

EPIDEMIOLOGÍA Y ANÁLISIS GENÉTICO DE LA HEMOFILIA A EN ANDALUCÍA

Tesis Doctoral presentada por
D. Ramiro José Núñez Vázquez
para optar al grado de Doctor en Medicina
por la Universidad de Sevilla

**Dña. ROSARIO PÉREZ GARRIDO, DOCTOR EN MEDICINA,
JEFE DE SECCIÓN DE COAGULOPATÍAS COGÉNITAS HEMORRÁGICAS
DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO VIRGEN DEL ROCÍO
Y PROFESORA ASOCIADA DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA
DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA**

CERTIFICA:

Que el Licenciado D. RAMIRO JOSÉ NÚÑEZ VÁZQUEZ, ha realizado el trabajo de investigación que lleva por título: "EPIDEMIOLOGÍA Y ANÁLISIS GENÉTICO DE LA HEMOFILIA A EN ANDALUCÍA" bajo mi dirección, reuniendo las condiciones necesarias para ser leída y defendida como tesis para optar al grado de Doctor en Medicina.

Para que conste y a los efectos oportunos, expido la presente comunicación en Sevilla a 6 de Febrero de 2017.

**Fdo: Dra. Rosario Pérez Garrido
DIRECTORA DE LA TESIS**

**D. ILDEFONSO ESPIGADO TOCINO, DOCTOR EN MEDICINA,
JEFE DE SECCIÓN DE CLÍNICA DE HEMATOLOGÍA
DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO VIRGEN DEL ROCÍO
Y PROFESOR ASOCIADO DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA
DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA**

CERTIFICA:

Que el Licenciado D. RAMIRO JOSÉ NÚÑEZ VÁZQUEZ, ha realizado el trabajo de investigación que lleva por título: "EPIDEMIOLOGÍA Y ANÁLISIS GENÉTICO DE LA HEMOFILIA A EN ANDALUCÍA" bajo mi dirección, reuniendo las condiciones necesarias para ser leída y defendida como tesis para optar al grado de Doctor en Medicina.

Para que conste y a los efectos oportunos, expido la presente comunicación en Sevilla a 6 de Febrero de 2017.

**Fdo: D. Ildefonso Espigado Tocina
DIRECTOR DE LA TESIS**

**D. JERÓNIMO PACHÓN DIAZ, CATEDRÁTICO DE MEDICINA
DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA Y JEFE DE SERVICIO
DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO
VIRGEN DEL ROCÍO**

CERTIFICA:

Que ha actuado como tutor de la Tesis Doctoral presentada por el licenciado D. RAMIRO JOSÉ NÚÑEZ VÁZQUEZ, titulada: "EPIDEMIOLOGÍA Y ANÁLISIS GENÉTICO DE LA HEMOFILIA A EN ANDALUCÍA" reuniendo su autor, a mi juicio, las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor en Medicina.

Para que conste y a los efectos oportunos, expido la presente comunicación en Sevilla a 6 de febrero de 2017.

**Fdo: Dr. Jerónimo Pachón
TUTOR DE LA TESIS**

*“La única razón para
que el tiempo exista
es para que no ocurra
todo a la vez”*

Albert Einstein

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quisiera expresar un profundo agradecimiento a mis directores de tesis, por guiarme en este reto personal y profesional, un objetivo que me había marcado en la vida.

A la Dra. Rosario Pérez Garrido por ser mi maestra. Su vitalidad, perseverancia y conocimientos han sido decisivos para llevar a término este proyecto.

Al Dr. Ildefonso Espigado, siempre colaborador y dispuesto a facilitarme el trabajo.

Al Dr. Jerónimo Pachón, que asumió la tutorización sin dudarlo, con toda generosidad.

Al Dr. José Villar, su legado siempre estará con nosotros.

Al Dr. José Antonio Pérez Simón por su decisión, empuje y ánimo para la consecución de este objetivo.

Al Dr. Raul García Lozano, en todo momento dispuesto a compartir sus conocimientos.

A Ana y Carmen por sus ánimos y cuidados.

A Reyes y Javier por su permanente comprensión y apoyo.

A mis compañeros del Grupo Andaluz de Coagulopatías por su confianza y afecto.

A mis padres por convertirme en quién soy. Imposible recibir más amor, atención y apoyo.

A mi hermana, sin duda un ejemplo a seguir, especialmente, en los momentos complicados.

A Toñi, Elena y Ramiro, por estar ahí siempre e incondicionalmente.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	17
1.1. Hemostasia.....	21
1.1.1. Factores de la coagulación, papel del FVIII y FIX en el proceso de la coagulación.	22
1.2. Diagnóstico de la hemofilia A	26
1.3. Gen del F8 y proteína	27
1.4. Bases moleculares de la hemofilia A.....	29
1.4.1. Mutaciones en sitios CpG.....	31
1.4.2. Hemofilia A: mutaciones en el gen F8.....	31
1.4.3. Mutaciones de riesgo de desarrollo de inhibidor en hemofilia grave	35
1.4.4. Inhibidores en hemofilia leve y moderada	35
1.5. Aspectos clínicos de la hemofilia	36
1.6. Tratamiento y desarrollo de inhibidor.....	37
1.7. Discrepancias.....	39
1.8. Portadoras de hemofilia.....	40
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	43
3. MATERIAL Y MÉTODOS	47
3.1. Pacientes	49
3.1.1. Controles	51
3.1.2. Algoritmo de trabajo	52
3.2. Extracción de ADN	53
3.3. Estudio mutacional.....	53
3.3.1. Inversión del intrón 22.....	53
3.3.1.1. Cebadores	53
3.3.1.2. Condiciones de mezcla de PCR.....	54
3.3.1.3. Parámetros de PCR	55
3.3.1.4. Electroforesis.....	55
3.3.2. Inversión del intrón 1	55
3.3.2.1. Cebadores	55
3.3.2.2. Condiciones de la mezcla de PCR	57
3.3.2.3. Parámetros de PCR	57
3.3.2.4. Electroforesis.....	57

3.3.3. Secuenciación.....	58
3.3.3.1. Cebadores para la amplificación del gen FVIII.....	58
3.3.3.2. Condiciones de la mezcla para la amplificación del gen FVIII.....	59
3.3.3.3. Parámetros de PCR.....	60
3.3.3.4. Electroforesis y purificación.....	60
3.3.3.5. Reacción de secuenciación.....	60
3.3.3.6. Alineación de las secuencias.....	61
4. RESULTADOS	63
4.1. Descripción general de las mutaciones.....	65
4.2. Mutaciones en pacientes con hemofilia A grave.....	70
4.2.1. Inversión intrón 22.....	70
4.2.2. Inversión intrón 1.....	71
4.2.3. Mutaciones sin sentido.....	72
4.2.4. Mutaciones de cambio de aminoácido "missense".....	73
4.2.5. Pequeñas deleciones e inserciones.....	75
4.2.6. Mutaciones en zona de procesamiento de ARN (splicing).....	78
4.2.7. Grandes deleciones.....	79
4.3. Mutaciones en pacientes con hemofilia A moderada.....	80
4.3.1. Mutaciones de cambio de aminoácido "missense".....	80
4.3.2. Mutaciones en zona de procesamiento de ARN (splicing).....	83
4.3.3. Pequeñas deleciones.....	83
4.3.4. Grandes deleciones.....	84
4.4. Mutaciones en pacientes con hemofilia A leve.....	85
4.4.1. Mutaciones puntuales de cambio de aminoácido "missense".....	86
4.4.2. Splicing.....	90
4.5. Discrepancias.....	90
4.6. Mutaciones no descritas.....	91
4.7. Estudio de portadoras.....	94
5. DISCUSIÓN	97
5.1. Mutaciones discrepantes.....	107
5.2. Mutaciones relacionadas con el aumento de FVIII con la edad.....	109
5.3. Mutaciones de alto riesgo para el desarrollo de inhibidor.....	110
5.4. Portadoras de Hemofilia.....	115
6. CONCLUSIONES	117
7. BIBLIOGRAFÍA	121

