break in human nuclear extracts. *Nucleic Acids Res* 20:501-506.

Lyon MF (1961). Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus Musculus*). *Nature* 190: 372-373.

Maynard Smith J (1998). Evolutionary Genetics. Second Edition. *Oxford University Press*.

Maestrini E, Rivella S, Tribioli C, Rocchi M, Gamerino G, Santachiara-Benerecetti, Parolini O, Notarangelo, Toniolo D (1992). Identification of novel RFLPs in the vicinity of CpG islands in Xq28: Application to the analysis of the pattern of X-chromosome inactivation. *Am J Human Genet* 50:156-166.

McKusick VA (1995). Mendelian inheritance in man. A Catalog of Human genes and genetics disorders. Eleventh Edition. Baltimore: *The John Hopkins University Press* 1994 II: 2384-2393.

Meselson MS, Radding CM (1975). A general model for genetic recombination. *Proc Nat Acad Sci USA* 72:358-361.

Naylor J, Brinke A, Hassock S, Green PM, Giannelli F (1993). Characteristic mRNA abnormality found in half the patients with severe Haemophilia A is due to large inversions. *Hum Mol Genet* 2:1773-1778.

Naylor J, Buck D, Green PM, Williamson H, Bentley D, Giannelli F (1995). Investigation of the factor VIII intron 22 repeated region (*int22h*) and the associated inversion junctions. *Hum Mol Genet* 4:1217-1224.

Naylor J, Nicholson P, Goodeve A, Hassock S, Peake I, Giannelli F (1996). A novel DNA inversion causing severe hemophilia A. *Blood* 87:3255-3261.

Ohta K, Shibata T, Nicolas A (1994). Changes in chromatin structure at recombination initiation sites during yeast meiosis. *EMBO J* 13:5754-5763.

Oldenburg J, Picard JK, Schwaab R, Brackmann HH, Tuddenham EGD, Simpson E (1997). HLA genotype of patients with severe Haemophilia A due to intron 22 inversion with and without inhibitors of factor VIII. *Tromb Haemost* 77:238-242.



Orr-Weaver TL, Szostak JW (1983). Yeast recombination: the association between double strand gap repair and crossing over. *Proc Natl Acad Sci USA* 80:4417-4421.

Pâques F, Haber JE (1999). Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 63:349-404.

Peake IR, Lillicrap DP, Boulyjenkov V, Briet E, Chan V, Ginter EK, Kraus EM, Ljung R, Mannucci PM, Nicolaides K, Tuddenham EGD (1993). Report of a joint WHO/WFH meeting on the control of haemophilia: carrier detection and prenatal diagnosis. *Blood Coagulation Fibrinol* 4:313-344.

Pittman DD, Kaufman RJ (1988). Proteolytic requirements for thrombin activation of anti-hemophilic factor (Factor VIII). *Proc Natl Acad Sci USA* 85:2429-2433.

Powell L, Wallis SC, Pease J, Edwards YH, Knott TJ, Scott J (1987). A novel form of tissue-specific RNA processing produces apolipoprotein-B48 in intestine. *Cell* 50:831-840.

Powers PA, Smithies O (1986). Short gene conversions in the human fetal globin gene region: a by-product of chromosome pairing during meiosis? *Genet* 112:343-358.

Puck JM, Willard HF (1998). X inactivation in females with X-linked disease. *N Eng J Med* 338:325-328.

Rao BJ, Dutreix M, Radding CM (1991). Stable three-stranded DNA made by RecA protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:2984-2988.

Rossiter JP, Young M, Kimberland L, Hutter P, Ketterling RP, Gitschier J, Horst J, Morris MA, Schaid J, Moerloose P, Sommer SS, Kazazian HH, Antonarakis SE (1994). Factor VIII gene inversions causing severe Hemophilia A originate almost exclusively in male germ cells. *Hum Molec Genet* 3:1035-1039.

Rüdriger NS, Gregersen N, Kielland-Brand MC (1995). One short well conserved region of *Alu*-sequences is involved in human gene rearrangements and has homology with procaryotic *chi*. *Nucleic Acids Res* 23:256-260.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-491.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989). Molecular cloning. A laboratory manual. Second Edition. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.

Scharrer I, Neutlizing O (1993). Incidence of inhibitor in haemophiliacs. A review of the literature. *Blood Coagulation Fibrinol* 4:753-758.

Schwaab R, Brackmann HH, Meyer C, Seehafer J, Kirchhesser M, Haack A, Olek K, Tuddenham EGD, Oldenburg J (1995). Haemophilia A: mutation type determines risk of inhibitor formation. *Haemost Thrombosis* 74:1402-1406.

