Biblioteca Digital F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR FACULTAD DE CIENCTAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral



Genética molecular de hemofilia: caracterización de mutaciones en hemofilia B, expresión de hemofilia en mujeres y desarrollo de nuevos métodos de análisis de inversiones

Radic, Claudia Pamela

2010

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. 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. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Radic, Claudia Pamela. (2010). Genética molecular de hemofilia: caracterización de mutaciones en hemofilia B, expresión de hemofilia en mujeres y desarrollo de nuevos métodos de análisis de inversiones. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Radic, Claudia Pamela. "Genética molecular de hemofilia: caracterización de mutaciones en hemofilia B, expresión de hemofilia en mujeres y desarrollo de nuevos métodos de análisis de inversiones". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2010.

EXACTAS Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293 **Contacto:** digital@bl.fcen.uba.ar



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Genética molecular de Hemofilia: caracterización de mutaciones en hemofilia B, expresión de hemofilia en mujeres y desarrollo de nuevos métodos de análisis de inversiones.

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Ciencias Biológicas.

Claudia Pamela Radic

Director de tesis: Dr. Carlos Daniel De Brasi.

Consejero de estudios: Dr. Alberto Kornblihtt.

Lugar de trabajo: Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires.

Buenos Aires, 2010.

Genética molecular de Hemofilia: caracterización de mutaciones en hemofilia B, expresión de hemofilia en mujeres y desarrollo de nuevos métodos de análisis de inversiones.

RESUMEN

Las hemofilias A (HA) y B (HB) son coagulopatías hereditarias, ligadas al cromosoma X (X), sufridas por varones (1:5000) y raramente por mujeres, causada por defectos génicos del factor VIII (F8) y IX (F9), respectivamente. Para caracterizar el espectro de mutaciones causales de HB en Argentina se aplicó un esquema original de 12 amplímeros para el F9, incluyendo un screening por CSGE (conformation sensitive gel electrophoresis), en 49 familias, y se identificaron 29 cambios missense (60/), 7 nonsense (14/), 4 defectos de splicing (8/), 2 pequeñas inserciones-deleciones (4/), 6 grandes deleciones (12/) y un cambio en región promotora del F9. Dos cambios *missense* no reportados mostraron, uno la disrupción de un puente disulfuro y otro la destrucción de un sitio de γ-carboxilación condicionando el fenotipo de HB severa. Para mejorar la estrategia de detección de grandes rearreglos que involucran *int22h* e *int1h* en el F8, causales del 50/ de las HA severas, se desarrolló un abordaje nuevo, inverse-shifting-PCR (IS-PCR). Mediante el uso de un test diagnóstico para la inversión del intron 22 (Inv22), los resultados de IS-PCR fueron validados por perfecta concordancia en 32 y 43 casos previamente estudiados por Southern blot y PCR inversa, y en 34 casos nuevos. El uso conjunto del test diagnóstico y complementario sobre las series de nuestra población, no mostró las variantes estructurales, i.e., deleciones y duplicaciones hipotetizadas en la literatura. El test para la inversión del intrón 1 fue validado por perfecta concordancia en 21 casos estudiados por doble PCR y en 13 casos nuevos. Para investigar la utilidad de IS-PCR en diagnóstico prenatal, muestras de vellosidades coriónicas de una madre portadora de la Inv22 y su feto nonato fueron diagnosticadas. Para estudiar la causa de la expresión de HA severa en mujeres portadoras heterocigotas se ajustó y validó el sistema del gen HUMARA para estimar el patrón de inactivación del X (XIP). Se estudiaron 6 mujeres con HA severa: una mostró la mutación c.3633delA en hemi-homocigosis, 4, mostraron la mutación en heterocigosis y sesgo extremo en el XIP, y un caso, heterocigota para c.4388_4391delCTTT, mostró XIP no sesgado en leucocitos de sangre periférica (hipotetizando una inactivación hepática distinta). En una serie de 37 portadoras heterocigotas, y un grupo control de 20 no portadoras, se estudió la correlación XIP-FVIII:C mediante análisis de contingencia y de errores respecto a un modelo teórico original (Obs.-Esp.), obteniéndose modestas diferencias significativas (p<0,05) asociadas a una gran dispersión de FVIII:C. Este trabajo presentó la primera serie molecular de mutaciones causales de HB en Argentina, el desarrollo de una nueva estrategia para el estudio de las grandes inversiones causales de HA y la búsqueda de causalidad de la expresión de HA severa en mujeres.

Palabras clave: Hemofilia A, Hemofilia B, mutaciones deletéreas, inversión del intron 22, inversión del intron 1, *inverse shifting*-PCR, mujeres sintomáticas.

Molecular genetics of hemophilia: characterization of hemophilia B mutations, expression of hemophilia in women and development of new methods for inversion analysis.

ABSTRACT

Hemophilia A (HA) and B (HB) are X-chromosome (X) linked inherited coagulation disorders suffered by men (1:5000) and rarely by women, which are caused by gene defects of factor VIII (F8) and IX (F9), respectively. To characterize the spectrum of HB causative mutations in Argentina, an original scheme of 12 amplicons for F9 including a screening by CSGE (conformation sensitive gel electrophoresis) was applied in 49 families identifying 29 missense mutations (60/), 7 nonsense (14/), 4 splicing defects (8/), 2 small insertions-deletions (4/), 6 large deletions (12/) and one change in the F9 promoter region. Two previously unreported missense changes showed a disruption of a disulfide bridge, and the destruction of a site for ycarboxylation by analysis in silico, both conditioning the severe HB phenotype. To improve the genotyping strategy for large rearrangements involving *int22h* and *int1h* in the F8 that cause 50/ of severe HAs worldwide, we design and developed a new approach, inverse-shifting-PCR (IS-PCR). Using a diagnostic test for analysis of the intron 22 inversion (Inv22), IS-PCR results were validated by obtaining perfect agreement, in 32 and 43 cases previously studied by Southern blot and a former inverse PCR approach; and in 34 new cases. The combined use of a complementary and a diagnostic test over our population series showed no structural variants, i.e., deletions and duplications hypothesized in the literature. The test for genotyping F8 intron 1 inversion was validated by perfect result agreement in 21 cases previously studied by double PCR, and 13 new cases. To investigate the usefulness of IS-PCR in prenatal diagnosis, chorionic villus samples from an Inv22 carrier mother and her fetus were diagnosed. To study the cause of severe HA expression in heterozygous female carriers a system of the gene HUMARA for estimating X-inactivation patterns (XIP) was adjusted and validated. We studied 6 women with severe HA: one showed an hemi-homozygous mutation, c.3633delA, 4 showed heterozygous mutations with extremely skewed XIP; and one case, heterozygous for c.4388 4391delCTTT, showed a non skewed XIP in peripheral blood leukocytes (hypothesizing a different hepatic inactivation). A series of 37 heterozygous carriers and a control group of 20 non-carriers were studied for XIP-FVIII: C correlation. We analyzed contingency tables and relative errors (Obs.-Esp.) applying an original theoretical model and found modest significant differences (p<0.05) associated with a wide variation of FVIII:C. This work presented the first molecular series of HB causative mutations in Argentina, the development of a new strategy for characterization of large DNA inversions causing severe HA and investigate the causes of a full expression of severe HA phenotype in women.

Keywords: Hemophilia A, Hemophilia B, deleterious mutations, intron 22 inversion, intron 1 inversion, inverse-shifting-PCR, symptomatic women.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Carlos De Brasi por sus valiosos consejos en cada etapa del trabajo, brindándome a cada momento toda su atención para llevar a cabo no solo ésta tesis, sino en la forma de manejarme en mi carrera, por su paciencia y todas esas ideas que en algún momento pondremos en práctica. A la Dra. Liliana Rossetti por sus constantes aportes, su dedicación y paciencia para enseñarme los pasos a seguir en el laboratorio, sus consejos y su gran ayuda.

Al Dr. Miguel Candela por el aporte de todas las muestras y su paciencia... Al Dr. Miguel de Tezanos Pinto y al Dr. Raúl Pérez Bianco.

A mis compañeros y amigos del laboratorio! A mis amigas de la facu que están siempre!!!! A mis amigas que sin saber que es genética escuchan atentamente todo lo que les cuento...para compartir conmigo esta experiencia.

A los siguientes organismos e instituciones que brindaron el lugar físico y los subsidios de investigación: al Instituto de Investigaciones Hematologicas *Mariano R. Castex*, Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires, al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y técnicas, CONICET, a la Agencia Nacional de Promoción Científica y tecnológica (AGENCIA), a la Fundación *Florencio Fiorini,* Fundación *Alberto J. Roemmers* y especialmente a la Fundación *Rene Barón*, por su gran aporte a este trabajo y por la beca inicial de investigación.

A mi familia....

A Mariano, Gonzalo, mi mamá y mi papá...

Declaración de publicaciones.

Los resultados del presente trabajo de tesis han sido parcialmente publicados en los siguientes artículos:

1. Genotyping the Hemophilia Inversion Hotspot by use of Inverse PCR. Liliana C. Rossetti, **C. Pamela Radic**, Irene B. Larripa, Carlos D. De Brasi. Clinical Chemistry 51 (7) 1154-1158 (2005).

 Sixteen novel haemophilia A causative mutations in the first Argentinean series of severe molecular defects. Rossetti LC, Radic CP, Candela M, Pérez Bianco R, de Tezanos Pinto M, Goodeve A, Larripa IB, De Brasi CD. *Haematologica* 2007, 92(6): 842-5.

3. Developing a new generation of tests for genotyping hemophilia-causative rearrangements involving *int22h* and *int1h* hotspots in the factor VIII gene. **Radic CP**-Rossetti LC, Larripa IB, De Brasi CD. Journal of Thombosis and Haemostasis 2008; 6: 830-6.

4. Inverse shifting-PCR based prenatal diagnosis of hemophilia-causative inversions involving *int22h* and *int1h* hotspots from chorionic villus samples. **Radic CP**-Rossetti LC, Zuccoli JR, Abelleyro MM, Larripa IB, De Brasi CD. Prenat. Diagn., 2009, Dec; 29(12):1183-5.

Sin embargo el material publicado constituye un tercio del material presentado. Los capítulos I y III son enteramente inéditos.

Lic. Claudia Pamela Radic.

IN	DI	CE

Introducción	1
Hemofilia B	4
Estructura de la proteína, el mensajero y el gen del gen del FIX de coagulación	5
Hemofilia A	8
Estructura de la proteína, el mensajero y el gen del gen del FIX de coagulación	9
Grandes inversiones recurrentes del F8	10
Expresión de hemofilia en mujeres	15
Objetivos	18
Materiales y métodos	20
Población para el estudio de los genes del FIX y FVIII e inactivación del	20
Muestras y métodos de purificación del ADN genómico	21
Amplificación y análisis del gen del Factor IX de coagulación humano	22
Amplificación y análisis del gen del Factor VIII de coagulación humano	24
Screening de mutaciones por CSGE	27
PCR inversa para el análisis de la inversión del intrón 22 e inversión del intrón 1	27
Estudio de la inactivación del cromosoma X	29
Archivos de GenBank utilizados, sus fechas especificas y notación de	30
Secuenciación de ADN	31
Bioinformática	32
Formulas matemáticas y métodos estadísticos	32
Capítulo I	33
Resultados	33
Grandes deleciones parciales o totales del F9	33
Mutaciones pequeñas causales de HB y cambios polimórficos en el F9	37
Cambios a no sentido (<i>nonsense</i>)	39
Cambios de falso sentido (<i>missense</i>)	39
Pequeñas deleciones e inserciones	42
Mutaciones en sitios de <i>splicing</i>	44
Cambios en las regiones no traducibles	45
Estudios de portadoras	46
Mutaciones en sitios CpG	46
Desarrollo de anticuerpo inhibidor en HB	46
Discusión	47
Capítulo II	57
Resultados	57
Diseño del abordaje de IS-PCR para estudiar todos los posibles rearreglos	58
Test diagnóstico	62
Test complementario	63
Diseño del abordaje de IS-PCR para estudiar la inversión del intrón 1	65
Test único para la Inv1	66
Respuesta de la técnica de IS-PCR a la cantidad y calidad de ADN	67
Detección de eventuales mosaicos	68
IS-PCR y diagnóstico prenatal	71
Estimación de la eficiencia de formación de círculos de ADN	72
Discusión	75

Capítulo III	79
Resultados	79
Estudio de mutaciones del gen del FVIII y cigosidad en mujeres.	80
Ajuste y validación de distintos abordajes para el análisis de los patrones	81
Estimación cuantitativa del patrón de inactivación del cromosoma X (XIP).	84
Mujeres con síntomas clínicos de HA.	87
Correlación entre los niveles de FVIII:C y XIP.	92
Discusión	99
Discusión general	106
Conclusiones	110
Referencias	114

INTRODUCCIÓN

La hemofilia es una enfermedad hemorrágica hereditaria, ligada al cromosoma X, que afecta principalmente a varones en todas las poblaciones humanas (McKusick, 1995), aunque también ha sido observada en caninos, murinos, equinos y ovinos entre otras especies de mamíferos. Ingram en 1976, publicó una reseña histórica de hemofilia y observó que; los primeros datos sobre hemofilia fueron aportados por rabinos en 1700, quienes observaron un excesivo sangrado en ciertos niños luego de la circuncisión, y en algunos casos el sangrado fue tan severo que los llevó a la muerte. El rabino Maimónides describió que si los niños tenían hemofilia, era la madre quien se la transmitía. Otto en 1890, observó un grupo de niños con sangrados prolongados con madres sin problemas de sangrado, pero que podían transmitirlo a sus hijos y sus hijas a sus nietos. Ya en el siglo XX, varios investigadores estudiaron el proceso de coagulación. Sahli en 1905, encontró que el fibrinógeno era suficiente para producir la coagulación. Addis y Howell en 1910 y 1914, respectivamente, demostraron que la producción de fibrinógeno a fibrina a través de trombina no se veía alterada en los pacientes hemofílicos. En 1928 el Dr. Hopff, describe la enfermedad como Hemofilia. En 1935 Quick y colaboradores desarrollaron el test para medir la formación de trombina, el tiempo de protrombina, resultando normal en los pacientes con hemofilia. Lewis y colaboradores en 1946, describieron la globulina antihemofílica, una pequeña fracción plasmática de dadores normales que corregía el tiempo de coagulación de los hemofílicos, mas tarde denominado factor VIII. En 1944, el Dr. Alfredo Pavlovsky, describió una mutua corrección del tiempo de coagulación al mezclar sangre de dos hemofílicos, logrando de esta manera la primera diferenciación entre grupos de complementación que después resultaron en la hemofilia A y B. En 1970, se obtienen los primeros concentrados de FVIII y FIX, hecho que produjo un importante avance en el tratamiento de la hemofilia. En 1982 Kurachi y Davie, aislaron y caracterizaron el gen del factor IX causal de hemofilia B y en 1984, Gitschier y colaboradores caracterizaron el gen del factor VIII causal de hemofilia A (datos historiados por Ingram, 1996).

La hemofilia es conocida como la enfermedad de la familia real. La reina Victoria, en 1853, tuvo su octavo hijo, Leopold, con evidentes rasgos de hemofilia, reportados en la revista British Medical Journal en 1868. Leopold pudo casarse y tuvo una hija, portadora obligatoria, Alice quien tuvo un hijo hemofílico, Rupert, el al igual que su abuelo murió de una hemorragia cerebral. Dos hijas de la reina Victoria, Alice y Beatrice transmitiendo la enfermedad a tres nietos y seis bisnietos de la reina; así, la condición fue transmitida a través de ellas a muchas familias reales de Europa, incluyendo España y Rusia. El hemofílico más famoso de la historia fue el hijo del Zar Nicolas II de Rusia, Alexis. Se ha especulado que la enfermedad creó una severa tensión en la familia real rusa, permitiendo que Rasputín ganara una gran influencia en la corte. Alexis y su familia fueron asesinados por la revolución bolchevique en 1917. La mutación causal de hemofilia y el tipo de hemofilia de los descendientes de la reina Victoria, ha sido descripta recientemente por Rogaev y colaboradores (2009), el cambio encontrado fue reportado como una mutación en el sitio consenso de *splicing* del intrón 3 (IVS3-3A>G) en el gen del FIX. Este hallazgo indica que la familia real sufría de hemofilia B.

Actualmente es posible clasificar la hemofilia en dos tipos, indistinguibles clínicamente, la hemofilia A (HA, MIM # 306700), asociada a un defecto en el factor VIII de coagulación (FVIII), y la hemofilia B (HB, MIM # 306900) que se caracteriza por el déficit del factor IX de coagulación (FIX) en plasma (McKusick, 1994). La HA presenta una frecuencia de 1-2 cada 10.000 varones en cambio en HB la frecuencia es algo menor, 1-2 cada 30.000 varones.

Estas dos proteínas, FVIII y FIX, circulan como precursores inactivos, y son activados en presencia de un cambio hemostático, a través de la cascada de coagulación. El FVIII es un cofactor sin actividad enzimática por sí mismo, que 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 entre otras funciones actúa como transportadora del FVIII tanto durante su secreción como en la circulación general. El factor VIII activado por clivaje proteolítico (FVIIIa) es un cofactor esencial para el factor IX activo (FIXa). El FIX es una serín proteasa con requerimiento absoluto del FVIII como cofactor, que es activado principalmente por el factor XI activo (FXIa). El FVIIIa y el FIXa forman un complejo activo, el complejo tenasa, que activa el factor X (FX) sobre una membrana fosfolipídica activada (la superficie plaquetaria) y en presencia de iones calcio, en una de las reacciones más importantes para modular el proceso de coagulación sanguínea; la cascada culmina con la deposición de fibrina, el polímero estructural de la coagulación sanguínea (Bowen, 2002).

En una enfermedad recesiva ligada al cromosoma X como la hemofilia, la condición se manifiesta en el varón que es descripto 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 análisis bioquímicos específicos. Sobre base estadística, debido al fenómeno de inactivación del cromosoma X (Lyon, 1961) una mujer portadora presentará aproximadamente la mitad de actividad del FVIII o FIX respecto a un individuo de coagulación normal.

Por la segregación al azar de alelos ligados al cromosoma X, sabemos que, cuando una mujer es portadora, cada uno de sus hijos varones tiene 50/ de riesgo de resultar hemofílico y cada una de sus hijas 50/ de ser portadora. En la descendencia de un varón hemofílico, todas sus hijas serán portadoras ya que heredarán el cromosoma X ligado al gen afectado, mientras que todos sus hijos varones resultarán no afectados por heredar el cromosoma Y. Según predijo genetista inglés, J. S. B. Haldane, para una enfermedad hereditaria ligada al cromosoma X, cuyos afectados tienen una muy reducida o nula eficacia biológica o *fitness*, las mutaciones que la causan tienen una alta tasa de aparición de novo. Dependiendo de la eficacia reproductiva de los hemofílicos y asociada a la severidad fenotípica un máximo de un tercio de las mutaciones que causan hemofilia aparecerían de novo en cada generación para compensar el tercio de mutaciones que se pierden con los cromosomas X de los varones hemofílicos (los dos tercios restantes de los cromosomas X con los genes afectados de la población estarían en portadoras y éstas tienen una capacidad reproductiva no afectada apreciablemente) (Haldane, 1935). En los últimos años con el advenimiento de las eficaces terapias sustitutivas del factor defectuoso o ausente, la probabilidad de que un afectado alcance la edad reproductiva y pueda dejar descendencia ha aumentado significativamente, sin embargo, este cambio en hemofílicos severos alcanza a minoritarios segmentos de la población mundial y sólo se restringe a un lapso relativamente pequeño de tiempo como para modificar significativamente los parámetros poblacionales globales.

El origen de la hemofilia, esporádica o familiar, describe la aparición de la enfermedad en una familia. El origen esporádico describe la aparición de *novo* de la enfermedad en un grupo familiar, y el origen familiar, describe recurrencia de la hemofilia en la familia bajo estudio.

La gravedad de las manifestaciones clínico-hemorrágicas de los pacientes con HA o HB está en relación con los valores de actividad del FVIII o FIX plasmático, respectivamente, en comparación con un plasma patrón de individuos de coagulación normal.

El tratamiento específico de la hemofilia se basa en la terapia de reemplazo o administración periódica en pequeñas dosis del factor deficiente, desde distintas fuentes, como prevención de episodios clínicos severos (terapia profiláctica), lo que permite una mejora significativa de la calidad de vida de los hemofílicos severos.

El desarrollo de inhibidores (anticuerpos neutralizantes hacia el factor de coagulación que se administra con fines terapéuticos) se produce principalmente cuando las mutaciones causales de

Introducción

la enfermedad se asocian a la ausencia del producto génico, como grandes deleciones, grandes rearreglos, mutaciones a no sentido (*nonsense*); mientras que las mutaciones asociadas a la presencia del producto confieren un bajo riesgo de desarrollo de inhibidor. Sin embargo, no siempre esta relación es tan clara, y en ciertos casos con mutaciones idénticas, algunos han desarrollado anticuerpo inhibidor y otros no (Vianello *et al*, 1997, Goodeve *et al*, 2000). El desarrollo de inhibidor también esta relacionado con características específicas del sistema inmunológico del paciente hemofílico (antígenos HLA, etc) (Oldenburg *et al*, 2004), así como con el tipo de factor terapéutico administrado, la edad de la primera infusión, el protocolo de administración, entre otras causas. La prevalencia de inhibidores es mayor en HA (cerca del 10 al 20/ de los pacientes) que en HB (< 3/ de los pacientes) (Martinez-Murillo *et al*, 2001).

Hemofilia B.

La hemofilia B (HB) o enfermedad de Christmas se caracteriza por mutaciones de diverso tipo y severidad a lo largo del gen del factor IX de coagulación (*F9*), y al igual que en HA resulta en una proteína plasmática afectada o ausente.

La HB puede clasificarse según el criterio bioquímico, en severa (<1 Ul/dl de actividad del FIX:C), moderada (entre 1 y 5 Ul/dl) y leve (entre 5 y 40 Ul/dl) (Walker *et al*, 1995) y estas categorías correlacionan muy bien con la severidad en las manifestaciones clínicas.

El desarrollo de inhibidores de la terapia de reemplazo en HB es infrecuente, presentándose en el 3/ de los individuos con HB severa (Oldenburg *et al*, 2006). Pacientes con deleciones génicas o rearreglos presentan un alto riesgo de desarrollo de inhibidor, aproximadamente 50/; mientras que los casos de cambios en el marco de lectura (*frameshifts*), aparición de codones de terminación prematuros y algunas mutaciones sobre secuencias de *splicing*; se asocian a con riesgo intermedio (~20/) (Rick *et al*, 2003).

Actualmente, los datos de las mutaciones causales de HB, los cambios polimórficos observados en el *F9* y la información clínica y bioquímica asociada son computados en la base de datos de acceso público en internet en la página de *haemophilia B mutation database 13 edition* (Giannelli *et al*, 1998), (URL: <u>http://www.kcl.ac.uk/ip/petergreen/haemBdatabase.html)</u>.

4

Estructura de la proteína, el mensajero y el gen del factor IX de coagulación humano.

El *F9* fue aislado en 1982 (Kurachi y Davie, 1982) y caracterizado en 1985 (Yoshitake *et al*, 1985). El *F9* se localiza en el brazo largo del cromosoma X, en la banda cromosómica Xq27.1, transcribe orientado hacia el telómero, abarca una región genómica de 33 kilo bases (Kb) incluyendo 8 exones (A-H) y codifica un ARN mensajero (ARNm) de 2,8 kb (Yoshitake *et al*, 1985) (Fig. 1 panel superior).

El FIX maduro consta de 415 residuos (excluyendo 46 residuos correspondientes al péptido señal y al propéptido), con una masa molar relativa de 55 kilo Daltons (kD), constituye una enzima con actividad serín-proteasa dependiente de la vitamina K, sintetizada en el hígado y liberada al plasma como un zimógeno o proenzima, que es activada a través del clivaje proteolítico mediado mayoritariamente por el FXIa. El FIXa participa en un complejo junto con el FVIIIa sobre la superficie plaquetaria para activar al factor X en una reacción crucial para la generación de trombina y el proceso de coagulación sanguínea.

En la proteína se pueden distinguir principalmente 4 grandes dominios estructurales, desde el extremo amino (Fig. 1): el dominio Gla (residuos 1-40), un pequeño segmento hidrofóbico (41-47), dos dominios que muestran homología con el factor de crecimiento epidérmico (EGF-1 y -2) (48-84 y 85-128, respectivamente), juntos estos 3 dominios conforman la cadena liviana del FIX (1-145), y un dominio catalítico serín-proteasa, que corresponde a la cadena pesada (181-415). Ambas cadenas se mantienen unidas a través de un puente disulfuro (Di Scipio *et al*, 1978, Anson *et al*, 1984).





Antes de la secreción, la proteína sufre modificaciones post-traduccionales mediadas por la enzima carboxilasa dependiente de vitamina K, incluyendo γ-carboxilación de los 12 residuos de ácido glutámico pertenecientes al dominio Gla, también glicosilaciones, fosforilaciones e hidroxylaciones (Enjolras *et al*, 2004).

Como se mencionó arriba, el *F9* se organiza en 8 exones (Fig. 1, panel superior): El exón A codifica para el péptido señal involucrado en la secreción desde el hepatocito, el exón B codifica principalmente para el propéptido, los sitios de unión de la carboxilasa dependiente de vitamina K, y junto al exón C codifican para completar el dominio Gla; el exón D codifica para el primer dominio del tipo factor de crecimiento epidérmico que contiene un dominio conservado de residuos carboxílicos incluyendo un β -hidroxiaspártico en el aminoácido 64 que une un ión Ca⁺⁺ adicional con alta afinidad. El exón E codifica para el segundo dominio del tipo factor de crecimiento epidérmico; el exón F codifica para el segmento llamado péptido de activación, que se libera del factor resultando en la cadena liviana y pesada del FIXa. Los exones G y H codifican para el dominio catalítico con actividad serin-proteasa, responsable de la proteólisis del factor X a Xa, esta región mantiene alta homología con otras serín-proteasas estudiadas y es altamente probable que la tríada His221, Asp269 y Ser365 participen en el clásico mecanismo catalítico estudiado en este grupo de proteínas como la tripsina. Estos tres residuos juntos se los denomina tríada catalítica (Giannelli *et al*, 1998).

Estudios posteriores a la caracterización completa del *F9* en 1985, detectaron defectos genéticos causales de HB, observando una alta frecuencia de mutaciones por cambio de un solo nucleótido, ampliamente distribuidas dentro de la secuencia génica, asociadas a cambios de falso sentido (*missense*), cambios a no sentido (*nonsense*) y cambios del marco de lectura (*frameshifts*) (Tabla 1). Asimismo, existe un grupo de mutaciones que afectan al promotor del gen del FIX, asociadas a un fenotipo inusual de HB, llamado HB Leyden, que se caracteriza por una restitución espontánea de los niveles de FIX:C (actividad del FIX) luego de la pubertad (Lillicrap, 1998). En HB hay pocos estudios que muestren la relación entre el tipo de mutaciones de tipo *missense* causan el 59 / de los casos con fenotipo severo y moderado y que aproximadamente el 95 / de estas mutaciones son de origen independiente. En familias con HB leve, el 97 / presenta mutaciones de tipo *missense* y sólo el 41 / es de origen independiente. Esta asociación entre la mayor severidad del fenotipo hemofílico y el origen

independiente de la mutación causal (indicada por su asociación a diferentes haplotipos de marcadores ligados) encuentra sólido sustento teórico en el razonamiento de J.S.B Haldane citado más arriba (Haldane, 1935).

Tabla 1: Principales mutaciones involucradas en HB.

Tipo de mutación	Porcentaje observado *
Falso sentido	54.6
Sin sentido	27.7
Pequeñas deleciones/inserciones (< 50 bp)	11.6
Grandes deleciones (> 50 bp)	6

* Datos obtenidos de Oldenburg et al, 2004.

En este contexto, este trabajo se propone abordar, el estudio exhaustivo del gen del FIX de coagulación humano en busca de mutaciones causales de HB y variantes polimórficas, polimorfismos de DNA, en el *F9* en la población Argentina.

Hemofilia A.

Como se indicó la HA está caracterizada por mutaciones deletéreas de distinto tipo a lo largo del gen del factor VIII de coagulación (*F8*), resultando en una proteína plasmática FVIII ausente o afectada.

La HA puede también clasificarse según un criterio bioquímico-clínico en severa (con actividad del FVIII:C menor a 1 UI/dI), moderada (entre 1 y 5 UI/dI) y leve (entre 5 y 20 UI/dI) (Hoyer, 1994). Aunque existe cierta disparidad en los datos provenientes de la literatura, se estima que entre el 20 y el 30/ de los pacientes con fenotipo de HA severa desarrollan anticuerpos contra el FVIII terapéutico (Schwaab *et al,* 1995).

Estructura de la proteína, el mensajero y el gen del factor VIII de coagulación.

La determinación de la secuencia nucleotídica del ADNc (ADN copia del ARNm) del FVIII, predice una cadena polipeptídica madura de 2332 aminoácidos (excluyendo los 19 residuos del péptido señal, indispensables para su secreción) con una masa molar relativa de 265 kD (sin considerar carbohidratos) (Vehar *et al,* 1984). El FVIII es sintetizado principalmente en hepatocitos y células endoteliales entre otros tejidos. En forma similar al *F9*, el *F8* presenta una expresión residual muy baja en las células nucleadas de sangre periférica, razón que dificulta los análisis de expresión genómica.

La estructura primaria del FVIII muestra básicamente 3 tipos de dominios repetidos que incluyen una región triplicada de aproximadamente 330 residuos (dominios A), una región única de 980 residuos (dominio B) y una región carboxi-terminal duplicada de 150 residuos (dominios C), y tres pequeños péptidos ácidos (a₁, a₂, a₃) en el orden: NH₂.A₁-a₁-A₂-a₂-B-a₃-A₃-C₁-C₂.COOH (Vehar *et al*, 1984) (Fig. 1, panel inferior). Esta estructura presenta un alto grado de homología con el factor V de coagulación (A₁-A₂-B-A₃-C₁-C₂, sólo sus dominios B no están relacionados), con la proteína plasmática ceruloplasmina (A₁-A₂-A₃) y con la ferroxidasa (dominio A) (Vehar *et al*, 1984). Sus dominios C también presentan homologías entre sí y con proteínas de otras especies, pero en grado menor.

El gen que codifica para el factor VIII, localizado en la región Xq28 del cromosoma X, fue uno de los genes de mayor tamaño caracterizado en humanos hasta fines de los años 80 (186 kb) (Gitschier *et al*, 1984). Contiene 26 exones con tamaños comprendidos entre 69 y 3106 pares de bases (bp) que se transcriben a un ARNm 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) (Fig. 1, panel inferior).

Después del clonado y caracterización del *F8* (Gitschier *et al*, 1984; Vehar *et al*, 1984; Toole *et al*, 1984; Wood *et al*, 1984), numerosos estudios detectaron mutaciones causales de HA severa, moderada y leve, incluyendo casi todo tipo de cambios: deleciones grandes (> 0,2 kb) mediadas por eventos de recombinación homóloga (Rossetti *et al*, 2004) o de recombinación no homóloga (Woods-Samuels *et al*, 1991), deleciones o inserciones pequeñas (de 1 bp, en motivos repetidos, o de pocas bases, algunas de las cuales predicen cambios en el marco de lectura o *frameshifts* y otras no), inserciones grandes, como la inserción del retrotransposón *LINE-1*, *long interspersed nuclear elements* o Alu, mutaciones puntuales que causan cambios de falso sentido (*missense*), o aparición prematura de codones de terminación (*nonsense*), o que afectan las secuencias necesarias para el proceso de maduración del transcripto primario de ARN en ARNm (*splicing*) (Gitschier *et al*, 1991) (Tabla 2). Actualmente todas las mutaciones asociadas a HA se encuentran registradas y permanentemente actualizadas en la base de datos HADB (*Haemophilia A mutation*

database and factor VIII resourse site, previamente HAMSTeRS), libremente accesible en internet en la dirección URL: <u>http://www.hadb.org.uk</u> (Kemball-Cook *et al,* 1998).

Grandes inversiones recurrentes del F8.

Las mutaciones descriptas ya referidas arriba permiten explicar la causa de la casi totalidad de las HA moderadas y leves pero sólo algo más de la mitad de las HA severas. Doce años atrás, dos grupos de investigación (Naylor *et al*, 1993; Lakich *et al*, 1993) en forma independiente y simultánea demostraron que un tipo inusual de mutación se observaba en la mitad de los casos severos. Se trata de una disrupción del *F8*, debida a una inversión (inapreciable citogenéticamente) que separa a los exones 1-22 de los exones 23-26, aproximadamente 500-600 kb. Esta disrupción inactivante del *F8* es llamada inversión del intrón 22 (Inv22) y es la causa de casi la mitad de las HA severas en todo el mundo (Fig. 2, Tabla 2).

La Inv22 resulta por intercambio recíproco entre secuencias homólogas de 9,5 kb (*int22h*) ubicada una de ellas dentro del intrón 22 del *F8* (*int22h*-1) y otra que pertenece a un grupo de al menos dos copias adicionales de *int22h* (*int22h*-2 e *int22h*-3), ubicadas en posición más telomérica, también en Xq28, aproximadamente 400 kb río arriba (*upstream*) del gen del FVIII (Naylor *et al*, 1995) (Fig. 2). Como resultado de la Inv22, el gen del FVIII queda truncado a nivel de su intrón 22 y las nuevas secuencias que quedan yuxtapuestas aportan 4 exones putativos (Ilamados a, b, c y d) (Naylor *et al*, 1993).

Tipo de mutación	Severa ¹ FVIII:C $\leq 1/$		$Moderada^{1}$ $1 < FVIII:C \le 5/$	Leve ¹ 5/ < FVIII:C \leq 20/
Inversiones	distal 3	5/		
2	proximal	7/		
Inv22 ²	raros < 0.	5/		
	Inv22 total 4	12/		
Inv1 ³	5,	/		
	Total 4	7/		
Mutaciones	falso sentido	19/	falso sentido > 95/	falso sentido > 98/
Puntuales	sin sentido	7/		
	sitio splicing	4/	sitio splicing	
	Total 3	80/		
Deleciones	grandes (> 0,2kb)	10⁄	grandes (> 0,2kb)	
	pequeñas (< 0,2kb)	4/		
	Total 2	20/		
Inserciones	de una bp	2/		
	LINE-1 <	1/		
	Total	3/		

Tabla 2: Mutaciones involucradas en hemofilia A severa, moderada y leve.

¹Estimada de la información publicada en internet en la base de datos *HADB* (<u>http://www.hadb.org.uk</u>) (Kemball-Cook *et al*, 1998). ²Información publicada por Antonarakis, colaboradores y un Consorcio Internacional (Antonarakis *et al*, 1995). ³Información publicada por Bagnall y colaboradores (Bagnall *et al*, 2002).

Rossiter y colaboradores (1994), investigaron el origen de la Inv22 en un grupo de familias con hemofilia esporádica y observaron que ocurría con muy alta probabilidad en la meiosis del abuelo materno y no en la madre, ni en la abuela materna, demostrando que la inversión ocurría casi exclusivamente en células germinales masculinas. Esto también fue observado por Tizzano y colaboradores (1995), al reportar que en casos aislados de HA severa asociada a la Inv22, sorpresivamente, todas las madres eran portadoras cuando se esperaba que cierta proporción de ellas no lo fuera (ya que *a priori*, se esperaba que las tasas de mutación *de novo* de la inversión en varones y en mujeres, fueran similares). Proyectando una explicación para el sesgo observado, Rossiter, propuso que la presencia de dos cromosomas X en las meiosis femeninas inhibiría la interacción intracromosómica entre secuencias homólogas como *int22h* (Rossiter *et al*, 1994).