ABREVIATURAS

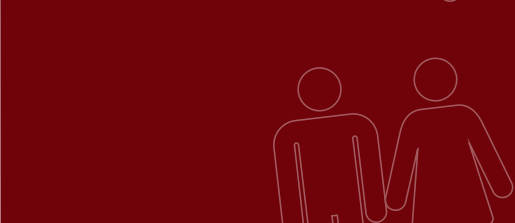
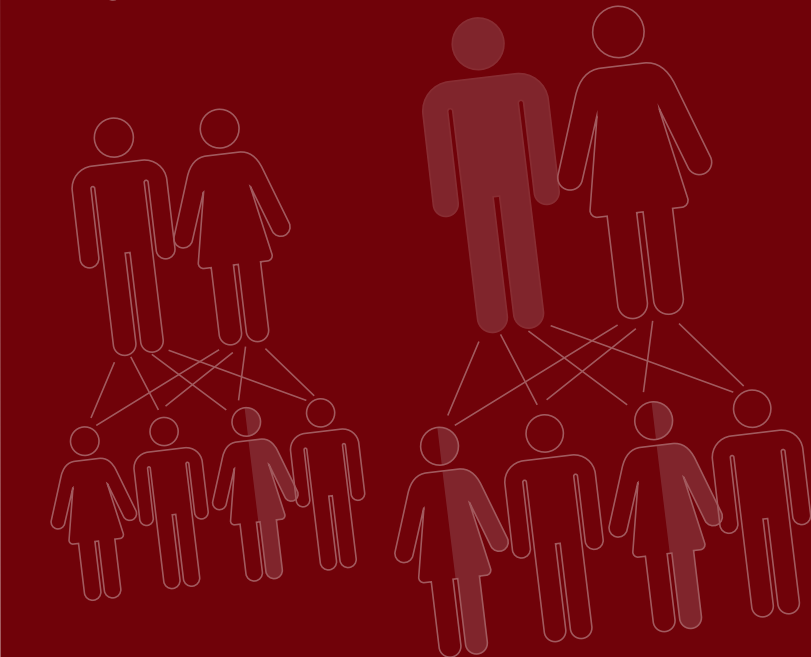
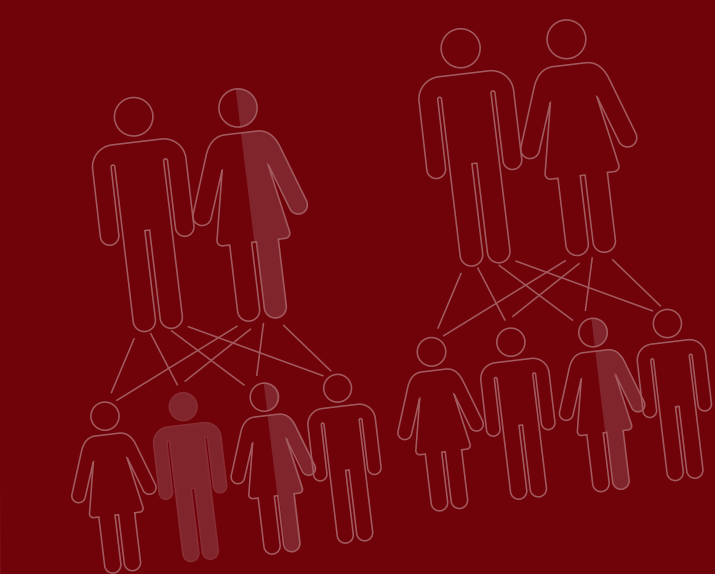
ADP	Difosfato de adenosina	Ins	Inserción
ADN	Ácido desoxirribonucleico	Inv1	Inversión del intrón 1
ARN	Ácido ribonucleico	Inv22	Inversión del intrón 22
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero	ITI	Inmunotolerancia
CpG	Dinucleótidos Citosina-Fosfato-Guanina no metilados	Kb	Kilobase
ddH₂O	Agua bidestilada	KDa	Kilodaltons
del	Delección	ml	Mililitros
DNTP	Desoxinucleótido trifosfato	min	Minutos
DMSO	Dimetil sulfóxido	μl	Microlitro
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético	μM	Micromolar
F8	Gen del factor VIII	pb	Par de bases
F9	Gen del factor IX	PCR	Polymerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)
FI a FXIII	Factor I a Factor XIII	rpm	Revoluciones por minuto
Fla a FXIIIa	Factor I activado a Factor XIII activado	TAFI	Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (Inhibidor de la Fibrinólisis Activado por Trombina)
fs	frameshift (cambio del marco de lectura)	TBE	Tampón tris-borato
FT	Factor tisular	TP	Tiempo de protrombina
FvW	Factor von Willebrand	TPTa	Tiempo parcial de protrombina activado
GP	Glicoproteína	UB	Unidad Bethesda
HAMSTeRS	The Hemophilia A Mutation, Structure, Test and Resource Site		
HLA	Antígenos leucocitarios humanos		

AMINOÁCIDOS Y BASES

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

CÓDIGO GENÉTICO				
	T	C	A	G
T	TTT Phe	TCT Ser	TAT Tyr	TGT Cys
	TTC Phe	TCC Ser	TAC Tyr	TGC Cys
	TTA Leu	TCA Ser	TAA*	TGA*
	TTG Leu	TCG Ser	TAG*	TGG Trp
C	CTT Leu	CCT Pro	CAT His	CGT Arg
	CTC Leu	CCC Pro	CAC His	CGC Arg
	CTA Leu	CCA Pro	CAA Gln	CGA Arg
	CTG Leu	CCG Pro	CAG Gln	CGG Arg
A	ATT Ile	ACT Thr	AAT Asn	AGT Ser
	ATC Ile	ACC Thr	AAC Asn	AGC Ser
	ATA Ile	ACA Thr	AAA Lys	AGA Arg
	ATG Met	ACG Thr	AAG Lys	AGG Arg
G	GTT Val	GCT Ala	GAT Asp	GGT Gly
	GTC Val	GCC Ala	GAC Asp	GGC Gly
	GTA Val	GCA Ala	GAA Glu	GGA Gly
	GTG Val	GCG Ala	GAG Glu	GGG Gly

*Triplete de terminación



1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

La hemofilia es la enfermedad hemorrágica grave hereditaria de mayor incidencia en la población general y sigue un patrón de herencia recesiva ligada al cromosoma X. Por tanto, las mujeres pueden transmitir la enfermedad, pero no padecerla (salvo situaciones raras de homocigosis o doble heterocigosis, existencia de otras alteraciones cromosómicas o una extrema ionización) (fig 1). Se caracteriza por una deficiencia de la actividad de Factor VIII (FVIII) de la coagulación (hemofilia A). La prevalencia estimada es de alrededor de 1 por 5000-10.000 varones nacidos.

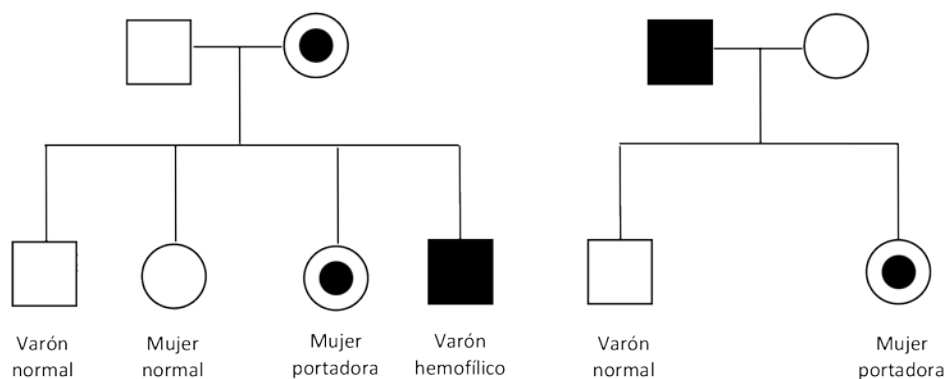


Figura 1. Herencia en hemofilia

Los orígenes de la hemofilia se remontan probablemente al periodo Cretácico, hace 65 millones de años, con tres órdenes de mamíferos afectados: Perissodactyla (Ungulata), Fissipedia (Carnivora) y Anthropeidea (Primates) (WHO Scientific Group on Inherited Blood Clotting Disorders. World Health Organization, 1972). Las primeras descripciones de esta enfermedad se encontraron en los papiros egipcios y en el libro antiguo sagrado de los judíos, el Talmud, en el siglo II antes de Jesucristo. En este libro se describía como algunos varones luego de ser circuncidados, presentaban hemorragias que resultaban mortales. Por esta razón, el patriarca Rabbi Judah estableció que los terceros varones pertenecientes a una familia en la que los

2 hijos anteriores hubiesen muerto desangrados, quedaban exentos de este proceder (Bolton-Maggs & Pasi, 2003).

El médico árabe Albucasis, en el siglo XI, también describió una familia en la que los varones murieron tras una lesión trivial. El médico hebreo Moisés Maimónides, en el siglo XII, descubrió que si los niños tenían esta enfermedad de la sangre, eran las madres las que la transmitían, por lo que aplicó una ley nueva: "si una madre tenía hijos con este problema de sangrado y ella se volvía a casar, ninguno de sus nuevos descendientes varones deberían ser circuncidados", demostrando con ello un reconocimiento temprano de la naturaleza hereditaria del trastorno (Ingram, 1976).

La primera descripción científica moderna de la hemofilia apareció en 1803, en un tratado en el que se describieron aspectos básicos de la enfermedad, la tendencia hereditaria a las hemorragias en varones y se rastreó la genealogía de varias familias hasta alrededor de 1720. Poco después, en 1813, en la revista *New England Journal of Medicine Surgery*, se publicó el primer árbol genealógico en hemofilia "An account of a remarkable haemorrhagic disposition existing in many individuals of the same family" (Ingram, 1976). No obstante, el término hemofilia apareció por primera vez en una descripción escrita en 1828 titulada "Über die haemophilie oder die erbliche" (Hopff F, 1823).

En 1947, el argentino Alfredo Pavlovsky mediante sus estudios sugirió que la hemofilia no era una enfermedad homogénea. En 1952, Aggeler et al. en Estados Unidos y Biggs et al. en Oxford describieron una entidad, conocida como enfermedad de Christmas por el apellido del primer paciente investigado, similar desde el punto de vista clínico y de herencia a la hemofilia pero ocasionada por un trastorno diferente, que posteriormente se identificó con la deficiencia del llamado FIX de la coagulación (hemofilia B) (Aggeler et al., 1952; Biggs et al., 1952).

La vinculación de la hemofilia a las familias reales europeas hizo que esta coagulopatía fuera conocida como la enfermedad de la realeza. Leopoldo, último hijo de la Reina Victoria, sin antepasados conocidos con este trastorno, fue diagnosticado poco después de su nacimiento en 1853. Murió a los 31 años a causa de una hemorragia intracraneal postraumática. Dos de las hijas de la Reina Victoria, Alice y Beatrice, fueron portadoras de la hemofilia; ellas transmitieron el padecimiento a diversas dinastías de la realeza de Europa, incluidas la española, la alemana y la rusa. Alexei Nikolayevich Romanov, nacido en 1904, hijo del zar Nicolás II de Rusia y Alexandra de Hasse, nieta de la Reina Victoria de Inglaterra, fue la persona más famosa afectada por esta enfermedad (fig. 2) (Mannucci & Tuddenham, 2001).



Figura 2. Alexei Románov, hijo del Zar Nicolás II

Recientemente, el descubrimiento de las tumbas del zar Nicolás II en 1991 y de la princesa Anastasia y el zarevich Alexei en el 2007, permitió estudiar el ADN de ambos hermanos e identificar la mutación responsable, descrita en otros individuos no relacionados con esta familia, y el tipo de hemofilia que padecían, una hemofilia B grave (Lannoy & Hermans, 2010).