Shetty W, Ghosh K, Pathare A, Colah R, Badakare S, Mohanty D (1997). Factor VIII and IX gene polymorphisms and carrier analysis in Indian population. *Am J Hematol* 54:271-275.

Solari AJ (1996). Genética humana. Fundamentos y aplicaciones en medicina. Capítulo 9. *Editorial Médica Panamericana (Madrid-Buenos Aires)*.

Southern E (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separates by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98:503-517.

Szostak JW, Orr-Weaver TL, Rothstein RJ, Stahl FW (1983). The double-strand break repair model for recombination. *Cell* 33:25-35.

Tizzano EF, Domenech M, Altisent C, Tusell J, Baiget M (1994a). Inversions in the factor VIII gene in Spanish Hemophilia A patients. *Blood* 83:3826.

Tizzano EF, Altisent C, Tusell J, Domenech M, Baiget M (1994b). Intron 22 Inversions and haemophilia. *Lancet* 343:791-792.

Tizzano EF, Domenech M, Baiget M (1995). Inversion of Intron 22 in isolated cases of Severe Hemophilia A. *Thromb Haemost* 73:6-9.

Toole JJ, Knopf JL, Wozney JM, Sultzman LA, Buecker JL, Pittman DD, Kaufman RJ, Brown E, Shoemaker C, Orr EC, Amphett GW, Foster WB, Coe ML, Knutson GJ, Fass DN, Hewick RM (1984). Molecular cloning of a cDNA encoding Human antihaemophilic factor. *Nature* 312:342-347.

Tuddenham EG, Cooper DN, Gitschier J, Higuchi M, Hoyer LW, Yoshioka A, Peake IR, Schwaab R, Olek K, Kazazian HH, Lavergne JM, Giannelli F, Antonarakis (1991). Haemophilia A: database of nucleotide substitutions, deletions, insertions and rearrangements of the factor VIII gene. *Nucleic Acids Res* 19:4821-4833.

Ullman A, Jacob F, Monod J (1967). Characterization by *in vitro* complementation of a peptide corresponding to an operator proximal segment of the  $\beta$ -galactosidase structural gene of *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 24:339-350.

van Dieijen G, Tans G, Rosing J, Hemker HC (1981). The role of phospholipid and factor VIIIa in the activation of bovine factor X. *J. Biol. Chem.* 256:3433-3442.

Vehar GA, Keyt B, Eaton D, Rodríguez H, O'Brien DP, Roblat F, Oppermann H, Keck R, Wood WL, Harkins RN, Tuddenham EGD, Lawn RM, Capon J (1984). Structure of Human factor VIII. *Nature* 312:337-342.

Voelkel-Meiman K, Keil RL, Roeder GS (1987). Recombination-stimulating sequences in yeast ribosomal DNA correspond to sequences regulating transcription by RNA polymerase I. *Cell* 48:1071-1079.

Vogel F, Motulsky AG (1997). Human Genetics. Problems and Approaches. Third edition. *Springer-Verlag Berlin*.

Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Feinberg AP (1985). Use of restriction fragment length polymorphisms to determine the clonal origin of human tumors. *Science* 227:642-645.

Wacey AI, Kembal-Cook G, Kazazian HH, Antonarakis SE, Schwaab R, Lindley P, Tuddenham EGD (1996). The haemophilia A mutation search test and resource site, home page of the factor VIII mutation database: HAMSTeRS. *Nucleic Acids Res* 24:100-102.

Waldman AS, Liskay RM (1987). Differential effects of base-pair mismatch on intracromosomal versus extracromosomal recombination in mouse cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:5340-5344.

Weinmann AF, Schoof JM, Thompson AR (1996). Clinical correlates among 49 families with hemophilia A and factor VIII gene inversions. *Am J Hematol* 51:192-199.

Weiss EH, Mellor A, Golden L, Fahmer K, Simpson E, Hurst J, Flavell RA (1983). The structure of a mutant *H-2* gene suggests that the generation of polymorphism in *H-2* genes may occur by gene conversion-like events. *Nature* 301:671-674.

Wion KL, Tuddenham EGD, Lawn RM (1986). A new polymorphism in the factor VIII gene for prenatal diagnosis of haemophilia A. *Nucleic Acids Res* 14:4535-4542.

Wood WL, Capon DJ, Simonsen CC, Eaton DL, Gitschier J, Keyt B, Seeburg PH, Smith DH, Hollingshead P, Wion KL, Delwart E, Tuddenham EGD, Vehar GA, Lawn RM (1984). Expression of active Human factor VIII from recombinant DNA clones. *Nature* 312: 330-336.

Yang D, Waldman AS (1997). Fine-resolution analysis of products of intracromosomal homeologous recombination in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 17:3614-3628.