Más recientemente en el año 2002, fue descripta otra gran inversión recurrente del gen del FVIII similar a la Inv22, pero que afecta al intrón 1 (Bagnall *et al*, 2002). Esta inversión del intrón 1 (Inv1) también esta mediada por secuencias homólogas, de aproximadamente 1 kb (*int1h*) opuestamente orientadas y situadas en el intrón 1 y 200 kb río arriba (*upstream*) del *F8* hacia el telómero Xq (Fig. 2). Esta mutación ha sido originalmente reportada con una frecuencia del 5/

de las HA severas (Bagnall *et al*, 2002) (Tabla 2), pero actualmente se ha determinado que la frecuencia es menor a la mitad de la estimación original (Rossetti *et al*, 2004).



Figura 2. Inversión del intrón 22 (Inv22) e inversión del intrón 1 (Inv1). Esquema de la región del cromosoma X que contiene el gen del factor VIII de coagulación, y las regiones extragénica homólogas al intrón 22, *int22h* involucradas en las inversiones. A. Se esquematiza la zona telomérica Xq (círculo negro) las copias extragénica *int22h*-3 y -2, rojo y naranja respectivamente; en azul la copia extragénica *int1h*-1, los exones del *F8*, en negro, se detallan en verde los exones de gran tamaño 1, 14 y 26; dentro del gen se notan en rojo la copia intragénica *int22h*-1 y en azul, *int1h*-1. B. Esquemas de recombinación entre la copia *int1h*-1 e *int1h*-2, para la lnv1 y recombinación entre las copias *int22h*-1 e *int22h*-3, para la lnv22 tipo I. C. Resultado de la recombinación que trunca el gen del factor VIII de coagulación, tanto para la lnv1 como para la lnv22.

Por la arquitectura de la recombinación homóloga, las copias de *int22h* involucradas en las inversiones deben estar en orientaciones invertidas. En 1993, Lakich y colaboradores demostraron que la secuencia extragénica *int22h*-3 se encontraba en orientación invertida respecto a la copia intragénica y como la inversión también puede ocurrir con la copia *int22h*-2, en la Inv22 tipo II, se creía que ambas secuencias extragénica se encontraban en orientación invertida respecto de la copia intragénica *int22h*-1. La caracterización completa de la secuencia del cromosoma X humano indicó que sólo *int22h*-3, se encontraría en orientación invertida respecto a la copia intragénica, y que las copias extragénica forman parte de los brazos de un gran palíndromo imperfecto con una secuencia central de copia única de 67,3 Kb y brazos homólogos invertidos de 50,5 Kb (Ross *et al*, 2005).

Si todos los cromosomas tuvieran la estructura descripta por Ross y colaboradores (2005), la recombinación que da lugar a la Inv22 sólo podría producirse entre *int22h-1* e *int22h-3*; y la recombinación entre las copias en igual orientación, *int22h-1* e *int22h-2*, deberían generar deleciones y duplicaciones de las 400 Kb que separan estas secuencias, pero no inversiones. En base a esta observación Bagnall y colaboradores (2005) hipotetizan que los brazos del palíndromo conteniendo *int22h-2* y -3 podrían sufrir entre ellos recombinación intracromosómica, dando como resultado el intercambio posicional de las secuencias extragénicas *int22h-2* y -3, proyectando una explicación natural para el evento que origina la Inv22 de tipo II que involucra las copias *int22h-1* y -2 orientadas inversamente (Fig. 3).

Para detectar la presencia de todos los posibles rearreglos que involucran *int22h*, inversiones tipo I y II, duplicaciones y deleciones, Bagnall y colaboradores (2006) desarrollaron una técnica basada en PCR de larga distancia en reemplazo del clásico método de *Southern blot* para el estudio de la Inv22 (Lakich et al, 1993).

Para poner en evidencia todos los posibles rearreglos que involucran *int22h*, en este trabajo se presenta el desarrollo de la estrategia *inverse shifting*-PCR (IS-PCR), como una variante de la técnica PCR inversa usada para genotipificar la Inv22 (Rossetti *et al*, 2005), donde un cambio definido en el tamaño del amplímero, dado por el uso de *primers* diferentes ubicados a distancias cortas y especificas del sitio de restricción, permite identificar todas las variantes que involucran *int22h*, y además sobre el mismo sustrato, estudiar la presencia de la Inv1.

13



Figura 3. Representación esquemática de todos los posibles rearreglos que involucran *int22h*. Los diagramas (A-D) muestran el cromosoma X desde la región 3'UTR del gen del *F8* hasta el telómero Xq (indicado como círculo cerrado). Las secuencias funcionales de *F8* están indicadas en verde rayado, mientras que secuencias no funcionales de *F8* se indican en rojo rayado. Dentro del *F8, int22h*-1 se indica como una caja-flecha en negro, *int22h*-2, en gris, e *int22h*-3, en blanco. Los brazos centroméricos y teloméricos (50 Kb cada uno) del gran palíndromo de 168 Kb que incluye *int22h*-2 e *int22h*-3 están indicados con flechas en azul, y la región de copia única central (67 Kb) que separa las regiones repetidas se muestra en una gama de gris a blanco, indicando cercanía con *int22h*-2 e *int22h*-3, respectivamente. A. Variantes estructurales normales (A1) *int22h*-1, -2 y -3 (variante h123), (A2) *int22h*-1, -3 y -2 (variante h132). B. Dos ejemplos de variantes con duplicación de 400 Kb, Dup22 (De Brasi y Bowen, 2008), (B1) recombinación entre las copias *int22h*-1 y -2 entre dos variantes h123; (B2) recombinación entre *int22h*-1 y -3 entre las variantes h123 y h132. C. Inversiones, (C1) Inv22-1 tipo I, (C2) Inv22-2 tipo II. D. Variantes con deleción de 400 Kb (De Brasi y Bowen, 2008), (D1) recombinación intracromosómica variantes h132, o intercromosómica, variantes h132, deleción tipo I, Del22-1, (D2) recombinación intracromosómica variantes h123, o intercromosómica, variantes h123, deleción tipo I, Del22-2.

Expresión de hemofilia en mujeres.

La hemofilia es trasmitida por mujeres quienes debido a su condición de heterocigotas no afectadas, son denominadas portadoras. Las portadoras heterocigotas de hemofilia pueden tener niveles de actividad normales o intermedios de factor VIII (o FIX según sean portadoras de HA o HB), dependiendo, entre muchos otros factores biológicos y experimentales, del balance en el mosaisismo presente en sus células somáticas, donde alternativamente o el cromosoma X ligado al gen no mutado o mutado está activo. Usualmente las portadoras son asintomáticas debido a que la inactivación al azar del cromosoma X (Favier *et al*, 2000), en el tejido secretor del factor asegura niveles de FVIII:C (o FIX:C) promedio de aproximadamente 50/ de la actividad del factor (50 UI/dl).

La evidencia fenotípica de enfermedad en desordenes recesivos ligados al cromosoma X es un fenómeno inusual. Sin embargo la literatura muestra algunos reportes de mujeres sintomáticas. La mayoría de estos casos resultan mujeres heterocigotas para mutaciones en el *F8* con síntomas de HA (o *F9* con síntomas de HB) asociada al sesgo completo en la inactivación del cromosoma X (Nissen *et al*, 1989; Kling *et al*, 1991; Orstavik *et al*, 1999; Bicocchi *et al*, 2005). Entre otras causas menos frecuentes para la expresión de hemofilia en mujeres se pueden citar, mujeres homocigotas o doble heterocigotas para mutaciones deletéreas en el *locus* del *F8*, anormalidades cromosómicas que dejen en hemicigosis el *locus* afectado, o la simulación clínica de HA, por ejemplo con mutaciones que afecten el factor von Willebrand, gen autosómico (vW) esencial para el transporte y estabilidad del FVIII en el plasma (i.e., vWD 2N, Normandy, con mutaciones en el dominio del vWF responsable de la unión con el FVIII).

La inactivación al azar de uno de los cromosomas X en las células de las hembras de mamíferos, es un fenómeno fisiológico que permite compensar las dosis de los genes ligados al X con los machos (XY). Esta inactivación ocurre temprano en la embriogénesis (embrión de 5-7 días), afecta casi todas las regiones del cromosoma X con escasas excepciones (Brown y Willard, 1990), las regiones pseudoautosómicas I y II, y genera individuos femeninos que son mosaicos de células conteniendo o bien el cromosoma X materno inactivo, o bien el X paterno inactivo, con una distribución cercana teórica del 50:50/ en cada tejido (Lyon, 1961). Una vez ocurrida la inactivación del X en cada célula somática, ésta se hereda clonalmente y permanece inalterada durante toda la vida adulta.

La inactivación sesgada es una marcada desviación de la inactivación 50:50/, y puede estar asociada a distintas causas: (1) aún por azar existen casos donde la inactivación se ubica en los extremos de la distribución binomial, con escasos eventos, pues, el número de células progenitoras de cada órgano o tejido, es pequeño (e.g., 15-25); (2) por la potencial desventaja adaptativa del clon una vez que se produjo la inactivación, donde las células con un dado cromosoma X activo presentan una mutación adicional no relacionada que afecta la eficacia proliferativa o sobrevida del clon; (3) por un defecto en el proceso de inactivación, por ejemplo, mutaciones en el gen XIST (*X inactivation specific transcript*), responsable de la iniciación en el proceso de inactivación, que bloqueen o estimulen la inactivación de un cromosoma X especifico en *cis* (Puck y Willard, 1998).

Para la inactivación del cromosoma X y su eventual sesgo, el sistema HUMARA (*human androgen receptor*) es un método sensible e informativo basado en la correlación demostrada entre el estado de metilación del primer exón del gen AR (*androgen receptor*) y el estado de inactivación del cromosoma X sobre el cual reside (Allen *et al*, 1992).

La determinación de la inactivación sesgada del cromosoma X tiene un importante valor para poder explicar el estatus de portadora sintomática en desórdenes recesivos ligados al cromosoma X, como en HA (Puck y Willard, 1998). Sin embargo, el análisis de leucocitos de sangre periférica como muestra sustrato a menudo no representa el mismo patrón presente en el hígado, tejido involucrado en la expresión del FVIII (o FIX).

Si bien se espera que los niveles de FVIII:C en portadoras sean de alrededor del 50/, en la práctica se observa un amplio rango, variando desde valores observados solo en pacientes hemofílicos hasta actividades normales; variación que ha sido atribuida a la inactivación del cromosoma X, y podría explicar ambos fenotipos extremos desde portadoras sintomáticas hasta casos con niveles de factor cercanos a los normales.

Orstavik y colaboradores (2000) estudiaron la correlación entre los niveles de FVIII:C y FIX:C en portadoras heterocigotas de HA y HB, respectivamente, y el patrón de inactivación del cromosoma X (XIP), mediante una tabla de contingencia por categorías, concluyendo que hay ausencia de correlación por lo menos en muestras de sangre periférica.

El estudio de la causa de hemofilia en las mujeres sintomáticas de nuestra serie, se llevará a cabo mediante primero la búsqueda de la mutación causal de hemofilia y la determinación de la cigosidad y el estudio del patrón de inactivación del cromosoma X en cada caso.

Introducción

Para estudiar la eventual asociación entre los niveles de FVIII:C y el patrón de inactivación del cromosoma X en mujeres heterocigotas, se plantea un modelo de correlación de dos ramas que dibuja una V (modelo V). En primera instancia esta topología de correlación es debida a que se desconoce la fase entre la mutación en el *F8* y el alelo X activo o inactivo. Este modelo V tiene como base biológica que valores bajos de FVIII:C, en portadoras heterocigotas sintomáticas, se asociarían preferencialmente con sesgo extremo de inactivación del cromosoma X ligado al *F8* no mutado, y niveles de FVIII:C esperado para portadoras, 50 UI/dl, la inactivación del cromosoma X debería tener valores cercanos al 50⁄, por inactivación al azar, y finalmente valores de FVIII:C parecidos a los niveles observados en no portadoras (e.g., 100 UI/dl), se asociarían con sesgo extremo en el patrón de inactivación del cromosoma X, ligado al alelo que lleva la mutación del *F8*.

En el tratamiento de las enfermedades hereditarias monogénicas como la hemofilia, están en desarrollo un número creciente de ensayos de terapia génica, que permitirán mejorar la calidad de vida de los pacientes hemofílicos. Mientras tanto, el asesoramiento genético de las familias afectadas (diagnostico de portadoras y prenatal) adquiere un valor fundamental. La información clave para este asesoramiento genético es provista por el laboratorio de genética molecular. En la presente tesis doctoral los objetivos se encuentran orientados hacia la búsqueda de mutaciones causales de hemofilia B, el desarrollo de nuevos abordajes que permitan estudiar grandes rearreglos, orientados a los mediados por *int22h* e *int1h*, en hemofilia A, y por último el análisis de las causas de la expresión de hemofilia en mujeres.

OBJETIVOS

Capítulo I: Análisis del gen del FIX, caracterización de mutaciones causales de Hemofilia B en Argentina.

- Caracterizar el espectro de mutaciones sobre el gen del factor IX de coagulación humano, causal de hemofilia B, en pacientes Argentinos con distinto grado de severidad.
- Desarrollar, poner a punto y validar mejores abordajes de screening molecular para la identificación de pequeñas mutaciones (mutaciones de cambio de base y pequeñas deleciones o inserciones) adecuado a nuestro país.
- Estudiar y discutir la asociación entre las mutaciones encontradas y la severidad de la hemofilia B observada en cada paciente, relación Genotipo-Fenotipo.

Capítulo II: Diseño, desarrollo y validación del método de genotipificación de los rearreglos que involucran int22h e int1h en el gen del FVIII, mediante inverse shifting-PCR.

- Diseñar, desarrollar y validar una estrategia de análisis rápido para detectar todos los posibles rearreglos mediados por las secuencias *int22*h e *int1*h, responsables de la inversión del intrón 22 e inversión del intrón 1, respectivamente.
- Investigar la presencia en nuestra población de variantes aun no reportadas en la literatura, i.e., duplicaciones y deleciones involucrando *int22*h.

Capítulo III: Análisis de la expresión de Hemofilia en mujeres. Inactivación del cromosoma X.

- Desarrollar y validar el método de análisis de patrones de inactivación del cromosoma X basado en el sistema HUMARA, adecuado a las características de nuestro país, y sin el uso de radioisótopos.
- Estudiar la cigosidad de mutaciones causales de hemofilia A severa caracterizadas en mujeres relacionadas a familias afectadas.

- Estudiar la inactivación del cromosoma X en mujeres portadoras sintomáticas, no sintomáticas y no portadoras de Hemofilia A.
- Análisis de causalidad de la expresión de hemofilia en mujeres sintomáticas.
- Estudiar estadísticamente la correlación entre el patrón de inactivación del cromosoma X y los niveles de FVIII:C en mujeres portadoras y no portadoras de Hemofilia A, en muestras de sangre periférica. Poniendo a prueba modelos teóricos versus hipótesis nula.

MATERIALES Y MÉTODOS

Poblaciones para el estudio de los genes del FVIII y FIX e inactivación del cromosoma X

La población para el estudio molecular del *F9* incluye miembros de 51 familias no relacionadas, distribuidas en 39 familias con HB severa, cinco con HB moderada y siete familias con HB leve. En todos los casos, la información clínica asociada a cada paciente, como el desarrollo de anticuerpo inhibidor de la terapia sustitutiva del FIX y la condición esporádica o familiar de la enfermedad, fue computada en la base de datos diseñada a tal efecto.

Para el desarrollo y validación de las nuevas técnicas de análisis para los rearreglos que involucran a *int22h*, se estudiaron tres grupos de individuos. El primer grupo estuvo compuesto por 32 individuos (18 varones y 14 mujeres) previamente genotipificados para la Inv22 por análisis de *Southern blot*, e incluyó 10 varones sin la Inv22 y ocho varones con HA severa positivos para la Inv22 (cuatro del tipo I y cuatro del tipo II), y entre las mujeres, seis no portadoras para la Inv22 y ocho portadoras de la Inv22 (cuatro del tipo I y cuatro del tipo I). El segundo grupo se compone de 43 pacientes (24 varones y 19 mujeres) previamente estudiados para la Inv22 mediante el método de PCR inversa desarrollado en nuestro laboratorio (Rossetti *et al*; 2005) incluyendo 11 varones sin la inversión, 13 positivos para la Inv22, 10 mujeres no portadoras y nueve portadoras de la Inv22. El tercer grupo incluye 34 nuevos casos con HA severa sin estudios moleculares previos.

Para el desarrollo y validación de nuevos abordajes para el análisis de la Inv1 se estudiaron dos grupos de individuos negativos para la Inv22. El primer grupo incluyó 21 casos (14 varones y siete mujeres) previamente analizadas para la Inv1 por la técnica de doble PCR (Bagnall *et al*; 2002), y el segundo grupo que incluyó 13 nuevos casos (siete varones y seis mujeres).

Para los estudios de inactivación de cromosoma X se han incluido 72 mujeres relacionadas a 61 familias con HA severa, con mediciones de los niveles de FVIII:C y 20 controles de la población general Argentina sin datos de niveles de FVIII:C. La población de mujeres portadoras con niveles de FVIII:C promedio de 49,6 UI/dI y la población de no portadoras con niveles promedio de FVIII:C de 97,4 UI/dI. El grupo estudiado contó con seis mujeres portadoras sintomáticas de hemofilia A con niveles de FVIII:C entre 1 y 1,5 UI/dI.

Tanto para el estudio molecular del *F9* como para la inactivación del cromosoma X se utilizó una colección de muestras de dadores de sangre sanos, como representativa de la población general Argentina.

Los Proyectos de Investigación que incluyen estos estudios fueron aprobados por el Comité Científico del Instituto de Investigaciones Hematológicas *Mariano R Castex*, y por el Comité de Ética de la Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires. La información clínica y molecular asociada a cada paciente fue manejada bajo la idea de preservar el anonimato. En todos los casos se obtuvo el consentimiento informado correspondiente.

Muestras y métodos de purificación de ADN genómico

Las muestras de 5-10 ml de sangre periférica fueron obtenidas por punción venosa usando etilen- diamin-tetra acetato de sodio (EDTA) al 0,1/, y recogidas en tubos tipo vacutainer o tubos cónicos de 15 ml. Las muestras de leucocitos de sangre periférica fueron obtenidas mediante tres o cuatro lavados para lisis de eritrocitos, con un volumen de solución hipotónica Tris: EDTA (Tris/HCl 10 mM pH 7,8, EDTA 0,5 mM), obtención de pellet de leucocitos. La lisis celular se llevó a cabo mediante la incubación a 37° C por toda la noche o a 55° C por tres horas, en buffer PK (Tris 10 mM; EDTA 5 mM; SDS 0,5/) y 30-50 ul de proteinasa K (PK, 20 mg/ml).

Las muestras de DNA genómico nuclear de leucocitos de sangre periférica fueron obtenidas por purificación del tipo *salting-out* (Lahiri y Nuremberg, 1991): el producto de la lisis celular es desproteinizado por el agregado de 1,6 ml de NaCl (6 M) cada 4,5 ml de pellet tratado con PK e incubado por 15 min a 4° C, o alternativamente, por el método de fenol-cloroformo (Sambrook *et al*, 1989): el producto de lisis celular, desproteinizado por una extracción con fenol (fenol saturado en Tris-HCl 0,1 mM, pH 7,5) y una extracción IAC (cloroformo: alcohol isoamilico 24:1 v/v saturado en agua), precipitación de ADN en 0,1 volumen de NaCl 3 M y precipitación alcohólica en 2 volúmenes de etanol frío. Las muestras de ADN genómico nuclear de células descamadas de la mucosa bucal fueron obtenidas por micrométodo de purificación del tipo tipo *salting-out* (Lahiri y Nuremberg, 1991). La calidad y concentración de las muestras de ADN genómico fueron evaluadas por electroforesis en gel de agarosa (1 /) y su concentración y pureza, por espectrofotometría UV (260 y 280 nm).

Amplificación y análisis del gen del factor IX de coagulación humano

Todas las secuencias exónicas relevantes del gen del FIX (F9, promotor, ocho exones, las secuencias asociadas a la maduración del ARN o splicing y las señales de poliadenilación) fueron amplificadas en 12 reacciones PCR cuyos tamaños moleculares (334-583 pb), características y diseño estaban de acuerdo al método de screening de mutaciones elegido, CSGE (conformation sensitive gel electroforesis) (Hink et al, 1999; Mitchell et al, 2005). La tabla 3 resume la secuencia de los oligonucleótidos primers, las temperaturas de annealing, las concentraciones óptimas del ión Mg⁺⁺, así como los tamaños de cada amplímero y la posición o coordinación de bases de cada primer sobre el archivo de secuencias nucleotídicas correspondiente (GenBank K02402). La reacción PCR utiliza 3 µl de ADN genómico (100 ng/µl), en un volumen total de reacción de 25 μ l, con 200 μ M de dNTP (desoxiribonucleótido trifosfato, dATP, dTTP, dGTP, dCTP), 0,5 µM de cada primer, 0,5 U de Taq DNA Polymerase (Promega, Argentina) y buffer Taq polymerase (Tris-HCl 50 mM pH 9,0, NaCl 50 mM, BSA, seroalbúmina bovina, 0,1 mg/ml). La identidad y el tamaño de cada amplímero fue analizada por electroforesis en gel de agarosa (1-2 /). En este contexto las deleciones grandes (mayores 100 pb) fueron definidas como la ausencia repetida y consistente de un exón o un grupo de amplicones exón-específicos vecinos. En el caso de deleciones se realizó una PCR multiplex de cada amplímero del F9 y un amplímero del gen de β -globina para descartar errores por baja concentración de la muestras (Tabla 4). El termo-ciclado estándar óptimo consta de: treinta ciclos de 94° C, 30 seg.; 55° C, 45 seg.; 72° C, 1 min.; precedidos por 94° C, 3 min. y seguidos por 5 min. a 72° C.

Primer	Secuencia (5' > 3')*	Tamaño	Temp.Ann.	MgCl ₂	GenBank K02402
		(bp)	(º C)	[mM]	(nt)**
9PAF	ACGAAAAAATTTCAGAAGCCA				2148-2168
9PAR	CCATCAGCAATGTATGAGTGG	484	55	1.5	2611-2631
9PBF	AAGCTACAGGCTGGAGACAAT				2494-2514
9PBR	CCTTTGCTAGCAGATTGTGAA	499	55	1.5	2972-2992
9AF	AGGCCATTGGAAATAGTCCA				2865-2884
9AR	AAAGGCAAGCATACTCAATGT	260	55	1.5	3104-3124
9BF	CATCACAGATTTTGGCTCCA				9146-9165
9BR	TATGCTCTGCATCTGAAGGGT	347	55	1.5	9474-9494
9CF	CACATAATACCCTTCAGATGC				9466-9486
9CR	AATATGGGTTAGAGGGTTGG	341	55	1.5	9787-9806
9DF	AAAATCAGACTCCCATCCCA				13262-13281
9DR	GGTTTTGGTCACACTGAAGTT	583	55	1.5	13826-13846
9EF	CCCCCAATGTATATTTGACCC				20533-20553
9ER	CAAAAGGAAGCAGATTCAAGT	334	55	1.5	20846-20866
9FF	AAATACTGATGGGCCTGCTT				23206-23225
9FR	TGGTTAGTGCTGAAACTTGCC	459	55	1.5	23644-23664
9GF	AATTCATCTGCAAAGCTCACA				32851-32871
9GR	TGAAATTATGACCCTTCTGCC	401	55	1.5	33231-33251
9H1A	ATGAGATCTTTAACATTGCC				33678-33697
9H1B	GAACTTTGTAGATCGAAG	436	55	1.5	34095-34112
9H2A	TTTGGATCTGGCTATGTAAGT				33990-34010
9H2B	GAAATTCTCCCCTGTAAAG	488	55	1.5	34459-34477
Poly AF	AAGAGAACCGTTCGTTTGCA				35375-35394
Poly AR	AGAACTAAAGGAACTAGCAAG	510	50/55	1.5/2.0	35865-35885

Tabla 3: Oligonucleótidos primers para análisis del gen del factor IX de coagulación.

* Goodeve et al; datos no publicados.

** Coordinación de las posiciones en el archivo K02402 con los extremos 5' y 3' de los oligonucleótidos.

Tabla 4: Oligonucleotidos	primers	para	β-globina.
---------------------------	---------	------	------------

Primer	Secuencia (5' > 3')*	Tamaño (bp)	Temp.Ann. (º C)	MgCl₂ [mM]	GenBank NC_000011.9 5246696-5248301 (nt)**
L1	TCATGGCAAGAAAGTGCTCG	200	55	15	1087-1106
L4	CCCATTCTAACCTGTACCC	200		1.5	879-897

Amplificación y análisis del gen del factor VIII de coagulación humano

Todas las secuencias exónicas relevantes del gen del FVIII (F8, el promotor, los 26 exones y las secuencias consenso asociadas al splicing) fueron amplificadas en una reacción de PCR múltiple (x4) (que incluye el análisis conjunto de 4 exones), 16 reacciones PCR múltiples (x2), en las cuales se analizan dos exones simultáneamente, y una reacción PCR simple (x1), cuyos tamaños moleculares (227-612 pb), características y diseño estaban de acuerdo al método de screening de mutaciones elegido, CSGE. La tabla 5 resume la secuencia de los oligonucleótidos primers, las temperaturas de annealing, las concentraciones óptimas del ión Mg⁺⁺, así como los tamaños de cada amplímero, la coordinación de bases de cada primer sobre el archivo de secuencias nucleotídicas correspondiente (GenBank NC_000023.9, 153617257-154004192) y la combinación de cada uno de ellos para las reacciones de PCR multiples. Los reacción PCR se desarrolla con los mismos reactivos del análisis del F9, con la diferencia que en la reacción multiplex X4 se agregan 5 μ l de ADN (100 ng/ μ l) y en la multiplex X2 4 μ l del ADN sustrato. La identidad y el tamaño de cada amplímero al igual que para el F9 fue analizada por electroforesis en gel de agarosa (1-2 \checkmark). En este contexto las deleciones grandes (mayores a 100 pb) fueron definidas como la ausencia repetida y consistente de un exón o un grupo de amplicones exón-específicos vecinos.

El termo-ciclado estándar óptimo consta de: treinta y cinco ciclos de 94° C, 30 seg.; 55° C (50° C o 58° C, según corresponda, descripto en tabla 5), 1 min.; 72° C, 2 min.; precedidos por 94° C, 3 min. y seguidos por 5 min. a 72° C.

Primer	Secuencia (5' > 3')	Tamaño (bp)	Temp.Ann. (º C)	MgCl₂ [mM]	GenBank NC_000023.9 153617257154004192 (nt)
		Multiplex (X4	.)		
11ª	TGCGACTTTAGCTTCCACTT				165416-165435
11B	ACTGACCTATATTGCAAACCA	446	50	2.5	165841-165861
14H ₁	TATAGAAAGAAAATTCTGG	264	50	2.5	193252-193271
14H	CAGGTCTGTTTGCTTCATTC	304	50	2.5	193596-193615
22ª	AAATAGGTTAAAATAAAGTGTTAT	280	50	25	226456-226479
22B	TGGAAGCTAAGAGTGTTGTC	280	50	2.5	226716-226736
21N	CAGCTTAGATTAACCTTTCTC	227	50	25	222676-222696
21B	GAGTGAATGTGATACATTTCC		50	2.5	222882-222902
		Multiplex (X2)		
3ª	TGCTTCTCCACTGTGACCT	356	50	15	125532-125550
3B	ATCTAGTAAATGTTAAGAAAT	550	50	1.5	125867-125887
5ª	TTCTTACTGTCAAGTAACTG	274	50	1.5	135316-135335
5B	CTGAACAGTAATGTAATTTA			_	135570-135589
14D ₁	AACAAAACTTCCAATAATTC	350	55	1.5	191992-192011
14D	AGAGTTCTTTCCATGAGTCC			_	192323-192342
14J	CCCTACGGAAACTAGCAATG	503	55	1.5	193511-193528
14J ₂	TCTTCATTTCAACTGATATG				193992-194011
14B ₁	CCTTGGTTTGCA <u>G</u> ACAGAAC <u>(C</u>)	392	58	1.5	191302-191321
14B	TGTATTATCAGTACCTGCTG				191675-191694
14E		501	58	1.5	192240-192259
14E ₂					192722-192741
12ª		320	58	1.5	168595-168614
12B					108894-108914
140 14G	GCCAACCTCTCTTTGATCAC	460	58	58 1.5	192912-192951
163					217548 217567
16B		525	58	1.5	217548-217507
18ª	AGAGTATATCTGTGGGGAGTG				218525-218544
18B	CTTAAGAGCATGGAGCTTGT	412	58	1.5	218918-218937
14F1	TACATACAGTGACTGGCACT				192632-192651
14F	GACCACTGGGTTGAGGTGTC	381	58	1.5	192994-193013
26ª	GGTTTAATCCTGGACTACTG	250	50	4.5	284863-284882
26A ₂	GCACAAAGGTAGAAGGCAAG	356	58	1.5	285200-285219
1ª	ACTGCTCTCAGAAGTGAATG	520		4.5	99892-99911
1B	GTAGCATCACAACCATCCTA	526	55	1.5	100398-100417
24ª	CAGTGGAAGCTGCTCAGTAT	363	F.F.	1 Г	260785-260804
24B	CCCATAACCAAACTTCCTTG		55	1.5	261128-261147
4ª	GTACAGTGGATATAGAAAGGAC	319	65	55 1.5	129531-129552
4B	GATTCAGTTGTTTGTACTTCTC		22		129828-129849
9ª	CTAACATAGCTGAGCATCAG	/12	55	55 1.5	156443-156462
9B	AGATATGTCCATTGGAGACAA	418	55		156893-156860

 Tabla 5: Oligonucleótidos primers para análisis del gen del factor VIII de coagulación.

6ª	TCCCACTTATTGTCATGGAC	400	55	1 5	137677-137696
6B	TACAGAACTCTGGTGCTGAA	422	55	1.5	138079-138098
23ª	GTCTTATGTAGATGTTGGATG	240		15	259370-259390
23B	AGTCTCAGGATAACTAGAACA	549	22	1.5	259699-259719
17ª	TGTCATTCTGGAATCTACTGA	401		1 5	218053-218073
17B	CACTCCCACAGATATACTCT	491	55	1.5	218525-218544
20ª	ACGTTGAGTACAGTTCTTGG	211		1 5	221145-221164
20B	ACTAATAGAAGCATGGAGATG	511	55	1.5	221439-221459
P1A	GAGCTCACCATGGCTACATTC	F 20		1 5	98997-99017
P1B	TCCTGTCACTCCTCTTCTCAG	539	55	1.5	99515-99535
25ª	AGTGCTGTGGTATGGTTAAG	272		1 5	262028-262047
25B	TTGCTCTGAAAATTTGGTCATA	373	55	1.5	262378-262399
8ª	CCATATAGCCTGCAGAACAT	E 40		1 5	155914-155934
8B	CTGATGCTCAGCTATGTTAG	549	22	1.5	156443-156462
14K ₁	AGGACTGAAAGGCTGTGCTC	206	55	1 5	193882-193901
14K	AAGAGTTTCAAGACACCTTG	380	55	1.5	194248-194267
P2A	AGGTCAGGAGAAAGGGCATG	C18		1 5	99409-99428
P2B	CCCACTGGATTGCTCAGCAC	618	55	1.5	100006-100026
2ª	CCTCCTTGCTAATAGTAGAA	227	55	1 5	123023-123042
2B	ATTCTCTTTGGCAGCTGCAC	552	55	1.5	123335-123354
14ª	GACCTGTGATATAATGATAC	E10	55	1 5	190923-190941
14A ₂	GAAAAAGTCTCATAT TTGGC	518	55	1.5	191422-191441
15ª	AGATGAAGTGGTTAACTATGC	240	55	1 5	216033-216053
15B	GTGGGAATACATTATAGTCAG	548	55	1.5	216361-216381
10ª	CTAGCCTCAAATTACTATAATG	247		1 5	161434-161455
10B	ACTTTAGACTGGAGCTTGAG	547	55	1.5	161761-161780
14C	AGCAACAGAGTTGAAGAAAC	400		1 5	191592-191611
14C ₂	CTAATATATTTTGCCAGACT	499	55	1.5	192072-192091
7ª	GGCAAGAGCTGTTGGTTTG	460		1 5	153004-153022
7B	TGTCCAGTAAATTTTATTAAAAGT	460	55	1.5	153440-153463
19ª	GCAAGCACTTTGCATTTGAG	241	55	1 5	220412-220431
19B	AGCAACCATTCCAGAAAGGA	541		1.5	220734-220753
		Simple (X1)		-	
13ª	AACAATCTACTTTTTTGGAAGA	474	50	1 5	174664-174685
13B	CCTCAAGCAAGAGAATGCTA	474	50	1.5	175121-175140

Screening de mutaciones por CSGE.

Tanto los 12 amplímeros del *F9* como los 37 amplimeros del *F8* fueron sometidos a electroforesis por CSGE en forma similar (descripto por Williams *et al*, 1998). Cinco μ l de los amplímeros de muestras clínicas y 5 μ l de los amplímeros de las muestras control no mutadas fueron mezclados para formar los heterodúplex de ADN, para lo cuál fueron mantenidos a 96° C por 5 minutos seguido de 30 minutos a 64° C, para ser luego analizados electroforéticamente con 16-18 hs. de corrida, a una diferencia de potencial constante (400 V), en geles de poliacrilamida al 12/ (99:1 acrilamida:bisacrilamida) en condiciones medianamente desnaturalizantes (10/ etilen glicol, 15/ formamida deionizada) (CSGE-PAGE, *polyacrylamide gel electrophoresis*) (41 x 33 x 0,08 cm.). Cuando la señal indicativa fue fácilmente distinguible, los heterodúplex fueron resueltos en CSGE-PAGE de menor tamaño (17 x 15 x 0,15 cm, o 7 x 7 x 0,1 cm). La lectura de resultados del monitoreo por CSGE se realizó por coloración con plata. En la tinción con plata, el gel es lavado con agua destilada, sumergido por 10 minutos en fijador (10 / de etanol absoluto y 0,5 / ácido acético), mantenido en una solución de plata al 0,1 / por 15 minutos en agitación, lavado con agua destilada y revelado hasta la aparición de las señales con la solución de revelado (1,5 / hidróxido de sodio, 0,28 / formaldehído).

PCR inversa para el análisis de la inversión del intrón 22 e inversión del intrón 1.

Dos microgramos de ADN genómico es tratado con 20 U de la enzima de restricción BCll (Promega, USA) bajo las condiciones recomendadas, por 4 horas en 50 ul de volumen final (Tris-HCl 10 mM pH 7,9, NaCl 50 mM, MgCl₂ 10 mM, DTT, ditiotreitol, 1 mM, BSA 0,1 mg/ml). Los fragmentos de ADN son extraídos una vez en fenol (saturado en Tris-HCl pH 8) y cloroformo (1:1 v:v), una vez en IAC (cloroformo: alcohol isoamílico, 24:1 v:v), precipitado en NaCl 0,3 M con 2 volúmenes de etanol, secados al aire y resuspendidos en 100 μ l de agua bidestilada. La auto-ligación se realizó durante toda la noche a 15° C, en un volumen total de 400 μ l (alta dilución), con 3 U de enzima T4 ADN Ligasa; (Fermentas, Argentina) usando el buffer de ligación provisto por el vendedor (Tris-HCl 40 mM, pH 7,8, MgCl₂ 10 mM, ATP, adenosil trifosfato, 0,5 mM, DTT 10 mM, polietilen glicol, PEG 5 /). Los fragmentos Bcll auto-ligados (círculos B) fueron sometidos a una extracción en fenol-cloroformo, una extracción con IAC y precipitación en
etanol, como fue descripto más arriba. El análisis de los círculos B se realizó en condiciones PCR estándar, usando los *primers* indicados en la tabla 6. El análisis por *PCR-multiplex* fue realizado con 6 μ l del DNA eluído (círculos B) para la Inv22 y 3 μ l eluído para la Inv1, en un volumen total de 25 μ l, usando 0,5 U de *Taq DNA Polymerase* (Promega, Argentina), aproximadamente 200-400 mg de ADN, 0.6 μ M de cada *primer*, 200 μ M dNTP, 1.5 mM MgCl₂ y *buffer Taq polymerase*, para cada inversión. Los productos IS-PCR se analizan en electroforesis en geles de agarosa (1,5-2/) tinción con Bromuro de Etidio y fotografiados. El termo-ciclado consta de treinta ciclos de 94° C, 30 seg.; 56° C, 1 min.; 72° C, 1,5 min. precedidos por 94° C, 2 min. y seguido por 5 min. a 72° C.