Las dos últimas décadas del siglo XX fueron especialmente prolíficas en descubrimientos que han permitido avanzar tanto en el conocimiento profundo de las bases moleculares de la hemofilia como en el tratamiento de las mismas. Así, en 1982 fue clonado el gen del FIX (Choo, Gould, Rees, & Brownlee, 1982), en 1983 el FVIII había sido ya purificado y el gen que lo codifica fue finalmente identificado y caracterizado en 1984 (Gitschier et al., 1984). Casi de forma simultánea, la descripción de la técnica de la PCR impulsó el diagnóstico molecular de la hemofilia (Saiki et al., 1985). A partir de aquí, la producción de un nuevo tipo de concentrados, los llamados factores recombinantes, vinieron a completar y mejorar el arsenal terapéutico disponible, consistente hasta ese momento en concentrados de factor derivados del plasma.

1.1. Hemostasia

La hemostasia hace referencia al conjunto de procesos que controlan la fluidez de la sangre y a la integridad del sistema vascular. La palabra "hemostasia" proviene de dos palabras griegas: haimo que significa "sangre" y stasia que significa "detención". La lesión de un vaso sanguíneo pone en marcha una serie de mecanismos hemostáticos, con el objetivo de evitar la pérdida de sangre y la reparación del daño vascular y tisular. La hemostasia comprende interacciones complejas que

implican tanto a componentes sanguíneos como a la pared de los vasos sanguíneos. Tradicionalmente, se había considerado que la hemostasia fisiológica estaba compuesta de cuatro etapas sucesivas: a) vasoconstricción de la zona lesionada; b) formación de un agregado de plaquetas sobre la lesión; c) formación de fibrina, merced a la generación de trombina y su ulterior estabilización; y d) eliminación de la fibrina por la fibrinólisis.

En el esquema clásico de la hemostasia, las plaquetas estaban implicadas solamente en la segunda de estas etapas y eran los únicos elementos celulares implicados. Las plaquetas intervienen adhiriéndose al subendotelio mediante las glicoproteínas (GP) de membrana, fundamentalmente el complejo GP Ib-V-IX, que se une al factor von Willebrand (FvW) fijado al colágeno del subendotelio, proceso que se acompaña de cambios morfológicos importantes en las plaquetas con reordenamiento de la membrana y exposición de fosfolípidos cargados negativamente que dan lugar a la formación de un pseudópodo extenso que ayuda a anclar las plaquetas. La activación plaquetaria implica la liberación del contenido de los gránulos (tromboxano A₂, ADP, calcio y serotonina) (George, 2000), que promueven la activación de plaquetas adicionales y la contracción de las células de músculo liso de la pared de los vasos. Una señal sobre la membrana de las plaquetas genera un cambio conformacional de la glicoproteína IIb-IIIa (GPIIb-IIIa) y la exposición de los sitios de unión para las proteínas adhesivas como el fibrinógeno, FvW, fibronectina, y trombospondina. La formación del tapón hemostático primario está íntimamente relacionada con la activación del sistema de coagulación de la sangre, conduciendo a la generación de trombina y la formación de la red de fibrina y un tapón hemostático estable (Monroe, Hoffman, & Roberts, 2002).

1.1.1. Factores de la coagulación, papel del FVIII y FIX en el proceso de la coagulación

El tapón plaquetario formado en la hemostasia primaria no tiene consistencia suficiente para detener la hemorragia, por lo que debe iniciarse el mecanismo de la coagulación para formar el coágulo de fibrina más estable y consistente. En el sistema de coagulación participan diversas proteínas, casi todas enzimas (tabla 1).

En la década de los 60, dos grupos propusieron un modelo de coagulación que contemplaba una cascada enzimática compuesta por una serie de etapas secuenciales, en las que la activación de un factor de coagulación activa al siguiente para favorecer la generación de trombina, que convierte el fibrinógeno en una proteína insoluble, la fibrina, componente estructural del coágulo (Macfarlane, 1964). Según el modelo clásico, existirían dos vías de activación, intrínseca y extrínseca, iniciadas por el FXII y el complejo factor tisular (FT)/FVII respectivamente (fig. 3), que convergen en una vía común a nivel del FX activo (FXa). El complejo protrombinasa, compuesto por el FXa, Ca⁺⁺ y FVa, a nivel de superficies fosfolípídicas favorece la generación de

trombina y la formación de fibrina. Este esquema sigue siendo útil para explicar las pruebas de laboratorio empleadas en hemostasia, como el tiempo de protrombina (TP) para la vía extrínseca y tiempo de tromboplastina parcial activado (TTPa) para la vía intrínseca. Sin embargo, pronto se comprobó que ambas vías no actúan de forma independiente, que plaquetas, células endoteliales y otros elementos celulares participan de forma decisiva en el proceso de la hemostasia, interactuando entre ellas, según describe la teoría celular de la coagulación (fig. 4) (Hoffman & Monroe, 2001).

Factor	Sinónimo	Forma activa	Nivel plasmático (µg/ml)	Cromosoma
Factor I	Fibrinógeno	Glicoproteína	2.000-4000	4q23-q32
Factor II	Protrombina	Serín proteasa, vitamina-K dependiente	60-70	11p11-q12
Factor III	Factor tisular	Cofactor asociado a células	—	1p21-p22
Factor V	Proacelerina	Cofactor	12	1q21-q25
Factor VII	Proconvertina	Serín proteasa, vitamina-K dependiente	3-6	13q34
Factor VIII	Factor antihemofílico A	Cofactor	8-12	Xq28
Factor IX	Factor Christmas	Serín proteasa y vitamina-K dependiente	18-24	Xq27.1-q27.2
Factor X	Factor de Stuart-Prower, trombocinasa	Serín proteasa, vitamina-K dependiente	30-40	13q34
Factor XI	Antecedente plasmático de tromboplastina	Serín proteasa	52	4q32
Factor XII	Factor de Hageman	Proteasa	60	5q33
Factor XIII	Protransglutaminasa	Transglutaminasa	240	Cadena-A 6p24-p25 Cadena-B 1q31-q32
Precalicroína	Factor de Fletcher	Proteasa	35	4q35
Quininógeno alto PM	Factor de Fitzgerald-Willians-Flaujeauc	Proteasa	150	3q26
Factor von Willebrand	-	Cofactor	12	12q13.2

Tabla 1. Factores de la coagulación y sus características.

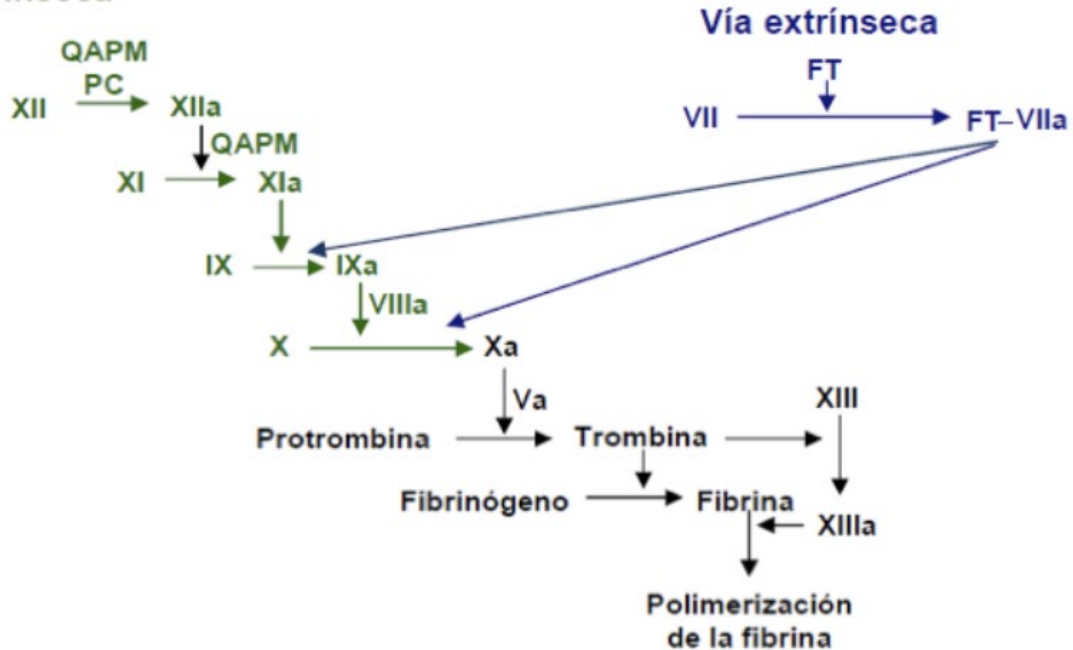
Vía intrínseca


Figura 3. Modelo clásico de cascada de coagulación.

Según este modelo, la coagulación se desarrolla en tres etapas interrelacionadas.

- La fase de iniciación, que tiene lugar a nivel de células productoras de FT, como fibroblastos, monocitos o células endoteliales. Después de una lesión vascular, se produce el contacto de la sangre circulante con el subendotelio, lo que favorece la unión del FT con el FVII circulante y su posterior activación. El complejo FT/VIIa activa los factores IX y X. El FXa se combina en la superficie celular con el factor Va para producir pequeñas cantidades de trombina, que tienen un papel importante en la activación de plaquetas y del FVIII.
- La fase de amplificación sobre la superficie de las plaquetas, que son activadas por la trombina generada, que amplifica la señal procoagulante inicial mediante la activación de los factores V, VIII y XI, que se ensamblan en la superficie plaquetaria permitiendo que tengan lugar las reacciones enzimáticas posteriores.
- En la fase de propagación, el complejo "tenasa" (VIIIa, IXa, Ca⁺⁺ y fosfolípidos) cataliza la activación del FX, mientras que el complejo "protrombinasa" (Xa, Va, Ca⁺⁺ y fosfolípidos) participa en la conversión de protrombina en grandes cantidades de trombina, necesarias para la formación de un coágulo estable de fibrina. Finalmente, la trombina generada activaría, asimismo al FXIII y a un inhibidor de la fibrinólisis (TAFI), que proporcionan la resistencia del coágulo de fibrina.