Zangenberg G, Huang M-M, Amheim N, Erlich H (1995). New HLA-DPB1 alleles generated by interallelic gene conversion detected by analysis of sperm. *Nature Genet* 10:407-414.

## 11. ABREVIATURAS

**A y a:** alelos distinguibles de un *locus*.

**aa:** aminoácido.

**AHe:** heterodúplex asimétrico.

**AHED:** hipótesis 8, heterodúplex ligado a D y homodúplex E ligado a U. Conversión génica eventual I=>E.

**AHEU:** hipótesis 7, heterodúplex ligado a U y homodúplex E ligado a D. Conversión génica eventual I=>E.

**AHID:** hipótesis 5, heterodúplex ligado a D y homodúplex I ligado a U. Conversión génica eventual E=>I.

**AHIU:** hipótesis 4, heterodúplex ligado a U y homodúplex E ligado a D. Conversión génica eventual E=>I.

**ANM:** Academia Nacional de Medicina.

**Arg-Met:** unión peptídica arginina-metionina.

**Arg-Ser:** unión peptídica arginina-serina.

**ATCC:** American Type Culture Collection.

**ATP / TTP / GTP / CTP:** adenosin / timidin / guanosin / citosin trifosfato.

**B:** RFLP *Bcl* del intrón 18 del gen del FVIII.

**bp:** pares de bases.

**BSA:** sero albúmina bovina.

**BU:** Unidades Bethesda de inhibidor anti FVIII\*.

**cDNA:** DNA copia de RNA.

**cen:** centrómero.

**Ci:** unidad Curie de radioactividad.

**CO:** entrecruzamiento recíproco (*crossing over*).

**CODW:** hipótesis 3, entrecruzamiento neto río abajo del marcador.

**COUP:** hipótesis 1, entrecruzamiento neto río arriba del marcador.

**D:** frecuencia alélica asociada a la LD PCR DI en hemofílicos con la Inv22.

**dATP / dTTP / dGTP / dCTP:** desoxi-adenosin / desoxi-timidin / desoxi-guanosin- / desoxi-citosin trifosfato.

**DE LD PCR:** LD PCR extragénica río abajo (*downstream*).

**DI LD PCR:** LD PCR intragénica río abajo (*downstream*).

**$\partial F$ :** diferencial de la función F.

**$\partial F / \partial X_1$ :** derivada de la función F respecto a la variable  $X_1$ .

**DMF:** di-metil formamida.

**DNA:** ácido desoxirribonucleico.

**DS:** doble cadena.

**DSB:** ruptura de doble cadena del DNA.

**DTT:** di-tio treitol.

**DW PCR:** S PCR dentro de *int22h*.

**E:** frecuencia alélica asociada a la LD PCR DE en individuos normales sin la Inv22.

**EDTA:** ácido etilen-diamin-tetra acético.

**eF:** error de la función F.

**EtBr:** bromuro de etidio.

**F:** orientación por convención para *int22h*, indica la dirección opuesta a la transcripción del gen F8A.

**FIIa:** factor II de coagulación activado.

**FIX:** factor IX de coagulación.

**FIXa:** factor IX de coagulación activado.

**FV:** factor V de coagulación.

|   |  |
|---|--|
| <b>FVIII:</b> factor VIII de coagulación.   | <b>kD:</b> kilo Dalton.  |
| <b>FVIII:C:</b> actividad plasmática del FVIII.   | <b>I.d.:</b> desequilibrio de ligamiento.  |
| <b>FX:</b> factor X de coagulación.   | <b>LB:</b> medio de cultivo de Luria-Bertani.  |
| <b>FXa:</b> factor X de coagulación activado.   | <b>LD PCR:</b> PCR de larga distancia.   |
| <b>G6PD:</b> glucosa 6-fosfato deshidrogenasa.  | <b>LHA:</b> hemofilia A leve   |
| <b>HA:</b> hemofilia A.   | <b>LINE:</b> elementos nucleares interdispersos largos.  |
| <b>HB:</b> hemofilia B.   | <b>M:</b> RFLP <i>MspI</i> A del intrón 22 del gen del FVIII.  |
| <b>HBV:</b> virus de la hepatitis B.  | <b>MC:</b> búfer <i>multicore</i> para enzimas de restricción (Promega).   |
| <b>HCV:</b> virus de la hepatitis C.  | <b>MFGMP:</b> proteína murina de membrana de los glóbulos de la leche.   |
| <b>HEPES:</b> búfer hidroxietil piperazina / ácido etan sulfónico.  | <b>MHA:</b> hemofilia A moderada.  |
| <b>HIV:</b> virus de la inmunodeficiencia humana.   | <b>min.:</b> minuto.   |