Tabla 6: Oligonucleotidos *primers* para el análisis de la inversión del intrón 22 e intrón 1 del *F8*coagulación.

Primer	Secuencia 5' a 3'	NC_000023.9	Sitio Bcll*
ID	ACATACGGTTTAGTCACAAGT	153758587-608	27
ED	TCCAGTCACTTAGGCTCAG	154257328-47 154349067-86	99 99
IU	CCTTTCAACTCCATCTCCAT	153779730-50	460
2U	ACGTGTCTTTTGGAGAAGTC	154270775-95	358
3U	CTCACATTGTGTTCTTGTAGTC	154333426-48	306
1-IU	GCCGATTGCTTATTTATATC	153899635-54	33
1-ID	TCTGCAACTGGTACTCATC	153886959-77	271
1-ED	GCCTTTACAATCCAACACT	154030453-71	187

* Distancia en nucleótidos desde el nucleótido 5' del primer hasta el sitio de restricción BCII.

Estudio de la inactivación del cromosoma X.

Dos microgramos de ADN genómico son tratados (o no tratados) con 20 U de la enzima de digestión Hpall (Fermentas, USA), las condiciones incluyen digestión 24 horas, en 20 ul de volumen final 37° C, con el buffer recomendado (Tris-acetato 33 mM pH 7,9, acetato de magnesio 10 mM, acetato de potasio 66 mM, BSA 0,1 mg/ml) e inactivación de la enzima por 20 minutos a 65º C. Cuatro microlitros del ADN tratado o no tratado con la enzima de digestión son sometidos por separado a la reacción de PCR que amplifica el primer exón del gen AR (sistema HUMARA). Los primers se muestran en la tabla 7. Para el ajuste de la reacción PCR se aplicaron 2 condiciones distintas: primer HUMARA F marcado radiactivamente o primers sin marca radioactiva. Para la reacción de marcación del primer se incubaron por 1 hora a 37º C, 10 pmoles de primer, utilizando la enzima T4 Polinucleótido Kinasa (Fermentas), el buffer T4 Polinucleótido Kinasa (Tri-HCl 50 mM, pH 7,5, MgCl₂ 10 mM, DTT 5 mM, espermidina 0,1 mM) y y-P³²-ATP. En la reacción PCR se incluyeron 3 µl del ADN digerido o no digerido, 200 µM dNTP, 1,5 mM MgCl₂ 0,5 U de Tag DNA Polymerase (Promega, Argentina) y buffer Tag polymerase, en ambas condiciones. En la reacción que incluía el primer marcado, dicho oligonucleótido se agregó en relación 4:1 con el oligonucleótido no marcado, en un volumen final de 15 μl, en el caso de la reacción sin marcación radioactiva 0,6 µM de cada primer fueron agregados para obtener un volumen final de reacción de 25 µl. La reacción utilizando el oligonucleótido marcado radiactivamente es detenida por el agregado de una solución de stop (NaOH 10 mM, 95 / formamida, 0,2 mM EDTA pH 8, 0,05 / xilencianol, XC, 0,05 / azul de bromofenol, ABF). El análisis de los resultados para la PCR con el primer marcado, se utilizaron geles de poliacrilamida al 5/ (7 M urea, 29:1 acrilamida:bisacrilamida, 10X TBE - TBE 1X: Tris-HCl 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM pH 8,0) las muestras se desnaturalizaron por calentamiento a 70° C durante 2 minutos en el momento y se sembraron 2 a 3 μ l de cada reacción. Finalizada la electroforesis, se pasó el gel a papel Whatmann 3MM, se cubrió con film adherente y se secó en un equipo secador de geles (Gibco BRL GD40/50D) durante 1 hora a 80°C. El gel seco se expuso para impacto sobre placas radiográficas (CP-BU, Afga) y pantalla amplificadora durante un mínimo de 18 horas a temperatura ambiente. Las placas se revelaron por medio de un proceso fotográfico convencional.

En el caso de amplificación PCR con oligonucleótidos no marcados, los resultados son primero analizados en geles de poliacrilamida de 10 cm de largo al 11/ (29:1 acrilamida:bisacrilamida)

en condiciones no desnaturalizantes, para ver la presencia o ausencia de señal. Los resultados obtenidos son analizados en geles poliacrilamida de 40 cm al 12/ (37.5:1 acrilamida:bisacrilamida), con *buffer* TBE 1X, en condiciones no desnaturalizantes, con 16-18 hs. de corrida, a una diferencia de potencial constante (450 V). La lectura de resultados se realizó por coloración con plata, previamente descripta. Los resultados fueron fotografiados y la densidad de las señales fue analizada mediante el programa GELPRO32. El análisis del patrón de inactivación del cromosoma X (XIP) calculado mediante XIP = 100 - 50 x (A'/A) x (A+B) / (A'+B'), siendo A y B las señales del ADN no-tratado, y A' y B' las correspondientes al tratamiento con la enzima de restricción sensible a metilación. Cuando fue necesario se realizaron las correcciones de *slippage* en las intensidades correspondientes, donde la señal de menor peso molecular se ve incrementada por la señal producida por el *slippage* de la polimerasa, correspondiente a la de mayor peso molecular. La corrección indica la resta de la señal correpondiente al *slippage* mediada sobre una señal homo-hemicigota aislada.

Tabla 7: Oligonucleótidos primers para el estudio HUMARA.

Primer	Secuencia (5' > 3')*	Tamaño (bp)	MgCl₂ [mM]	NG_009014.1 (nt)
HUMARA-F	TTCAGAATCTGTTCCAGAGCGTGC	(255 224)*	4 5	1184-1207
HUMARA-R	GCTGTGAAGGTTGCTGTTCCTCAT	(255-324)*	1.5	1448-1471

* El tamaño del amplímero dependerá del número de repeticiones del trinucleotido CAG (255-324 pb)

Archivos del GenBank utilizados, sus fechas específicas y notación de mutaciones.

Locus K02402 (30/04/1996): gen *F9. Locus* NC_000023.9: g.153500000_154004192 (03/03/2008): gen *F8, int1h-1, int22h-1,* la secuencia extragénica *int1h-2* y los brazos centromericos y telomericos correspondientes a la repetición invertida de 168 Kb donde se localizan *int22h-2* e *int22h-3*.

Para la notación de ADN genómico (g.) y proteína (p.)de *F9*, se utiliza la publicada por Yoshitake, 1985. En la proteína madura, factor IX excluye a los 46 aa correspondientes al péptido señal y al propéptido; y considera para la notación nucleotídica genómica, 30 nucleótidos que no son traducidos en el exón A (5´UTR). En la notación para cDNA (c.) se considerada como nucleótido +1 el primer nucleótido traducible (base A del ATG) (den Dunnen y Palman, 2003).

Secuencia del gen del receptor de andrógenos humano (*AR*) RefSeqGene NG_009014.1 Secuencia del gen de β -globina (*HBB*) NC_000011.9: 5246696-5248301.

Secuenciación de ADN.

Tanto los amplímeros exónicos con patrones o movilidad anómalos en el análisis por CSGE-PAGE, cada uno de los productos PCR obtenidos en el análisis de la inversión del intrón 22 e intrón 1 (únicamente en la puesta a punto para corroborar los resultados), como los productos de amplificación del primer exón del gen AR, en el caso que fuesen homocigotas, fueron sometidos a secuenciación directa de ADN según el método de terminadores de cadena (Sanger et al, 1977). Los productos de PCR a secuenciar fueron resueltos en electroforesis en gel de agarosa preparativa, escindidos del gel, y luego purificados usando cromatografía en minicolumnas GFXTM Spin columns (Amersham, Argentina), cuantificados en geles de agarosa (1,5 /) y secuenciados por el método automático con marcación fluorescente (o manual. Algunas secuencias se realizaron manualmente (secuencias del F9 y marcador de peso para puesta a punto en análisis HUMARA) por el método de los terminadores de cadena (Sanger et al, 1977) con el sistema comercial fmol DNA Cycle Sequencing System (Promega) con marcación isotópica (³²P) del oligonucleótido primer en su extremo 5⁻. Para la reacción de marcación del primer se incubaron por 30 min. a 37º C, 10 o 5 pmoles de primer (según la cantidad de secuencias a realizar), utilizando la enzima T4 Polinucleótido Kinasa, el buffer T4 Polinucleótido Kinasa (50 mM Tri-HCl, pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 0,1 mM espermidina) y γATP. Para la reacción de secuencia se utilizaron 20 fmoles de producto de amplificación, utilizando el buffer fmol Sequencing (50 mM Tris-HCl, pH 9, 2 mM MgCl₂), una mezcla de deoxinucleótidos (dNTP) y dideoxinucleótido (ddNTP), el oligonucleótido primer marcado y 0.5 U de Taq DNA Polymerase (Promega, Argentina). La reacción de secuencia es detenida por el agregado de la solución de stop. Previo a la siembra en el gel de poliacrilamida al 6 / (7 M urea, 29:1 acrilamida:bisacrilamida, 10X TBE - TBE 1X: Tris-HCl 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM pH 8,0) las muestras se desnaturalizaron por calentamiento a 70° C durante 2 minutos en el momento y se sembraron 2 a 3 μ l de cada reacción. Finalizada la electroforesis, se procedió como fue descripto para el estudio de los productos HUMARA. Por último se procedió a la lectura de las secuencias y su comparación con las secuencias patrones.

Bioinformática.

La anotación de secuencias genómicas del *F9*, mapas de restricción, alineamientos y manipulación *in silico* de las secuencias, fueron realizados mediante el paquete de *software DNA star Lasergene* (Editseq, SeqBuilder y MegAlign) (bajo sistema operativo MS Windows).

El diseño de *primers* se efectúo bajo la asistencia del programa Oligo 4.1 (bajo el sistema operativo MS DOS) y Primer select (DNA star Lasergene). Para acceder al algoritmo Blast (*basic local alignement search tool*), se utilizó la página Web de acceso pública del NCBI (*The National Center for Biotechnology Information*). Asimismo, se utilizó el acceso "en línea" al programa Repeat Masker para analizar la presencia de secuencias repetidas y/o de baja complejidad en los segmentos genómicos de interés.

El estudio de los sitios consenso de splicing se realizó a través de los programas: NNpredict (<u>www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html</u>), NetGene2 (<u>www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2</u>), SoftBerry SPL (<u>www.softberry.com/berry.html</u>) GeneSplicer Web Interface (www.tigr.org/tdb/GeneSplicer/gene_spl.html)

Fórmulas matemáticas y métodos estadísticos.

Fue utilizado el paquete estadístico provisto por el programa Graphpad prism 5.0, las tablas de contingencia de 2 x 2 fueron analizadas mediante el *test* exacto de Fisher y Chi-cuadrado, el error de los modelos de correlación FVIII:C-XIP fue analizado mediante la prueba no paramétrica *Mann-Whitney*.

CAPÍTULO I

Análisis del gen del FIX, caracterización de mutaciones causales de Hemofilia B en Argentina.

Resultados

Se estudiaron 51 familias con antecedentes de Hemofilia B (HB) con el objetivo de caracterizar la mutación causal de la enfermedad. Se encontraron 29 familias con mutaciones de falso sentido (*missense*), siete con mutaciones a no sentido o de aparición de un codón de terminación prematuro de la traducción (*nonsense*), cuatro con mutaciones en sitios de procesamiento o maduración del ARN (*splicing*), una en la región promotora, dos con pequeñas deleciones e inserciones, seis con grandes deleciones y dos familias resultaron indeterminadas. Asimismo fueron detectados dos polimorfismos de largo del fragmento de restricción, no causales de HB (*RFLPs, Restriction Fragment Long Polimorphism*) *de las enzimas Mse*l (polimorfismo PA) y *Mnl*I (polimorfismo Malmö). El 84 / de las variantes genéticas encontradas en este estudio ya han sido reportadas en la base de datos de HB.

Grandes deleciones parciales o totales del F9.

Fueron estudiados en 12 amplímeros, todas las regiones relevantes del gen del Factor IX (*F9*): el promotor, los ocho exones (A-H) junto a las secuencias asociadas a la procesamiento del ARN (sitios de *splicing*) y las señales de poliadenilacion, a partir de ADN genómico extraído de leucocitos de sangre periférica. La identidad y el tamaño de cada amplímero fue analizada por electroforesis en gel de agarosa (Fig. 4). Mediante este análisis se encontraron tres casos con ausencia consistente y repetida en todos los amplímero estudiados (deleción total del gen, casos 47, 48, 49, Tabla 8), un caso con ausencia repetida en un grupo de amplímeros exónespecíficos vecinos (caso 44, Tabla 8), y dos casos con ausencia de un único amplímero (casos 45 y 46, Tabla 8) (Fig. 5B).

Los seis pacientes no relacionados (11,7/ de las familias estudiadas) presentan HB severa y dos de ellos desarrollo de anticuerpo inhibidor neutralizante contra la terapia de reemplazo. En estos casos no se presentaron familiares para el estudio genético.



PM PA PB A B C D E F G H1 H2 Poly PM

Figura 4. Amplímeros del F9. Gel de agarosa al 1/, correspondiente a todos los amplímeros que amplifican las regiones regulatorias (promotor, productos PA y PB), cada uno de los ocho exones y sus sitios consenso de *splicing* (A, B, C, D, E, F, G y H, este último representado por dos amplímeros, H1 y H2) y región de poliadenilacion (Poly). La primera y última calle corresponden al marcador de peso molecular (PM). El tamaño de cada amplímero se detalla en materiales y métodos. Nótese que el amplímero F presenta una señal inespecífica sobre la señal específica.

Caso	Descripción	Exón/	Reportes	FIX	Sev.	F/E	Obs.	Poly	Poly
#	Nomenciatura	Dominio	Cambios d	e falso sentid	0	<u> </u>		FA	Iviaiiiio
1		• /			0	L -		1	
1.	g.11/G>A; C.88G>A;		5	IN	IVI	F		-	+
2		5P-PP	> 50	N	6	-	6		
۷.	g.0304C>1; C.127C>1;		>50	IN	5	E .	Сра	-	+
2	p4Arg>11p	3P-PP	> 70	N	6	-	66		
э.	g.03030302A; C.12602A;		>70	IN	5	Г	сра,	-	-
4	p4Aig-Gill	JF-FF D/	No	N	c	E	a 670045C		1
4.	g.039702C, C.10002C,	D/ Gla	NO	IN	3	E		Ŧ	т
5	g 10/1196 \T: c 2056 \T:		No	N	c	E	1035	-	_
5	g.10419071, c.303071, c.305071, c.	EGE1	NO	IN IN	5			Ŧ	_
6	g 1043065A+c 31665A		>60	N		E	CnG	_	+
0.	n 60Gly>Ser	EGE1	200	IN IN	L L	L L	Сро	_	т
7	g 104584>G' c 3444>G'		7	N	s	F		_	+
7.	n 69Tyr>Cvs	FGF1	,			· ·			
8	g 17699G>A' c 422G>A'	F/	5	N	S	F		-	+
0.	p.95Cvs>Tvr	EGF2	5		5	-			
9.	g.20375G>A: c.533G>A:	F/	5	N	S	E		-	+
-	p.132Cvs>Tvr	P. act.	_		_				
10.	g.20413C>T; c.571C>T;	F/	54	N	М	E	CpG	-	+
	p.145Arg>Cys	P. act.					•		
11.	g.20519G>A; c.677G>A;	F/	44	N	S	E	CpG	-	+
	p.180Arg>Glu	P. act.					g.30803insA		
							c.234-19insA		
							IVS7		
12.	g.30076G>A; c.761G>A;	G/	2	Ν	S	Е		-	+
	p.208Gly>Asp	Cat.							
13.	g.30112C>T; c.797C>T;	G/	3	Ν	М	Е		-	+
	p.220Ala>Val	Cat.							
14.	g.30150G>A; c.835G>A;	G/	69	N	L	F	CpG	+	-
	p.233Ala>Thr	Cat.							
15,	g.30864G>A; c.881G>A;	H (H1)/	>86	N/N	M/	F/F	CpG	-/-	+/+
16.	p.248Arg>Gln	Cat.			L		NR		

Tabla 8. Caracterización molecular del F9 en pacientes Argentinos con HB.

Caso	Descripción	Exón/	Reportes	FIX	Sev.	F/E	Obs.	Poly	Poly
#	Nomenclatura*	Dominio	Previos**	Inhibidor.				PA	Malmo
17.	g.31008C>T; c.1025C>T;	H (H1)/	>100	N	L	F	CpG	-	+
10	p.2961 nr>Met	Cat.	4	N	C	-	PO		
18.	g.31051G>1; C.1068G>1;	H (H1)/	1	N	5	F	PO	-	+
10	p.51011p>Cys		1	N	c	E			
19.	g.31112071 C.1129071	п (п2)/ Саt	T	IN	3	E		Ŧ	Ŧ
20	g 111965A: c 113665A:	н (н2)/	>60	N	17	E/E	CnG	-/-	+/+
20,	n.333Arg>Gln	Cat.	200	IN IN	1	L/ L	NR	-/	.,.
22,	g.31176G>A; c.1193G>A;	H (H2)/	6	N/N	S/	Ε	NR	-/-	+/+
23.	p.352Gly>Asp	Cat.			S				
24.	g.31187G>A; c.1204G>A;	H (H2)/	6	Ν	М	Е		-	+
	p.356Gly>Arg	Cat.							
25.	g.31217G>T; c.1234G>T;	H (H2)/	1	N	S	F		-	+
26	p.366Gly>Trp	Cat.	2		6	-			
26.	g.3122/A>G; C.1244A>G;	H (H2)/	2	N	5	F		-	+
27	σ 31274T>Δ· c 1291T>Δ·	H (H2)/	1	N	s	F		_	-
27.	p.385Trp>Arg	Cat.	1		5				
28.	g.31262G>A; c.1279G>A;	H (H2)/	2	Ν	S	E		-	-
	p.381Gly>Arg	Cat.							
29.	g.31282A>G; c.1306G>A;	H (H2)/	7	Ν	S	Е		+	-
	p.390Ala>Thr	Cat.				-			
			Cambios	a no sentido					
30.	g.6340G>T; c.103G>T;	В/	No	+	S	F		+	-
	p12Glu>Stop	SP-PP		AR					
31,	g.6460C>T; c.223C>T;	B/	50	N/	S/	E/E	CpG, NR;	-/-	+/+
32.	p.29Arg>Stop	Gla	N -	+ AR	S	_			
33.	g.20377G>1; C.535G>1;	F/ Plact	NO	IN	3	E		-	+
3/	g 20/97C>T· c 655C>T·	F. all.	1	N	s	F		_	+
54.	p.173Gln>Stop	P. act.	1	IN	5	-			
35.	g.20562G>A; c.719G>A;	F/	6	+	S	E		-	+
	p.194Trp>Stop	Cat.		AR					
36.	g.31118C>T; c.1135C>T;	H (H2)/	46	Ν	S	F	CpG	-	+
	p.333Arg>Stop	Cat.							
	М	utaciones er	n sitios conse	nso de proce	samien	to del /	ARN		
37.	g.118delGTTT;	IVS1	5	Ν	S	F		-	+
	c.88+1_4delGTTT								
38.	g.64911>G; c.252+21>G	IVS2	NO	N	S	E	Fen. M	-	+
39.	g.66/6A>G; C.253-2A>G	IVS2	1 No	N	S			-	+
40.	8.1020011121, C.391+111121	1054		N a región pron	3 notora		-	+	+
41	a 60>A				notora	г	Crc	1	
41.	g00/A	JUIK	29 guoñas Incor	rionos/Dolos	L		Срв	-	Ŧ
12	g 10EdolineACATATCCTAAA:	<u>۲</u>	No	LIUTIES/ Delet	c	c	Γ		
42.	c 76delinsAGATATCCTAAA	FGF2	NU	TBR	3	E		Ŧ	-
	p21fsX20	2012		1 Div					
43.	g.30845_30846delGA;	H (H1)/	No	Ν	S	F		- 1	-
	c.862_863delGA;	Cat.							
	p.242fsX21								
			Grandes	deleciones					
44.	g.Del ExG_PolyA		S	Ν	S	E		-	+
45.	g.Del ExF		S	Ν	S	E		+	
46.	g.Del ExD		S	N	S	F		-	+
47,	g.PromA_PolyAdel		S	N/	S/	F/			
48, 40				+/	5/ د	E/			
49.				T	5		1	L	

Tabla 8. Tabla de mutaciones del F9 en pacientes con HB. En la tabla se muestran los 49 pacientes donde se encontró la mutación causal. Se detallan en cada caso el exón y el dominio donde se encontró la mutación causal, amplimeros de PA a Poly, y los dominios del F9, pro-pre-peptido, sp y pp, dominio γ-carboxi-glutamico, Gla, dominio parecido al factor de crecimiento epidérmico 1 y 2, EGF1 y EGF2 respectivamente, péptido de activación, p act. y dominio catalítico, cat. * Numeración (g.) correspondiente a Yoskitake *et al* (1985). ** Numero de reportes en la base de datos internacional de HB (URL, http://www.kcl.ac.uk/ip/petergreen/). Desarrollo de anticuerpo inhibidor (N, sin desarrollo de inhibidor; +, con inhibidor; AR, alta respuesta; TBR, transiente de baja respuesta), severidad del caso (S: severo, M: moderado, L: leve). Origen de la hemofilia: familiar (F) o esporádica (E). Obs, observaciones, CpG, ocurrencia de la mutación sobre un sitio CpG, y las mutaciones adicionales, cuando corresponde; NR, casos no relacionados; PO, portadora obligatoria. Se indica la presencia (+) o ausencia (-) de los polimorfismos PA y Mälmo.



Figura 5. Distribución de mutaciones en *F9 causales de HB.* (A) esquema del *F9* incluyendo todos los exones (A-H), representando el tamaño aproximado de cada uno, sobre cada exón se muestran las mutaciones puntuales encontradas en la serie estudiada, sustituciones nucleotídicas: cambios de falso sentido (círculos), cambios a no sentido (cuadrados), mutaciones en sitios consenso de *splicing*, donor o aceptor (semi-círculo hacia la derecha o izquierda, respectivamente), deleciones (triángulos), inserciones (triángulos invertidos). El centro oscuro en todas las figuras indica presencia de inhibidor neutralizante, el centro claro indica no desarrollo de inhibidor. (B) Esquema de la proteína de FIX, con cada dominio, Pre: pre-péptido, Pro: pro-péptido, Gla: dominio gama-carboxiglutámico, H: dominio hidrofóbico o de los aminoácidos aromáticos, EGF 1 y 2: dominio parecido al factor de crecimiento epidérmico 1 y 2 respectivamente, Act: péptido de activación y dominio Catalítico. Se esquematizan las deleciones con barras horizontales correspondientes a deleción total del gen (ExA_H), deleción de un exón, D o F (ExD o ExF, respectivamente) y deleción de dos exones G y H (ExG_H). En todos los casos el centro oscuro representa presencia de inhibidor de alta respuesta en el paciente y el centro claro, ausencia o inhibidor transiente de baja respuesta.

En todos los casos donde se encontró deleción total o parcial del gen, para descartar errores de detección de la señal debida a bajas concentraciones de ADN, o fallas en la amplificación por errores en la reacción PCR, se realizó una PCR multiplex con cada amplímero del *F9* y la amplificación de una región del gen autosómico β-Globina (*HBB*, cromosoma 11p15.5 NC_000011.9: 5246696-5248301, materiales y métodos), en los casos de deleción total, se observó la amplificación del amplímero β-Globina y ausencia de todas las señales de los amplímeros correspondientes al *F9* (Fig. 6). Este mismo procedimiento se realizó para todas las deleciones encontradas (Casos 44, 45 y 46, Tabla 8), y en cada uno se observó amplificación positiva del amplímero β-Globina y ausencia de amplímero correspondientes a la deleción (Fig. 6).



Figura 6. Detección de grandes deleciones. Geles de agarosa al 1/, PCR multiplex para cada uno de los amplímeros del *F9* (región promotora, PA, PB, exones y secuencias consenso de *splicing*, A, B, C, D, E, F, G, H1 y H2; y sitio de polyadenilacion, Pa) y un amplímero del gen β -globina, como control de amplificación, señal de 200 pb. (A). Paciente con deleción total del *F9*. Se observa en el gel la ausencia de amplificación de todos amplímeros específicos del *F9*, la flecha roja indica una señal inespecífica del amplímero F, de menor tamaño a la esperada, como resultado del análisis por PCR multiplex se observa la amplificación positiva del control en todas las calles. (B) Paciente con deleción del amplímero F. Se pueden observar las señales de los amplímeros del *F9* y β -globina, positivos ambos para todos los amplímeros excepto para el amplímero F (flecha roja) donde se observa la amplificación del amplímero de β -globina y la señal inespecífica del amplímero F. La primera y última calle en cada gel corresponden al marcador de peso molecular (PM), se indica la escala del marcador de peso molecular en pares de bases (pb) de 600 a 200 pb. El tamaño de cada amplímero se detalla en materiales y métodos.

Mutaciones pequeñas causales de HB y cambios polimórficos en el F9.

En los casos donde el análisis primario de los amplímeros mediante electroforesis en gel de agarosa no indicó ninguna anormalidad aparente, se realizó un análisis secundario de las mutaciones pequeñas, mediante la generación de heterodúplex (mezcla de muestras del probando y control) por la técnica de *screening* de CSGE-PAGE seguido de secuenciación de los amplímeros que presentaron movilidad CSGE diferencial respecto de los heterodúplex control, en corridas paralelas (Fig. 7A). De esta manera, fueron caracterizadas 43 mutaciones causales de hemofilia B, en las 45 familias sin rearreglos estructurales del *F9* (detalles en Tabla 8). Se encontraron mutaciones de falso sentido en el 64/ de las familias (29/45), el 16/ (7/45) mostró mutaciones a no sentido, el 9/ , mutaciones en sitios de procesamiento del ARN (4/45), el 2/ , cambios en la región promotora (1/45), el 4/ (2/45), pequeñas deleciones e inserciones y sólo el 4/ (2/45) resultaron indeterminadas (Tabla 8). Los cambios polimórficos encontrados se asocian a variantes ya descriptas de RFLPs de la enzima de restricción Msel en la región promotora (amplímero PA) g.698C>T, cambio presente en el 20/ de los individuos con amplificación positiva (Fig. 4B) y de MnII, en el amplímero F del *F9*, polimorfismo de Mälmo (M) (McGraw *et al*, 1985) g.20422G>A c.582G>A p.148Ala>Thr, con una frecuencia alélica del 80/ del total de los casos con amplificación positiva (Fig. 7C).



Figura 7. Análisis secundario de mutaciones pequeñas por CSGE-PAGE. Se muestran las señales específicas observadas en algunos de los casos presentados. A) Amplímeros B y H2, los patrones de señal correspondientes a los heterodúplex entre muestras de pacientes y controles (C30, C28, C19, C29), se indican con flecha roja, también se muestra en cada gel, el patrón correspondiente al homodúplex control (CN). Cualquier cambio en el patrón respecto del control indica potencialmente la presencia de un cambio en la secuencia de la muestra probando. B) Patrones de señales correspondientes al amplímero PA, asociado a la presencia del polimorfismo del promotor de *F9* g.698C>T. Los heterodúplex PA, corresponden a mezclas del amplímero de cada paciente y un control negativo para el polimorfismo, resultando los casos C13 y C5 positivos para el cambio g.698C>T (flecha roja). C) Patrones de señal correspondientes al polimorfismo Malmö en el amplímero F. Los heterodúplex F, corresponden a mezclas del amplímero de cada paciente y un control positivo para el polimorfismo. Con flecha roja se indican los casos C3 y C28 negativos para el polimorfismo Malmö g.20422G>A.

Cambios a no sentido (nonsense)

Los siete probandos que mostraron sustituciones nucleotídicas con creación de un codón de terminación prematuro presentan asociación clínica con HB severa (Tabla 9), tres de ellos con desarrollo de inhibidor neutralizante contra la terapia de reemplazo (p.-12Glu>Stop, p.29Arg>Stop, p.194Trp>Stop), y uno de ellos p.29Arg>Stop asociación con alergia. Cinco mutaciones se encontraron reportadas en la literatura y solo dos no reportadas (p.-12Glu>Stop, p.194Trp>Stop). De las siete mutaciones, dos corresponden a cambios en sitios CpG, ambos reportados en la literatura (p.29Arg>Stop, p.333Arg>Stop) (Tabla 8). Las mutaciones a no sentido encontradas se distribuyen en diferentes dominios del *F9*; pro-péptido (p.-12Glu>Stop), dominio Gla (p.29Arg>Stop, en dos casos directamente no relacionados), en EGF2 (p.133Gly>Stop), péptido de activación (p.173Gln>Stop) y dominio catalítico (p.194Trp>Stop, p.333Arg>Stop) (Fig. 5, Tabla 8).

Tipo mutación/ Severidad	Severa	Moderada	Leve	Total
Missense	18	5	6	29
Nonsense	7	-	-	7
Splicing	4	-	-	4
Ins/Del	2	-	-	2
5´UTR	-	-	1	1
Grandes deleciones	6	-	-	6
Total	37	5	7	49

Tabla 9. Mutaciones causales de HB en el F9 y severidad bioquímica.

Cambios de falso sentido (missense)

Se encontraron 29 casos con mutaciones de falso sentido. El 62/ de ellas presentó características clínicas de HB severa, el 17/ HB moderada y el 21/ HB leve (Tabla 9). Ningún caso se encontró asociado al desarrollo anticuerpo inhibidor contra el FIX terapéutico. Sólo dos mutaciones, p.8Glu>Gln, p.56Cys>Phe, no han sido reportadas en la literatura, aunque si hay reportes en estos residuos pero no corresponden al mismo cambio. Nueve de las 29 mutaciones encontradas se asocian a sitios CpG (31/), y todos ellos fueron reportados en la literatura (Tabla 8). Una de las mutaciones encontradas (caso C6), a pesar de estar reportada en la literatura, como el cambio afecta la última base del exón A, fue estudiada por los programas

de predicción de impacto sobre sitios de *splicing*, y los resultados se detallan más abajo. El caso C11, además de mostrar una mutación causal, p.180Arg>Gln, reportada en la literatura, también mostro un polimorfismo no muy frecuente (g.30803insA), con solo 4 reportes en la base de datos de variantes polimórficas de HB (Green *et al*, 1992).

Las mutaciones de falso sentido encontradas se distribuyen en casi todos los dominios del *F9*, excluyendo el péptido señal y el dominio hidrofóbico (o dominio de los aminoácidos aromáticos), el 62/ (18/29) se localiza en el dominio catalítico, 10/ en EGF1 (3/29), igual porcentaje, 10/ (3/29) se observa en el pro-péptido y en el dominio EGF2 (3/29), 3/ (1/29) se presentaron en el dominio Gla (dominio de γ -carboxilación) e igual porcentaje, 3/ (1/29) en el péptido de activación (Fig. 5, Tabla 8).

Bottema y colaboradores (1991) han clasificado las mutaciones de falso sentido del F9 según el tipo y grado de la conservación de aminoácidos en: (1) sustituciones genéticas, aminoácidos conservados tanto en el FIX de distintas especies de mamíferos (humanos, ratones, porcinos, perros, conejos, hamsters, ratas y bovinos) como en las tres distintas serín-proteasas de la cascada de coagulación (FVII, FX y proteína C), (2) sustituciones parcialmente genéticas, aminoácidos conservados en FIX de distintas especies de mamíferos y solo igual a una o dos de las tres serín-proteasas; o (3) sustituciones específicas, sobre residuos conservados sólo en algunas especies de mamíferos. Usando este sistema de Bottema y colaboradores (1991) se clasificaron las mutaciones encontradas en nuestra población y se compararon con la severidad de cada paciente (tabla 10). Dentro de las sustituciones genéticas, el 83/ se encuentra representado por casos con HB severa (10/12), y el 17/ representa los casos moderados (1/12) y leves (1/12) en esta clasificación. Las sustituciones en los aminoácidos parcialmente genéticos de los casos con HB severa indican un 57/ (8/14) y 21/ (3/14) para los casos con HB moderada y en el 21/ para los casos con HB leve (3/14). En las sustituciones de los aminoácidos de tipo específicos no se encontró ningún caso con HB severa, el 67/(2/3) de los casos corresponde a HB leve y el 33/ a HB moderada (1/3) (Tabla 10). Sobre estos datos, se realizó la comparación entre el número de casos con HB severa versus aquellos con HB moderada/leve, para los tres grados de conservación de aminoácidos, y se observó un p<0,05, test de Chi-cuadrado (Tabla 10).

Grado de conservación/	Severo	Moderado	Leve
Severidad			
Genético	10	1	1
Parcialmente Genético	8	3	3
Especifico	0	1	2

Tabla 10. Clasificación de las mutaciones de falso sentido encontradas en nuestra serie de pacientes con HA, según Bottema y colaboradores (1991).

En los casos de las mutaciones *missense* no reportadas en la literatura, para ser asignadas como mutaciones causales de HB, se siguieron los siguientes criterios. Se alineo las secuencias del aminoácido del FIX humano con FIX ortólogos y en ambos casos se observó que el cambio de base se producía en aminoácidos altamente conservados (aminoácido tipo genético, según Bottema *et al*, 1991) (Fig. 8). Se estudiaron 200 cromosomas X de la población Argentina general y no se observaron ninguno de los cambios de base encontrados en estos pacientes, y por último se estudiaron los cambios en la estructura 3D de la proteína mediante las predicciones del programa SWISS pdb Viewer.



Figura 8. Alineamiento de secuencias ortólogas al FIX. P00740 (secuencia FIX Humano), Q95ND7 (FIX de *Pantroglodites*) P19540 (*Canis familiaris*) P00741 (*Bovino bos taurus*) P16294 (*Mus musculus*). Alineamiento obtenido en el servidor de análisis de proteínas UNIPROT (disponible en URL: <u>http://www.uniprot.org</u>) se indican con flecha roja, los aminoácido p.8 Glu (E) y p.56Cys (C).

En el primer caso p.8Glu>Gln, el cambio de un residuo polar con carga negativa por uno polar sin carga, produce un cambio en la superficie electroestática de la molécula en el dominio Gla que podría modificar las interacciones con la superficie plaquetaria (Fig 9A). La mutación p.56Cys>Phe representa un cambio de un residuo polar sin carga por uno no polar. Sin embargo el cambio estructural mas importante está dado por la destrucción de un puente disulfuro. La cisteina 56, normalemente se une a la cisteina 71 mediante un puente disulfuro, la sustitución de Cis56Phe disrumpe el puente disulfuro, desestabilizando el dominio EGF1 (Fig 9B).