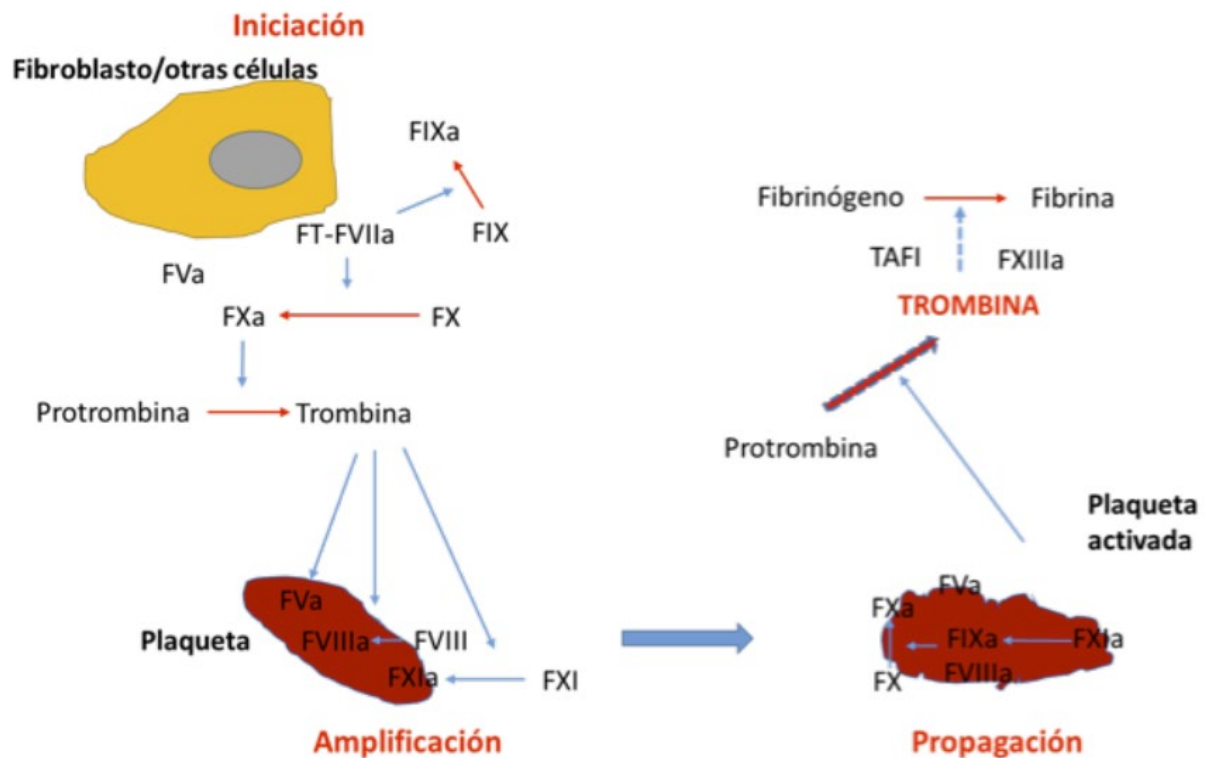


Figura 4. Esquema del modelo celular de la coagulación.

La hemofilia A se clasifica en tres tipos atendiendo a la dosificación de FVIII que presente el paciente (tabla 2): hemofilia grave cuando es menor del 1% (<0.01 UI/ml del nivel normal), moderada si se encuentra entre el 1 y el 5% (0.01 - 0.05 UI/ml) y leve si el paciente presenta entre el 5 y el 40% de factor del nivel normal (>0.05-<0.40 UI/ml) (Blanchette et al., 2014).

Esta clasificación sigue vigente por la buena correlación que presenta en el perfil clínico de la mayoría de los casos, a pesar de la limitación que supone la heterogeneidad del fenotipo hemorrágico en pacientes con hemofilia grave o moderada (Mannucci & Franchini, 2013).

Concentración de FVIII	Clasificación	Clínica
<0,01 IU/ml (<1% del normal)	Grave	Hemorragias espontáneas en articulaciones y músculos, hemorragias después de golpes, accidentes y cirugía.
0,01-0,05 IU/ml (1-5% del normal)	Moderada	Hemorragias en articulaciones y músculos después de pequeñas heridas, hemorragia excesiva después de cirugía y extracciones dentales.
>0,05-0,40 IU/ml (6-30% del normal)	Leve	No se producen hemorragias espontáneas, hemorragias después de cirugía, extracciones dentales y accidentes.

Tabla 2. Clasificación de la hemofilia según el nivel de factor

1.2. Diagnóstico de la hemofilia A

El diagnóstico de hemofilia es fundamental para realizar una estrategia adecuada de tratamiento. Es importante discriminar entre formas graves, moderadas y leves pues tiene una importante implicación en el comportamiento clínico del déficit. Un adecuado diagnóstico implica métodos de cribado lo suficientemente sensibles y específicos, así como estudios para determinar la actividad del FVIII.

Inicialmente, los métodos específicos para la valoración de la hemostasia secundaria se basan en el tiempo de protrombina (TP), tiempo parcial de protrombina activado (TPTa), tiempo de trombina y fibrinógeno que exploran las vías extrínseca, intrínseca y común de la cascada de la coagulación y orientan sobre una posible deficiencia factorial. En el caso de la hemofilia encontraremos un alargamiento del TPTa y la confirmación vendrá dada por la determinación del FVIII deficiente. Para ello se emplea el método coagulativo en una etapa, consistente en mezclas de plasma problema con plasma carente del factor a dosificar y la medición del TPTa de dicha mezcla. Los resultados obtenidos se comparan con los resultados de las diluciones de un plasma de referencia.

Para la dosificación de FVIII disponemos también de una técnica cromogénica. El FVIII presente en una muestra es activado por la trombina. El FVIII activado acelera la conversión de FX en FXa en presencia de FIX activado, fosfolípidos e iones de calcio. La actividad del FXa es evaluada mediante la hidrólisis de un sustrato p-nitroanilina específico del FXa. La tasa de liberación inicial de la p-nitroanilina (de color amarillo) medida a 405 nm es proporcional a la actividad del FXa y, por tanto, a la actividad del FVIII en la muestra (Barrowcliffe, Raut, Sands, & Hubbard, 2002). Este método es más sensible y presenta menos interferencias técnicas, ya que los resultados no se alteran por la presencia de anticoagulante circulante de tipo lupus o heparina.

El diagnóstico molecular permite conocer la mutación exacta presente en una familia afectada. Estas mutaciones se localizan a lo largo de todo el gen del F8. En hemofilia A grave, la determinación de la inversión del intrón 22 es el primer paso en el estudio de mutaciones, pues se encuentra casi en el 50% de los pacientes. En el resto de pacientes se amplifican los segmentos de ADN mediante PCR para identificar la presencia de un posible cambio de un nucleótido e identificar una secuencia anormal, comparando la mutación caracterizada con las descritas en la base de datos internacional.

En los casos en los que el diagnóstico directo no es concluyente se recurre al diagnóstico indirecto mediante el estudio de haplotipos y diversos marcadores moleculares polimórficos (Rick, Walsh, & Key, 2003; Sánchez-García, Gallardo, Ramírez, & Vidal, 2005).

Es importante determinar el estado de portadoras en las mujeres de familias con antecedentes de hemofilia A, para que así puedan acceder a las distintas opciones de reproducción disponibles. El análisis mutacional también permite establecer relaciones entre el defecto molecular y la presencia de inhibidores.

1.3. Gen del F8 y proteína

El gen del F8 está localizado en la parte más distal del brazo largo del cromosoma X (Xq28). Es un gen extremadamente largo, con una estructura compleja, caracterizado en 1984 (fig. 5). Consta de 26 exones que se extienden a lo largo de unas 186.000 pares de bases en el genoma humano y que dan lugar a un mRNA de prácticamente 9 Kb, incluyendo 7.053 nucleótidos codificantes (Gitschier et al., 1984). Este gen es inusual ya que dentro del intrón 22 tiene dos genes adicionales, F8A y F8B. F8B se transcribe en la misma dirección que el gen FVIII y da lugar a un mRNA de 2.5 Kb que incluye un exón propio y los exones 23 a 26 del gen FVIII. Por su parte, el gen F8A no contiene intrones y se transcribe en sentido opuesto (Levinson, Kenwick, Gamel, Fisher, & Gitschier, 1992; Levinson, Kenwick, Lakich, Hammonds, & Gitschier, 1990). Existen dos copias más de F8A que se son extragénicas y se encuentran a unas 400 Kb hacia la región telomérica, con una homología cercana al 100% y cuya presencia es responsable de casi el 50% de las hemofilias A graves. La función de los genes F8A y F8B es desconocida (Lakich, Kazazian, Antonarakis, & Gitschier, 1993; Naylor et al., 1995).

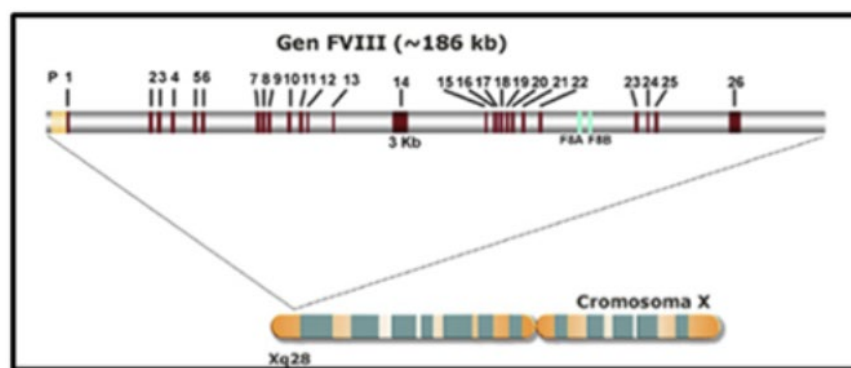


Figura 5. Estructura del gen del F8 y localización en el cromosoma X. Las zonas marcadas de color rojo corresponden a los exones del gen F8.