| <b>HLA:</b> antígenos leucocitarios humanos.  | <b>N PCR:</b> PCR anidada ( <i>nested</i> ).   |
| <b>Ho:</b> homodúplex.  | <b>OD:</b> unidad de densidad óptica.  |
| <b>I:</b> frecuencia alélica asociada a la LD PCR UI o DI en individuos normales sin la <i>Inv22</i> .                                      | <b>OGCE:</b> hipótesis 9, homodúplex E ligado a U y D. Conversión génica obligatoria $E \Rightarrow I$ .             |
| <b>IAC:</b> cloroformo-alcohol isoamilico.  | <b>OGCI:</b> hipótesis 6, homodúplex I ligado a U y D. Conversión génica obligatoria $I \Rightarrow E$ .             |
| <b>IIHema:</b> Instituto de Investigaciones Hematológicas <i>Mariano R Castex</i> .   | <b>p:</b> proporción o probabilidad del alelo [+].   |
| <b>int22h:</b> secuencia homóloga del intrón 22 del gen del FVIII.  | <b>PCA:</b> proteína C activada.   |
| <b>int22h-1:</b> secuencia <i>int22h</i> ubicada dentro del intrón 22 del gen del FVIII ( <i>intragénica</i> ).                             | <b>PCR:</b> reacción en cadena de la polimerasa.   |
| <b>int22h-2 / -3:</b> secuencias <i>int22h</i> ubicadas fuera del gen del FVIII ( <i>extragénicas</i> ), proximal y distal respectivamente. | <b>P<sub>E</sub>:</b> probabilidad que una especie heterodúplex [I/E] o [E/I] se resuelva hacia el homodúplex [E/E]. |
| <b>Inv22 D:</b> <i>Inv22</i> distal o tipo 1*.  | <b>P<sub>I</sub>:</b> probabilidad que una especie heterodúplex [I/E] o [E/I] se resuelva hacia el homodúplex [I/I]. |
| <b>Inv22 P:</b> <i>Inv22</i> proximal o tipo 2*.  | <b>PMS:</b> segregación post-meiótica.   |
| <b>Inv22:</b> inversión del intrón 22 del gen del FVIII.  | <b>q:</b> proporción o probabilidad del alelo [-].   |
| <b>IPTG:</b> iso-propil-tio galactósido.  | <b>R:</b> orientación por convención para <i>int22h</i> , indica la dirección de la transcripción del gen F8A.       |
| <b>IVS22:</b> intrón 22.  |  |
| <b>kb:</b> kilo pares de bases.   |  |

**RCLB:** búfer de lisis de glóbulos rojos.

**RFLP:** polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción.

**RNA:** ácido ribonucleico.

**S PCR:** PCR de corta distancia.

**SDS:** dodecil sulfato de sodio.

**SDSA:** apareamiento de cadenas dependiente de la síntesis.

**seg.:** segundo.

**SHA:** hemofilia A severa.

**SHe:** heterodúplex simétrico.

**SHIE:** hipótesis 2, heterodúplex simétrico ligado a U y D. Conversión génica alternativamente posible en ambas direcciones I=>E y E=>I.

**SNP:** polimorfismo de un único nucleótido.

**SSB:** ruptura de simple cadena del DNA.

**SSC:** solución salina-citrato.

**TBE:** búfer tris-borato-EDTA.

**TE:** búfer tris-EDTA.

**tel:** telómero.

**U:** frecuencia alélica asociada a la LD PCR UI en hemofílicos con la Inv22.

**UI LD PCR:** LD PCR intragénica río arriba (*upstream*).

**UV:** ultra-violeta.

**UWCM:** *University of Wales College of Medicine.*

**VNTR:** polimorfismo de número variable de repeticiones directas.

**vWD:** enfermedad de von Willebrand.

**vWF:** factor de von Willebrand.

**X:** RFLP XbaI A del intrón 22 del gen del FVIII.

$\chi^2$ : estadístico de Chi cuadrado.

**Xist:** transcrito específico del X-inactivo.

**Xq28:** región 2, subregión 8 del brazo q del cromosoma X.

\* Las abreviaturas de parentesco (**H**, hemofílico; **M**, madre; etc.), de presencia o no de inhibidor (+, presencia; -, ausencia), de de origen de la enfermedad (**S**, esporádica; **F**, familiar) y del tipo específico de Inv22 (**D**, distal y **P**, proximal) figuran en el pie de la tabla 4 y sólo son usadas en el capítulo primero. Cualquier superposición de abreviaturas asociada a este capítulo debe ser resuelta respecto al contexto.