(A)



Figura 9. Análisis por modelado de la estructura 3D *in silico* de las mutaciones missense p.8Glu>Gln y p.56Cys>Phe, no reportadas en la literatura. (A) Cambio en las uniones electroestáticas p.8Glu>Gln, se muestra la estructura del FIX y la superficie de la proteína en la región del cambio. En amarillo se detallan las regiones sin carga neta y en rojo las zonas con carga neta negativa. (B) Estructura de la proteína mostrando el cambio p.56Cys>Phe, y la desaparición de un puente disulfuro Cis56-Cis71 en presencia de la mutación.

(B)



Pequeñas deleciones e inserciones

En una familia con un paciente con HB severa asociada al desarrollo de anticuerpo inhibidor, se encontró un cambio no reportado en la literatura del tipo inserción/deleción, *frameshift* (g.105delinsAGATATCCTAAA) en el primer exón del *F9* que afecta el dominio EGF2 de la proteína. La inserción de 12 pb combinada con la deleción de una base, predice la aparición de 4 aminoácidos (Arg, Tyr, Pro, Lys), dentro del exón A, produciendo un desfasaje del marco de

lectura, condicionando la aparición de un codón de terminación de la traducción prematuro 20 residuos río abajo de la mutación (Tabla 8, Fig. 5).

Otra familia con HB severa sin desarrollo de anticuerpo inhibidor mostró una deleción de dos bases (g.30845_30846delGA) en el exón H del *F9*, afectando el dominio catalítico de la proteína. Este cambio tampoco ha sido reportado en la literatura. La deleción de dos bases predice corrimiento en el marco de lectura de la proteína generando un codón de terminación prematuro, 21 aminoácidos río abajo (Tabla 8, Fig. 5).

El análisis de g.105delinsAGATATCCTAAA y g.30845_30846delGA fue realizado inicialmente en electroforesis en geles de poliacrilamida de alta resolución y para simplificar su detección también fue aplicado con éxito en PAGE de análisis rápido (10 cm) (Fig. 10). En estos casos, solo el probando con deleción de dos bases concurrió con cuatro familiares mujeres para diagnóstico molecular, resultando una tía materna y sus dos hijas, primas del probando, portadoras de la mutación, y una segunda tía materna, no portadora (Fig 10).



(B)



Figura 10. Análisis de los pacientes C43 y C42 (Tabla 8) con pequeñas inserciones-deleciones. (A) Árbol familiar de la familia del caso C43 con g.30845_30846del GA. (B) Se muestran las señales del CSGE-PAGE de baja resolución específicas observadas en los amplímeros H1 y A, de dos casos asociados a corrimientos en el marco de lectura: C43 con una deleción de dos bases y C42, con una inserción neta de 11 pares de bases. En C43, se presentaron dos tías del probando (II2 y II1) resultando una portadora y una no portadora, y dos primas (III1 y III2) hijas de II2, ambas resultando portadoras, la madre del probando (II.3) no concurrió al estudio genético. En C42, se estudió el probando y un control negativo de la mutación, CN. En todos los casos se indican con una flecha roja las señales anómalas de ADN heterodúplex.

Mutaciones en sitios de splicing

Se encontraron en la serie cuatro pacientes (8/) con una única mutación presente sobre secuencias consenso para el proceso de *splicing*. En todos los casos se trató de pacientes con HB severa y sin desarrollo de anticuerpo inhibidor. Tres casos mostraron cambios en el sitio donor de *splicing*: una deleción de cuatro bases en el intrón 1 del *F9* (c.88+1_+4delGTTT) (C37, Tabla 8), una transición nucleotídica en el intrón 2 (c.252+2T>G) (P38, Tabla 8) y una inserción de una base en el intrón 4 (c.391+1insT) (C40, Tabla 8). Otro caso (P39, Tabla 8) mostró un cambio de base en intrón 2 (c.253-2A>G), en el sitio aceptor de *splicing*. Asimismo, se encontró una sustitución nucleotídica en la última base del exón A que además de predecir un cambio de falso sentido (c.88G>A, p.-17Val>Ile) (C1, Tabla 8) reportado en la literatura, el cambio también podría afectar el sitio donor de *splicing* del intrón 1 (Fig. 11).

Todas las mutaciones bajo sospecha de afectar secuencias involucradas en el splicing, tanto los casos no reportados en la literatura (c.252+2T>G, c.391+1insT), como los reportados, fueron sometidas a un análisis bioinformático, a través de programas de predicción de secuencias de splicing en ADN genómico. En la figura 11 se detallan los resultados obtenidos mediante este análisis teórico. En cada caso, primero se estudian los sitios consenso donor o aceptor para el procesamiento del ARN esperado para la secuencia salvaje, no mutada (WT), en los casos donde este sitio no es reconocido, o el valor de la predicción se ubica en el límite inferior del rango, el estudio resulta no informativo para el análisis de las secuencias con la mutación. En el estudio del sitio dador de splicing del exón A/intrón 1, sólo es informativo el programa de splicing NNsplice (Fig. 11A), en la región exón B/intrón 2 y exón D/intrón 4, todos los programas utilizados, resultan informativos: NNsplice, NetGene2, SoftBerry SPL y GeneSplicer (Fig. 11A), El sitio aceptor de splicing del intron 2/exón C únicamente no es reconocido por el programa NetGene2 (Fig 11B). Cuando se ingresan las secuencias mutadas en algunos casos los programas muestran un score por debajo del límite inferior, indicando que la secuencia deja de ser reconocida como sitio de *splicing*. En la mutación c.391+3insT, el programa NN*predict* indica una excepción, la aparición de un nuevo sitio dador de *splicing* 5 bases río arriba de la inserción. Si esta última predicción fuese correcta, quedarían incorporadas a la secuencia del exón D dos residuos, glicina y un codón de terminación prematuro.





(B) Sitio aceptor de splicing



Figura 11. Análisis teórico de mutaciones que afectan el *splicing*. (A) Sitios dador de procesamiento de ARN. (B) sitios aceptor de procesamiento de ARN. Los *scores* en el límite inferior del rango en el sitio tipo salvaje (WT) es indicado por subrayado y determina que el análisis resulta no informativo. En cada uno de los cuatro algoritmos se indican entre paréntesis los rangos de *score*, siendo el límite superior indicativo de secuencias de *splicing* óptimas.

Cambios en las regiones no traducibles

La serie estudiada sólo mostró un caso con una transición nucleotídica en la región promotora del *F9*, g.-6G>A, correspondiente a un paciente de seis años con HB leve. La mutación, sobre un sitio CpG, está reportada en la literatura, como asociada a HB Leyden (Morgan *et al*, 1995; Vidaud *et al*, 1993, Lillicrap 1998,).

Estudio de portadoras.

Diecisiete probandos concurrieron al diagnostico molecular con al menos una mujer relacionada para el estudio del *status* de portadora, (i.e., madres, hijas, tías maternas o primas maternas). Se estudiaron un total de 27 mujeres, resultando 21 portadoras de HB y 6 no portadoras.

Mutaciones en sitios CpG

El 34/ (12/35) de las mutaciones puntuales descriptas en esta serie fueron transiciones nucleotídicas en dinucleótidos CpG: 42/ C>T (5/12) y 58/ G>A (7/12). En las 26 mutaciones de falso sentido, se observaron seis transiciones G>A y tres C>T. En los seis cambios a no sentido, dos correspondieron a transiciones C>T, y el cambio observado en la región promotora del *F9* corresponde a una transición G>A.

Desarrollo de anticuerpo inhibidor en HB

Cinco pacientes con HB severa presentaron desarrollo de anticuerpo inhibidor neutralizante contra la terapia de reemplazo de alta respuesta. Este número de casos, aumentado, respecto de otras poblaciones es debido principalmente a que nuestro laboratorio estudió pacientes con inhibidor de HA y HB a nivel nacional para el protocolo de estudio de pacientes con inhibidor de Argentina. El 33/ (2/6) mostró deleción total del gen, dentro de las mutaciones a codón de terminación prematuro, el 43/ (3/7) presentó inhibidor, en todos los casos de alta respuesta. Un paciente con una inserción/deleción (g.105delinsAGATATCCTAAA), presentó inhibidor de tipo transitorio, de desaparición antes de los 6 meses, o transiente, de baja respuesta. No se observó desarrollo de inhibidor en los pacientes con mutaciones en los sitios de *splicing* ni en los casos donde los cambios generaron mutaciones sin sentido. Sin embargo, podemos analizar las frecuencias de composición del grupo de pacientes que si desarrollaron inhibidor ya que representan el total de pacientes Argentinos con HB e inhibidor. En este grupo, dos pacientes mostraron deleción total del *F9* (40/) y tres mostraron cambios a codón de terminación prematuro (60/).

Discusión

Se encontró la mutación causal de HB en 49 de las 51 familias estudiadas (96/), aplicando un algoritmo de estudio para el gen del factor IX de coagulación humano. El algoritmo de análisis del *F9*, diseñado por nosotros, adaptado a las características económicas de nuestro país, incluyó la detección de grandes deleciones por ausencia repetida y consistente de un grupo de amplímeros vecinos, usando como control de amplificación un amplímero del gen β -globina; aquellos amplímeros que resultaron en amplificación positiva fueron sometidos *screening* por la estrategia de CSGE-PAGE, de alta resolución, finalmente para la caracterización de la mutación se aplicó secuenciación de ADN de aquellos amplímeros con movilidad CSGE diferencial respecto de los controles.

La serie estudiada mostró un doce por ciento de grandes deleciones (6/49), lo que representa una alta frecuencia respecto de otros datos publicados en la literatura, con un promedio del 3/ (Lilicrap, 1998; Mitchell *et al*, 2005) u 8/ (Ljung *et al*, 2001). Este amplio porcentaje en la serie de pacientes presentados es debido principalmente al sesgo introducido por la participación del laboratorio en el protocolo de estudio de pacientes con inhibidor a nivel nacional, lo que incrementó el número de familias con grandes deleciones, fenotipo severo y desarrollo de anticuerpo inhibidor en nuestra serie.

Como perspectivas en estos casos se espera poder estudiar las deleciones en heterocigosis, mediante dos estrategias; medición de dosis génica y estudio de los puntos de ruptura de la deleción para investigar además el mecanismo molecular que le dio origen.

El método de *screening* utilizado para la detección de mutaciones puntuales se basa en la estrategia de CSGE que ha mostrado ser robusta con una eficiencia superior al 85 / (Ganguly *et al*, 1993; Korkko *et al*, 1998; Hinks *et al*, 1999), con productos PCR entre las 200 y 800 pb para mutaciones ubicadas a más de 50 pb de los extremos del amplímero. Nuestro sistema de análisis por CSGE mostró una eficiencia del 96/ en la detección de mutaciones pequeñas en nuestra serie (43/45).

Las señales CSGE asociadas a la mutación ya caracterizada, permitieron realizar el estudio de portadoras a 27 mujeres en las familias afectadas.

En todos los casos, el algoritmo de análisis de mutaciones se completa con la asignación del genotipo obtenido al fenotipo observado.

Los criterios de asignación de causalidad aceptados internacionalmente de las mutaciones asociadas a HB se basan en los siguientes puntos. El reporte de la mutación en la base de datos de HB. Los criterios de genética molecular recabada en la experiencia de otras enfermedades monogénicas en base a la asociación entre cambios genéticos específicos y sus cambios proteicos derivados. No encontrar la variante genética bajo análisis en una serie de varones de la población general (típicamente más de 200 alelos). Para mutaciones *missense*, el alineamiento de secuencias aminoacídicas de proteínas ortólogas. El cambio de un residuo conservado sería más indicativo de afectación de la función que en residuos no conservados. Modelado y predicción *in silico* de los potenciales cambios en la estructura secundaria y tridimensional de la proteína mutada afectando su función.

La explicación clásica indica que la aparición de un codón de terminación prematuro, predice una proteína truncada que se degrada en el citoplasma y es típicamente asociada a HB severa, como en los casos presentados. Esta predicción también se ve reflejada en la base de datos donde estas mutaciones se encuentran asociadas a fenotipo severo. Una explicación alternativa a la asignación de mutaciones *nonsense* al fenotipo severo es la del fenómeno de *Nonsense Mediated Decay* que asocia la degradación rápida de ARN mensajero con codones de terminación prematuro (Frischmeyer *et al*, 1999). Aunque ninguno de estos mecanismos fue investigado en hemofilia ambos coinciden en su asociación con el fenotipo severo.

Las mutaciones a no sentido representan el 14/ de los casos de esta serie, este porcentaje es similar a lo observado en distintas series reportadas en la literatura, 13 y 14,4 / en paciente con hemofilia B (Lilicrap, 1998; Belvini *et al*, 2005), aunque debemos recordar el sesgo introducido por el protocolo de estudio de pacientes con inhibidor.

Las mutaciones de falso sentido encontradas se distribuyen a lo largo de casi todo *F9*, excluyendo el péptido señal y el dominio hidrofóbico. Se observaron cambios en la secuencia nucleotídica que afectan al pro-péptido, entre las que se pueden destacar p.-4Arg>Trp y p.-4Arg>Gln, dos casos muy estudiados en la literatura. El pro-péptido del FIX es responsable de direccionar las γ-carboxilaciones de los 12 residuos de ácido glutámico de la proteína madura para dar lugar a los residuos de ácido γ-carboxiglutámico en el dominio Gla y es removido luego de la secreción del FIX al torrente sanguíneo. Ambos cambios en el aminoácido arginina -4 no afectan la γ-carboxilacion, pero si impiden que se clive el pro-péptido, lo que afectaría a su vez la conformación inducida por calcio, haciendo menos estable la proteína madura (Green *et al*, 1989; Wojcik *et al*, 1997). Otra mutación encontrada en el pro-péptido es el cambio de base c.88G>A, que se produce en la última base del exón A y se encuentra reportado en la literatura como una mutación de falso sentido, (p.-17Val>Ile), asociada a HB severa en el 100 / de los casos reportados, en cambio el paciente estudiado en esta serie presenta un fenotipo de HB moderada. La presencia de este cambio en la proximidad del sitio de procesamiento del ARN podría afectar además el sitio consenso donor de *splicing* del intrón 1. El análisis de esta mutación mediante los programas de predicción de secuencias consenso de *splicing* resultó en una disminución en los parámetros normales de predicción registrados por estos programas, indicando una posible disrupción del correcto procesamiento del ARN en este caso. Esta ambigüedad en la descripción de los resultados obtenidos por este cambio de base permitiría explicar la diferencia entre los fenotipos reportados y el caso estudiado en esta serie, el estudio a nivel de ARN sería determinante para explicar la causa del fenotipo.

La única mutación encontrada en el dominio Gla es un cambio de base no reportado en la literatura, c.160G>C, correspondiente a la sustitución p.8Glu>Gln, en cambio si se encuentra ampliamente reportada cuando el ácido glutamico cambia por ácido aspartico, indistintamente cual fuera el cambio la sustitución del aminoácido glutamico impide la γ-carboxilación lo que interrumpe la interacción del FIX con la membrana fosfolipídica (Freedman *et al*, 1996). Este cambio fue estudiado por el programa SWISS pdb view, los resultados mostraron una modificación de la superficie electroestática de la molécula.

En el dominio EGF1 se encontraron tres mutaciones, dos de las cuales presentan reportes en la base de datos de HB, p.60Gly>Ser y p.69Tyr>Cys, asociados a HB leve y severa respectivamente tanto en la base de datos como en los casos estudiados. El dominio EGF1 del FIX participa en la interacción con el FVIIIa y con el FX, y sería indispensable para activación del FIX por el FVIIIa y el factor tisular (Lenting *et al*, 1996). El mantenimiento de la estructura de este dominio se ve afectada por los cambios de base observados en los casos reportados, en la sustitución glicina por serina, un residuo hidrofóbico cambia por uno hidrofílico, y en la sustitución tirosina por cisteína, cambia un residuo aromático polar por uno hidrofílico pequeño, en consecuencia en cada caso se producirían cambios en la estructura terciaria de la proteína modificando las

interacciones de esta con el FVIIIa y el factor tisular. En el caso del cambio no reportado, p.56Cys>Phe, es aún más evidente la modificación de la estructura de la proteína, debido a que la sustitución cisteína por fenilamina disrumpe un puente disulfuro, esencial para el mantenimiento del *loop* 1 y 2 dentro del dominio EGF1.

El *loop* 1 y 2 del dominio EFG2 es esencial para la normal interacción con la superficie plaquetaria y producir el correcto ensamblado del complejo tenasa en la activación del FX, y están especialmente involucrados los residuos del 88 al 109, excepto el 94 (Yang *et al*, 2004). La arginina 94 junto al ácido glutámico 78, serían necesarios para la interacción del dominio EGF2 con la cadena liviana del FVIIIa (Christophe *et al*, 1998). En la serie presentada el cambio de base en EGF2, p.95Cys>Tyr, está reportado en la literatura y también disrumpe un puente disulfuro (Mukherjee *et al*, 2004).

Entre el dominio EGF2 y el péptido de activación hay 17 aminoácidos que forman parte de la cadena liviana en la proteína activa del FIX, entre ellos la cisteína 132 mediante un puente disulfuro se une a la cisteína 289 del dominio catalítico, este puente disulfuro mantiene unida la cadena liviana y la pesada en el FIXa. La mutación en la cisteína 132, no permite la formación de este puente disulfuro alterando severamente la estructura y, en consecuencia, todos los pacientes reportados en la base de datos con cambios en el residuo 132 igual que el paciente de nuestra serie están asociados a HB severa. Otro cambio reportado en la última base de esta región es p.145Arg>Cys, este cambio impide el clivaje de la cadena liviana y produce una disminución en los niveles de activación del FIX (Braustein *et al,* 1981).

En cambio, una disminución en los niveles de clivaje del péptido de activación fue observada cuando el cambio se produce en el último aminoácido del péptido de activación, p.180Arg>Gln (Huang *et al*, 1989).

El dominio catalítico contiene la estructura característica de las serín proteasas, la triada catalítica, His221, Asp269 y Ser365, residuos relacionados con el sistema de sitio activo y el sitio de unión al sustrato, Asp359 (Green *et al*, 1989). En este dominio se encontraron en nuestra serie 15 mutaciones distintas, todas reportadas en la literatura. Las primeras dos mutaciones, p.208Gly>Asp y p.220Ala>Val, forman parte del sitio activo delimitado por las cisteína 206 y cisteína 222, que contiene la histidina 221. Modificaciones en este sitio podrían modificar la

orientación de la histidina 221 en la triada catalítica. En el caso del cambio Glicina 208, no cargado muy pequeño, por ácido aspártico, introduce un aminoácido con carga negativo. Este cambio tan significativo se ve reflejado en la severidad fenotípica del paciente estudiado así como en todos los reportes en la literatura asociado a HB severa. Asimismo, este cambio afecta en un aminoácido clasificado como parcialmente genético (Bottema *et al*, 1991). El cambio de Alanina por Valina, se produce en un aminoácido genéticamente conservado, no modifica la carga en la superficie, pudiendo ser esta característica, una de las causas de la heterogenea severidad observada en la base de datos para este cambio específico. El defecto p.233Ala>Thr, involucra un aminoácido clasificado como específico del FIX, según Bottema y colaboradores (1991) y tanto en el caso reportado en nuestra serie como en la mayoría (95⁄) de los reportes de la literatura está asociado a HB leve. Ha sido propuesto que este aminoácido, alanina 233, forma parte del *loop* que une calcio en el dominio catalítico y esto sería esencial para la eficiencia catalítica y la unión al FVIIIa (Mathur *et al*, 1997), por lo que al no verse afectada la actividad del FIX, pero si la eficiencia, podría ser asociado a HB leve.

Lillicrap (1998) ha descripto, en población caucásica, cuatro cambios *missense* (i.e., p.60Gly>Ser, p.248Arg>Gln, p.296Thr>Met y p.397Ile>Thr) todos asociados a HB leve. En nuestra serie fueron encontrados tres de ellos (p.60Gly>Ser, p.248Arg>Gln y p.296Thr>Met). Según Lilicrap (1998) estos cambios serían responsables de un tercio de todas las HB leves en caucásicos. En acuerdo a esta observación en nuestra serie este grupo de mutaciones representan el 50/ (3/6) de los casos con HB leve.

Los cambios observados en las posiciones 352, 366, 381, 385 corresponden a sustituciones genéticas en aminoácidos conservados, por lo que en todos los casos se prevé una asociación con fenotipos severos. En este sentido excepto el cambio en el aminoácido 381 que se encuentra reportado tanto en casos moderados como severos, todos los reportes corresponden a HB severa.

Los cambios en los residuos 310, 331, 333, 356, 369 y 390, afectan aminoácidos parcialmente genéticos. Las mutaciones p.310Trp>Cys, p.331Val>Thr, p.369His>Arg y p.390Ala>Thr, son cambios asociados a fenotipos severos tanto en la literatura como en nuestra serie. Las sustituciones triptófano por cisteína, valina por treonina y alanina por treonina, son cambios de aminoácidos hidrofobicos por hidrofílicos, estos cambios alterarían la estructura de la proteína, lo que podría explicar la severidad observada. En el caso del cambio histidina por arginina el cambio de aminoácido no introduce cambios en la cargas de la superficie molecular, porque

ambos son polares con carga positiva, a pesar de lo cual tanto en los reportes como en el caso estudiado ambos están asociados a HB severa.

En cambio, en las mutaciones p.333Arg>Gln y p.356Gly>Arg se observa una discordancia entre los datos de severidad de la literatura y aquellos de nuestra serie, mostrando en el primer caso fenotipo leve y en el segundo moderado en nuestra serie, respectivamente, sin embargo prevalecen en la base de datos fenotipos moderados (68/) y leves (75/), respectivamente. En el cambio p.333Arg>Gln se alteraría la unión del FIXa con el FVIIIa lo que reduciría la actividad enzimática, sin perderla completamente, lo que permite explicar la diversidad de fenotipos (KolKman *et al*, 1999).

Tanto la deleción de dos bases como la deleción-inserción con inserción neta de 11 bases, reportadas en esta serie modifican el marco de lectura de la proteína e incluyen en el exón un codón de terminación prematuro. Las deleciones inserciones con cambios del marco de lectura suelen estar asociadas a HB severa (Bowen, 2002), como ocurre en los pacientes reportados de nuestra serie.

La bibliografía provee de herramientas computacionales, libremente disponibles en la internet, que a través de matrices, incluyendo información teórica permiten estudiar el impacto de sustituciones nucleotídicas en el ADN genómico sobre secuencias implicadas en el proceso de splicing. Estos programas utilizan información codificada local, general o señales específicas de splicing, por eso cada uno mide scores diferentes y en algunos casos en igual secuencia se reconocen señales de splicing en distintos puntos (Pertea et al, 2001; Vorechovsky, 2006; Buratti et al, 2007). El uso de estas herramientas bioinformáticas permite predecir si la sustitución nucleotidica, muestra algún efecto sobre las secuencias de splicing, si bien esta predicción no explica el efecto sobre la molécula del factor IX, proveen un análisis teórico comprehensivo para establecer los posibles efectos del splicing cuando no es posible evaluar el ARN mensajero por el muy bajo nivel de expresión del FIX (y FVIII) en leucocitos de sangre periferica, técnica de elección para el estudio de este tipo de mutaciones. El análisis de las mutaciones no reportadas en los sitios de *splicing*, mostraron en la mayoría de los programas (4/4 programas para la mutación c.252+2T>G y 3/4 en el caso c.391+1insT) un valor de score por debajo del límite inferior, prediciendo la desaparición del sitio de splicing, en el caso c.252+2T>G, la sustitución indica un cambio en la secuencia conservada GT del sitio donor de *splicing*, este tipo de sustitución afecta la mayoría de los casos reportados en la literatura con defectos en el sitio de *splicing* (Buratti *et al*, 2007).

Un caso de interés en esta serie es el que presenta un cambio de base en la región 5` regulatoria del gen. La región regulatoria, desde el sitio -40 al sitio +18, es denominada región especifica regulatoria Leyden (James et al, 2008). Las mutaciones en esta región están asociadas a un inusual fenotipo, Hemofilia B Leyden, en donde los niveles de factor IX aumentan luego de la pubertad (Heit *et al*, 1999). Este aumento de la expresión del FIX también ocurre en personas de la población general de ambos sexos y el nivel de factor en estos casos aumenta hasta casi un 25/ luego de la adolescencia, ya que desde la pubertad en adelante, factores de transcripción dependientes de testosterona, median la unión al promotor del F9, de elementos respondedores de andrógenos (ARE) y facilitan la unión de proteínas de unión al sitio D (DBP- D binding protein), en regiones rio arriba del promotor (James et al, 2008), lo que aumenta la expresión génica. Se reportaron regiones, desde -27 a -22, donde las mutaciones no provocan este aumento en los niveles de FIX luego de la pubertad. Esta ausencia de la respuesta puberal en los niveles de FIX se asocia a que esta región es responsable de la unión de dos factores de transcripción en la región ARE (Heit et al, 1999). El cambio g.-6G>A esta reportado como el de mayor aumento en los niveles de factor respecto de otras mutaciones en la región promotora (Lillicrap 1998). El caso presentado en esta serie corresponde a un niño de seis años con HB leve, sin antecedentes de hemofilia en la familia. Bajo la evidencia de otros casos reportados en la literatura, se espera un aumento en los niveles de factor IX luego de la pubertad, llegando a niveles normales o casi normales que reduzcan o pierdan el fenotipo hemofílico.

Las mutaciones puntuales pueden ser agrupadas según sean recurrentes o no. La hipermutabilidad del dinucleótido CpG apoya la recurrencia de mutaciones de origen independiente en estos sitios. Los sitios CpG, pueden dar lugar a las transiciones C>T o G>A, con mayor frecuencia que las transversiones C>A, C>G, G>T o G>C, diferencias en la frecuencias de transiciones/ transversiones, en el caso de C>T, estaría dada por la desaminación de la 5'metil citosina, produciendo timidina (Ketterling *et al*, 1994). En hemofilia B los datos de la literatura, muestran los mismos porcentajes que en nuestra serie, el 30/ de las mutaciones puntuales están asociadas a sitios CpG mientras que el resto se distribuye en cualquiera de los otros

dinucleótidos (Bowen, 2002). La serie presentada aquí muestra un 34/ de mutaciones puntuales sobre sitios CpG.

Hay raros ejemplos de mutaciones recurrentes en sitios no CpG, generalmente explicados por efecto fundador asociado a fenotipo de HB moderada o leve, aunque no se observaron en nuestra serie.

El *F9* contiene 20 sitios CpG en el marco abierto de lectura, seis de los cuales se encuentran en el triplete CGA. Las transiciones C>T en el triplete CGA, arginina, resultan siempre en la aparición de un codón de terminación prematuro.

La identificación de la mutación causal de hemofilia B, permite estimar el riesgo de desarrollo de anticuerpo inhibidor neutralizante contra la terapia de reemplazo con FIX, indicando la frecuencia de pacientes con inhibidor sobre el total de pacientes con esa mutación en poblaciones no sesgadas. Existen variados reportes de la incidencia de desarrollo de inhibidor, en HB. Tagariello y colaboradores (2010) estiman una incidencia que varía entre 3 y 10/, dependiendo del grupo estudiado, mientras que Oldenburg y colaboradores (2006), reportan una incidencia de solo el 3/ y Belvini y colaboradores (2005), un 4,7/. En todos los casos citados el desarrollo de inhibidor contra el FIX exógeno está asociado a pacientes con HB severa. Se ha reportado que la formación de inhibidor se presenta como un rasgo multifactoriales entre ellos: el tipo de mutación y elementos del sistema inmune. Dos tipos de mutaciones causales de HB severa se asocian al desarrollo de inhibidor: mutaciones de punto, que incluyen: mutaciones a no sentido e ins/del con corrimiento del marco de lectura, y grandes deleciones totales o parciales del F9 o rearreglos. Cuando el defecto molecular es conocido, la probabilidad de desarrollo de inhibidor varía según el tipo de cambio, en mutaciones de falso sentido la probabilidad de desarrollo de inhibidor es del 0/, en ins/del que producen corrimiento del marco de lectura, al igual que la aparición de un codón de terminación, la probabilidad es del 20/, y los grandes rearreglos presentan una probabilidad del 50/ (Lillicrap, 1998).

En la serie presentada se observaron 5 casos con HB severa y desarrollo de anticuerpo inhibidor de alta respuesta (13/), dos casos corresponden a deleción total del gen, y tres a cambios a no sentido. Mientras que no se encontró ningún paciente con desarrollo de inhibidor con HB moderada o leve, ya que todos estos pacientes mostraron cambios de falso sentido. Sin embargo se encontraron discordancias en el desarrollo de inhibidor en dos pacientes con la

misma mutación sin sentido (p.29Arg>Stop), y en tres pacientes con deleción total del gen (casos 47, 48 y 49). La respuesta al porque pacientes con la misma mutación no desarrollan inhibidor está asociada a los factores de riesgo adicionales ya mencionados y que la presencia, tipo y localización de la mutación representa un factor de riesgo muy importante pero no es por sí sola determinante para que el paciente desarrolle inhibidor. Ha sido observado que un subgrupo de pacientes con HB severa con desarrollo de inhibidor, en general debida a deleción completa del *F9*, expresan además signos clinicos de alergia a la administración exógena del FIX terapéutico (Warrier et al, 1997; Tagariello et al, 2007), característica observada en uno de los casos de la serie estudiada (caso 31), pero asociado a una mutación de codón de terminación prematuro.

El estudio de la serie presentada se realizó sobre muestras de ADN genómico de leucocitos de sangre periférica y no se investigó la presencia cuali-cuantitativa del FIX:Ag en el plasma de los pacientes, por lo cual, y no se ha podido determinar de qué manera, o si ha sido secretado el factor IX de coagulación, mas allá de la determinación bioquímica de los niveles de actividad. A pesar de esta limitación, en este trabajo se evaluó, desde una perspectiva teórica, el probable impacto de las mutaciones de falso sentido no reportadas en la literatura, mediante el estudio de la estructura 3D de la proteína mutada, y se compiló la información bibliográfica de cada una. En conclusión estimamos que sí es posible asociar el fenotipo observado con el tipo y localización de la mutación encontrada; y que la población de pacientes argentinos estudiados muestra una estrecha asociación fenotipo-genotipo en la mayoría de los casos, igual o similar a la reportada en la base de datos internacional de HB.

Si bien los estudios meramente genéticos no permiten establecer con certeza que los cambios asociados a las mutaciones de falso sentido produzcan cambios en la estructura de terciaria de la proteína, se pueden citar otros mecanismos por los que un cambio tipo *missense* puede impactar el fenotipo resultante. Entre ellas mencionamos: (1) incorrecto procesamiento del ARN o *splicing*, por cambios en las secuencias exónicas de elementos *enhancer* de *splicing* (ESE), (2) inestabilidad del ARN mensajero por reducción de su vida media, de los mismos, resultando en una producción reducida o nula de la proteína, (3) inestabilidad propia de la proteína secretada, o (4) la pérdida de interacción física directa con otras proteínas o la pérdida de la actividad catalítica que le impida cumplir su función en la cascada de coagulación.

De acuerdo a datos del año 2008 de la WFH (*World Federation of Hemophilia*) (2009), la Argentina sobre una población de 40.913.584 personas, tiene registrados 1.777 pacientes con HA y 254 con HB. Esto significa que la presente serie estudiada de 51 familias constituye más del 20/ del total de pacientes con HB de argentina. Asimismo, con cinco pacientes con HB e inhibidor nuestra serie estima sobre el total de pacientes inscriptos con HB (254) una frecuencia aproximada del 2/.

CAPÍTULO II

Diseño, desarrollo y validación del método de genotipificación de los rearreglos que involucran int22h e int1h en el gen del FVIII, mediante inverse shifting-PCR.

Resultados

La estrategia de inverse shifting-PCR (IS-PCR) se basa en la amplificación específica diferencial de fragmentos de restricción circularizados que presentan cambios de secuencia asociados a determinados rearreglos genéticos y que resultan en tamaños de producto definidos y pequeños indicativos de la presencia de cada fragmento de restricción individual. Conociendo la secuencia de ADN de cada fragmento estudiado, el abordaje de IS-PCR nos da similar información que el análisis de Southern blot correspondiente. Esta estrategia de IS-PCR ha sido aplicada para investigar todos los posibles rearreglos mediados por las secuencias int22h e int1h. Estos rearreglos incluyen: la inversión molecular del intrón 22 (Inv22) y la inversión del intrón 1 (Inv1) del gen del FVIII (F8), y las duplicaciones y deleciones mediadas por int22h que son variantes estructurales aún no confirmadas en casos clínicos. La obtención de amplímeros de distintos tamaños mediante la estrategia de IS-PCR, se basa en la ubicación diferencial de primers a cortas distancias definidas de los sitios de restricción (Bcll) en cada uno de los fragmentos involucrados. De esta manera, el tamaño molecular de cada amplímero formado resulta diagnóstico de la presencia de cada fragmento (Bcll) circularizado específico en la muestra del paciente analizado. Este abordaje evita la amplificación directa a través de las secuencias int22h (9,5 kb) por PCR de larga distancia, permite detectar los patrones tipo I y tipo Il de la Inv22 y también estudiar la presencia de la Inv1, simultáneamente, sobre el mismo sustrato obtenido (ADN genómico fragmentado por Bcll y circularizado por autoligación). Asimismo, el estudio de estos fragmentos de restricción permite estudiar la eventual presencia de todas las variantes genómicas que involucran *int22h* (i.e., duplicaciones y deleciones).

Si bien el método de IS-PCR también involucra los procedimientos de restricción del ADN, autoligación de terminales y análisis por PCR como la estrategia de PCR inversa clásica, difiere de ésta en que el tamaño de los amplímeros es pequeño, conocido *a priori* por diseño (permitiendo un fino ajuste de condiciones de amplificación) e indicativo. Estas diferencias con el abordaje de PCR inversa clásico, caracterizado por tamaños de productos PCR desconocidos (a menudo obtenidos por condiciones de PCR de larga distancia o PCR anidadas), implican mejoras significativas en la robustez y confiabilidad diagnóstica a favor de la estrategia de IS-PCR.

Diseño del abordaje de IS-PCR para estudiar todos los rearreglos del int22h.

El diseño de la estrategia de IS-PCR para genotipificar los rearreglos que involucran *int22h*, fue elaborado sobre los archivos de ADN genómico humano, ubicando las secuencias nucleotídicas correspondientes a los fragmentos de restricción BclI para el análisis de *Southern blot* clásico de la Inv22 según Lakich y colaboradores (1993): 21,6 Kb para la secuencia intragénica normal, 14 y 16 Kb para las secuencias extragénicas normales, 20 Kb para una de las copias rearregladas y 17,5 o 15,5 Kb para las copias recíprocas rearregladas (tipo I o tipo II respectivamente). La secuencia nucleotídica correspondiente al *F8* y la región telomérica del cromosoma X, conteniendo las secuencias extragénicas *int22h*-2 y -3, fueron anotadas en el archivo de *GenBank* NC_000023.10 desde la base 154064063 incluyendo la región 3' UTR del *F8* a la base 155270560 correspondiente a la región telomerica Xq. (Fig. 12, diagrama 1)

El estudio de las secuencias nucleotídicas de los fragmentos de restricción BcII que involucran *int22h* permitió el diseño un *set* de *primers* orientados hacia los sitios de restricción BcII (divergentes) para determinar su convergencia por la autoligación y producir una señal de amplificación diferencial reconocible, específica de cada fragmento. Para evitar la obtención de productos de amplificación no específicos, las secuencias genómicas de los fragmentos BcII relevantes (secuencia relevante de cada círculo armada *in silico* con una Kb río arriba y río abajo del sitio BcII ya ligado) fueron "enmascaradas" para evitar secuencias repetidas (*LINE y SINE, long y short interspersed nuclear elements y LTR, long terminal repeats*) en el diseño de *primers*. Se encontraron SINEs como ALU y MIR, un LTR (MaLR) y LINEs (L1, CR1), por lo que los potenciales sitios específicos de los *primers* se vieron restringidos a regiones libres de ADN repetitivo.