La cadena polipeptídica está compuesta de 2351 aminoácidos, la cual incluye un péptido señal de 19 aminoácidos y una proteína madura de 2332 aminoácidos (Vehar et al., 1984). Su estructura consta de 6 dominios del tipo A1-A2-B-A3-C1-C2 (fig. 6). Los dominios A tienen una homología importante con la ceruloplasmina (proteína de unión al cobre), y con el FV. Por otra parte, los dominios C1 y C2 también parecen presentar una cierta relación con otras proteínas como las lectinas. El dominio B es único y no tiene homología con ninguna otra proteína conocida (Lenting, van Mourik, & Mertens, 1998).

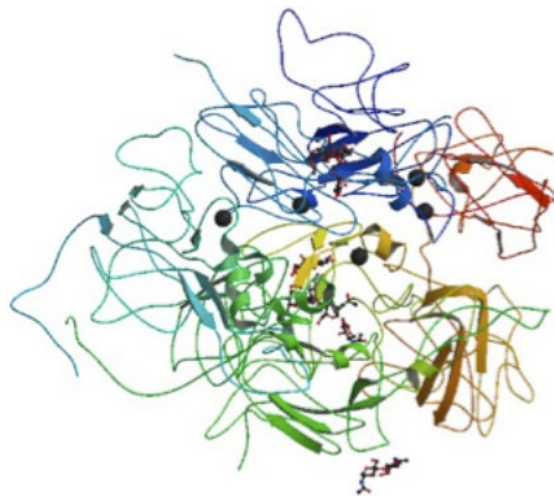


Figura 6. Estructura tridimensional del FVIII.

Los dominios se acotan según las siguientes coordenadas: A1 entre los residuos 1 y 328; A2 entre 380 y 711; B entre 712 y 1648; A3 entre 1694 y 2019; C1 entre 2020 y 2172; C2 entre 2173 y 2332. Existen dos regiones ricas en aminoácidos ácidos: una entre los dominios A1 y A2 (región a1) que contiene 15 ácidos aspártico y glutámico y parece estar implicada en la actividad procoagulante del FVIII; otra, entre los dominios B y A3 (región a3), también rica en dichos aminoácidos y que contiene la zona de unión al FvW (Fay & Jenkins, 2005) (Fay & Jenkins, 2005) (Fig. 7).

El FVIII es muy sensible al procesamiento proteolítico. Circula, principalmente, asociado al FvW en forma de dos cadenas, una pesada que incluye los dominios A1-A2-B y otra ligera A3-C1-C2, unidas de forma no covalente mediante la interacción de iones Ca^{2+} y Cu^{2+} .

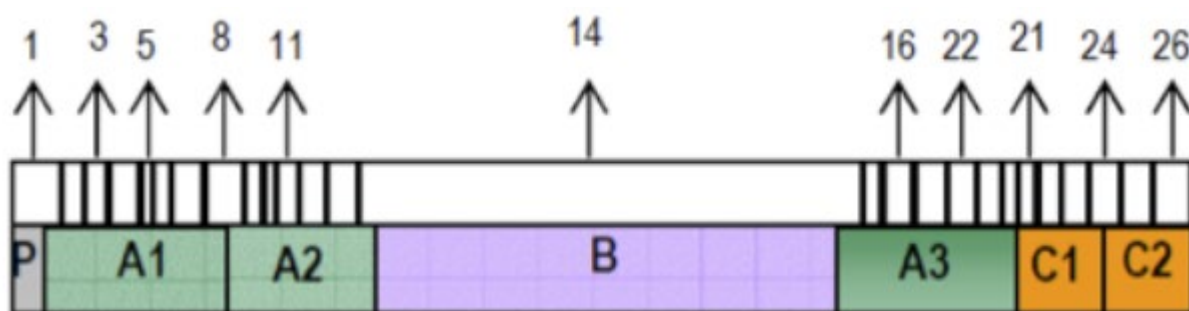


Figura 7. Estructura de la proteína de FVIII (2351 aa) y exones del gen de F8 (26).

A partir de esta proteína estructuralmente entera, se eliminan 19 residuos del extremo N – terminal, el péptido señal, para generar la proteína madura. El factor VIII es activado por la trombina o por el FXa mediante escisión en los residuos arginina 372, 740 y 1689. La primera escisión se

produce en el residuo Arg1689 y genera una cadena variable (90-120 kDa) formada por los dominios A1, A2 y un fragmento de tamaño variable del dominio B, y una cadena ligera formada por los dominios A3-C1-C2. A continuación, se producen dos escisiones más, en Arg372 (entre los dominios A1 y A2), y en Arg740 (entre los dominios A2 y B).

En plasma el FVIII circula como un heterodímero con los dominios A1 y A2 unidos de forma no covalente con una cadena ligera A3-C1-C2 mediante iones calcio. (Stoilova-McPhie, Villoutreix, Mertens, Kemball-Cook, & Holzenburg, 2002).

En la circulación, el FVIII es transportado y protegido por el FvW. La activación del FVIII también produce la liberación del FVIIIa del FvW, en base a la proteólisis cercana a la región N-terminal por trombina, que escinde un péptido del sitio de unión con el FvW, originando la liberación del FVIII (Saenko, Shima, & Sarafanov, 1999). La función de FVIIIa es actuar como cofactor de FIX en el complejo "tenasa" que convierte FX en FXa, permitiendo así que la coagulación progrese hasta la formación del coágulo. Diferentes regiones de FVIII están implicadas en la interacción con otras proteínas como FIX, FX y fosfolípidos de membrana.

Varias líneas celulares tienen el potencial de expresar el gen del FVIII. Se ha demostrado la expresión del RNA mensajero (RNAm) del factor en una variedad de tejidos incluido el bazo, nódulos linfáticos y el riñón (Lenting et al., 1998).

Sin embargo el hígado es el principal órgano productor de FVIII, más concretamente las células sinusoidales y en menor medida los hepatocitos (Hollestelle et al., 2001). La región promotora del gen del FVIII comprende elementos de respuesta que son característicos para la expresión específica en el hepatocito. Así, pacientes hemofílicos sometidos a trasplante hepático recuperan los niveles de FVIII hasta valores de normalidad (Lambing, Kachalsky, & Kuriakose, 2011).

1.4. Bases moleculares de la hemofilia A

Después de la clonación y caracterización del gen de FVIII (Gitschier et al., 1984; Toole et al., 1984; Vehar et al., 1984) se produjeron importantes avances en la caracterización molecular de los defectos que causan la hemofilia con la identificación de gran número de anomalías genéticas, mostrando que su base molecular es extremadamente diversa (Stenson et al., 2003). Las alteraciones identificadas incluyen mutaciones puntuales, deleciones, inserciones, reordenamientos e inversiones. Por lo general, los reordenamientos/inversiones son bastante raros, con excepción de dos inversiones presentes en pacientes con hemofilia A grave, la inversión del intrón1 y la inversión del intrón 22, que suponen aproximadamente un 20% de los casos totales (40-55% de los casos graves) (Bagnall, Waseem, Green, & Giannelli, 2002). El 80% restante de los casos son debidos, sobre todo, a mutaciones puntuales que consisten en la sustitución de un nucleótido y deleciones o inserciones de una o pocas bases, distribuidas a lo largo de todo el gen. Las deleciones e inserciones de gran tamaño son menos frecuentes (<5%) y son, generalmente, causantes de hemofilia grave.

Las pequeñas deleciones e inserciones son definidas arbitrariamente como deleciones e inserciones de menos de 50 pares de bases (pb), y cuando son de un número de bases que no es múltiplo de tres implica un cambio en el marco de lectura original y, por tanto, la secuencia de aminoácidos a partir del punto de la mutación será diferente a la proteína original, apareciendo con frecuencia un codón de parada prematuro (fig. 8).

Se han realizado estudios de amplias poblaciones para identificar su espectro mutacional y la relación genotipo/fenotipo. Reino Unido, Canada, Austria, Italia, Estados Unidos, Portugal entre otros, han publicado sus resultados (Green, Bagnall, Waseem, & Giannelli, 2008; Margaglione et al., 2008; Reitter et al., 2010; Rydz et al., 2013).

Actualmente todas las mutaciones asociadas a hemofilia A se encuentran registradas y permanentemente actualizadas en la base de datos Factor VIII Variant Database (Haemophilia A mutation database and factor VIII resource site, previamente HAMSTeRS), libremente accesible en internet en la dirección URL: <http://www.factorviii-db.org/> (Kemball-Cook, Tuddenham, & Wacey, 1998). La nueva nomenclatura añade 19 aminoácidos a la utilizada en HAMSTERS al considerar que Ala20 es el primer aminoácido de la proteína madura.

Se ha observado que no es posible identificar la mutación responsable en un pequeño porcentaje de casos, un 2% aproximadamente (Klopp, Oldenburg, Uen, Schneppenheim, & Graw, 2002).