Figura 12. Sistema basado en IS-PCR para la genotipificación de los fragmentos Bcll que involucran int22h. Los diagramas (1 a 9) muestran esquemas del cromosoma X desde la region 3'UTR del gen del F8 hasta el telómero Xq (indicado como círculo cerrado). El sitio de reconocimiento de la enzima de restricción Bcll se indica como B. Las posiciones nucleotídicas relevantes son indicadas respecto del archivo GenBank NC 000023.10 (diagrama 1). Los diagramas muestran los alelos normales (N) variante estructural eventualmente polimórfica h123 y h132 (diagramas 2 y 3, respectivamente), la Inv22 tipo I, la Inv22 tipo II (diagramas 6 y 7, respectivamente), la duplicación en tándem (Dup22) variantes [1-2/1-2-3] y [1-3/1-2-3] (diagramas 4 y 5, respectivamente) y la deleción del exón 1-22 del F8 (Del22) semejante a la inversión de tipo I (Del22-1) o del tipo II (Del22-2) (diagramas 8 y 9, respectivamente). Las secuencias funcionales de F8 están indicadas en verde, mientras que secuencias no funcionales de F8 se indican en rojo. La gama de color indica secuencias oscuras más cercanas al promotor, y las claras, más cercanas a la región 3' del F8. Dentro del F8, int22h-1 se indica como una caja-flecha en negro, int22h-2, en gris, e int22h-3, en blanco. Los brazos centroméricos y teloméricos del gran palíndromo de 168 Kb que incluye int22h-2 e int22h-3 están indicadas con flechas en violeta, y la región de copia única central que separa las regiones repetidas se muestra en una gama de gris a blanco, indicando cercanía con int22h-2 e int22h-3, respectivamente. Los sitios específicos de los primers para la Inv22 por IS-PCR, IU, 2U, 3U, ID y ED; son indicados con triángulos sólidos orientados hacia el sitio Bcll relevante en cada caso.

Es importante indicar que la notación de la orientación de las secuencias *int22h* que fue utilizada en este trabajo corresponde a la dirección de transcripción del *F8*: las regiones vecinas río arriba (*upstream*) del homólogo intragénico *int22h*-1 corresponden a secuencias más cercanas al promotor del *F8*; y en el caso de las secuencias extragénicas (*int22h*-2 y -3), se aparean con sus homólogos intragénicos y se aplica la misma notación que para *int22h*-1.

El fragmento de restricción BcII de 21,6 Kb correspondiente a la secuencia normal e involucra los *primers* IU (Intragénico *Upstream*) e ID (Intragénico *Downstream*) ubicados a 460 y 27 pb respectivamente del sitio BcII, generando una señal de 487 pb (Fig. 12 diagramas 2 y 3, Tabla 6). Los fragmentos de 14 y 16 Kb de las secuencias normales extragénicas muestran secuencias virtualmente idénticas río abajo, por fuera de *int22h*, indicando que la homología de estos *loci* extragénicos se extiende más allá de los límites de *int22h*. El segmento homólogo se extiende más de 2,2 Kb por fuera de *int22h* y por ello incluye el sitio BcII extragénico río abajo. A 99 pb de este sitio BcII se ubica el primer ED (Extragénico *Downstream*). En cambio la secuencia que incluye los sitios de restricción BcII río arriba de las secuencias *int22h* extragénicas están ubicados sobre una región de copia única, de 67 Kb que separa y diferencia las copias *int22h*-2 y -3. En esta región de copia única se ubicó, a 306 pb del sitio de restricción BcII río arriba de la copia *int22h*-3, el *primer* 3U (*int22h*-3 Upstream) y río arriba de la copia *int22h*-2, el primer 2U (*int22h*-2 Upstream) a 358 pb del sitio BcII, generando las señales de 405 y 457 pb respectivamente (Fig. 12 diagramas 2 y 3, Tabla 6). El entrecruzamiento recíproco de *int22h*-1 puede darse con cualquiera de las dos copias extragénicas *int22h*-2 o -3 (más cercana al telómero Xq) y se asocian a dos fragmentos de restricción distintos: 17,6 Kb, que contiene la quimera entre *int22h*-3 río arriba (3U) e *int22h*-1 río abajo (ID) en la Inv22 tipo I y de 15,5 Kb, con la quimera entre *int22h*-2 río arriba (2U) e *int22h*-1 río abajo (ID) en la Inv22 tipo II. En ambos tipos de Inv22 también se produce una copia recíproca a las nombradas, de 20 Kb, que contiene la quimera entre *int22h*-1 río arriba (IU) y río abajo, el segmento extragénico de secuencias compartidas entre *int22h*-2 o -3 (ED). El entrecruzamiento recíproco que genera la inversión se producirá con la copia que se encuentre en orientación invertida respecto de la copia intragénica (Fig. 12 diagrama 6 y 7). Sobre la variante estructural h123 de la hipótesis de Bagnall y colaboradores (2005) (NC_000023.10 secuencia de referencia) la recombinación entre *int22h*-1 e *int22h*-2 genera la Inv22 tipo II. En ambos casos, la copia no involucrada en la inversión queda intacta, círculo Bcll de 14 Kb en la Inv22 tipo I y el circulo Bcll de 16 Kb en la Inv22 tipo I (Fig. 12 diagrama 6 y 7).

La hipotética recombinación entre copias de *int22h* de igual orientación genera potencialmente: (a) una duplicación que abarca un segmento de 0,5 Mb definido desde *int22h*-1 hasta la copia más centromérica de *int22h* en cada variante estructural asociada a un fragmento de restricción adicional de 20 Kb (Dup22) no asociado a hemofilia (Fig. 12 esquema 4 y 5), y (b) una deleción del mismo fragmento de 0,5 Mb asociado o similar al patrón de tipo I o II según el caso (15,5 y 14 Kb, respectivamente) pero con la desaparición del fragmento de 20 Kb (Del22-1 y Del22-2 (Fig 12 diagramas 8 y 9).

La aplicación de la técnica de IS-PCR con el uso de *primers* (Tabla 6, Materiales y Métodos) específicos de cada fragmento Bcll (Fig. 12) organizados en dos reacciones separadas de PCR multiplex (*test* diagnóstico y *test* complementario) permite discriminar todas las variantes estructurales mencionadas arriba generadas por recombinación mediada por *int22h*, i.e., la Inv22 tipo I, Inv22 tipo II, Del 22-1, Del22-2, Dup22 y las estructuras normales (N, h123 o h132).

Test diagnóstico

El *test* diagnóstico para los rearreglos de *int22h* permite identificar un patrón diferencial para la Inv22 del tipo I, tipo II y el alelo normal del *F8* (variantes polimórficas hipotéticas h123 y h132) (Fig. 12 diagramas 6, 7, 2 y 3, respectivamente). El *test* utiliza cuatro *primers:* IU, 2U, 3U e ID (Fig. 12). Este grupo de *primers* genera productos PCR de 487 (ID + IU), 333 (ID + 3U) y 385 pb (ID + 2U), correspondiendo al alelo normal, inversión tipo I e inversión tipo II, respectivamente (Tabla 11).



Test Diagnostico Inv22

Figura 13: Test Diagnostico para el estudio de la Inv22. La tabla muestra los *primers* y la longitud de los amplimeros, en pares de bases (pb) para el test diagnóstico de IS-PCR. La imagen muestra los productos del análisis en una electroforesis en gel de agarosa y tinción con BrEt, Calle (1) caso negativo para la Inv22; (2) hemofílico Inv22 tipo I; (3) portadora Inv22 tipo I; (4) hemofílico Inv22 tipo II positivo; y (5) portadora Inv22 tipo II. M indica marcador de tamaño molecular (escalera de 100 pb).

Inv22	Primer	IU	2U	3U
Test Diagno	istico ID	487	385	333

En la primera reacción PCR ensayada en condiciones estándar (materiales y métodos), los resultados mostraron un sistema de señales netas, específicas e intensas (Fig. 13). Por lo tanto no fueron necesarios refinamientos adicionales en las condiciones de tratamiento ni amplificación, para mejorar la claridad y confiabilidad del sistema de análisis.

Para la validación del test diagnóstico, se estudiaron tres grupos de pacientes:

El primer grupo compuesto por 32 individuos, representando 46 cromosomas X previamente analizados por *Southern blot*, fueron estudiados a ciegas mediante la estrategia de IS-PCR, y se obtuvo una perfecta concordancia entre ambos métodos tanto para los 18 pacientes con hemofilia A severa (10 pacientes sin la Inv22, cuatro con la Inv22 tipo I y cuatro con la Inv22 tipo II), como para las 14 mujeres relacionadas a familias afectadas por HA severa (seis sin la Inv22, cuatro portadoras tipo I).

El segundo grupo compuesto por 43 pacientes previamente estudiados para la Inv22 por el método de PCR inversa desarrollado en nuestro laboratorio (Rossetti *et al*, 2005), fue reanalizado a ciegas mediante la estrategia de IS-PCR. En este caso además de confirmarse el diagnóstico molecular de todos los pacientes estudiados, se especificaron los patrones del tipo de inversión: 11 varones y 10 mujeres fueron correctamente diagnosticados como negativos para la Inv22, y 13 hemofílicos con la Inv22 y nueve portadoras fueron clasificados según el tipo de Inv22, 18 de ellos como Inv22 tipo I y cuatro Inv22 tipo II.

El tercer grupo incluyó 34 nuevos casos con HA severa sin estudios moleculares previos, que fueron estudiados por IS-PCR. En este tercer grupo, 15 probandos fueron encontrados negativos para la Inv22 y cinco presentaron la Inv22 tipo I, once mujeres de familias afectadas por HA severa resultaron negativas para la Inv22 y tres resultaron portadoras de la Inv22 tipo I.

Test complementario

El análisis teórico de las variantes que involucran recombinación homóloga sobre *int22h* indica dos rearreglos genómicos posibles: las deleciones (Del22), potencialmente causales de HA, que muestran patrones parecidos al tipo I o al tipo II según la copia extragénica involucrada; y las duplicaciones eventualmente no deletéreas (Dup22) potencialmente no causales de hemofilia (Bagnall *et al*, 2006). La aparición de estas duplicaciones o deleciones estarían asociadas al entrecruzamiento recíproco entre la copia *int22h*-1 y la copia extragénica de posición más centromérica e igual orientación (*int22h*-2 o -3, a partir de las variantes estructurales normales h123 o h132, respectivamente) generaron la necesidad para desarrollar un *test* complementario al diagnóstico, que permitiera su caracterización rápida y confiable (Fig. 12 diagramas 4, 5, 8 y 9).

El *test* complementario al igual que el diagnóstico utiliza cuatro *primers* (IU, 2U, 3U y ED). Nótese que sólo uno de los *primers* del grupo de cuatro cambia, ID por ED, y esto permite discriminar los fragmentos asociados a los rearreglos que no podían ser diferenciados por el *test* diagnóstico: (1) el alelo normal y la Dup22, con amplímeros de 457 (ED + 2U) y 405 pb (3U + ED) en ambos rearreglos, y un amplímero extra específico de la duplicación de 559 pb (IU + ED); (2) la Inv22 tipo I y la Del22 parecida al tipo I, con amplimeros de 559 (IU + ED) y 457 pb (ED + 2U) para la Inv22-I y sólo el amplímero de 457 pb (ED + 2U) en la Del22 tipo I; y (3) la Inv22 tipo II y la Del22 similar al tipo II, con amplímeros de 559 (IU + ED) y 405 pb (3U + ED)
para la Inv22-II y solo el amplímero de 405 pb (3U + ED) en la Del22 tipo II (tabla 11). Al igual que en el *test* diagnóstico, los resultados mostraron un sistema de señales netas, específicas e intensas (Fig. 14). Por estos resultados tampoco fueron necesarios ajustes técnicos adicionales.



Test Complentario

Figura 14. Test Complementario para la caracterización de todos
los posibles rearreglos que involucran int22h. La longitud de los
amplímeros, en pares de bases (pb) para el test complementario
esta determinada en función de un grupo específico de primers
(tabla). La imagen muestra los productos del análisis IS-PCR en una
electroforesis en gel de agarosa y tinción con BrEt, para el test
complementario en las mismas muestras que en la figura 2A (1-5).
M indica marcador de tamaño molecular (escalera de 100 pb).

Inv22	Primer	IU	2U	3U
Test Complen	nentario ED	559	457	405

Para validación práctica del *test* complementario, se estudiaron las mismas muestras que para el *test* diagnóstico confirmándose sólo la presencia de los patrones normales y los asociados a la Inv22 del tipo I y II, y sus combinaciones correspondientes, en mujeres portadoras; no encontrándose casos de patrón compatible a las duplicaciones y deleciones asociadas a *int22h*, descriptas en los párrafos precedentes.

La identidad de todos los amplímeros específicos del sistema de análisis IS-PCR (i.e., 487, 333, 385, 457, 405 y 559 bp) fue determinada por secuenciación de ADN. En todos los casos, se confirmaron las secuencias de ADN esperadas por el armado realizado *in silico* a partir de los archivos indicados en el diseño.

En resumen, la Tabla 11 muestra como el uso conjunto del *test* diagnóstico y complementario permite la caracterización completa de todos los posibles rearreglos que involucran *int22h* tanto en varones (cromosoma X hemicigota), como en mujeres (complemento cromosómico sexual XX).

Alelos	<i>Test</i> diagnostico ID + IU + 3U + 2U	<i>Test</i> complentario ED + IU + 3U + 2U	
Varones (46;XY)	Pb	рb	
Normal (N)	487	457, 405	
Inv22 tipo I (Inv22-1)	333	559, 457	
Inv22 tipo II (Inv22-2)	385	559, 405	
Duplicación F8 1-22 (Dup1-22)	487 559, 457, 405		
Deleción tipo I (Del22-1)	333	457	
Deleción tipo II (Del22-2)	385	405	
Mujeres (46;XX)	pb	pb	
N/N	487	457, 405	
N/Inv22-1	487, 333	559, 457, 405	
N/Inv22-2	487, 385	559, 457, 405	
N/Dup1-22	487	559, 457, 405	
N/Del22-1	487, 333	457, 405	
N/Del22-2	487, 385	457, 405	

Tabla 11: Sistema de genotipificación de los rearreglos de int22h.

Diseño del abordaje de IS-PCR para estudiar la inversión del intrón 1.

El diseño de la estrategia de IS-PCR para genotipificar la Inv1, fue elaborado sobre el archivo de GenBank NC 000023.10, donde fueron ubicados los fragmentos de restricción Bcll que contenían int1h, el fragmento de restricción Bcll de 13 kb incluye la secuencia intragénica normal (*int1h-1*) (g.154233508 154246469) el fragmento de 9,6 kb y (g.154367779_154377441), correspondiente a la copia extragénica normal (int1h-2). El entrecruzamiento recíproco entre las copias alineadas de int1h asociado al origen de la inversión del intrón 1 y realizado in silico genera dos fragmentos Bcll quiméricos: el que contiene a *int1h*-1/-2 de 12,4 kb y el recíproco que contiene a *int1h*-2/-1 de 10,2 Kb (Fig. 15). De manera similar al estudio de los rearreglos que involucran int22h el estudio de los rearreglos

de *int1h* se basó en los mapas de restricción BcII de la región genómica involucrada que permitió un diseño de *primers* con parecidas características experimentales (e.g., temperaturas de hibridación) y tamaños distinguibles de amplímeros específicos compatibles para un eventual montaje de análisis IS-PCR multiplex para ambas inversiones recurrentes. Como se

realizó para el sistema de análisis de los rearreglos de *int22h* por IS-PCR, las secuencias cercanas a los sitios de restricción Bcll relevantes, fueron "enmascaradas" para evitar secuencias repetidas y se diseñó un sistema de tres *primers*, 1-ID (Inv1- Intragénico *Downstream*), 1-IU (Inv1-Intragénico *Upstream*) y 1-ED (Inv1-Extragénico *Downstream*) que permitió la genotipificación de la Inv1 (Fig. 15).



Figura 15. Sistema basado en IS-PCR para la genotipificación de los fragmentos BCII que involucran *int1h-*. Los diagramas de 1 a 3 muestran esquemas del cromosoma X desde la región 3'UTR del F8 hasta el telóméro Xq (círculo cerrado). Los sitios de reconocimiento de la enzima de restricción BCII relevantes se indican con B. Las posiciones nucleotídicas relevantes son indicadas respecto del archivo GenBank número NC_000023.10 (diagrama 1). El diagrama 2 muestra el alelo normal y el diagrama 3, la Inv1. Las secuencias funcionales de *F8* están indicadas en verde, mientras que secuencias no funcionales del *F8* se indican en rojo; la gama de color oscuro-claro representa la dirección desde secuencias cercanas al promotor hasta la región 3' del *F8*. Dentro de F8, *int1h-*1 se indica como pequeña flecha negra e *int1h-*2, en blanco. Los sitios aproximados de los *primers* para detección de la Inv1 por IS-PCR, 1-IU, 1-ID y 1-ED, son indicados con triángulos sólidos orientados hacia cada sitio BCII relevante.

Test único para la Inv1

En cada muestra, los círculos BcII ya obtenidos para genotipificar la inversión del intrón 22 por IS-PCR, fueron reutilizados para detectar la presencia de la inversión del intrón 1. El *test* único para el estudio de la Inv1 utiliza tres *primers*, 1-ID, 1-IU y 1-ED, que generan amplímeros de 304 (1-ID + 1-IU) y de 224 pb (1-ED + 1-IU) asociado al alelo normal e Inv1, respectivamente (Fig. 15, esquemas 2 y 3).

Al igual que en todos los ensayos IS-PCR diseñados hasta el presente la primera reacción PCR ensayada en condiciones estándar (materiales y métodos) mostró señales claras, específicas e intensas (Fig. 16), por lo que no fueron necesarios ajustes adicionales en las condiciones de tratamiento y amplificación utilizadas.

M 1 2 3



Test único Inv1

Figura 16. Test único para el estudio de la Inv1. La tabla muestra la longitud de
los amplímeros IS-PCR en pares de bases (pb) determinado por los pares de
primers indicados. La imagen muestra los productos del análisis IS-PCR en
electroforesis en gel de agarosa y tinción con BrEt. Calle (1) caso negativo para
la Inv1, (2) hemofílico con la Inv1, (3) portadora de la Inv1. M indica marcador
de tamaño molecular (escalera de de 100 pb).

Inv1	Primer	1-ID	1-ED
Test único	1-IU	304	224

El método de IS-PCR para la genotipificar la Inv1 fue validado en un estudio a ciegas de 21 individuos previamente genotipificados por el método de doble PCR descripto por Bagnall y colaboradores (2002), incluyendo dos probandos de hemofilia A severa con la Inv1, una portadora heterocigota de la Inv1 y 18 individuos negativos. En todos los casos se encontró perfecta concordancia entre ambas técnicas. Asimismo, hasta el presente el análisis de la Inv1 por IS-PCR se aplicó a 13 nuevos casos no informativos para la Inv22, y no fueron encontrados más muestras con la Inv1.

Respuesta de la técnica de IS-PCR a la cantidad y calidad del sustrato de ADN.

En la rutina del diagnóstico molecular donde se utilizan muestras de pacientes de distinta edad, procedencia y condición física, y no siempre son extraídas y enviadas inmediatamente al laboratorio, la extracción de ADN resulta en un variado rango de calidades y cantidades. En consecuencia, la implementación de una técnica aplicable a laboratorios de diagnóstico molecular internacionales de alta, mediana y baja complejidad, debe incluir ensayos de robustez como para poder ser aplicada a muestras de ADN de distinta calidad. Para estimar la habilidad de la estrategia de IS-PCR para la obtención de resultados confiables en muestras de variada calidad (y cantidad) de ADN, se realizó la comparación de los resultados del test diagnóstico de la Inv22 con el análisis electroforético de las mismas muestras de ADN sustrato reflejando sus características (Fig. 17). La comparación indica que a pesar de que la integridad de las muestras de ADN impacta la intensidad de las señales de IS-PCR que se obtienen en muestras extremadamente degradadas, los resultados son netos y confiables en un amplio espectro de calidades y concentraciones de ADN.



Figura 17. Evaluación de la técnica de IS-PCR en muestras clínicas de ADN con diferentes calidades. Panel superior, análisis en electroforesis en gel de agarosa 1/ EtBr de ocho muestras de ADN mostrando diferentes calidades y concentraciones. La cantidad de muestra sembrada es igual a la utilizada como sustrato para la técnica de IS-PCR. El panel inferior muestra los resultados de la aplicación de técnica de IS-PCR para la Inv22, alineados verticalmente con las muestras de ADN del panel superior (1-8). Las regiones de tamaño molecular relevante están indicadas. Corridas 1 y 3 corresponden a portadoras de la Inv22 tipo I; 2 y 7, portadoras Inv22 tipo II; 4 y 6, hemofílicos con la Inv22 tipo II; 5, hemofílico Inv22 tipo I; y 8 mujer con patrón normal.

Detección de eventuales mosaicos

Oldenburg y colaboradores (2000) describieron el caso de una mujer portadora en mosaico de la Inv22 tipo I. Este caso fue detectado por análisis de *Southern blot* con marcación isotópica y cuantificación de señales. Debido a este hallazgo se realizó un experimento para estimar la capacidad de la estrategia de IS-PCR para detectar eventuales portadoras en mosaico de la Inv22 e Inv1. El experimento fue diseñado usando diluciones seriadas de muestras de ADNs de pacientes con la Inv22 e Inv1, en muestras de ADNs control negativo (Fig. 18); previa determinación del punto de equivalencia de templados en ambas muestras mediante una amplificación PCR independiente. Sobre estas diluciones se desarrolló la estrategia de IS-PCR utilizando el *test* diagnóstico de la Inv22 y el *test* único de la Inv1. La capacidad de detectar y analizar portadoras en mosaico del método se estimó a partir de las mediciones de densidad de

la señal fotográfica digital generada por la emisión de fluorescencia del BrEt en el análisis electroforético y su correlación con las mezclas simuladoras del mosaico (Fig. 18A). Las señales relativas del amplímero de 487 pb en el caso de la Inv22 y del amplimero de 304 pb en la Inv1, fueron calculadas según la fórmula [(señal normal) / (señal normal + señal de inversión)] para cada proporción del eventual mosaico (Fig. 18A, 18B). Los parámetros de la regresión lineal (pendiente y R^2) indican que la intensidad relativa de la señal de la Inv22 y de la Inv1) puede reflejar la composición porcentual del mosaico, porcentaje de células heterocigotas para la mutación sobre el total de células de la muestra analizada (Fig. 18A, 18B). La señal específica de la Inv22, ha sido detectada hasta que la composición del ADN mutado representaba un 2,5 /, correspondiendo ésto a un 5 / de células heterocigotas para la Inv22 en una eventual portadora en mosaico (Fig. 18A). En el caso de la señal específica de la Inv1, se ha detectado en una composición del mosaico del 10 / de células heterocigotas en una eventual portadora en mosaico (Fig. 18B).



Figura 18. Estimación de la habilidad de IS-PCR para detectar y evaluar eventuales portadoras en mosaico de la Inv22 (A) y la Inv1 (B). Las imágenes de la izquierda muestran el análisis electroforético (agarosa 2/ EtBr) de amplímeros multiplex a partir de muestras creadas artificialmente simulando portadoras en mosaico para Inv22 tipo I e Inv1 (A y B, respectivamente). El porcentaje de células de las portadoras en mosaico indica la cantidad relativa de las células portadoras de la inversión (100/ representa una portadora típica y 0/, una mujer no portadora o un mosaico bajo el límite de detección). Las flechas indican la mínima señal en mosaico que puede ser reconocida (aproximadamente 5 y 10/ de las células en mosaico, para la Inv22 y la Inv1, respectivamente). Los gráficos de la derecha muestran la regresión lineal entre la intensidad relativa de la señal de la inversión a la suma ambas señales vs la composición del mosaico (/) para las portadoras en mosaico simuladas de la Inv22 tipo I (A) e Inv1 (B). Los parámetros de la regresión lineal (R² y pendiente) se muestran en cada grafico.

IS-PCR y diagnóstico prenatal.

Para estudiar la habilidad de la estrategia de IS-PCR para ser aplicada al diagnóstico prenatal en hemofilia, este método fue aplicado a muestras de ADN extraído a partir de vellosidades coriónicas. El diagnóstico prenatal fue aplicado a un grupo familiar compuesto por una mujer, portadora de HA severa embarazada y su hijo varón hemofílico positivo para la Inv22. Se obtuvieron muestras de sangre periférica en el probando y en su madre, y, en la madre embarazada también una muestra de las vellosidades coriónicas (VC) en la semana 20 de gestación del feto propósito del estudio. La muestra de vellosidades coriónicas fue estudiada citogenéticamente indicando un feto femenino de cariotipo normal 46;XX. Cuando se tomaron las muestras (año 2002) se realizó la detección molecular de la Inv22 por Southern blot en las muestras de ADN de leucocitos de sangre periférica pero no se obtuvieron señales en la muestra de VC debido a la calidad y/o cantidad del ADN extraído. Las muestras de ADN extraídas a partir de VC del feto femenino y de un feto masculino sin antecedentes de hemofilia (utilizado como control negativo de las inversiones) y muestras obtenidas a partir de sangre periférica representando todos los posibles genotipos control fueron estudiadas por la estrategia de IS-PCR para la Inv22 e Inv1. Previendo problemas debidos a la calidad y cantidad en este tipo de muestras de VC en estos ensayos se aumentó la cantidad de ADN circularizado sustrato de PCR (de 3 a 6 μl) y el número de ciclos en el programa de amplificación (de 25 a 30). Los resultados mostraron señales netas inequívocas aunque no intensas en ambas muestras obtenidas a partir de VC y fue posible asignar el diagnóstico de portadora heterocigota de la Inv22 tipo I a la muestra del propósito y de negativo para ambas inversiones al feto masculino utilizado como control (Fig. 19) (Radic et al, 2009).

Inv22	Primer	IU	20	3U
Test diagnóstico	ID	487	385	333
		Normal	Tipo II	Tipo I

Inv1	Primer	1-ID	1-ED
Test único	ID	304	224
		Normal	Inv1 +





Inv 22 Test diagnóstico





Inv 1 Test único

Figura 19. Diagnóstico prenatal mediante la estrategia de IS-PCR. En el panel superior se muestran las tablas indicando la estrategia de genotipificación en cada caso, Inv22 (izquierda) e Inv1 (derecha). En las imágenes del panel inferior se muestra el análisis de productos IS-PCR en electroforesis en gel de agarosa y tinción con BrEt. *Test* diagnóstico Inv22, calle (1) caso negativo para la Inv22; (2) hemofílico con la Inv22 tipo II; (3) portadora de la Inv22 tipo II; (4) hemofílico con la Inv22 tipo I; (5) portadora de la Inv22 tipo I; (6) muestra de vellosidades coriónicas (VC) del feto femenino (propósito), que resulta en portadora heterocigota de la Inv22 tipo I; y (7) muestra de VC de un feto varón negativo para la Inv22. Test único para la Inv1, calle (1) caso negativo para la Inv1; (2) hemofílico Inv1 positivo; (3) portadora Inv1; (4) muestra de VC del feto propósito, negativo para la Inv1; y (5) muestra de VC del feto varón negativo para la Inv1. M indica marcador de tamaño molecular, escalera de 100 pares de bases.

Estimación de la eficiencia de formación de círculos de ADN.

Como la formación de círculos (fragmentos de ADN autoligado) es el paso clave para todos los protocolos de PCR inversa, fue diseñado un experimento para estimar la eficiencia de circularización en muestras clínicas (Fig. 20). La eficiencia de circularización es inversamente estimada en unidades de Templados Por Círculo (TPC). TPC indica el número promedio de templados de ADN originales que son necesarios para formar un círculo de ADN. Las unidades TPC en cada muestra fueron obtenidas por interpolación de las intensidades relativas de las señales de un sistema PCR *multiplex*, con la cuantificación de dos templados: uno obtenido cuando se genera efectivamente el círculo BcII (templado dependiente de circularización, TDC), y corresponden en un caso a la amplificación del círculo del alelo normal de 21,6 Kb, mediante

los primers IU e ID (TDC1) señal de 487 pb y en otro caso a la amplificación del alelo circularizado del fragmento de la inversión de 20 Kb mediante los primers ID y ED (TDC2), señal de 559 pb; y el otro templado independiente de circularización y restricción Bcll, (TIC), produce una amplificación positiva tanto en los casos donde se produce la circularización como en los fragmentos de ADN no circularizados, con amplificación del exón 22 del F8, con primers 22A y 22B y una señal de 228 pb. Para poder calcular la eficiencia de circularización en muestras clínicas, fue creada artificialmente una curva de calibración, partiendo de mezclas de dos constructos: (#1) definido por la estructura TDC1-ADN espaciador-TIC y (#2), TDC2-ADN espaciador-TIC, donde TDC1, TDC2 y TIC son los templados indicados más arriba. Cada constructo representa una relación uno a uno de los templados que lo componen. Para la curva de calibración se realizaron diluciones seriadas del constructo #1 en el #2 manteniendo constante la concentración total y se desarrolló una PCR multiplex con los primers IU+ID (que amplifica TDC1) y 22A+22B (TIC); y se evaluaron las densidades relativas de ambas señales en cada mezcla (punto de la curva). Entonces, a partir de una muestra que contiene constante el constructo #1, mezclado con diluciones del constructo #2, se obtienen las relaciones de templados TDC:TIC, de 1:1, 1:2, 1:6, 1:26, 1:126, 1:626 y 1:3126 que representan las unidades de 1, 2, 6, 26, 126, 626 y 3126 TPC, respectivamente. Las intensidades relativas de las señales fueron estimadas sobre los productos finales de la reacción en gel de agarosa teñido con Br Et, y graficadas respecto de las unidades TPC, relativa eficiencia en la formación de 21,6 kb (Fig. 20). En un experimento independiente, para poder estimar la eficiencia de la formación del círculo de 20 kb, se realizaron las mezclas recíprocas, en este caso usando el constructo #2 como constante mezclado con diluciones del constructo #1. Los resultados, similares en ambos casos, se muestran en la Figura 20 C.



Figura 20. Estimación de la eficiencia de circularización en muestras clínicas de ADN. (A) Se muestran los resultados del análisis elecroforético (en gel de agarosa al 1 / y tinción con *Br Et*), de la curva de calibración (8 calles) y 7 muestras clínicas (4 varones sin la Inv22 y 3 mujeres, una de ellas portadora heterocigota de la Inv22). TDC es Templado Dependiente de Circularización, y TIC, Templado Independiente de Circularización. El esquema a la derecha los constructor #1 y #2, con los tamaños relativos de cada producto PCR. La intensidad relativa de señal fue calculada como TDC/(TDC+TIC) y graficada respecto a las unidades TPC (Templados Por Circulo). El error en la intensidad relativa de señales fue arbitrariamente estimado por el valor correspondiente a la mezcla de templados 1:626 y el error de los TPC fue propagado a partir de este error usando el método de derivadas parciales ($\epsilon y = \epsilon x. \delta y / \delta x$) en la curva de regresión. (B) Estimación de la eficiencia de circularización para los fragmentos de 21,6 Kb (círculos verdes), 7 casos y de 20 Kb (círculos rojos), 6 casos. (C) Evaluación de la calidad y la concentración de las muestras utilizadas en los ensayos de eficiencia de circularización en el protocolo de IS-PCR (electroforesis en gel de agarosa de 12 muestras de ADN genómico).

En resumen, este procedimiento asocia altas eficiencias de circularización a bajos valores de TPC y menores eficiencias a mayor número de unidades TPC.

La eficiencia de formación del círculo Bcll de 21,6 Kb fue estimada en siete muestras mostrando un promedio de 4 TPC (rango 1,8-8,7) (Fig 20 B). Para el círculo Bcll de 20 Kb fueron evaluadas seis muestras resultando un promedio de 7 TPC (rango de 2-11,7). Una muestra correspondiente a una mujer portadora heterocigota de la Inv22, pudo ser evaluada para estimar la eficiencia de formación de los dos círculos (i.e., 21,6 y 20 Kb) resultando en eficiencias muy similares (2 y 1,9 TPC, respectivamente) (Fig. 20B). Esta evidencia en ensayos independientes sobre la misma muestra es confirmatoria de la cantidad de la estimación de eficiencias. A pesar que, en base teórica, el principal factor que podría influir en la eficiencia de circularización es la calidad (integridad) del ADN sustrato, los resultados indican como factor más importante la cantidad de la muestra de ADN. Bajas o moderadas cantidades iniciales de ADN sustrato se asocian con mayores eficiencias (2-3 TPC) mientras que altas cantidades de ADN resultan inadecuadas para completar eficientemente la circularización (Fig. 20C)

Discusión

Se presentó un nuevo método de genotipificación para la inversión del intrón 22 e inversión del intrón 1, basado en la estrategia de *inverse shifting*-PCR. El abordaje basado en PCR inversa en su variante *multiplex* ha sido aplicado en este caso para estudiar la presencia de rearreglos genómicos reales o potenciales específicos definidos por recombinación homóloga involucrando a los duplicones *int22h* e *int1h*.

El diseño del sistema de análisis por IS-PCR fue inspirado en el cambio de las señales observado en las autorradiografias del análisis de *Southern blot* clásico de Lakich y colaboradores (1993) que permite distinguir los distintos tipos de la inversión del intrón 22, un patrón de 21,6, 14 y 16 Kb corresponde al alelo normal; uno de 17,5, 14 y 20 kb a la Inv22 del tipo I, y el de 15,5 16 y 20 kb, a la Inv22 del tipo II.

El desarrollo de la estrategia de IS-PCR representa una mejora respecto del método previamente desarrollado en nuestro laboratorio también basado en PCR inversa (Rossetti *et al*, 2005). Este nuevo abordaje permite discriminar, mediante el *test* diagnóstico, el tipo de inversión del intrón 22 (tipo I o II), sin cometer errores al asignar las Del22 en el grupo de las Inv22, ya que ambas son mutaciones deletéreas para el *F8* y causales de HA severa; y a las Dup22 en el grupo de las variantes no asociadas a hemofilia por contar con una copia del *F8*

intacta, no involucrada en el rearreglo. En el laboratorio de Genética Molecular de la Hemofilia, el uso del *test* diagnóstico para genotipificar tanto la Inv22 como la Inv1 sobre el mismo sustrato, los fragmentos de restricción Bcll autoligados, en iguales condiciones de PCR y termociclado, y electroforesis analítica en el mismo gel de agarosa de manera simultánea, permite ahorrar recursos y acortar los tiempos de genotipificación de ambos rearreglos.

El *test* complementario fue desarrollado para permitir el estudio de las variantes teóricas que involucran *int22h* aún no reportadas en la literatura en casos clínicos bien caracterizados. Bagnall y colaboradores (2005) revisando la literatura, encontraron el caso de una mujer afectada por recurrentes abortos espontáneos, mostrando sesgo extremo en la inactivación del cromosoma X asociado a una gran deleción en heterocigosis en Xq28 (Pegoraro *et al*, 1997). Los autores sugirieron que esta gran deleción en heterocigosis no completamente definida podría corresponder a la Del22 (Fig. 12). Si éste fuera el caso, la Del22 podría ser encontrada exclusivamente en mujeres heterocigotas con algún grado de compromiso en su fertilidad, sin síntomas de sangrado, porque los niveles normales de FVIII:C serían imputados al sesgo extremo en la inactivación sobre el cromosoma X portador de la deleción.

Es interesante razonar que si la Inv22 tipo I y la Inv22 tipo II presentan frecuencias relativas determinadas por la abundancia relativa de las variantes normales h123 y h132 (4:1) (hipótesis de la inversión polimórfica de Bagnall *et al*, 2005), la Del22 del tipo II que ocurriría sobre la variante h123, es esperada como, aproximadamente cuatro veces más frecuente que Del22 tipo I que ocurriría sobre cromosomas normales con la variante h132. En resumen, la relación de frecuencias de los tipos de Inv22, Inv22-I/Inv22-II sería reflejo de la relación entre las variantes h123/h132 y sería también encontrada en las eventuales deleciones Del22-II/Del 22-I (Fig. 12).

Una reciente comunicación de la organización de Centros Médicos de Hemofilia del Reino Unido de Gran Bretaña (UKCDO) (Green *et al*, 2007) discute como las duplicaciones involucrando *int22h* del *F8* pueden ser una causa de preocupación para el diagnóstico molecular de la inversión del intrón 22 y el asesoramiento genético en HA. A partir de la experiencia de los laboratorios de genética diagnóstica en hemofilia, ellos dedujeron que estas duplicaciones aludidas o bien no existirían, o que, si existieran, serían extremadamente raras. Aún así, para evitar potenciales falsos positivos, este grupo recomienda que en los casos con resultados de Inv22 positivos en mujeres diagnosticadas mediante el método de PCR de larga distancia descripto por Liu y colaboradores (1998), éstos sean validados con análisis cualitativos (usando por ejemplo el polimorfismo de repetición del motivo CA en el intrón 13 del *F8*) y cuantitativos (por medición de dosis génica del segmento eventualmente duplicado dentro del *F8* entre los exones 1 al 22, Fig. 12, Dup22). El uso combinado del *test* diagnóstico y complementario de la Inv22 presenta una alternativa rápida y efectiva para discriminar estas eventuales duplicaciones y deleciones por recombinación entre copias de *int22h* que pueden causar confusión en el diagnóstico molecular de la HA.

En un análisis retrospectivo de la literatura, encontramos que Peretz y colaboradores (1994) reportaron un entrecruzamiento desigual entre una copia de estructura normal del *F8* y una invertida, ligando ambas copias en el mismo cromosoma X en la hermana de un paciente con hemofilia A severa. La re-evaluación de las características asociadas al caso reportado por Peretz y colaboradores sugieren que la duplicación de las secuencias *F8* que complicaron el análisis de portadora de la Inv22 en la paciente, podría haber correspondido a un caso de Dup22 heterocigota donde ambos cromosomas X son portadores de una copia intacta del *F8* y por lo tanto no estarían asociados al desarrollo de hemofilia cuando segregaran hacia un varón en hemicigosis. En conclusión, consideramos que las duplicaciones mediadas por *int22h*, Dup22, aunque de presencia no bien caracterizada en casos clínicos reportados, aún representan un riesgo de diagnóstico falso positivo de la Inv22 cuando no son específicamente asignadas. La estrategia de IS-PCR, mediante la aplicación combinada de los *test* diagnóstico y complementario, permite distinguir entre cada una de las variantes estructurales que involucran *int22h* sean éstas causales o no de HA, y en consecuencia, evitan potenciales errores diagnósticos.

En conclusión, la aplicación de la estrategia de IS-PCR mediante el *test* diagnóstico y complementario, representa una mejora significativa respecto al método previo de PCR inversa (Rossetti *et al*, 2005) y al método original basado en PCR de larga distancia (Liu *et al*, 1998) porque evita posibles errores diagnósticos; y también respecto a las técnicas que sí detectan todos los posibles rearreglos de *int22h*, la técnica de *Southern blot* (Lakich *et al*, 1993) y el nuevo sistema basado en PCR de larga distancia (Bagnall *et al*, 2006), debido a que reúne las virtudes de ambas, pues es tan rápida como los métodos de LD-PCR y tan robusta como el de *Southern blot* pero reduce largos y trabajosos procedimientos y evita el uso de material radioactivo que debe ser manejado por personal entrenado y habilitado.

La estrategia de IS-PCR fue evaluada en su habilidad de detectar portadoras en mosaico de la Inv22 o Inv1 de manera semicuantitativa, dando un resultado confiable en eventuales portadoras con una composición límite estimada del 5/ y 10/ de células heterocigoras para la Inv22 e Inv1, respectivamente. Esta característica del abordaje de IS-PCR permitirá detectar mosaicos de la Inv22 como antes sólo ha podido lograrlo el análisis de *Southern blot* (Lakich *et al*, 1993) y no las técnicas basadas en PCR de larga distancia, y provee una herramienta para investigar eventuales mosaicos en portadoras de la Inv1 donde la técnica de detección asequible hasta el presente, doble PCR multiplex desarrollada por Bagnall y colaboradores (2002), no lo permite.

El diagnóstico prenatal para la detección de la Inv22 actualmente puede resolverse mediante la estrategia de *Southern blot* (Lakich *et al*, 1993) o por PCR de larga distancia (Liu *et al*, 1998; Belvini *et al*, 2001) cuando la calidad del ADN extraído de las muestras de vellosidades coriónicas supera ciertos estándares requeridos. En el caso de la detección prenatal de la Inv1, la estrategia desarrollada por Bagnall y colaboradores (2002) de doble PCR ha sido utilizada en otros laboratorios con resultados satisfactorios (Salviato *et al.*, 2007; Liang *et al.*, 2008). El método de IS-PCR propuesto mostró ser efectivo en la detección prenatal de la Inv22 a partir de muestras de vellosidades coriónicas, mostrando señales netas tanto para el *test* diagnóstico de la Inv22 como para el test único de la Inv1.

El resultado de los experimentos conducidos para la estimación de la eficiencia de circularización, procedimiento clave en los protocolos de PCR inversa, indica la importancia de mantener grandes volúmenes de ligación y poco DNA sustrato, esenciales para asegurar grandes distancias intermoleculares promedio entre los fragmentos de restricción, de modo de favorecer la ligación de los extremos de una misma molécula y la formación de círculos de ADN, por sobre la ligación entre distintas moléculas (ligación lineal). En los mismos experimentos se pudo estimar que, entre los rangos estándar de las extracciones de rutina en los laboratorios de genética molecular diagnóstica, la calidad del ADN sustrato del método de IS-PCR no constituye un factor limitante para la eficiencia en la formación de círculos. Este último hallazgo parece contrastar con especulaciones realizadas desde el análisis teórico.

CAPÍTULO III

Análisis de la expresión de Hemofilia en mujeres. Inactivación del cromosoma X.

Resultados

En hemofilia, como en otros desordenes recesivos ligados al cromosoma X, los varones resultan afectados y las mujeres portadoras. La expresión fenotípica de estos desordenes en mujeres es un fenómeno inusual, sin embargo se han observado algunos casos tanto en nuestra población, como en numerosos reportes de la literatura.

Para estudiar la causa de la expresión fenotípica de hemofilia A severa en mujeres de nuestra población, se determinó en primer lugar, el tipo de mutación y la cigosidad asociada en seis mujeres con desarrollo de síntomas de HA severa para determinar el número de alelos mutados involucrados.

En segundo lugar, en mujeres con genotipo heterocigota para mutaciones causales de HA severa, se determinó el patrón de inactivación del cromosoma X (XIP) mediante el sistema HUMARA (*human androgen receptor*), con el objetivo de explicar la expresión fenotípica, esperando en principio una asociación directa entre desarrollo de síntomas de HA y la observación de sesgo completo en la inactivación del cromosoma X.

Asimismo, se estudió la correlación entre el estado de inactivación del cromosoma X en células nucleadas de sangre periférica y los niveles de FVIII:C en mujeres portadoras heterocigotas para mutaciones asociadas a HA severa, sintomáticas y no sintomáticas y también en mujeres no portadoras como control indicativo de la dispersión de datos del nivel de FVIII:C. Para este estudio se presentaron distintos modelos de correlación, el modelo V y dos modelos alternativos sin base biológica, modelo A y modelo promedio de portadoras, estos modelos fueron comparados con el modelo promedio de no portadoras donde está asegurada la independencia entre el nivel de FVIII:C y XIP. Los resultados del estudio en muestras de sangre periférica indican que no puede ser descartado el modelo V de correlación entre el nivel del FVIII:C y XIP en portadoras heterocigotas de HA severa. En algunos casos se estudio en paralelo el XIP en células descamadas de mucosa bucal para explorar potenciales diferencias en el estado de inactivación del cromosoma X en distintos tejidos.

Estudio de mutaciones del F8 y cigosidad en mujeres.

En la serie de 72 mujeres relacionadas con hemofílicos A severos incluidas en el estudio, 21 correspondían a la serie histórica del laboratorio, quienes al momento de inicio del trabajo ya presentaban diagnóstico molecular de la mutación causal: 15 portadoras (dos de ellas con síntomas de hemofilia A) y 6 no portadoras. En las 51 mujeres restantes, en los casos donde había sido estudiada la mutación en el probando, directamente se buscó el cambio especifico en las mujeres de la familia. En los casos donde el probando no tenía estudiada la mutación o no se tuvo acceso a su muestra, se aplicó el algoritmo de análisis para el *F8* sobre la eventual portadora (materiales y métodos) (Tabla 12 y Tabla 13).

Status	Número de casos
Inv22	13
Inv1	1
Pequeñas deleciones inserciones	10
Sustituciones nucleotídicas	18
Portadoras obligatorias (mutac. no det.)	2
Total portadoras	44
Total indeterminadas	4
Total no portadoras	24

Tabla 12. Status de las mujeres estudiadas en la serie. Se detallan el número de casos y las mutaciones encontradas en las portadoras de HA severa. Las portadoras obligatorias corresponden a hijas de hemofílicos en las cuales no pudo ser determinada la mutación, al igual que en los casos de mujeres indeterminadas, también se muestra el número de mujeres no portadoras encontradas en la serie estudiada.

La serie estudiada mostró 44 mujeres portadoras de HA severa, 4 indeterminadas y 24 no portadoras. El espectro de mutaciones encontradas en las mujeres del estudio se muestra en la tabla 13. En los casos donde no se pudo establecer el status de portadora de hemofilia, dichas mujeres no formaron parte del estudio final de inactivación del cromosoma X.

Ajuste y validación de distintos abordajes para el análisis de los patrones de inactivación del cromosoma X mediante el sistema HUMARA.

Para estudiar patrón de inactivación del cromosoma X (XIP), primero se ajustó el método de análisis del sistema HUMARA en comparación al método de referencia descripto por Allen y colaboradores (1992, materiales y métodos), en muestras de ADN genómico humano control, extraídos mediante la técnica de *salting out* a partir de leucocitos de sangre periférica. En primera instancia se ajustó un esquema de amplificación por PCR *touch down*, utilizando distintos ciclados hasta obtener una señal específica neta en geles de poliacridamida no desnaturalizante de baja resolución (10 cm y tinción con plata). Para determinar la identidad de los amplímeros observados en las placas autorradiográficas, fue sometido a secuenciación automática-fluorescente de ADN un producto PCR correspondiente a una muestra que mostró un único alelo (P39). El patrón de la secuencia obtenido fue comparado *in silico* con el archivo de *GenBank* correspondiente a la secuencia HUMARA (materiales y métodos) confirmó el número de repeticiones estimado por comparación con la secuenciación manual de un producto PCR de tamaño y secuencia conocida, corrido en paralelo (Fig. 21). La muestra (P39) mostró un producto de 285 pares de bases, con 22 repeticiones del trinucleótido CAG.



Figura 21. Autorradiografía de electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante de alta resolución. Se muestra un segmento de la autorradiografía conteniendo la secuenciación manual del un producto de 500 pares de bases de secuencia conocida (T, C, A, G) y muestras sin el tratamiento con la enzima de restricción sensible a metilación de siete portadoras (P4, P7, P39, P10, P8, P15, P16), un caso no determinado (ND1) y un control normal (CN14); la señal de P39 muestra un único alelo, y las señales de las otras muestras se presentan en heterocigosis. Abajo, se detalla el número de repeticiones del trinucleótido CAG para cada alelo HUMARA.

En este ajuste también fueron incluidas muestras de 5 mujeres que tenían confirmado status de portadora (casos P5, P6, P7, P8, P10), y un caso que presentaba síntomas moderados de

hemofilia aunque resultó indeterminado y fue excluido de la serie para el estudio de inactivación del cromosoma X (caso ND1) (Fig. 22).



Figura 22. Análisis del STR-HUMARA mediante autorradiografía. Se indican los patrones de señal obtenidos con (D) y sin (Sd) el tratamiento con la enzima de restricción sensible a metilación Hpall. Abajo, se detallan los alelos HUMARA obtenidos indicando el número de repeticiones del trinucleótido (CAG), en las muestras de dos portadoras (P7, P10), dos casos no determinados (ND2, ND1) y tres controles normales (CN5, CN15, CN8).

Con el objetivo de evitar el uso de radioisótopos, se desarrollaron tres métodos alternativos para el análisis del XIP. Catorce casos; tres casos de la población control (CN7, CN9, CN12), cinco casos de mujeres portadoras confirmadas (P5, P6, P7, P8, P10) (Fig. 22), cuatro casos de mujeres no portadoras confirmadas (NP2, NP3, NP6, NP7) y dos casos indeterminados (ND1, ND2), fueron estudiados simultáneamente mediante el abordaje clásico con uso de marcación radioisotópica y desarrollo de autorradiografías por exposición (Allen *et al*, 1992) y tres métodos alternativos para resolución electroforética del producto obtenido por PCR-*touchdown* no radiactiva.

Los métodos alternativos utilizados fueron: (1) electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante, de alta resolución (en las mismas condiciones que los geles para secuenciación de ADN descriptos por Allen *et al*, 1992, sin el uso de material radiactivo) (Naumova *et al*, 1995), (2) electroforesis en gel de poliacrilamida medianamente desnaturalizantes de alta y baja resolución (CSGE-PAGE), y (3) electroforesis en gel de poliacrilamida no desnaturalizantes de alta resolución (materiales y métodos). En todos los casos el revelado fue por tinción con sales de plata. Para la elección del método óptimo se determinó la capacidad de discriminación de dos alelos contiguos (e.g., 24-25 repeticiones del motivo CAG del STR-HUMARA) y la reproducibilidad del método. El método (3) presentó un mayor poder se discriminación alélica y mejor reproducibilidad en tres experimentos independientes.

El análisis preliminar de amplímeros mediante el sistema (3) de baja resolución fue realizado para identificar la presencia y abundancia relativa de la/s señales específicas. En algunos casos fue posible determinar la presencia de señales en heterocigosis (Fig. 23). Los geles de alta resolución permitieron resolver los alelos de todas las muestras heterocigotas, validando los resultados obtenidos mediante autorradiografías del método de referencia (Fig. 24, Tabla 13).



Figura 23. Análisis preliminares del STR-HUMARA mediante electroforesis en gel de poliacrilamida no desnaturalizante de baja resolución. Se muestran las señales obtenidas a través de un gel de poliacrilamida de baja resolución para cuatro muestras, casos P3, P9, P11 y P16, en cada caso se detallan el tratamiento (D) o no (Sd) con la enzima de restricción sensible a metilación *Hpa*II. Nótese que a pesar de la resolución limitada en algunos casos muestran dos señales indicando la condición heterocigota para el polimorfismo de repetición (CAG)n, caso P3 y P9. Esta instancia de análisis se aplica para evidenciar el éxito de la amplificación PCR y para ajuste de intensidades para la siembra del análisis de alta resolución.

En la población control de ajuste técnico sin datos de factor (Tabla 13, CN), 14 de los 20 casos (70 /) resultaron heterocigotas para el polimorfismo (CAG)n de HUMARA. En la población de portadoras de HA severa, 38 de las 44 mujeres estudiadas (86/) resultaron informativas para el STR-HUMARA y de las 24 no portadoras de HA, 21 (88/) también mostraron heterocigosis para el polimorfismo (CAG)n del sistema HUMARA (Tabla 13), al igual que las cuatro mujeres indeterminadas (datos no incluidos en la tabla 13). En resumen, 15 del total de 92 mujeres estudiadas (16/) resultaron no informativos para el STR-HUMARA, usando el sistema de electroforesis en gel no desnaturalizante de alta resolución (sistema 3) y fueron excluidos del estudio de la inactivación del cromosoma X y la eventual asociación entre el patrón de inactivación y el nivel de FVIII:C.





Estimación cuantitativa del patrón de inactivación del cromosoma X (XIP).

La evaluación densitométrica cuantitativa de las señales de las autoradiografías y geles teñidos con plata coloidal capturadas por fotografía digital fue realizada con asistencia de *Sofware* especializado (Fig. 25). El patrón de inactivación del cromosoma X (XIP: *X-chomosome lnactivation Pattern*), calculado mediante la fórmula XIP = 100 – 50 x (A'/A) x (A+B) / (A'+B') (siendo A y B las señales de amplificación del ADN no-tratado, y A' y B' las correspondientes al pretratamiento del ADN sustrato de amplificación por PCR con la enzima Hpall), es un porcentaje asimétrico cuyos límites inferior 50/ y superior 100/ indican ausencia de sesgo y sesgo completo, respectivamente. En los casos de muestras con señales alélicas contiguas (e.g., 23-24 repeticiones CAG) se realizaron correcciones por *slippage* (materiales y métodos) estimando y restando el aporte del alelo de mayor tamaño sobre el menor. En la tabla 13 se detallan los resultados de XIP obtenidos para todas las muestras 82 casos (se excluyen cuatro casos indeterminados para el *F8* y seis casos de la población general con un único alelo HUMARA). Los datos del XIP fueron obtenidos como un promedio entre tres mediciones densitométricas de geles con muestras digeridas, amplificación PCR y electroforesis

independientes para asegurar reproducibilidad del ensayo. Los resultados de la evaluación individual del XIP por el sistema HUMARA y su composición alélica se muestran en la tabla 13.



Figura 25. Densitometria de señales del STR-HUMARA y comparación de métodos. A. Análisis de placa autoradiográfica de la muestra P10. Señales obtenidas con (D) y sin (SD) el tratamiento con la enzima Hpall sensible a metilación, XIP 97,6/. B. Análisis de electroforesis en gel de poliacrilamida no desnaturalizante teñido con plata de la muestra P10, XIP 97,9/. Igual que en (A) panel superior muestra las señales sin digestión (SD), y panel inferior, las señales obtenidas después del tratamiento con Hpall (D).

	EV/III-C	Edad	Sis	stema HL	JMARA			
Caso		Euau (años)	#	#	Longitud	XIP (⁄)		Mutación
	01/ul	(anos)	Alelos	Rep.	fragmento			
Portadoras heterocigotas								
P1	40	35	2	23/21	288/282	9	3.2	c.6919_6920delGA Ex 26
P2	44	-	2	26/19	297/276		72	Inv22
P3	25	-	2	26/23	297/288	8	2.4	Inv22
P4	30	-	2	28/26	303/297	8	9.5	c.6769A>G Ex 25 p.2238Met>Val Do C2
P5	40	33	2	25/23	294/288	67.6	70.6	Inv22+/-
P6	80	35	2	24/20	291/279	59.8	55	c.1754T>C Ex12 p.566lle>Thr Do A2
P7	<1	14	2	25/24	294/291	79.5	75.1	c.4388_4391delCTTT Ex 14
P8	40	25	2	23/22	288/285	54.4	58	c.6544C>T Ex21 p.2163 Arg>Cys Do C1
P9	38	34	2	29/22	306/285		58	c.1909A>G Ex13 p.618Asn>Asp Do A2
P10	<1	56	2	26/23	297/288	97.6	97.9	c.578G>C Ex 4 p.174Gly>Ala Do A1
P11	91	35	2	25/21	294/282		77	c.3061delAAGA Ex 14
P12	79	28	2	25/19	294/276		74	c.6671G>A Ex 24 p.2209Arg>Gln Do C2

Tabla 13. Tabla integrada de la serie de mujeres analizada con datos clínicos individuales, de inactivación del cromosoma X, de caracterización molecular y cigosidad de mutaciones en el *F8.*

		Edad	Sis	stema HL	JMARA				
Caso		(años)	#	#	Longitud	XIF	P(∕)	Mutación	
	01/ul	(anos)	Alelos	Rep.	fragmento				
P13	65	30	2	26/20	297/279	9	7.4	Inv22	
P14	34	28	2	32/26	315/288	55.6		Inv22	
P15	1.5	22	2	29/27	306/300	9	9.2	c.4241C>A Ex14 p.1395Ser>Stop Do B	
P17	76	15	2	24/21	291/282	-	74	Inv1	
P18	107	35	2	27/18	300/273	5	1.3	c.1815C>A Ex 14 p.586Tyr>Stop Do A2	
P19	103	41	2	19/22	276/285	(91	c.1633delA Ex14 p.1192delA Do B	
P20	16	20	2	21/22	283/285	8	37	c.1633delA Ex14 p.1192delA Do B	
P21	46	-	2	24/21	291/283	6	8,8	Inv22	
P22	32	37	2	23/22	288/285	ļ	54	c.2320C>T Ex 14 p.755Gln>Stop Do B	
P23	17	22	2	21/19	283/276	5	6.5	c.3633delA Ex14 p.1192delA Do B	
P24	57	32	2	24/23	291/288	5	5,9	c.1718G>C Ex 11 p.554Cys>Ser Do A2	
P25	78	19	2	25/23	294/288	5	6,3	c.6118T>C Ex 20 p.2021Cys>Arg Do C1	
P26	55	9	2	25/21	294/283	5	7,1	c.6118T>C Ex 20 p.2021Cys>Arg Do C1	
P27	42	35	2	25/16	294/267	5	7,6	c.3756delG Ex 14	
P28	20	30	2	27/22	300/285	7	3,8	c.5130delT Ex 14	
P29	46	-	2	26/25	297/294	8	35	Inv22	
P30	70	28	2	25/21	294/283	6	6,6	c.6474T>C Ex 23 p.2139lle>lle Do C1	
P31	1,2	-	2	23/19	288/276	9	2.8	P.0	
P32	17	-	2	24/23	291/288	8	8,3	P.0	
P33	110	18	2	24/22	291/285	6	1.6	Inv22	
P34	<1	1	2	29/25	306/294	9	9,9	c.325A>G Ex 3 p.90Asn>Asp Do A1	
P35	58	35	2	29/22	306/285	9	7,8	c.325A>G Ex 3 p.90Asn>Asp Do A1	
P36	93	37	2	29/25	306/294	8	5,8	c.325A>G Ex 3 p.90Asn>Asp Do A1	
P37	58	32	2	29/25	306/294	9	7,9	c.325A>G Ex 3 p.90Asn>Asp Do A1	
P38	50	54	2	25/22	294/285	5	6,6	c.325A>G Ex 3 p.90Asn>Asp Do A1	
	T				Portadoras h	nomo-he	micigota		
P16	1.5	24	2	27/22	300/285	8	1.4	c.3633delA Ex14 **	
	<u> </u>	Porta	adoras no	o informa	ativas para el	patrón d	e inactivad	ción del cromosoma X	
P39	62	13	1	-	-		-	Inv22	
P40	126	-	1	-	-		-	c.2014_2016delTTC Ex13	
P41	48	15	1	-	-		-	Inv22	
P42	40	18	1	-	-		-	Inv22	
P43	20	20	1	-	-		-	Inv22	
P44	65	-	1	-	-		-	Inv22	
					No P	ortadora	S		
NP1	57	35	2	25/19	294/276	5	3.4	NP	
NP2	72	34	2	27/25	300/294	62.8	64.7	NP	
NP3	117	25	2	35/30	324/309	61.5	55.6	NP	
NP4	110	31	2	27/26	300/297	6	6.2	NP	
NP5	77	27	2	25/23	294/288	6	1.8	NP	
NP6	99	21	2	22/21	285/282	60.5	61.3	NP	
NP7	97	28	2	30/24	309/291	61.4	61.6	NP	
NP8	92	-	2	24/21	291/282	6	7.9	NP	
NP9	81	-	2	26/21	297/282	5	3.4	NP	
NP10	168	18	2	28/25	303/294	9	1.6	NP	
NP11	88	35	2	25/17	294/270	6	5.2	NP	
NP12	135	21	2	20/19	2/9/276		o/	NP	
NP13	92	24	2	20/19	2/9/2/6		o/	NP	
NP14	120	24	2	27/22	300/285		/ð	NP NO*	
NP15	298	-	2	25/24	294/291	6	5.5		
NP16	102	26	2	26/23	297/288	7	1.3	NP	

		Edad	Sis	stema HL	JMARA			
Caso	UI/dl	(años)	#	#	Longitud	XII	P(∕)	Mutación
	0.7 0.	(0.1.00)	Alelos	Rep.	fragmento			
NP17	47	17	2	26/23	297/288	8	0.2	NP
NP18	87	17	2	22/21	285/282	7	0,5	NP
NP19	33	13	2	22/20	285/279	7	3,9	NP
NP20	102	-	2			7	0.6	NP
NP21	71	-	2			9	5.7	NP
		No por	tadoras	no inforr	nativas para e	el patrón	de inactiv	ación del cromosoma X
NP22	121	27	1	-	-		-	NP
NP23	174	64	1	-	-		-	NP
NP24	98	17	1	-	-	-		NP
Controles								
CN1		58	2	27/22	300/285	5	5.9	-
CN2		20	2	22/19	285/276	6	7.2	-
CN3		50	2	24/22	291/285	7	1.4	-
CN4		51	2	29/22	306/285	6	4.1	-
CN5		41	2	26/24	297/291	5	6.4	-
CN6		74	2	29/25	306/294	5	1.3	-
CN7		-	2	26/23	297/288	60.5	64.5	-
CN8		40	2	25/23	294/288	7	5.3	-
CN9		-	2	24/22	291/285	79.4	82,3	-
CN10		-	2	22/11	285/255	7	1.2	-
CN11		34	2	20/19	279/276	8	0.1	-
CN12		-	2	30/23	309/288	78.1	85.5	-
CN13		69	2	25/22	294/285	7	9.9	-
CN14		-	2	25/21	294/282	9	6.9	-

Tabla 13. Análisis de inactivación del cromosoma X en mujeres de la población Argentina. En la tabla se detallan, el número de caso asociado al estado de portadora (P), no portadora (NP) o a los casos control de la población Argentina general (CN). El nivel de factor VIII (FVIII:C) en UI/dl, se indica sólo en los casos que corresponde (los casos CN no tienen mediciones de FVIII:C), la edad, el numero de alelos HUMARA, el número de repeticiones del trinucleótido (CAG)n, el tamaño de cada fragmento de amplificación y el patrón de inactivación del alelo HUMARA (XIP): para Portadoras y No Portadoras obtenidos a partir de mediciones en geles nativos de poliacrilamida y tinción con plata; en los controles, mediciones de las señales en placa autorradiográfica. En los casos que se muestran dos valores en la columna del XIP, el primero corresponde al resultado obtenido por mediciones de las señales en placa autorradiográfica, y el segundo a mediciones en geles de poliacrilamida y tinción con plata. En la última columna se detalla el tipo de mutación en heterocigosis, en las portadoras. P.O indica portadora obligada y NP no portadora. Ex indica exón del *F8*, y Do, dominio involucrado en la mutación. * Embarazada. ** Indica la presencia de la mutación en homo-hemicigosis.

Mujeres con síntomas clínicos de HA.

Seis mujeres de la serie estudiada presentaron síntomas clínicos de hemofilia A severa (sintomáticas), y niveles de actividad de FVIII:C de 1,5 (P15 y P16), 1,2 (P31) y menor a 1 UI/dI (P7, P10, P34), en cercana correlación con la severidad clínica.

En esta serie, un único caso, P16, mostró un patrón hemicigota u homocigota. En cinco de las seis mujeres sintomáticas (83/) se confirmó su estatus de portadora heterocigota de una única mutación deletérea en el *F8.* En cuatro de ellas (casos P10, P15, P31 y P34), el XIP mostró sesgo superior al 90/ (sesgo extremo > 90/) y un solo caso (P7) de los cinco heterocigotas (20/) mostró ausencia de sesgo (XIP < 85/) con XIP del 75/ (Tabla 13).

Fenotipo de HA severa asociado a homo/hemicigosis.

El caso P16, resultó singular pues, se observó una deleción de una base (c.3633delA) con un patrón hemicigota (doble heterocigota: deleción de una base y una gran deleción total o parcial del *F8*) u homocigota (posiblemente asociado a consanguineidad) (Tabla 13). Habiéndose descartado anomalías cromosómicas del par sexual por análisis citogenético, hasta el momento no se ha determinado fehacientemente la hemi u homocigocidad molecular en esta paciente con HA severa, aunque resultados preliminares de dosis génica indicarían la presencia de dos dosis del alelo que porta la mutación (homocigosis). Estos datos y la imposibilidad de descartar consanguineidad en la familia, permitirían encontrar una explicación para la expresión fenotípica severa de la enfermedad. Este caso fue excluido para los estudios de correlación ya que un eventual XIP sesgado afectaría alelos del *F8* iguales (homocigosis) o equivalentes (hemicigosis molecular). En la figura 26 se muestra el grupo familiar de P16 (familia A) y los resultados en cada caso.



	Muestra	Alelos HUMARA	F8	Ni∨el F∨III:C (%)	XIP (%)
l.1	P19	19/ <u>22</u>	P. heterocigota	103	91
1.2	-	21	No hemofilico	-	-
II.1	P16	22/27	P. homo- hemicigota	1,5	81
11.2	P23	19/21	P. heterocigota	17	56
II.3	P20	21/ <u>22</u>	P. heterocigota	16	87
11.4	NP19	19/21	No portadora	33	74
11.5	-	22	Hemofilico	<1	-
111.1	-	19	Hemofilico	< 1	-

Figura 26. Análisis de la familia A, caso P16. La causa de los síntomas de hemofilia en la paciente II.1 (P16), flecha roja, caso índice, se asocia a un estado hemi-homocigota de la mutación c.3633delA, encontrada también en un medio hermano (II.5) y un medio sobrino (III.1) y en la madre, I.1 (P19) y dos medias hermanas II.2, II.3 (P20 y P23, respectivamente) en heterocigosis. El patrón de inactivación del cromosoma X (XIP), mostró sesgo extremo en I.1 (P19), y moderado en II.3 (P20), tabla panel derecho.

En familia A, una mujer, P20, portadora heterocigota de una única mutación en el *F8* (c.3633delA), media hermana de P16, presentó un nivel de FVIII:C del 16 UI/dI, con síntomas moderados o leves de HA (sangrado en el parto y extracción dental), el XIP en leucocitos de sangre periférica (SP) mostró sesgo de 87/, lo que proveería una posible explicación para el desarrollo de síntomas clínicos e indicadores bioquímicos leves (Fig. 26, II.3).

Fenotipo de HA severa asociado a sesgo en el XIP

En la familia B, el caso P34 mostró síntomas de HA severa (FVIII:C <1 UI/dI) y una única mutación en heterocigosis (c.325A>G) en el exón 3 del *F8* asociada al defecto *missense* p.90Asn>Asp en el dominio A1, mostró dos alelos del polimorfismo del STR-HUMARA (25 y 29) y un patrón de inactivación del cromosoma X con sesgo extremo, XIP de 99/, tanto en muestras de leucocitos de sangre periférica (XIP_{SP}) como en muestra descamadas de mucosa bucal (XIP_{MB}). En ambos tejidos el alelo del gen HUMARA activo correspondió al de 29 repeticiones CAG (III.1, Fig. 27).

El padre de P34 (II.1, Fig. 27), no hemofílico, presentó el alelo (CAG) 25 del STR-HUMARA y la madre, P35 (II.2 Fig. 27), portadora no sintomática de HA (FVIII:C 58 UI/dI), resultó heterocigota para la mutación en el *F8* (c.325A>G) y heterocigota para el polimorfismo (CAG) (22/29). Es interesante observar que el XIP mostró discrepancias entre los dos tejidos analizados, observándose un XIP sesgado extremo del 99/ en muestras de leucocitos de sangre periférica, con el alelo 29 activo, y un XIP del 60/ en muestras de mucosa bucal.

Estos hallazgos observados de XIP_{SP} y XIP_{MB} concordantes en P34, permiten razonar como probable el mismo resultado para el tejido productor del FVIII (i.e., hepatocitos) y proveer una explicación para la expresión de síntomas de HA severa. Asimismo la determinación del haplotipo del padre no afectado de hemofilia permitió determinar la fase entre el cromosoma X que porta la mutación del *F8* y el alelo HUMARA (CAG) 29 en P34 (III.1, Fig. 27).

Las tías de P34, P36 y P37 (II.3 y II.4, Fig. 27), portadoras heterocigotas para la mutación del *F8* (c.325A>G) ambas no sintomáticas (FVIII:C 93 UI/dI y 58 UI/dI, respectivamente), mostraron el polimorfismo (CAG) del STR-HUMARA en heterocigosis con los alelos 25 y 29. El XIP_{SP} mostró sesgo extremo en P38 (XIP_{SP} 97,9/) y moderado en P36 (XIP_{SP} 85,8/); el XIP_{MB} en P36 mostró los mismos resultados que XIP_{SP}. En el caso de P37 la cantidad de muestra de ADN de mucosa bucal no permitió realizar el estudio (Fig. 27).

La abuela de P34, P38 (I.1, Fig. 27) no sintomática (FVIII:C 50 UI/dI), mostró también un patrón heterocigota para la mutación c.325A>G en el *F8*, y heterocigota para el polimorfismo HUMARA con los alelos (CAG) 22 y 25, con XIP_{SP} no sesgado típico de 56⁄. En este caso tampoco se obtuvo muestra de ADN de mucosa bucal para estudiar el XIP. Estos hallazgos permitieron inferir el haplotipo del abuelo materno de la paciente P34 no hemofílico y determinar la fase entre el cromosoma X ligado al *F8* no mutado y el alelo HUMARA (CAG) 29 (I.2, Fig. 27). En resumen, en la madre y las tías de P34, la fase del X paterno indica que el alelo (CAG) 29, alelo compartido en los tres casos, está ligado al alelo no mutado del *F8*.

Los resultados observados en la madre de P34, P35, portadora asintomática, permiten indicar que se produjo un cambio de fase por recombinación entre el alelo *F8* que porta la mutación y el alelo HUMARA 29, en la gameta gestante de su hija P34 con síntomas de HA severa. Asimismo los resultados discordantes entre el XIP medido en sangre periférica y el observado en mucosa bucal, en P35, permitirían interpretar que posiblemente en el hígado el patrón de inactivación del cromosoma X sea independiente y al azar, como el que mostró en mucosa bucal. En la tía, P37, se esperarían los mismos resultados que en P35, debido a la ausencia de síntomas y el nivel de FVIII:C que presenta, pero esto no se puede asegurar porque la muestra de ADN de mucosa bucal resultó insuficiente para realizar el estudio.

La abuela de P34, P38 muestra los resultados más típicamente observados en portadoras heterocigotas para la mutación en el *F8*, i.e. ausencia de síntomas y XIP del 56/, indicando inactivación al azar, no sesgada del cromosoma X. La tía de P34, P36, con FVIII:C del 93 UI/dl y concordancia en los niveles de XIP con sesgo moderado (86/), en las muestras de ADN extraídas de leucocitos sangre periférica y mucosa bucal permiten inferir que el tejido productor de FVIII:C también presentaría XIP sesgado. Asimismo en el caso P36, debido a que se conoce la fase y que el alelo preferentemente activo en ambos tejidos corresponde al alelo paterno ligado al *F8* no mutado (1.2, Fig. 27), se justifica plenamente tanto la ausencia de síntomas como el elevado nivel de factor, parecido al de una no portadora.