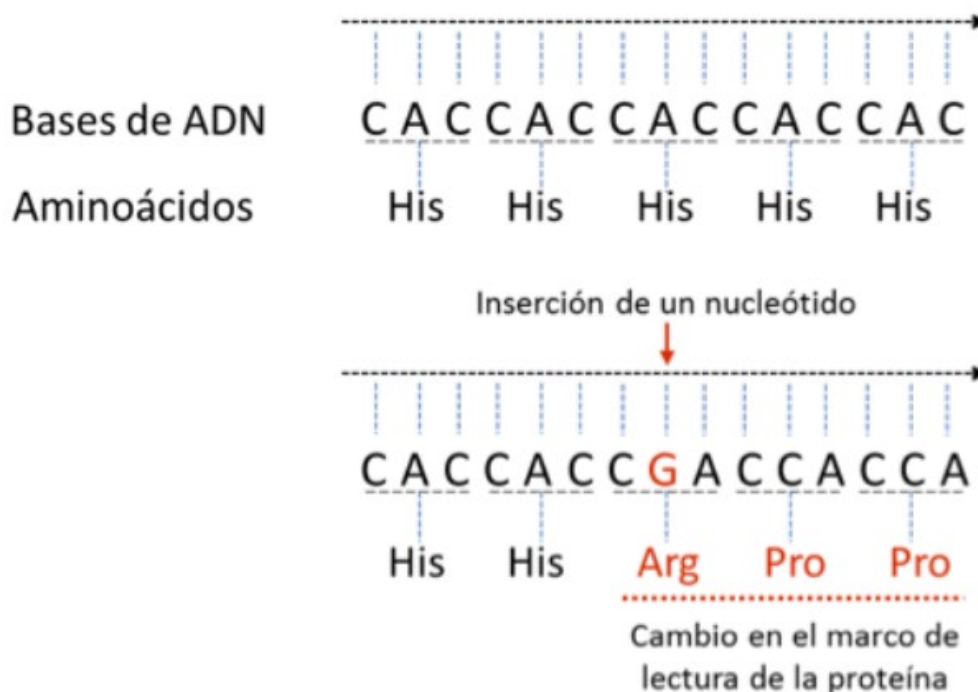


Figura 8. Mutación de cambio en la pauta de lectura

1.4.1. Mutaciones en sitios CpG

Los rangos mutacionales entre organismos unicelulares y multicelulares se mantienen en una proporción sorprendentemente bien conservados entre 1×10^9 y 1×10^{10} mutaciones por base por división celular. Sin embargo, la presencia de una mayoría de mutaciones puntuales sugiere la existencia de algún factor predisponente para la replicación errónea (Kemball-Cook G, and Gomez K., 2010). A partir de la comparación de pseudogenes y sus contrapartes funcionales se ha demostrado que los nucleótidos G y C son aproximadamente dos veces más mutables que los nucleótidos A y T en mamíferos, un patrón que parece ser cualitativamente común tanto en especies bacterianas como eucarióticas estudiadas a la fecha. Esto significa que un dinucleótido CpG, donde la "p" representa que están enlazados por un fosfato, tiene un rango mutacional que es aproximadamente 10 veces superior al de otros sitios (Hodgkinson & Eyre-Walker, 2011). La principal forma de modificación del ADN en mamíferos implica la metilación de los residuos de citosina para formar 5-metilcitosina, en concreto cuando están localizados inmediatamente a una guanina (5'-CG-3'). Estos residuos de citosina metilados (5-metilcitosina) son propensos a sufrir deaminación espontánea y dar lugar a timidina, la cual no es reconocida como anormal por el mecanismo de reparación del ADN de las células, ya que la timidina se produce de forma natural. Después de la replicación se produce la introducción del par de bases AC en la nueva cadena, en lugar de la secuencia GC original. El dinucleótido CpG es susceptible de ser metilado en la citosina a lo largo de todo el genoma, y por tanto, este proceso es una causa común de mutación en el genoma humano (Bottema et al., 1993). Más del 30% de todas las mutaciones puntuales que se detectan en hemofilia ocurren en sitios CpG dentro del gen FVIII, que contiene 70 dinucleótidos. La arginina es el aminoácido más mutado, debido a que cuatro de los tripletes que lo originan (CGT, CGC, CGA y CGG) contienen dinucleótidos CpG.

De igual forma, una frecuencia alta de mutaciones puntuales recurrentes en hemofilia A (codones de parada y cambios de aminoácidos), ocurren en sitios CpG, indicando que es un "hotspot" para mutaciones en el gen del FVIII. De hecho, en hemofilia A las mutaciones puntuales más frecuentes son las mutaciones de cambio de aminoácido, p.R2150H (CGT>CAT) y p.R593C (CGC>TGC) que tienen lugar en sitios CpG.

1.4.2. Hemofilia A: mutaciones en el gen F8

Inversión del intrón 22

El defecto genético más común en hemofilia A es una inversión que afecta al intrón 22 y que se denomina de forma genérica inversión del intrón 22 (Inv22). Afecta aproximadamente al 40-50% de individuos con hemofilia A grave (20% de los totales) (A. Goodeve, 2008). Esta inversión se

produce debido a la existencia de dos regiones (int22h2 e int22h3) localizadas a unas 400 Kb del gen F8 hacia la región telomérica, homólogas a una secuencia que se encuentra en el intrón 22 (int22h1) pero en orientación opuesta. La inversión tiene lugar por una recombinación homóloga intracromosómica entre int22h1 y una de las dos copias teloméricas, resultando un gen F8 truncado a partir del exón 22 (Andrikovics et al., 2003; Lakich et al., 1993) (fig. 9). En células germinales masculinas existe una probabilidad 10 veces mayor que aparezca esta mutación que en células germinales femeninas, donde esta recombinación es inhibida durante la meiosis mediante emparejamiento homólogo de los cromosomas X (Rossiter et al., 1994).

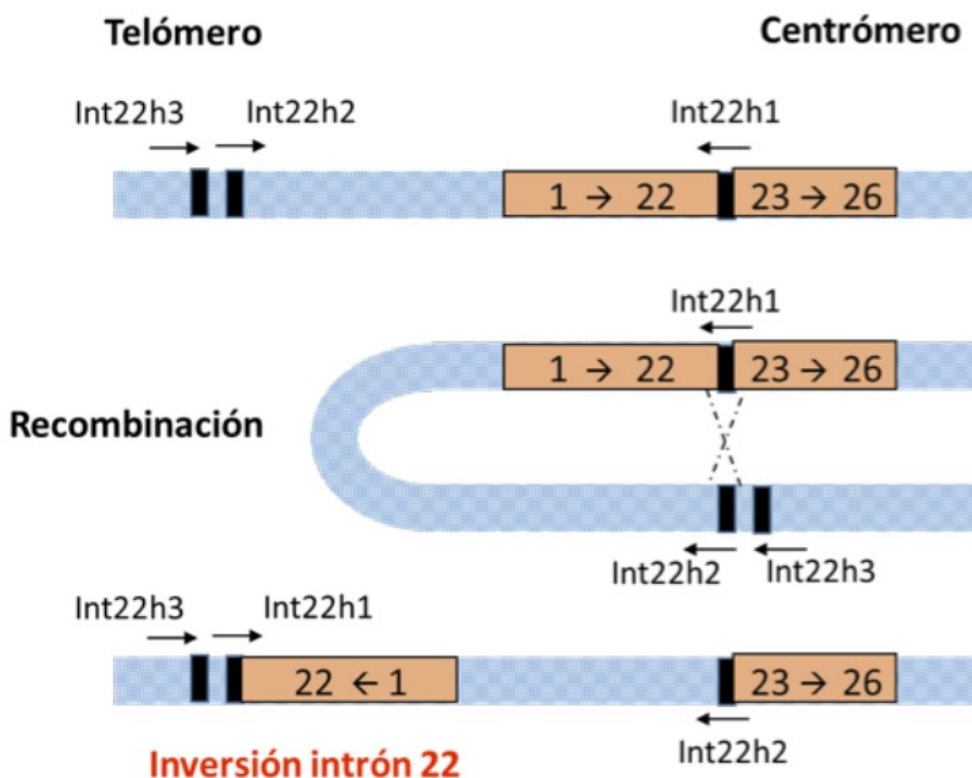


Figura 9. Esquema de la inversión del intrón 22

Inversión del intrón 1

Una inversión similar implica al intrón 1 del gen del FVIII. Resulta de la recombinación intracromosómica entre una secuencia de 1 kb en el intrón 1 (int1h1) y una secuencia homóloga (int1h2) distanciados por 140 kb aproximadamente en sentido 5'. Esta inversión ha sido descrita en aproximadamente el 5% de los pacientes con hemofilia A grave (Bagnall et al., 2002).

Deleciones e inserciones

Las grandes deleciones en el gen F8 son definidas arbitrariamente como deleciones de más de 50 pb en tamaño y pueden variar hasta la deleción completa del gen. La mayoría de las deleciones descritas abarcan varias kilobases, pero los puntos de rotura y empalme han sido caracterizados sólo en algunos casos (Vidal, Farssac, Tusell, Puig, & Gallardo, 2002). Al menos 49 regiones relacionadas con secuencias Alu se han identificado en la secuencia del gen F8. Todas las grandes deleciones e inserciones dan lugar a hemofilia grave (Kaufman RJ, Antonorakis SE, & Fay PJ, 2006).

En relación con las pequeñas deleciones e inserciones, generalmente dan lugar a cambios en la pauta de lectura ("frameshift") que resultan en la aparición de un codón de parada prematuro, predominando las deleciones o inserciones de un solo nucleótido. Cuando la deleción/inserción afecta a un número de pares de bases de tres (o múltiplo de tres), conduce a la producción de una proteína anómala, cuya funcionalidad depende de la posición en la que tiene lugar la deleción ("inframe"). Un tipo de mutación muy frecuente es la deleción o inserción de un nucleótido de adenina en un tramo de ADN constituido por varias adeninas. Estas deleciones o inserciones son probablemente causadas por errores de deslizamiento que son introducidos por la ADN polimerasa durante la replicación del ADN. Las pequeñas deleciones afectan a todos los exones, excepto los exones 20 y 21, y en cuanto a las pequeñas inserciones éstas se distribuyen a lo largo de varios exones (Johannes Oldenburg & El-Maarri, 2006).

Mutaciones puntuales

Dentro de las mutaciones puntuales podemos diferenciar:

- Mutaciones de cambio de aminoácido "missense", en las que la sustitución de un nucleótido produce un cambio de aminoácido en la proteína codificada (fig. 10).
- Mutaciones sin sentido que producen un codón de parada, donde el triplete correspondiente cambia a uno de los tres de codones de terminación (TAA, TAG, TGA) (fig. 11).
- Mutaciones en la zona de procesamiento del ARN, en las que la sustitución de un nucleótido altera o suprime la secuencia específica que indica el sitio en el que tiene lugar el procesamiento de un intrón. Como consecuencia de estas mutaciones, uno o más intrones permanecen en el ARN maduro y pueden alterar la generación de la proteína.

Este tipo de mutaciones, aproximadamente 85% mutaciones de cambio de aminoácido y 15% mutaciones de codón de parada, son el defecto genético más común en hemofilia A. Con respecto a las mutaciones de cambio de aminoácido, éstas pueden dar lugar a fenotipo leve, moderado o grave, dependiendo del aminoácido afectado y de la localización en el gen, mientras que las mutaciones de codón de parada son responsables de fenotipo grave. Las mutaciones de cambio de aminoácido están localizadas a lo largo de todo el gen FVIII.

Las mutaciones puntuales también incluyen una pequeña proporción de mutaciones que ocurren en la zona de procesamiento del ARN. La mayoría de estas mutaciones afectan a los sitios dadores invariantes, GT, en la región 5' de los intrones, y a los sitios aceptores invariantes, AG, en la región 3' de los intrones, que puede llegar a producir una alteración en el número de exones o generar exones incompletos (Bogdanova et al., 2002).

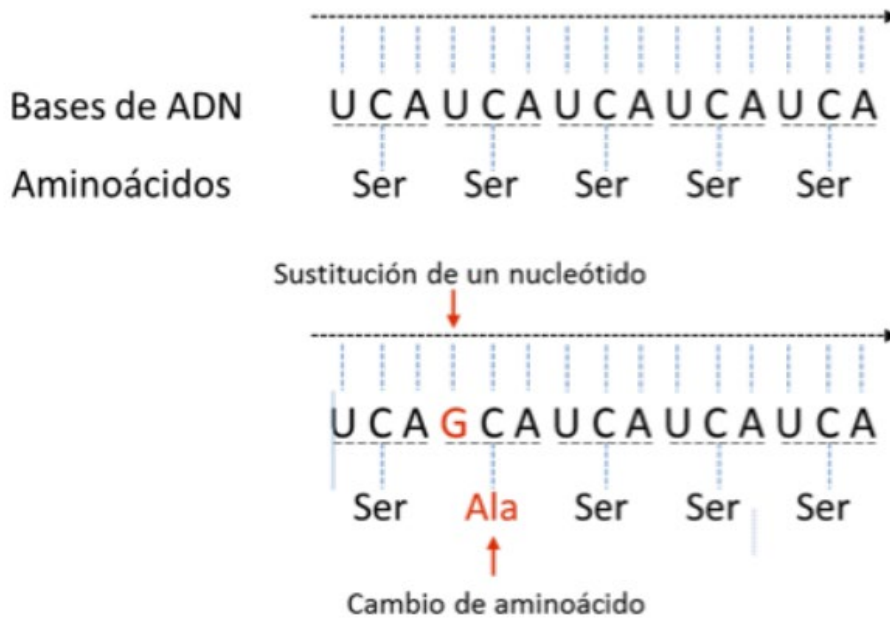


Figura 10. Mutación cambio de aminoácido

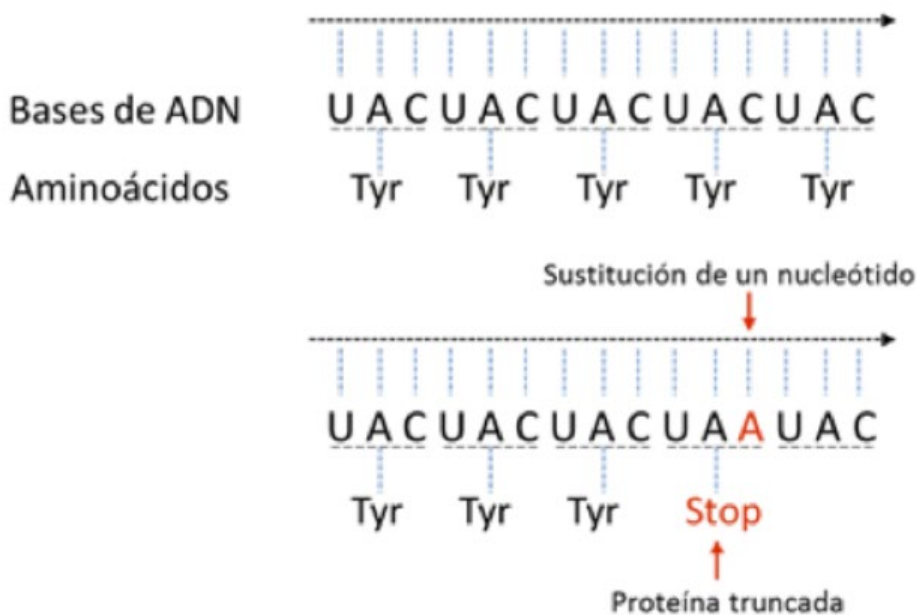


Figura 11. Mutación codón de parada

1.4.3. Mutaciones de riesgo de desarrollo de inhibidor en hemofilia grave

Existe una correlación bien establecida entre tipo de mutación y desarrollo de inhibidor. En los pacientes con hemofilia grave las mutaciones que dan lugar a una ausencia de proteína o a una proteína truncada están asociadas con un riesgo más elevado de desarrollar inhibidor. La Inv22 tiene lugar por una recombinación homóloga intracromosómica resultando un gen truncado a partir del exón 22; sin embargo, el porcentaje descrito de inhibidores es del 20%, menor del esperado, para lo cual no existe una explicación. Se especula que pueden existir producción y secreción de trazas de transcritos de la proteína que podrían inducir la tolerancia. Una recombinación similar ha sido descrita en el intrón 1, que implica al 5% de los pacientes con hemofilia A grave y con porcentaje similar de inhibidores (S. C. Gouw et al., 2011). El riesgo de desarrollo de inhibidor en el caso de grandes deleciones es de un 21% cuando la mutación afecta a un solo dominio frente a más del 80% cuando varios dominios se encuentran implicados. Las pequeñas deleciones/inserciones (de menos de 50 pares de bases) que afectan a secuencias de adeninas del exón 14 se han asociadas a un bajo riesgo de formación de inhibidor (3%). Este tipo de mutaciones a menudo conducen a alteraciones del marco de lectura (frameshift) y secundariamente a un codón de parada produciendo un fenotipo grave, lo que haría esperar una frecuencia similar de inhibidor que en las mutaciones sin sentido; sin embargo, esto no ocurre probablemente por la existencia de un mecanismo endógeno de reparación del marco de lectura durante la formación del ARNm, suficiente para permitir pequeñas cantidades de proteína. Estas pequeñas cantidades de FVIII normal conducirían a inmunotolerancia y secundariamente a una baja prevalencia de inhibidor. En cambio, las pequeñas deleciones/inversiones localizadas fuera de las secuencias de repeticiones de adeninas (non A run) están asociadas a un relativo alto riesgo de formación de inhibidor del 20% al 25% (Boekhorst et al., 2008).

Las mutaciones que dan lugar a cambio de aminoácidos con sentido representan un grupo de interés por estar asociadas a la presencia de proteína endógena, aunque funcionalmente alterada, que sería suficiente para inducir la inmunotolerancia, lo que les confiere un bajo riesgo de formación de inhibidor. En el estudio de Oldenburg, en 912 pacientes solo un 5% con este tipo de mutación desarrollaron inhibidor (J. Oldenburg & Pavlova, 2006).

1.4.4. Inhibidores en hemofilia leve y moderada

Pese a que la frecuencia global de aparición de inhibidores es menos frecuente en los casos de hemofilia moderada/leve, un subgrupo de pacientes presenta un riesgo más elevado. Así, aquellos que presentan mutaciones localizadas en los dominios A2 y C1/C2, tienen un riesgo cuatro veces superior que pacientes con mutaciones localizadas en otras regiones. Hay et al. estudiaron 26 pacientes con hemofilia moderada-leve y mutaciones con sentido localizadas en estas regiones (Arg593Cys, Tyr2105Cys, Arg2150Cys, Pro2300Leu y Trp2229Cys) y encontraron

una alta prevalencia de inhibidores (41%), similar a la reconocida en enfermos con mutaciones graves (Hay, 2006). El comportamiento de estos inhibidores tiene unas características especiales ya que aparecen relativamente tarde, durante la etapa de adulto y responden mal al tratamiento con inmunotolerancia. El alto riesgo de formación de inhibidor en este tipo de mutaciones sugiere que esta parte de la molécula de FVIII es especialmente inmunógena. Algunos de estos pacientes con hemofilia leve mostraron valores residuales de FVIII al mismo tiempo que presentaban un nivel elevado de inhibidor. Estudios más detallados revelaron que el anticuerpo neutralizaba el FVIII transfundido pero no el endógeno, especulándose con la posibilidad de que el anticuerpo esté dirigido contra un epítotope normal del FVIII, carente en la molécula alterada, y que produciría una respuesta antigénica al epítotope desconocido del FVIII transfundido. El dominio C1/C2 es especialmente inmunógeno, quizás por localizarse allí la unión al FvW y a los fosfolípidos de membrana. Cualquier cambio molecular puede afectar a la estructura tridimensional y alterar la inmunogenecidad, lo que apoyaría la observación de que la incidencia de inhibidor en las mutaciones de cambio de aminoácidos dependen más de su localización que de la severidad del fenotipo del paciente (Marc Jacquemin et al., 2003).

La intensidad del tratamiento también se ha mostrado relevante en pacientes con hemofilia leve y moderada. En el Reino Unido, en una serie de 26 pacientes con hemofilia A leve/moderada e inhibidor, 16 pacientes lo desarrollaron después de tratamiento intensivo en relación con cirugía, traumatismo o sangrado muscular (Sharathkumar et al., 2003). El riesgo parece aumentar en pacientes mayores de 30 años y no parece estar influenciado por el número previo de días de exposición al factor, como sucede en hemofilia grave (Kempton et al., 2010).