	Muestra	Alelos HUMARA	F8	Nivel FVIII:C (%)	XIP (%) SP	XIP (%) MB
I.1	P38	22/25	P. heterocigota	50	56,6	-
1.2	-	29	No hemofilico	-	-	-
II.1	-	25	No hemofilico	-	-	-
II.2	P35	22/ <u>29</u>	P. heterocigota	58	99	60
II.3	P37	25/ <u>29</u>	P. heterocigota	58	97,9	-
11.4	P36	25/29	P. heterocigota	93	85,8	86
III.1	P34	25/ <u>29</u>	P. heterocigota	<1	99	99

Figura 27. Análisis de la familia B con una paciente afectada por HA severa. La causa de los síntomas de hemofilia en III.1 (P34) se asocian a la presencia del cambio p.90Asn>Asp en heterocigosis y sesgo completo en la inactivación del cromosoma X. La mutación se presenta en heterocigosis en todas las mujeres de la familia que concurrieron al asesoramiento genético: la madre, II.2 (P35) y la tía, II.3 (P37), mostraron sesgo extremo en la inactivación del cromosoma X, en muestras de ADN de sangre periférica mientras que P35 no mostró sesgo en mucosa bucal. En las tablas se detallan los resultados de cada familia, los alelos subrayados indican el alelo activo en los casos de sesgo extremo en la inactivación del X. Nótese que la imposibilidad de inactivar el cromosoma X en *cis* segrega ligado al alelo HUMARA (CAG) 29 en el árbol familiar B.

En la presentación típica de mujeres sintomáticas afectadas de hemofilia, tres casos sin un grupo familiar asociado (P10, P15 y P31) mostraron niveles de FVIII:C de 1, 1,2 y 1,5 UI/dl y sesgo extremo en el XIP: 97,9/, 99,2/ y 92,8/, respectivamente, en muestras de leucocitos de sangre periférica. Este hallazgo conjunto en portadoras heterocigotas confirmadas por el estudio molecular (Tabla 13) nos permite estimar como probable el hecho que también el hígado este afectado por el mismo patrón XIP sesgado explicando así la expresión se síntomas de HA severa en este grupo.

Fenotipo de HA severa no asociado a sesgo en el XIP ni mutación del F8 en homo/hemicigosis En una presentación con características singulares, el caso P7 mostró el cambio c.4388_4389delCTTT en heterocigosis asociado a un patrón de inactivación no sesgado del cromosoma X (XIP 75/) en sangre periférica. Estos resultados no permiten explicar la expresión clínica de la enfermedad en esta mujer. La expresión de hemofilia en esta paciente podría ser causada por un patrón de inactivación del X independiente y sesgado en el hígado. Para explorar esta posibilidad (XIP independiente en distintos tejidos) se solicito muestra de mucosa bucal. Lamentablemente la paciente P7 no reside en Buenos Aires y no ha podido ser entrevistada hasta el presente. A propósito de P7 y de la potencial disparidad (independencia) del XIP en hepatocitos es interesante destacar el caso de P13, una portadora heterocigota no sintomática que presentó niveles de FVIII:C de 65 UI/dl y un XIP_{SP} de 97,4/ en contraste con un XIP_{MB} del 69/, demostrando que el sesgo extremo en un tejido no implica necesariamente el mismo resultado en otros tejidos si no subyace un defecto común que lo propulse en todas las células del organismo.

Correlación entre los niveles de FVIII:C y XIP.

El objetivo de correlacionar el FVIII:C con XIP_{SP} es explorar la utilidad de estudiar el patrón de inactivación en muestras de leucocitos de sangre periférica para estimar su magnitud en hígado (XIP_H) como tejido secretor del FVIII, y su asociación última con los niveles de actividad FVIII:C resultante en mujeres portadoras heterocigotas confirmadas de mutaciones causales de HA severa.

Aún hoy, en la literatura médica internacional se utiliza el mero hecho de observar un patrón de XIP sesgado extremo en sangre periférica para caracterizar la causa del desarrollo de síntomas de HA severa en una portadora heterocigota sin que esta correlación haya sido probada con datos experimentales.

En nuestra serie, los niveles del FVIII:C muestran marcadas diferencias entre las mujeres portadoras heterocigotas (43 casos, excluyendo el caso P16 homo-hemicigota) y no portadoras de hemofilia (23 casos, excluyendo el caso NP15, embarazada) (ambos casos caracterizados por análisis molecular, Tabla 13), con un promedio de 49,6 UI/dI y 97,4 UI/dI, respectivamente (Fig. 28A).

En promedio los niveles de XIP, medido en muestras de sangre periférica, en mujeres no portadoras presentan una distribución en torno a un promedio de 68/ y del 75/ para las portadoras (se incluyen 37 portadoras y 20 no portadoras por resultar informativas para la medición del XIP). En ambas poblaciones se observan casos con valores sesgados extremos de XIP (>90/) aunque la proporción es mayor en las mujeres portadoras (Fig. 28B), debido a la inclusión en esta serie de un número mayor de mujeres sintomáticas de HA que en una serie de portadoras elegidas al azar.



Figura 28. Distribución de FVIII:C y XIP. A) Distribución de los niveles de FVIII:C en mujeres portadoras heterocigotas de mutaciones causales de HA severa (rojo) y no portadoras (azul), se muestran los promedios en cada caso B) Distribución del patrón de inactivación del cromosoma X en muestras de sangre periférica (XIP_{SP}) en mujeres portadoras heterocigotas (rojo) y no portadoras (azul) de mutaciones del *F8* causales de hemofilia A severa.

En la figura 29 se muestra la distribución del nivel de FVIII:C en portadoras y no portadoras de HA severa versus el XIP, en muestras de leucocitos de sangre periférica.



Figura 29. Distribución de los niveles de FVIII:C en relación al XIP. A) Portadoras heterocigotas de hemofilia A severa. B) No portadoras.

En base teórica, en el tejido productor principal del FVIII (i.e, células hepáticas) la población de mujeres portadoras debiera correlacionar niveles extremos de FVIII:C (e.g., >90 UI/dI y <10 UI/dI) con patrones de inactivación del cromosoma X sesgado (e.g., XIP>90/). Mediante una tabla de contingencia y el uso del test exacto de Fisher, se analizaron los datos de las portadoras, categorizando FVIII:C como extremo con valores >90/ o <10/ de los valores de referencia, el promedio de no portadoras (100/) o el doble del promedio de portadoras (50/), versus sesgo extremo en la inactivación del cromosoma X, XIP ≥90/. En estudios paralelos siendo menos estrictos en la definición de los límites también se analizaron los datos computando el 85/ y el 15/ de los promedios de FVIII:C en ambas poblaciones, versus valores XIP mayores o menores al 85/. Teniendo en cuenta las diversas fuentes de variación de los niveles de FVIII:C en portadoras y no portadoras (ver discusión), fue tomado como valor de referencia para el cálculo de los límites de FVIII:C, dos veces el valor promedio de FVIII:C de portadoras, tanto para la correlación estricta (90/) como para la menos estricta (85/) (Tabla 14A y 14B). Sin embargo, atendiendo a que la muestra de portadoras esta sesgada con casos de familias con mujeres sintomáticas, entonces consideramos más correcto tomar como valor de referencia para el cálculo de los límites de las categorías de la contingencia el promedio del nivel de FVIII:C de no portadoras (Tabla 14C y14 D).

Este análisis en la población de portadoras indicó ausencia de correlación entre el FVIII:C y el XIP (Tabla 14B y 14D) en la correlación menos estricta (85/), tanto cuando se utilizaron los valores de referencia del promedio de no portadoras como dos veces el promedio de

portadoras, igual a lo reportado en la literatura por Orstavik y colaboradores (2000) en un estudio de mujeres portadoras de hemofilia A y B asociadas a probandos con distinto grado de severidad. En cambio, cuando se utilizaron límites de categoría más estrictos (90/), tanto tomando como valor de referencia de actividad normal el promedio de no portadoras como el doble del promedio de portadoras, los niveles de FVIII:C extremos y el XIP extremo (>90/) en sangre periférica mostraron una modesta correlación significativa (*Test* exacto de *Fisher* p =0,0408) (Tabla 14A, 14C).

Valor de referencia 2x promedio EVIII-C portadoras								
Valor de referencia 2x profiledio i vinice portadoras								
A) Correlación estricta			 B) Correlación menos estricta 					
	XIP ≥90⁄	XIP <90/		XIP ≥85⁄	XIP <85/			
FVIII:C extremo	-	5	FVIII:C extremo	6	4			
(≥86,2, ≤9,6 UI/dI)	5		(≥81,4, ≤14,4 UI/dI)					
FVIII:C intermedio		22	FVIII:C intermedio	0	10			
(86,2-9,6 UI/dI)	4	23	(81,4-14,4 UI/dl)	δ	19			
Fisher p= 0,0408*			Fisher p=0,1322 ns					

Valor de referencia promedio FVIII:C no portadoras							
C) Correlación estricta			D) Correlación menos estricta				
	XIP ≥90⁄	XIP <90/		XIP ≥85⁄	XIP <85/		
FVIII:C extremo	F	5	FVIII:C extremo	6	6		
(≥83,1, ≤9,2 UI/dl)	5		(≥78,5, ≤13,9 UI/dl)				
FVIII:C intermedio	ntermedio		FVIII:C intermedio	0	17		
(83,1-9,2 UI/dl)	4	25	(78,5-13,9 UI/dl)	0	17		
Fisher	p= 0,0408*		Fisher p=0,4701 ns				

Tabla 14. Tablas de contingencia para el análisis de correlación FVIII:C extremo vs XIP extremo. Tomando como valor de referencia dos veces el promedio de FVIII:C de portadoras en A) Análisis de correlación con valores de XIP extremos y FVIII:C extremo e intermedio, en la correlación estricta, resultando en una modesta diferencia significativa, OR (*Odds ratio*)=5,7 (IC (intervalo de confianza) =1,1-29,4). B) Análisis de correlación con valores de XIP extremo y FVIII:C extremo e intermedio, correlación menos estricta, resultando no significativa, OR =3,5 (IC =0,7-16,1). Tomando como valor de referencia el promedio de FVIII:C de no portadoras en C) Análisis de correlación con valores de XIP extremos y FVIII:C extremo s y FVIII:C extremo e intermedio, correlación de correlación estricta, resultando en una modesta diferencia significativa, OR =5,7 (IC =1,1-29,4). D) Análisis de correlación con valores de XIP extremo y FVIII:C extremo e intermedio, correlación menos estricta, resultando estricta, resultando en una modesta diferencia significativa, OR =5,7 (IC =1,1-29,4). D) Análisis de correlación con valores de XIP extremo y FVIII:C extremo e intermedio, correlación con valores de XIP extremo y FVIII:C extremo e intermedio, correlación con valores de XIP extremo y FVIII:C extremo e intermedio, correlación con valores de XIP extremo y FVIII:C extremo e intermedio, correlación con valores de XIP extremo y FVIII:C extremo e intermedio, correlación con valores de XIP extremo y FVIII:C extremo e intermedio, correlación con valores de XIP extremo y FVIII:C extremo e intermedio, correlación con valores de XIP extremo y FVIII:C extremo e intermedio, correlación con valores de XIP extremo y FVIII:C extremo e intermedio, correlación con valores de XIP extremo y FVIII:C extremo e intermedio, correlación menos estricta, resultando no significativa, OR =2,1 (IC =0,5-8,7).

Con el objetivo de analizar esta correlación entre los niveles de FVIII:C y el XIP en mujeres portadoras de mutaciones severas del *F8* bajo otra perspectiva, se planteó un modelo matemático de correlación lineal entre los niveles de FVIII:C y el patrón de inactivación presente en el hígado sobre elementos meramente teóricos.

Si se conociera la fase entre el cromosoma X activo o inactivo y el alelo mutado para el *F8*, se esperaría una correlación directa entre los valores de FVIII:C altos y valores de XIP altos, con inactivación preferencial del alelo *F8* mutado. Como en esta serie de portadoras no se conoce la fase, la correlación no puede comprender todo el rango de niveles de XIP. Con fase desconocida entonces, los valores de XIP correspondientes al intervalo 0-50/ son transformados en espejo hacia el cuadrante superior, resultando en el rango 50-100/ y una correlación lineal en portadoras que grafica una V (modelo V, Fig. 30). Nótese que la forma V corresponde a una correlación lineal que fue arbitrariamente elegida por simplicidad por sobre otras funciones similares que relacionen XIP y FVIII:C también posibles (e.g., forma U con correlación sigmoidea). Debido a que nuestra serie de portadoras esta sesgada por inclusión de mujeres sintomáticas es más correcto que el modelo V (y los modelos alternativos) tome como valor de referencia (100/ de actividad) el nivel de FVIII:C promedio del grupo de no portadoras.

Para poner a prueba este modelo V de correlación FVIII:C *versus* XIP en sangre periférica de portadoras se analizó la magnitud y dispersión del valor absoluto del promedio de los errores entre los niveles de FVIII:C observados y los esperados de acuerdo a lo predicho por el modelo teórico para cada valor de XIP de sangre periférica específico.



Portadoras de Hemofilia A severa

Figura 30. Hipótesis de correlación FVIII:C-XIP modelo V. Se muestra la distribución de los niveles de FVIII:C y XIP en la población de mujeres portadoras heterocigotas de HA severa. En línea continua violeta, línea de tendencia de la primera rama del modelo V, valores bajos de FVIII:C con valores altos de XIP. En línea continua rosa, línea de tendencia de la segunda rama del modelo V, partiendo de valores intermedios para el FVIII:C y el XIP y llegando a valores extremos altos de XIP asociados a valores extremos de FVIII:C. Con línea punteada se grafica el modelo alternativo, el modelo A para contraste de la hipótesis de correlación con el modelo V. El promedio de los errores absolutos de los datos al modelo V (valor absoluto de datos observados menos datos esperados para el modelo V) fue comparado con el promedio de los errores absolutos de los datos de no portadoras respecto su valor promedio (modelo donde el nivel de XIP es independiente de los niveles de FVIII:C) y con los valores promedio de los errores en dos modelos alternativos, sin base biológica, modelo A (Fig. 30) y promedio de portadoras, donde el nivel de XIP es considerado independiente de los niveles de FVIII:C, modelos que constituyen hipótesis nulas con ausencia de correlación entre los valores de XIP y FVIII:C.

El *test* estadístico utilizado, *test* no paramétrico *Mann Whitney*, no indicó diferencias significativas cuando se analizó el modelo V comparado con los errores al promedio en no portadoras indicando que el error respecto al modelo es de magnitud similar a la dispersión natural de los valores del FVIII:C sin influencia de la inactivación del cromosoma X (Fig. 31). En cambio, los resultados mostraron modestas diferencias significativas al comparar el modelo promedio de no portadoras con los modelos A y promedio de portadoras (Fig 31); al igual que al comparar el modelo V con el modelo A y el promedio de portadoras (Fig 31).



Modelos de correlación FVIII:C-XIP

Figura 31. Modelos de correlación FVIII:C-XIP. Se muestran los valores de los errores absolutos para cada modelo y el valor promedio en cada caso. Modelo promedio no portadoras, en negro, modelo V de portadoras de HA severa, en verde, modelo A de portadoras de HA severa, en rojo; modelo promedio de portadora de HA severa, en marrón. Sobre el gráfico se muestran los niveles de significación de las diferencias: * (p<0,05), ** (p<0,01) y ns, no significativas. La tabla insertada muestra en primera fila los resultados de comparar el promedio de no portadoras con los distintos modelos, resultando no significativo con el modelo V de portadoras (P =0,26), y diferencias significativas con los modelos A y promedio de portadoras (P =0,0023 y P =0,0039, respectivamente), y en la segunda fila, se muestran los resultados entre el modelo V de portadoras, y los distintos modelos, resultando no significativa la diferencia con el modelo promedio de no portadoras (P =0,26) y diferencias significativas con los modelos, resultados entre el modelo V de portadoras, y los distintos modelos, resultando no significativa la diferencia con el modelo promedio de no portadoras (P =0,26) y diferencias significativas con los modelos, resultando no significativa la diferencia con el modelo promedio de no portadoras (P =0,26) y diferencias significativas con los modelos A y promedio de no portadoras (P =0,26) y diferencias significativas con los modelos A y promedio de no portadoras (P =0,26) y diferencias significativas con los modelos A y promedio de no portadoras (P =0,26) y diferencias significativas con los modelos (P =0,021 y P =0,026, respectivamente).

Estos resultados mostrados en la figura 31, aunque de magnitud modesta, indican que el modelo V de correlación FVIII:C/XIP en portadoras es el único que no puede ser descartado. Las modestas diferencias significativas obtenidas aplicando los modelos alternativos propuestos sin base biológica, i.e., modelo A y modelo promedio de portadoras contra el modelo V y promedio de no portadoras, sugieren que el modelo V de correlación XIP/FVIII:C, podría explicar la fuente de variación adicional del FVIII:C de portadoras en muestras de sangre periférica.

Concordancia y discordancia. Análisis XIP_{MB}.

Como anomalías dos casos, P35 y P13 que muestran un nivel de FVIII:C del 58 y 65 UI/dl respectivamente, mostraron sesgo extremo en muestras de sangre periférica, "escapando" del modelo V. Mediciones de XIP en muestras de ADN extraído de mucosa bucal mostraron valores de 60 y 69/.

En contraste dos portadoras heterocigotas con valores extremos en el nivel de FVIII:C de 1 UI/dl (P34) y P36 con 93 UI/dl, el XIP en los dos tejidos estudiados mostró sesgo extremo y moderado respectivamente, observando una perfecta correlación con el modelo V. Las discrepancias del XIP entre tejidos en los dos primeros casos, y la concordancia en los últimos dos, permiten razonar que la estimación de los patrones de inactivación del X presentes en hígado se indicará independiente con mediciones XIP discordantes en sangre periférica y mucosa bucal, y similar a la obtenida en casos concordantes.

Discusión

Este capítulo presenta el análisis de las causas de la expresión fenotípica de hemofilia en mujeres portadoras de HA severa, e investiga la relación entre los niveles de actividad plasmática de FVIII:C en mujeres portadoras heterocigotas y controles y el patrón de inactivación del cromosoma X en muestras de sangre periférica.

En hemofilia como en toda enfermedad recesiva ligada al cromosoma X, los varones resultan afectados y las mujeres debido a que su condición de portadoras heterocigotas, resultan en su gran mayoría asintomáticas.

Sin embargo, la rara presencia de mujeres con síntomas de hemofilia A puede asociarse a distintas causas: dos alelos mutados (homocigota o doble heterocigota para la mutación), homocigosidad casi siempre debida a consanguineidad; un alelo mutado e inactivación sesgada o extrema; un alelo mutado en hemicigosis asociado a fenotipo femenino (e.g., Síndrome 46; XY con feminización testicular, síndrome 45;X0 en mosaico o no, deleción parcial sobre la región del gen relevante); condición autosómica hemorrágica mal asignada como hemofilia (e.g., enfermedad de von Willebrand, vWD severa tipo 3, vWD tipo 2N, deficiencia combinada FV y FVII, los dos últimos casos muestran fenotipo similar a HA leve-moderada), condición autosómica hemorrágica más el status de portadora de hemofilia (Favier *et al*, 2000; Bicocchi *et al* 2005; Kasper y Buzin, 2009).

La literatura muestra numerosos reportes de mujeres sintomáticas de hemofilia asociada a sesgo extremo en el patrón de inactivación del cromosoma X en sangre periférica y una mutación causal de hemofilia en heterocigosis (Nissen *et al*, 1989; Kling *et al*, 1991; Orstavik *et al*, 1999; Bicocchi *et al*, 2005).

En este trabajo se presentaron seis mujeres con fenotipo de HA severa, de ellas cinco resultaron heterocigotas para la mutación causal de hemofilia, y entre ellas cuatro mostraron sesgo completo en la inactivación del cromosoma X, proveyendo una explicación directa para la expresión clínica de hemofilia en estas cuatro mujeres (inactivación preferencial del X ligado al *F8* mutado).

En un caso singular donde se caracterizó un fenotipo con patrón homo u hemicigota (Tabla 13) la expresión de síntomas de HA severa estaría relacionada a la cigosidad de la mutación y sería completamente independiente del patrón de inactivación del cromosoma X presente. En la familia de esta paciente homo/hemicigota como caso índice (familia A), los síntomas
moderados de HA (sangrados esporádicos) presentes en otra paciente (P20, media hermana) con una única mutación en heterocigosis en el *F8* permitirían ser explicados por un patrón sesgado de inactivación del X del 87/.

En esta serie se presenta la primera observación de un caso singular donde se ha podido asociar el desarrollo de síntomas de HA severa a un cambio de fase del *F8* mutado. En esta familia B los resultados permitieron detectar el cambio de fase por recombinación, la fase entre el cromosoma X que porta la mutación en el *F8* (Xq28) y el alelo HUMARA (Xq11.3), en la niña sintomática (P34) respecto de su madre (P35) y gracias al análisis del árbol familiar extendido incluyendo a sus tías y su abuela materna. Asimismo, se detectó la causa de los síntomas de HA en P34, portadora heterocigota y sesgo extremo en la inactivación del cromosoma X, en los dos tejidos estudiados. En la madre del caso índice (P35) la discrepancia entre los resultados obtenidos para el XIP entre la muestra de sangre periférica y mucosa bucal, permiten inferir como posible que en el tejido productor del FVIII:C (i.e, células hepáticas) muestre un XIP balanceado, no sesgado, explicando tanto la ausencia de síntomas y el nivel de factor FVIII:C. En la tía materna del caso índice (P37), los resultados niveles de FVIII:C intermedio y XIP sesgado en sangre periférica podrían indicar lo mismo que en el caso de la madre discutido arriba (P35) pero no se contó con muestra suficiente de mucosa bucal para realizar el estudio.

Si bien el sesgo extremo de inactivación del cromosoma X (>90/), puede explicar la expresión de hemofilia en la mayoría de las mujeres heterocigotas sintomáticas estudiadas, 4/5 (80/), también permitiría explicar los casos en que las portadoras presentan un nivel de FVIII:C parecido al de las mujeres no portadoras. En este análisis, en primera instancia teórico, supone iguales patrones de XIP en sangre periférica e hígado. En estos de portadoras hetrocigotas con altos niveles de FVIII:C (e.g., mayor al doble del valor promedio de portadoras), si se pudiese determinar la fase entre la mutación y el cromosoma X activo, se esperaría que el *F8* mutado esté ligado al X inactivo. En la familia A la madre del caso índice (P16), P19, portadora heterocigota, sin síntomas de HA severa con FVIII:C de 103 UI/dI y XIP de 91/, podría ejemplificar este caso. También mostraría la misma condición las tías maternas del caso índice de la familia B, P36, con niveles sesgados y coincidentes de XIP del 86/ y 87/ en muestras de mucosa bucal y sangre periférica, respectivamente y FVIII de 93 UI/dI. En este último caso (P36) al haberse deducido la fase de la hemofilia por análisis del árbol familiar B, hemos podido

determinar que era el alelo F8 mutado, el preferentemente inactivado en estos dos tejidos estudiados.

En contraste dos casos de la población de portadoras no muestran esta asociación con las mediciones de XIP en sangre periferica, P18 y P33, mostrando en ambos, patrones de inactivación entre 50 y 60/ y niveles de FVIII:C de 107 y 110 UI/dI, respectivamente, valores esperados para no portadoras.

En los casos donde los niveles de XIP no permiten explicar los síntomas de sangrado en las mujeres portadoras heterocigotas de HA, o los altos niveles de FVIII:C, cercanos al valor medio esperado para no portadoras; se debe tener en cuenta que el estudio de XIP en muestra de sangre periférica es independiente y no puede reflejar el estado de inactivación del hígado, productor de FVIII:C. Por lo que sería ideal contar con muestras proveniente de tejidos distintos para inferir el estado del hígado.

Integración del modelo de producción de la actividad del FVIII:C en portadoras.

La inactivación de uno de los cromosomas X (i.e., X paterno o X materno) ocurre durante el día 5-6 postcigótico de un embrión femenino (46;XX), en cada una de sus células en forma independiente. En este estadio embrionario, blastocisto, el número de células que dan origen a cada órgano o tejido está estimado en 10-30 (n). La inactivación ocurre como un proceso estocástico que resulta en una distribución binomial donde intervienen dos variables, la probabilidad de inactivar el X paterno (o materno) y el número de eventos (células precursoras, n). Esta inactivación primaria se ve influida genéticamente por la maquinaria molecular asociada a la expresión del gen XIST, la capacidad para prevalecer en la competencia e inactivar en cis el cromosoma X ligado al alelo. El rasgo genético de eficiencias asociadas a cada alelo XIST abarca desde la completa incapacidad hasta una capacidad aumentada para inactivar, en ambos extremos, pasando por la situación más frecuente donde compiten maquinarias de inactivación con secuencias salvajes y capacidades idénticas asegurando una base estocástica simétrica (i.e., p =0,5). Una vez ocurrida en cada célula del embrión temprano la inactivación del X, esta se hereda clonalmente durante toda la vida adulta de la mujer. Sin embargo, tanto este proceso de expansión clonal histo-organogénico como el recambio celular en los tejidos adultos se ven influidos por la presencia eventual de mutaciones heterocigotas en genes ligados al X letales, subletales o leves en distinto grado que impacten la supervivencia celular de los clones donde se inactiva el X libre de mutación, generando un sesgo (secundario) que, cuando leve, puede crecer a lo largo de los años. Asimismo cada órgano o tejido tiene asociado parámetros fisiológicos específicos. Por ejemplo, la mucosa bucal tiene un alto recambio celular, en el hígado el recambio celular es de magnitud menor; y en los leucocitos de sangre periférica, no sólo existe un alto recambio celular sino que éstos se ven sometidos a eventos de activación y selección de clones por estar involucrados en los procesos inmunológicos (infección, alergias, etc) durante toda la vida de la mujer con el consecuente riesgo de impactar el sesgo medido en sangre periférica, crecientemente en mujeres de edad avanzada.

En resumen la predisposición genética a inactivar sesgado, sea ésta primaria (e.g., mutaciones en el gen XIST) o secundaria, i.e., mutaciones severas o leves en genes de la fisiología celular ligados al X operará igualmente en todos los tejidos u órganos condicionando la base estocástica en todas las células de la economía por igual, mientras que el proceso de inactivación en sí (condicionado o no) es siempre al azar y opera en cada célula independientemente. Nótese que en las colas de la distribución binomial, aún en un proceso estocástico con p= 1/2, el limitado número de eventos involucrados (n =20) condiciona la aparición de un 5 a un 10/ de poblaciones celulares que originan órganos o tejidos con inactivación sesgada (e.g, >80/).

Las diferencias observadas en el nivel de FVIII:C entre las portadoras y no portadoras de HA severa, se distribuyen en nuestra población de acuerdo a reportes internacionales (Kamphuisen *et al,* 1998; Plug *et al,* 2006; Ay *et al,* 2010). La gran dispersión observada en los niveles de FVIII:C en las mujeres no portadoras y portadoras de HA severa, ha sido objeto de estudio por distintos grupos de investigación. En no portadoras se ha observado que varios factores como el índice de masa corporal, la edad, el sexo, la toma de anticonceptivos orales, el estado de fumador, la diabetes mellitus, el grupo sanguíneo del sistema ABO, los niveles de colesterol total, los triglicéridos, el factor Von Willebrand y la actividad el FIX (Morange *et al,* 2005; Plug *et al,* 2006; Viel *et al,* 2009) influyen o están asociados con los niveles plasmáticos de FVIII:C.

El grupo de Orstavik (2000) en un esfuerzo por explicar la gran variación observada en los niveles de FVIII:C en la población de mujeres portadoras de HA familiares de hemofílicos con distintos grados de severidad, comparó los niveles de FVIII:C con el patrón de inactivación del cromosoma X, en sangre periférica. Sus resultados mostraron ausencia de correlación. Con el mismo tipo de análisis, sobre tablas de contingencia de FVIII:C extremo o intermedio *versus* XIP

sesgado o no sesgado, la población Argentina de portadoras heterocigotas para mutaciones causales de HA severa confirmadas por análisis molecular, serie quizás sesgada por inclusión de numerosas portadoras sintomáticas, nosotros obtuvimos modestas diferencias indicando correlación.

Dado que Orstavik y colaboradores (2002) encontraron diferencias significativas entre la edad y el XIP en sangre periférica, nosotros, con el objetivo de tomar precauciones en la comparación entre portadoras y no portadoras con respecto a la edad, se estimo la edad promedio en cada grupo y se observo que en ambos casos la edad promedio se encontraba entre los 30 años (las mujeres concurren a realizarse el estudio genético en la edad reproductiva).

El modelo propuesto, modelo V, plantea la existencia de una correlación lineal directa entre el nivel de FVIII:C y XIP en mujeres potadoras de mutaciones severas del *F8*, teniendo en cuenta que no se conoce la fase entre el alelo *F8* mutado y el alelo HUMARA activo o inactivo.

En este trabajo, la dispersión en el nivel de FVIII:C normalizado en las no portadoras fue tomado como medida biológica y experimental de la dispersión del FVIII:C en portadoras, no relacionado a los patrones de inactivación del X en los distintos tejidos u órganos. Esta medida de variación no fue utilizada de Orstavik y colaboradores (2000). Asimismo en nuestro trabajo en contraste con el trabajo de Orstavik solo son incluidas las mujeres portadoras heterocigotas confirmadas de mutaciones severas del *F8* causales de HA.

En resumen, mediante los análisis comparativos usando el modelo V se concluye que si bien nosotros observamos una modesta correlación entre XIP y el FVIII:C en sangre periférica; esto quizás pueda relacionarse al sesgo de nuestra serie con casos mostrando XIP sesgado en general condicionado genéticamente y por lo tanto, concordante en distintos tejidos.

Existen varios trabajos donde indican que el XIP presenta distinta magnitud de variaciones en los distintos tejidos (Tan *et al*, 1993; Gale *et al*, 1994; Carrel *et al*, 1996). Orstavik y colaboradores (2000) en el trabajo donde no encuentran correlación entre el XIP medido en sangre periférica y el FVIII:C, proponen estudiar distintos tejidos para obtener una correlación entre estos dos parámetros. En base a esta observación, fueron incluidas en nuestro estudio muestras de mucosa bucal: en dos casos el XIP_{MB} fue consistente con el XIP_{SP} (P34 y P36, Fig. 27), una portadora heterocigota con XIP sesgado y síntomas de HA severa; y una segunda portadora heterocigota con niveles de FVIII:C parecidos a una no portadora (93 UI/dI) y sesgo extremo en XIP. Otros dos casos (P35 y P13) mostraron inconsistencias entre las mediciones de XIP en estos tejidos. Ambos casos, portadoras heterocigotas, con niveles de FVIII:C típicos de portadoras asintomáticas (50 y 65 UI/dI, respectivamente) pero sesgo extremo en XIP_{SP}, la discrepancia permite inferir que en el hígado el nivel de FVIII:C es independiente y quizás parecido al observado en mucosa bucal (XIP_{MB} 60 y 69 / , repectivamente).

Dos grupos de investigación estudiaron las diferencias encontradas entre las variaciones en los niveles de FVIII:C en no portadoras y portadoras de HA. Ay y colaboradores (2010) encontraron asociaciones entre el FVIII:C y el índice de masa corporal, la proteína C reactiva, los niveles de fibrinógeno y el grupo 0 (como asociación secundaria), no así en el grupo de portadoras de HA. Concluyendo que el status de portadora es el mayor determinante de los niveles de FVIII:C en este grupo. El grupo de Viel y colaboradores (2007) estudiaron variantes comunes polimórficas así como las variantes raras dentro del *F8* y observaron que ambas contribuyen de manera sustancial en la variabilidad observada en los niveles de FVIII:C en la población general. Se desprendería de estos estudios que los errores que afectan la medición del FVIII:C en portadoras y no portadoras posiblemente no estén relacionados, y no se pueda trasladar la dispersión en los niveles observados para no portadoras al modelo de portadoras. Sin embargo ninguno de estos trabajos tomaron en cuenta la fuente de error mayor que implica la inactivación del X contra el *F8* no mutado, lo cual constituye una contribución probada tanto en la literatura (casos de portadoras heterocigotas sintomáticas de HA o HB asociados a XIP sesgado extremo medido en sangre periférica), como en nuestra serie.

En este capítulo se presentó la primera serie de mujeres sintomáticas de HA severa, de la población Argentina. Los resultados moleculares permitieron explicar el 83/ (5/6) de estos casos.

El análisis de XIP en muestras de sangre periférica mostró una modesta correlación con el nivel de FVIII:C en nuestra población. En contraste las anomalías (casos discordantes) podrían relacionarse principalmente al tejido en estudio, sangre periférica, por imposibilidad de estudiar el órgano secretor de FVIII:C. Como perspectiva, para una mejor estimación de los patrones de inactivación del cromosoma X, presentes en el hígado, sería útil estudiar siempre el par sangre periférica-mucosa bucal.

Como conclusión, en un análisis teórico sustentado por la evidencia tomada en conjunto es dable esperar que cuando exista una causa sistémica (predisposición genética) para que se

inactive preferencialmente un cromosoma X en todo el organismo, el XIP medido en sangre periférica sesgado extremo será consistente con aquel presente en otros tejidos (e.g., hígado, mucosa bucal, etc) y que por el contrario no existiera esta predisposición el XIP medido en sangre periférica resultará independiente del existente en otros tejidos y eventualmente distinto del tejido probadamente relacionado a los niveles de FVIII:C.

DISCUSIÓN GENERAL

En el área de la genética molecular diagnóstica en humanos, el desarrollo de nuevas estrategias más rápidas y económicas adaptadas a las características de nuestro país, permiten la caracterización de genotipos asociados a enfermedad, e impactan en primer lugar sobre la posibilidad de extender estos análisis a todos los segmentos de la sociedad aun en países con recursos limitados como el nuestro. Por otro lado, ayuda a los investigadores clínicos y básicos mejorando la *performance* de sus protocolos de trabajo.

En este contexto, la utilidad de interponer un método de *screening* primario de mutaciones como el CSGE, tiene como principal objetivo, evitar la secuenciación directa de cada uno de los amplímeros específicos del gen bajo estudio en cada muestra individual. Si bien la secuenciación automática directa del gen produce un resultado rápido, su empleo masivo insume altos costos económicos ya que en nuestro caso, debieran ser secuenciados 12 amplímeros para análisis de las regiones más importantes del *F9* (HB) y 37 amplímeros para el *F8* (HA) en pacientes y controles. Como fue mostrado en este estudio mediante la aplicación de monitoreo por CSGE, sólo es necesario caracterizar la secuencia de ADN del amplímero que resultó anómalo, mostrando un patrón de señal distinto, comparado con el control, redundando este procedimiento en un abaratamiento de costos.

Los reportes de mutaciones utilizando CSGE indican una eficiencia que no supera el 90/ de las mutaciones puntuales estudiadas (Belvini *et al*, 2005). Esta limitación estaría relacionada principalmente a la extrema dificultad de detectar bases mal apareadas en dominios muy ricos en GC (*high melting domains*) del amplímero analizado. Los otros factores que afectan negativamente la eficiencia de la técnica de CSGE pueden superarse o al menos disminuirse significativamente mediante un adecuado diseño del amplímero sustrato: el método de CSGE detecta pobremente cambios próximos a los extremos del producto de PCR (<50 bp), y amplímeros de tamaños moleculares fuera del rango 200-450 bp (Hinks *et al*, 1999).

Nuestro esquema de diagnostico molecular en hemofilia presentado y mejorado en este trabajo esta siendo aplicado a casos enviados desde otros países de Latinoamérica en el contexto del grupo Hispanoamericano de Genética en Hemofilia (GH₂). Por ejemplo el algoritmo de análisis para HA y HB, ha permitido caracterizar muestras provenientes del Uruguay (Hospital Pereyra Rossel, Montevideo) y de México (CIBO, Centro de Investigaciones Biomédicas de Occidente, Guadalajara). Asimismo, el laboratorio de Genética molecular de la Hemofilia formó parte de un protocolo de estudio de pacientes argentinos con inhibidor (GADEI, Grupo Argentino de Estudio de Inhibidores en Hemofilia).

En algunos trabajos se emplea una estrategia de multiplex PCR, y análisis de heterodúplex resueltos por CSGE-PAGE (Jayandharan *et al*, 2003), sin embargo en la mayoría de los laboratorios de países desarrollados los productos de PCR correspondientes a las regiones clave del *F9* (y *F8*) son directamente secuenciados con equipos automáticos de secuenciación de ADN de alto rendimiento (Drost *et al*, 2000; Ljung *et al*, 2001; Mukherjee *et al*, 2004). Como perspectiva en este punto, sería de gran utilidad aplicar un análisis de CSGE mediante amplificación PCR *multiplex* incluyendo 2, 3 o 4 regiones por corrida singular para abaratar costos y sobre todo para reducir los tiempos de *screening* de las mutaciones del *F9*, ya que para el *F8* ya fue desarrollado y validado, un esquema con esta mejora.

La estrategia de IS-PCR presentada para el estudio de la Inv22 constituye una herramienta útil y confiable para incluir en primera línea en el análisis de familias afectadas con HA severa. Esta estrategia permite caracterizar en paralelo, sobre la misma muestra sustrato la inversión del intrón 22 y la inversión del intrón 1. Asimismo, permite caracterizar el tipo de inversión 22 (tipo I o tipo II) mostrando así una mejora en la estrategia de PCR inversa también desarrollada en nuestro laboratorio (Rossetti et al, 2005). Aunque hasta el presente no hayan sido caracterizadas en muestras clínicas por Bagnall y colaboradores (2005) las variantes teóricas, hipotetizadas, duplicaciones y deleciones mediadas por int22h, podrían ser resueltas por la aplicación conjunta de los dos test, diagnóstico y complementario, en la estrategia IS-PCR presentada aquí, si bien estas variantes también pueden ser puestas en evidencia mediante la técnica de *Southern blot* (Lakich *et al*, 1993) y por el nuevo sistema basado en PCR de larga distancia desarrollado por Bagnall y colaboradores (2006). Sin embargo, el método de IS-PCR evita el uso de material radiactivo, y la amplificación a través de *int22h*, secuencias de ADN muy ricas en CG. A causa de los inconvenientes mencionados y riesgos de cometer errores diagnósticos asociados a las estrategias empleadas para genotipificar la inversión del intrón 22 e intrón 1 del F8 en el presente, consideramos que la estrategia presentada en este estudio puede ser muy bien recibida e incorporada por otros laboratorios de genética molecular de la hemofilia en el mundo, como ya ocurre con la estrategia de PCR inversa (Rossetti et al, 2005) (e.g., Viel et al, 2009). También desarrollada en nuestro laboratorio.

La presencia de mujeres portadoras sintomáticas de HA en nuestra población, permitió establecer en nuestro laboratorio la estrategia de análisis del patrón de inactivación del cromosoma X mediante el sistema HUMARA. Cuando existe un claro patrón sesgado en la metilación del cromosoma X y la mujer padece de síntomas de HA severa, dado que la inactivación del cromosoma X ocurre temprano en el desarrollo, es razonable esperar que tanto las células sanguíneas como los hepatocitos productores del FIX y FVIII exhiban idénticos patrones de inactivación. Esta información sugiere que el patrón de inactivación no es al azar presentando una tendencia a sesgar constitutiva en todos los tejidos. En consecuencia la inactivación sesgada por predisposición genética provee una explicación tanto para mujeres sintomáticas con muy bajos niveles de factor, como, en el otro extremo, con la mutación de hemofilia en fase contraria, niveles de factor propios de una mujer no portadora.

Además de estudiar las mujeres presentadas en este estudio, la aplicación de esta estrategia permitió realizar colaboraciones con otros grupos de investigación estudiando el patrón de inactivación del cromosoma X en portadoras sintomáticas de Duchenne y en mujeres con deleciones en el cromosoma X y falla ovárica, verificando en ambos casos la inactivación sesgada extrema.

Los resultados en el estudio de correlación nos permiten sugerir la incorporación sistemática en el laboratorio de diagnóstico molecular en hemofilia de dos tipos de muestras de acceso mínimamente invasivo para utilizar en el estudio del XIP, i.e., muestras de ADN proveniente de descamación de mucosa bucal y células nucleadas de sangre periférica.

Asimismo, como perspectiva se estudiarán las variantes genéticas del gen *XIST* responsables del inicio y eficiencia del proceso de inactivación del cromosoma X, en pos de encontrar una causa sistémica y heredable para el proceso de inactivación no al azar o sesgada.

En el tratamiento de enfermedades hereditarias monogénicas como la hemofilia, están en desarrollo un número creciente de ensayos de terapia génica, a partir de avances tecnológicos que permitan abaratar costos para extender su potencialidad a sectores no alcanzados satisfactoriamente por terapias profilácticas en el presente. Mientras tanto, el asesoramiento genético de las familias afectadas (diagnóstico de portadoras y prenatal) es un recurso particularmente valioso. La información clave para este asesoramiento genético, ofrecido a la familia afectada idealmente por el medico genetista, es provista por el laboratorio de genética molecular.

Discusión general

En vista de los resultados de este trabajo, creemos que la inclusión de los procedimientos presentados en la rutina del análisis molecular del *F9*, en el estudio de pacientes con HB, así como también la utilización de la estrategia de IS-PCR para la genotipificación de los rearreglos que involucran *int22h* e *int1h* en los casos de HA severa, mejorará y acelerará la provisión de información segura para el asesoramiento genético de familias afectadas. Además, la caracterización precisa del defecto genético causal del fenotipo en cada caso servirá de ayuda al médico hematólogo tratante, proveyéndole información de naturaleza estadística acerca de las probabilidades de formación de inhibidor contra la terapia de reemplazo del factor defectuoso o ausente.

CONCLUSIONES

Capítulo I

Se diseño y desarrolló un abordaje global para el estudio exhaustivo de mutaciones causales y variantes polimórficas de HB en el *F9* de coagulación humano. El número de casos presentados representa más del 20/ del total de pacientes argentinos con HB y el 100/ de los pacientes con HB e inhibidor por la inclusión en un protocolo de estudio específico (2008-2010). Este algoritmo termina con un análisis para la asignación de causalidad: análisis de la relación genotipo-fenotipo.

Se estudiaron 49 pacientes con HB y se obtuvieron 29 cambios *missense* (60/), 7 cambios *nonsense* (14/), 4 defectos en los sitios de *splicing* (8/), 2 pequeñas inserciones-deleciones (4/) con corrimiento del marco de lectura, 6 grandes deleciones (12/) y un cambio en región promotora. La serie también incluyó mujeres relacionadas a probandos, se estudiaron un total de 27 mujeres, resultando 21 portadoras de HB y 6 no portadoras.

Ocho de las mutaciones causales presentadas no se encontraron reportadas en la literatura, dos de ellas afectarían el sitio dador de *splicing* en el intrón 2 y 4, c.252+2T>G y c.391+1insT, respectivamente, dos corresponden a inserciones-deleciones que modifican el marco de lectura (p.-21fsX20 y p.242fsX21), dos casos asociados a aparición de un codón de terminación prematuro (p.-12Glu>Stop y p.133Gly>Stop) y dos casos predicen cambios *missense*. El caso, p.8Glu>Gln indica la disrupción de un puente bisulfuro, fundamental para mantener la estructura del dominio EGF1 del *F9*, y en el segundo caso, p.56Cys>Phe, afecta la γ-carboxilación de los residuos Gla de la proteína, y modifica la superficie electroestática de la molécula, fundamental para la unión del FIX a la superficie plaquetaria activada. La serie mostro un caso interesante con la presencia de una mutación en la región promotora del gen (g.-6G>A), denominada HB Leyden, el análisis de la literatura indica una recuperación de los niveles de FIX luego de la pubertad y eventualmente la desaparición del fenotipo.

Capítulo II

Se diseño y desarrollo un nuevo abordaje para la genotipificación de la inversión del intrón 22 (Inv22) e inversión del intrón 1 (Inv1) a través de la estrategia de *inverse shifting*-PCR (IS-PCR). El

uso de este nuevo abordaje basado en IS-PCR (*test* diagnóstico y complementario) permite la genotipificación del tipo de inversión del intrón 22 (i.e., tipo I y tipo II), todos los posibles rearreglos, hipotetizados teóricamente, mediados por recombinación homologa entre las copias del duplicon *int22h* (i.e., duplicaciones, dup22 y deleciones, del22 tipo I y tipo II) y sobre el mismo sustrato estudiar la presencia de la inversión del intrón 1.

El abordaje fue validado para el estudio de la inversión del intrón 22 por: 32 casos (18 pacientes con HA severa y 14 mujeres relacionadas) previamente estudiados por *Southern blot* y 43 casos (24 pacientes con HA severa y 19 mujeres relacionadas) previamente estudiados por PCR inversa, obteniéndose perfecta concordancia con la técnica de IS-PCR. Asimismo se estudiaron 34 casos nuevos (20 pacientes con HA severa y 14 mujeres relacionadas). En el uso conjunto del *test* diagnóstico y complementario no se observaron de patrones compatibles a las duplicaciones y deleciones mediadas por int22h. La validación de IS-PCR para el estudio de la inversión del intron 1 incluyó: 21 individuos previamente estudiados por doble PCR, que incluían dos probandos con la inversión del intrón 1, una portadora y 18 casos negativos, en todos los casos se encontró perfecta concordancia con la IS-PCR. Asimismo se aplicó a 13 nuevos casos.

Se estudió la eficiencia de circularización, la detección de eventuales portadoras en mosaico y la utilidad en diagnostico prenatal. La eficiencia de circularización para el circulo Bcl I mostró un promedio de 4 templados necesarios para la formación de un círculo y para el círculo de 20 Kb un promedio de 7 templados por círculo, en este estudio, también se observo que bajas o moderadas cantidades de ADN sustrato se asocian a mayores eficiencias en la formación de círculos. La capacidad de la estrategia de IS-PCR de detectar eventuales portadoras en mosaico mostró la detección de portadoras heterocigotas con un 5/ y un 10/ de células en mosaico para la Inv22 e Inv1 respectivamente. La habilidad de IS-PCR en diagnostico prenatal fue estudiada mediante la aplicación de esta estrategia a muestras de vellosidades criónicas a un feto femenino, propósito, resultando positivo para el Inv22 y una muestra control negativa para la Inv22.

Capítulo III

Se analizó el primer grupo de casos de mujeres portadoras sintomáticas de HA severa (FVIII:C \leq 1,5), se estudió la cigosidad de la mutación causal, mediante el *screening* total del *F8*, y el

patrón de inactivación del cromosoma X (XIP), a través de la puesta a punto del sistema HUMARA por métodos no radiactivos y validación de este análisis.

Se encontraron seis mujeres portadoras sintomáticas de HA severa. Un caso mostró la mutación causal, c.3633delA, en homo-hemicigosis, cuatro casos mostraron la mutación causal en heterocigosis y sesgo extremo en el patrón de inactivación del cromosoma X (XIP \geq 90/) y un caso mostro la mutación, c.4388_4391delCTTT, en heterocigosis sin observarse sesgo en el patrón de inactivación del cromosoma X.

En la familia B dos casos mostraron concordancia en los niveles de XIP en sangre periférica (XIP_{SP}) y mucosa bucal (XIP_{MB}). El caso índice (P34) heterocigota para el cambio c.325A>G, presentó XIP sesgado extremo, 99/, y niveles de FVIII:C <1UI/dl y su tía materna (P36) heterocigota para el mismo cambio, presentó XIP del 86 / y nivel de FVIII:C de 50 UI/dl. La detección de la fase permitió asociar en el caso índice el cromosoma X activo ligado al alelo F8 que porta la mutación y en su tía el cromosoma X activo al alelo *F8* que no porta la mutación. Estos hallazgos indicarían que el hígado presentaría el mismo sesgo que los tejidos estudiados. En cambio es esta misma familia la madre del caso índice (P35) presentó niveles de XIP discordantes en sangre periférica (XIP_{SP} 99/) y mucosa bucal (XIP_{MB} 60/) y la tía materna (P37) presentó un único XIP_{SP} del 97/, Ambos casos mostraron la mutación familiar en heterocigosis y niveles de FVIII:C de 58 UI/dl. El estudio de fase en estos casos indica que el cromosoma X activo está ligado el alelo *F8* no mutado. En consecuencia los valores observados de FVIII:C típicos de portadoras asintomáticas, indicarían junto al hallazgo de discordancia del XIP en SP y MB, que el hígado, presentaría un estado de inactivación distinto e independiente del medido en SP.

Los estudios de correlación XIP-FVII:C en sangre periférica mostraron modestas diferencias significativas (p <0,05) tanto en tablas de contingencia considerando FVIII:C extremo/intermedio *versus* XIP sesgado extremo/no sesgado, planteando un contraste con la literatura.

En otro análisis de la misma serie se aplica un modelo de correlación teórico, modelo V, asumiendo que no se conoce la fase entre el F8 mutado y el X inactivo, indicó en concordancia con el análisis de contingencia una modesta correlación significativa (p <0,05) comparado con

modelos alternativos en portadoras (modelo A y promedio de portadoras) y no significativos tomando la dispersión del promedio de la serie de no portadoras normalizado.

Estos hallazgos de correlación XIP-FVIII:C en sangre periférica, en contraste con lo reportado en la literatura, pueden asociarse a un sesgo en nuestra serie con exceso de portadoras sintomáticas, casos usualmente asociados a inactivación sesgada con predisposición genética, sea primaria o secundaria, a presentar sesgo en todos los órganos y tejidos de la economía.

La concordancia o discordancia de los valores de XIP en sangre periférica y mucosa bucal estarían estimando el grado de predisposición genética a presentar inactivación sesgada en toda la economía o mostrar segregación distinta e independiente en cada tejido, respectivamente.

Referencias

Allen R, Zoghbi H, Moseley A, Rosenblatt H, Belmont J. Methylation of Hpall and Hhal sites near the polymorphic CAG repeat in the human androgen receptor gene correlates with X chromosome inactivation. *Am J Hum Genet* 1992, 51:1229-39

Anson DS, Choo KH, Rees DJ, Giannelli F, Gould K, Huddleston JA, Brownlee GG. The gene structure of human anti-haemophilic factor IX. EMBO J 1984; 3(5):1053-60.

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, Scwartz 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, Vermylen J, Mori PG, Acquila M, Caprino D, Inaba H. Factor VIII Gene Inversions in Severe Hemophilia A: Results of an International Consortium Study. Blood 1995; 86:2206-2212.

Ay C, Thom K, Abu-Hamdeh F, Horvath B, Quehenberger P, Male C, Mannhalter C, Pabinger I. Determinants of factor VIII plasma levels in carriers of haemophilia A and in control women. Haemophilia. 2010 Jan;16(1):111-7. Epub 2009 Sep 16.

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

Bagnall RD, Giannelli F, Green PM. Polymorphism and hemophilia A causing inversions in distal Xq28: a complex picture. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 2598-9.

Bagnall RD, Waseem N, Green PM, Giannelli F Recurrent inversion breaking intron 1 of the factor VIII gene is a frequent cause of severe Hemophilia A. Blood 2002; 99: 168-74.

Base de datos de HA, HADB (previamente HAMSTERS): http://www.hadb.org.uk

Base de datos de HB, versión 13: http://www.kcl.ac.uk/ip/petergreen/haemBdatabase.html

Belvini D, Salviato R, Are A, Radossi P, Tagariello G. Rapid prenatal diagnosis of haemophilia. Haemophilia. 2001 Nov;7(6):603-4.

Belvini D, Salviato R, Radossi P et al. Molecular genotyping of the Italian cohort of patients with hemophilia B. Haematologica 2005; 90: 635–42.

Bicocchi MP, Migeon BR, Pasino M, Lanza T, Bottini F, Boeri E, Molinari AC, Corsolini F, Moreiro C, Acquila M. Familial nonrandom inactivation linked to the inactivation centre in heterozygotes manifesting haemophilia A. European Journal of Human Genetic 2005; 13: 635-40.

Bottema CDK, Ketterling RP, Li S, Yoon H, Phillips III JA, Sommer SS. Missense mutations and evolutionary conservation of amino acids: Evidence that many of the amino acids in the factor IX function as spacer elements. American Journal of Human Genetic 1991; 49: 820-838.

Bowen DJ, Keeney S. Unleashing the long-distance PCR for detection of the intron 22 Inversion of the factor VIII gene in severe haemophilia A. Thromb Haemost 2003; 89:201.

Braunstein KM, Noyes CM, Griffith MJ, Lundblad RL, Roberts HR.Characterization of the defect in activation of factor IX Chapel Hill by human factor XIa. J Clin Invest. 1981 Dec;68(6):1420-6.

Brown CJ, Willard HF. Localization of a gene that escapes inactivation to the X chromosome proximal short arm: implications for X inactivation. Am J Hum Genet 1990; 46(2):273-9.

Buratti E, Chivers M, Kra´ lovicč ova´ J, Romano M, Baralle M, Krainer A and Vorčechovsky´ I. Aberrant 50 splice sites in human disease genes: mutation pattern, nucleotide structure and comparison of computational tools that predict their utilization. Nucleic Acids Research, 2007, Vol. 35, No. 13, 4250-4263.

Carrel L, Hunt PA, Willard HF. Tissue and lineage-specific variation in inactive X chromosome expression of the murine Smcx gene. Hum Mol Genet. 1996 Sep;5(9):1361-6.

Christophe OD, Lenting PJ, Kolkman JA, Brownlee JJ and Mertens K. Blood Coagulation Factor IX Residues Glu⁷⁸ and Arg⁹⁴ Provide a Link between Both Epidermal Growth Factor-like Domains That Is Crucial in the Interaction with Factor VIII Light Chain *1998 The Journal of Biological Chemistry*, *273*, *222-227*.

Di Scipio RG, Kurachi K, Davie EW. Activation of human factor IX (Christmas factor). J Clin Invest 1978; 61:1528–38.

Enjolras N, Platier JL, Rodriguez MH, Rea M, Attali O, Vinciguerra C, Negrier C. Two novel mutations in the EGF-like domains of the factor IX dramatically impair intracelular processing and secretion. J. Thromb. Haemost. 2004; 2 (7): 1143-54.

Favier R, Lavergne JM, Costa JM, Caron C, Mazurier C, Viémont M, Delpech M, Valleix S. Unbalanced X-chromosome inactivation with a novel FVIII gene mutation resulting in severe hemophilia A in a female. Blood. 2000 15; 96(13):4373-5.

Freedman SJ, Blostein MD, Baleja JD, Jacobs M, Furie BC and Furie B. Identification of the Phospholipid Binding Site in the Vitamin K-dependent Blood Coagulation Protein Factor IX. *The Journal of Biological Chemistry 1996, 271, 16227-16236.*

Frischmeyer PA, Dietz HC. Nonsense-mediated mRNA decay in health and disease. Hum Mol Genet. 1999;8(10):1893-900.

Gale L, Weadon H, Boulos P, Linch DC. Tissue specificity of X chromosome inactivation pattern. Blood 1994; 83: 2899-905.

Ganguly A, Rock M, Prockop D. Conformation-sensitive gel electrophoresis for rapid detection of single-base differences in doble-stranded PCR products and DNA fragments: Evidence for

solvent-induced blends in DNA geteroduplex. Proc. Natl. Acad. Sci 1993, Nov 1; 90 (21), 10325-29.

Giannelli F, Green PM, Sommer SS, Poon M, Ludwig M, Schwaab R, Reitsma PH, Goossens M, Yoshioka A, Figueiredo MS, Brownlee GG. Haemophilia B: database of point mutations and short additions and deletions--eighth edition. Nucleic Acids Res 1998; 26(1):265-8.

Gitschier J, Kogan S, Levinson B, Tuddenham EG. Mutations of factor VIII cleavage sites in hemophilia A. Blood. 1988; 72(3):1022-8.

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

Goodeve AC, Williams I, Bray GL, Peake IR. Relationship between factor VIII mutation type and inhibitor development in a cohort of previously untreated patients treated with recombinant factor VIII (Recombinate). Recombinate PUP Study Group. Thromb Haemost 2000; 83(6):844-8.

Green P, Bentley D, Mibashan S, Nilsson I, Giannelli F. Molecular pathology of haemophilia B EMBO J. 1989 Apr;8(4):1067-72.

Green PM, Giannelli F, High KA, Sommer S, Lillicrap DP, Ludwig M, Olek K, Reitsma PH, Goossens M, Yoshioka A, Brownlee GG. Haemophilia B: database of point mutations and short additions and deletions—third edition, 1992. Nuclei Acids Res.1992; 11 (20): 2027-63.

Green P, Hill M, Bowen DJ, the UK Haemophilia Centre Doctors'Organisation Haemophilia Genetics Network. Duplications involving *int22h*-1 of the factor VIII gene: a cause for concern in genetic testing for hemophilia A? *J Thromb Haemost* 2007; 5: 2155-6.

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

Heit J.A, Ketterling RP, Zapata RE, Ordonez SM, Kasper CK. Hemophilia B Brandenberg-type promoter mutation. Haemophilia 1999, 5, 73-75.

Higuchi M, Kazazian HH, Kasch L, Warren TC, Mc Ginniss MJ, Phillips III JA, Kasper C, Janco R, Antonarakis SE. Molecular caracterization 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 1991; 88:7405-7409.

Hinks JL, Winship PR, Makris M, Preston FE, Peake IR, Goodeve AC. A rapid method for haemophilia B mutation detection using conformation sensitive gel electrophoresis. British Journal of Haematology 1999, 104: 915-918.

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

Huang MN, Kasper CK, Roberts HR, Stafford DW, High KA.Molecular defect in factor IXHilo, a hemophilia Bm variant: Arg----Gln at the carboxyterminal cleavage site of the activation peptide. Blood. 1989 Feb 15;73(3):718-21.

Ingram GIC. The history of hemophilia. Journal clinical pathology 1976; 29:469-79.

James PD, Stakiw J, Leggo J, Walker I, Lillicrap D. A case of non-resolving hemophilia B Leyden in a 42-year-old male (F9 promoter + 13 A>G). J Thromb Haemost 2008; 6: 885–6.

Kamphuisen PW, Houwing-Duistermaat JJ, van Houwelingen HC, Eikenboom JC, Bertina RM, Rosendaal FR. Familial Clustering of Factor VIII and von Willebrand Factor Levels Thromb Haemost 1998; 79: 323-7

Kasper CK, Buzin CH. Genetics of Hemofilia A and B. An introduction for clinicians, 2009. Southland publications. Pasadena, United states of America.

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

Kemball-Cook G, Tuddenham EG, Wacey AI. The factor VIII Structure and Mutation Resource Site: HAMSTeRS version 4. Nucleic Acids Res 1998; 26(1):216-9.

Ketterling RP, Vielhaber E, Sommer S. The rates of G:C>T:A and G:C>C:G transversions at CpG dinucleotides in the human factor IX gene. Am J. Hum. Genet. 1994, 54: 831-835.

Kling S, Coffey AJ, Ljung R, Sjörin E, Nilsson IM, Holmberg L, Giannelli F. Moderate haemophilia B in a female carrier caused by preferential inactivation of the paternal X chromosome. Eur J Haematol. 1991;47 (4):257-61.

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

Kolkman JA, Lenting PJ, Mertens K. Regions 301-303 and 333-339 in the catalytic domain of blood coagulation factor IX are factor VIII-interactive sites involved in stimulation of enzyme activity. Biochem J. 1999 Apr 15;339 (Pt 2):217-21.

Körkkö J, Annunen S, Pihlajamaa T, Prockop DJ, Ala-Kokko L. Conformation sensitive gel electrophoresis for simple and accurate detection of mutations: comparison with denaturing gradient gel electrophoresis and nucleotide sequencing.Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Feb 17;95(4):1681-5.

Kurachi K y Davie EW. Proc Natl. Acad. Sci U.S.A. 1982. 79: 6461-64.

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

Lakich D, Kazazian HH, Antonarakis SE, Gitschier J. Inversions disrupting the factor VIII gene are common cause of severe Haemophilia A. *Nature Genet*. 1993;5:236-41.

Lenting PJ, Christophe OD, Maat H, Rees DJ, Mertens K. Ca2+ binding to the first epidermal growth factor-like domain of human blood coagulation factor IX promotes enzyme activity and factor VIII light chain binding. J Biol Chem. 1996 Oct 11;271(41):25332-7.

Lillicrap D. The molecular basis of haemophilia B. Haemophilia 1998; 4:350-357.

Liu Q, Nozari G, Sommer SS. Single-tube polymerase chain reaction for rapid diagnosis of the inversion hotspot of mutation in haemophilia A. *Blood* 1998; 19: 5444.

Ljung R, Petrini P, Tengborn L, Sjörin E. Haemophilia B mutations in Sweden: a population-based study of mutational heterogeneity.Br J Haematol. 2001 Apr;113(1):81-6.

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

Martínez Murillo C, Quintana Gonzáles S, Fernandez R, Kasper C. Hemofilia, editorial Prado, México, D.F. 2001.Capítulo 4, páginas 55-66.

Mathur A, Zhong D, Sabharwal AK, Smith KJ, Bajaj SP.Interaction of factor IXa with factor VIIIa. Effects of protease domain Ca2+ binding site, proteolysis in the autolysis loop, phospholipid, and factor X. J Biol Chem. 1997 Sep 12;272(37):23418-26.

McGraw RA, Davis LM, Noyes CM, Lundblad RL, Roberts HR, Graham JB, Stafford DW. Evidence for a prevalent dimorphism in the activation peptide of human coagulation factor IX. Proc Natl Acad Sci USA 1985; 82 (9): 2847-51.

McKusik VA. Mendelian Inheritance in Man. A catalog of human genes and genetics disorders. Eleventh edition. Baltimore: The John Hopkins University Press 1994; Vol II, 2384-93.

Mitchell M., Keeney S., Goodeve A. The molecular analysis of haemophilia B: a guideline from the UK haemophilia centre doctors' organization haemophilia genetics laboratory network. Haemophilia 2005, 11: 398-404.

Morange PE, Tregouet DA, Frere C. Biological and genetic factors influencing plasma factor VIII levels in a healthy family population: result from Stanislas cohort. Br J Haematology 2005; 128: 91-9.

Morgan GE, Figueiredo MS, Winship PR, Baker R, Bolton-Maggs PH, Brownlee GG. The high frecuency of the -6G>A factor IX promoter mutation is the result both of a founder effect and recurrent mutation at a CpG dinucleotide. British Journal of Haematology 1995; 89:672-4.

Mukherjee S, Mukhopadhyay A, Banerjee D, Chandak GR, Ray K. Molecular pathology of haemophilia B: identification of five novel mutations including a LINE 1 insertion in Indian patients. Haemophilia 2004, 10:259-263.

Naumova AK, olien L, Bird LM, Slamka C, Fonseca M, Verner A, Wang M, et al. Transmissionradio distortion of the X chromosome among the male offspring of females with skewed X inactivation. Dev Genet 1995, 17: 198-205.

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

Nisen PD, Waber PG. Nonrandom X chromosome DNA methylation patterns in hemophiliac females. Journal Clinical Investigation. 1989; 83: 1400-03.

Oldenburg J, Rost S, El-Maari O, Leuer M, Olek K, Muller CR, Schawaab R. De novo factor VIII gene intron inversion in a female carrier presents as a somatic mosaicism. *Blood* 2000; 96: 2905-6.

Oldenburg J, Schroder J, Hermann Brackmann H, Muller-Reible C, Schwaab R, Tuddenham E. Environmental and genetic factors influencing inhibitor development. Semin Hematol 2004; 41(1 Suppl 1):82-8.

Oldenburg J, Pavlova A. Genetic risk factors for inhibitors to factors VIII and IX. Haemophilia. 2006 Dec;12 Suppl 6:15-22.

Orstavik KH, Orstavick RE. Skewed X chromosome inactivation in a female with haemophilia B and in her non carrier daughter: a genetic influence on X chromosome inactivation? 1999; 36: 865-66.

Orstavick K, Scheibel E, Ingerslev J, Schwartz M. Absence of correlation between X chromosome inactivation pattern and plasma concentration of factor VIII and factor IX in carriers of haemophilia A and B. Thrombosis Haemostasis, 2000; 83:433-437.

Pegoraro E, Whitaker J, Mowery-Rushton P, Surty U, Lanasa M, Hoffman EP. Familial skewed inactivation: a molecular trait associated with high spontaneous abortion rate maps to Xq28. *Am J Hum Genet* 1997; 61: 160-70.

Peretz H, Usher S, Martinowitz U, Seligsohn U. Factor VIII gene rearrangement in Hemophilia A carrier detection: a word of caution. Blood 1994; 84: 1351-2.

Pertea M, Lin X, Salzberg S. GeneSplicer: A new computationa lmethor for splice site prediction. Nucleic acids research 2001, 29: 5; 1185-1190.

Plug I, Mauser-Bunschoten EP, Bro[°]cker-Vriends AHJT, Ploos van Amstel JK, van der Bom JG, van JEM, Diemen-Homan, Willemse, and Rosendaal FR. Bleeding in carriers of hemophilia. Blood 2006; 108 (1): 52-6.

Puck J and Willard H. X inactivation in females with X-linked disease. The New England Journal of Medicine. 1998, 338 (29): 325-328.

Radic CP, Rossetti LC, Zuccoli JR, Abelleyro MM, Larripa IB y De Brasi CD. Inverse shifting PCR based prenatal diagnosis of hemophilia-causative inversions involving *int22h* and *int1h* hotspots from chorionic villus samples. *Prenat Diagn* 2009; 29: 1183–1185.

Rick ME, Walsh CE, Key NS. Congenital bleeding disorders. Hematology. 2003; 559-74. Review.

Roca X, Olson AJ, Rao AR, Enerly E, Kristensen VN, Børresen-Dale AL, Andresen BS, Krainer AR and Sachidanandam R. Features of 5'-splice-site efficiency derived from disease-causing mutations and comparative genomics. *Genome Res.* published online Nov 21, 2007

Rogaev E, Grigorenko A, Faskhutdinova G, Kittler E, Moliaka Y. Genotype analysis identifies the cause of the "Royal disease". Science 2009, Nov 6; 326 (5954):817.

Ross MT, Grafham DV, Coffey AJ, Scherer S, McLay K, Muzny D et al. The DNA sequence of the human X-chromosome. Nature. 2005; 434:325-37.

Rossetti LC, Goodeve A, Larripa IB, De Brasi CD. Homeologous recombination between AluSx-sequences as a cause of hemophilia. Human mutation 2004 MIB #759 24(5): 440.

Rossetti LC, Radic P, Larripa IB, De Brasi CD. Genotyping the hemophilia inversion hotspot by use of inverse PCR. *Clin Chem* 2005; 51: 154-8.

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. Factor VIII gene inversions causing severe Hemophilia A originate almost exclusively in male germ cells. Hum Molec Genet 1994; 3:1035-1039.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular clonning. A laboratory manual. Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York / USA, 1989.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci U S A. 1977 Dec;74(12):5463-7.

Schwaab R, Brackmann HH, Meyer C, Seehafer J, Kirchhesser M, Haack A, Olek K, Tuddenham EGD, Oldenburg J. Haemophilia A: mutation type determines risk of inhibitor formation. Haemost. Thrombosis. 1995; 74: 1402-06.

Tagariello G, Belvini D, Salviato R, Di Gaetano R, Zanotto D, Radossi P, Risato R, Sartori R, Tassinari C. The Italian haemophilia B mutation database: a tool for genetic counselling, carrier detection and prenatal diagnosis. Blood Transfus. 2007 Jul;5(3):158-63.

Tagariello y colaboradores WFH 2010

Tan SS, Williams EA, Tam PP. X-chromosome inactivation occurs at different times in different tissues of the post implantation mouse embryo. Nat Genet 1993; 3: 170-4.

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

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

Tsang TC, Bentley DR, Mibashan RS, Giannelli F. A factor IX mutation, verified by direct genomic sequencing, causes haemophilia B by a novel mechanism. EMBO J 1988; 7(10):3009-15.

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. Haemophilia A: database of nucleotide substitutions, deletions, insertions and rearrangements of the factor VIII gene. Nucleic. Acids Res 1991; 19:4821-4833.

Vehar GA, Keyt B, Eaton D, Rodriguez H, O'Brien DP, Roblat F, Oppermann H, Keck R, Wood WL, Harkins RN, Tuddeenham EGD, Lawn RM, Capon J. Structure of human factor VIII. Nature. 1984; 312: 337-342.

Vianello F, Radossi P, Tison T, Dazzi F, Tagariello G, Davoli PG, Girolami A. Prevalence of anti-FVIII antibodies in severe haemophilia A patients with inversion of intron 22. Br J Haematol 1997; 97(4):807-9.

Vidaud D, Tartary M, Costa JM, Bahnak BR, Gispert-Sanchez S, Fressinaud E, Gazengel C. Nucleotide substitutions at the -6 position in the promoter region of the factor IX gene result in different severity of hemophilia B Leyden: Consequences for genetic counseling. Human Genetics 1993; 91:241-4.

Viel K, Machiah D, Warren D, Khachidze M, Buil A, Fernstrom K, Souto J, Peralta J, Smith T, BlangeroJ, Poter S, Warren S, Fontcuberta J, Soria J, Flanders W, Almasy L, Howard T. A sequence variation scan of the coagulation factor VIII (FVIII) structural gene and associations with plasma FVIII activity levels. Blood, May, 109 (9): 3713-3724.

Vorechovský I. Aberrant 3' splice sites in human disease genes: mutation pattern, nucleotide structure and comparison of computational tools that predict their utilization. Nucleic Acids Res. 2006;34(16):4630-41. Epub 2006 Sep 8.

Walker I, Pai M, Akabutu J, Ritchie B, Growe G, Poon MC, Card R, Ali K, Israels S, Teitel J. The Canadian hemophilia registry as the basis for a national system for monitoring the use of the factor concentrates. Transfusion. 1995; 35 (7): 548-51.

Warrier I, Ewenstein BM, Koerper MA et al. Factor IX inhibitors and anaphylaxis in hemophilia B. J Pediatr Hematol Oncol 1997; 19: 23–7.

Williams IJ, Abuzenadah A, Winship PR, Preston FE, Dolan G, Wright J, Peake IR, Goodeve AC. Precise carrier diagnosis in families with haemophilia A: use of conformation sensitive gel electrophoresis for mutation screening and polymorphism analysis. Thromb Haemost. 1998 Apr;79(4):723-6

Wojcik EGC, Van Den Berg M, Poort SR, Bertina RM. Modification of the N-terminus of human factor IX by defective propeptide cleavage or acetylation results in a destabilized calcium-induced conformation : effects on phospholipid binding and activation by factor Xia. Biochemistry Journal 1997; 323, 629-636.

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. Expression of active Human factor VIII from recombinant DNA clones. Nature 1984; 312: 330-336.

Woods-Samuels P, Kazazian HH Jr, Antonarakis SE. Nonhomologous recombination in the human genome: deletions in the human factor VIII gene. Genomics 1991; 10(1):94-101.

Yang MY, Ragni MV. Clinical manifestations and management of labor and delivery in women with factor IX deficiency. Haemophilia. 2004 Sep;10(5):483-90.

Yoshitake S, Schach BG, Foster DC, Davie EW, Kurachi K. Nucleotide sequence of the gene for human factor IX (antihemophilic factor B). Biochemistry 1985; 24(14):3736-50.