Durante los periodos de tratamiento intensivo por hemorragias mayores o cirugía, la liberación de mediadores desde las células dañadas activan las células presentadoras de antígeno que serán las responsables de presentar el FVIII antigénico a los linfocitos T (Matzinger, 2002).

1.5. Aspectos clínicos de la hemofilia

Clínicamente la hemofilia se caracteriza por la aparición de sangrados recurrentes, cuya intensidad y frecuencia están en estrecha relación con la gravedad del defecto de FVIII. En la hemofilia grave los pacientes presentan hemorragias recurrentes, que pueden ser espontáneas o aparecer después de traumatismos mínimos o procedimientos quirúrgicos. En ausencia de historia familiar, los niños suelen debutar con hematomas y equimosis palpables desde los 3-4 meses de edad. Aunque bajo, existe riesgo de hemorragia intracraneal y extracraneal en el momento del parto. La sintomatología más característica es la aparición de sangrados articulares o hemartros que supone un 75-80% de los episodios hemorrágicos y los hematomas intramusculares, teniendo especial importancia aquellas hemorragias localizadas en regiones anatómicas determinadas que pueden causar síndrome compartimental como las localizadas en antebrazos o región

gemelar. Una localización de especial gravedad es el hematoma del músculo psoas-Iliaco que puede suponer un riesgo vital (Alcalay & Deplas, 2002).

Como consecuencia de los hemartros de repetición se produce una de las complicaciones más importantes de esta coagulopatía: la artropatía hemofílica, secundaria a la lesión de la membrana sinovial y el cartílago articular por la liberación del hierro, citoquinas y un proceso de neoangiogénesis, que condiciona la perpetuación del estado inflamatorio crónico en la articulación. El objetivo principal en la actualidad del tratamiento de la hemofilia es prevenir la afectación articular evitando el desarrollo de la artropatía hemofílica (Manco-Johnson et al., 2007; Roosendaal & Lafeber, 2006).

Las formas leves tienen una baja incidencia de sangrado, pero pueden aparecer tras procedimientos quirúrgicos o traumatismos importantes (Peerlinck & Jacquemin, 2010).

1.6. Tratamiento y desarrollo de inhibidor

El tratamiento de la hemofilia se basa en la administración de concentrados de FVIII para prevenir y tratar las hemorragias. Este tratamiento intravenoso puede ser administrado a demanda para el control de un episodio hemorrágico y en profilaxis dos o tres veces a la semana, esta última en las hemofilias graves, con el propósito de prevenir la afectación articular tan característica de estos pacientes, así como eventos graves amenazantes para la vida como las hemorragias intracraneales (Evatt, Black, Batorova, Street, & Srivastava, 2004).

Entre las nuevas opciones terapéuticas destacan los concentrados de factor VIII con vida media prolongada que permitirán la infusión de dosis con un mayor intervalo (M. Carcao, 2014; Mahlangu et al., 2016). Existen fármacos de administración subcutánea, especialmente los anticuerpos monoclonales que mimetizan la acción del FVIII, ya en ensayos clínicos fase III con resultados muy esperanzadores (Nogami, 2016). La terapia génica ha experimentado un significativo avance en los últimos años, sobre todo en hemofilia B (Hartmann & Croteau, 2016). La desmopresina, un análogo sintético de la hormona antidiurética es otro recurso terapéutico disponible para pacientes con hemofilia leve con nivel de factor por encima del 10% (Franchini, Zaffanello, & Lippi, 2010).

Como terapia coadyuvante, los antifibrinolíticos son muy efectivos en las hemorragias localizadas en zonas de gran actividad fibrinolítica como el área orofaríngea, además de medidas básicas como inmovilización y compresión de la zona lesionada, la aplicación de frío y elevación del miembro donde se localiza la hemorragia (Srivastava et al., 2013).

La presencia de un inhibidor contra el FVIII representa la complicación más importante del tratamiento en el paciente hemofílico. Se produce por la aparición de anticuerpos dirigidos contra el FVIII que neutralizan su función y que son desarrollados por ciertos hemofílicos tras haber sido

tratados con factor exógeno. Actualmente, para la cuantificación del título de inhibidor la prueba más extendida y utilizada es la técnica Bethesda modificada de Nijmegen en la que un lote de plasma normal (como fuente de FVIII) con plasma del paciente sin diluir se incuba durante 2 horas a 37°C y seguidamente se somete a pruebas de FVIII residual. Una unidad de inhibidor (Unidad Bethesda) se define como la cantidad que destruye la mitad del FVIII en esa mezcla (Sahud, 2000). El resultado debe ser corregido teniendo en cuenta el deterioro espontáneo del FVIII, mediante un control consistente en plasma normal incubado con "buffer". Los pacientes con inhibidores pueden ser divididos en "bajo respondedor", cuando la exposición al factor produce poco o ningún aumento del título del inhibidor (título < 10 UB), y "alto respondedor", cuando la exposición al factor es seguida por un rápido incremento en el título de inhibidor (> 10 UB). En estos pacientes con título de inhibidor alto, los anticuerpos pueden anular por completo el tratamiento con concentrados de factor (Bolton-Maggs & Pasi, 2003). A pesar de las estrategias aplicadas para el tratamiento de los episodios hemorrágicos con agentes bypass e, incluso, la implementación de regímenes de profilaxis, los pacientes con un inhibidor padecen una mayor morbilidad, con una menor calidad de vida en relación con su estatus ortopédico que los hemofílicos sin inhibidor (Gringeri, Mantovani, Scalone, Mannucci, & COCIS Study Group, 2003). Existe una gran variabilidad en la literatura respecto a la frecuencia de inhibidores. En hemofilia A la frecuencia global de aparición de inhibidores varía según las series entre el 3% y el 52%, aunque se considera que un 20-33% de los pacientes con hemofilia A grave desarrollarán un inhibidor, y menos frecuentemente en los casos de hemofilia A moderada/leve (3-13%) (Hay, 2006). La aparición de un inhibidor es un evento que se produce en edades tempranas de la vida. Los estudios de incidencia muestran un mayor riesgo en las primeras 50 exposiciones al factor, con una media de 9-16 días de exposición al tratamiento sustitutivo (Wight & Paisley, 2003). Las razones por las que solo una fracción de pacientes desarrolla inhibidor ha sido motivo de estudio. Varios factores han sido implicados en este proceso, incluyendo factores genéticos (tipo de mutación, gravedad de la hemofilia, genotipo HLA, historia familiar de inhibidores, genes polimórficos) y factores relacionados con el tratamiento como son la edad de inicio del tratamiento, las "agresiones" del sistema inmune, el tipo de concentrado de factor, la intensidad del tratamiento o el modo de administración (Elena Santagostino et al., 2005; Witmer & Young, 2013).

Sin duda, la alteración genética es el factor más importante en el desarrollo de un inhibidor, como ha quedado bien reflejado en numerosas publicaciones (Ghosh & Shetty, 2009; J. Oldenburg, Brackmann, & Schwaab, 2000; J. Oldenburg, El-Maarri, & Schwaab, 2002). En base a los conocimientos cada vez mayores de estos mecanismos, el desarrollo de un inhibidor no debe ser considerado un evento impredecible y en este sentido se han propuesto herramientas para una estratificación del riesgo (ter Avest et al., 2008).

La identificación de factores potencialmente modificables puede ofrecernos claves para definir estrategias de prevención, tanto directamente relacionadas con el tratamiento como también con aquellas implicadas en una modulación de la respuesta inmune, especialmente para pacientes con un perfil genético de alto riesgo.

Una vez desarrollado el inhibidor, el objetivo fundamental es eliminarlo mediante tratamientos de inmunotolerancia, y asegurar así una expectativa y calidad de vida similar a la del resto de los pacientes hemofílicos. Se consigue con la exposición continuada al factor deficitario. Las hipótesis para explicarla sería que la infusión reiterada provocaría inactivación o depleción de las células B y CD4 de memoria específica para el FVIII, o por la provocación de anticuerpos antidiotipo. Desde la primera experiencia, comunicada inicialmente por el grupo de Bonn (Brackmann, 1984) varias son las pautas utilizadas, que van desde dosis bajas de FVIII (50 UI/kg tres veces a la semana) hasta dosis altas (200 UI/kg/día), opcionalmente asociadas a fármacos inmunosupresores o inmunomoduladores. Los resultados obtenidos con las diferentes pautas de tratamiento son similares, a pesar de ser esquemas diferentes en dosis y duración, siendo la tasa de éxito del 60-80% (Kreuz & Ettingshausen, 2014).

En los pacientes que desarrollan un inhibidor, los recursos terapéuticos para el control de los sangrados se basa en la infusión de agentes baipás de la coagulación como son los concentrados de complejo protrombínico activado (CCPA) y el factor VII recombinante activado (rFVIIa) (Collins et al., 2013).

En hemofilia A leve o moderada los inhibidores son infrecuentes pero pueden presentarse después de una exposición intensa (por ejemplo, después de una intervención quirúrgica). Se han descrito mutaciones (p.Arg612Cys y p.Trp2248Cys) en las que el riesgo de inhibidor alcanza un 40%. Algunos inhibidores reaccionan solamente con el FVIII exógeno. Cuando reconocen también el factor propio, el inhibidor puede modificar el comportamiento clínico y el paciente presenta hemorragias graves como las que se observan en la hemofilia adquirida. En el 60% de los casos pueden observarse remisiones espontáneas aproximadamente a los nueve meses de la aparición del inhibidor; no obstante, durante este periodo, las manifestaciones clínicas pueden ser graves. La inmunotolerancia en estos casos se ha mostrado poco eficaz (Castaman & Fijnvandraat, 2014).

1.7. Discrepancias

A la hora de la determinación de FVIII debe tenerse en cuenta que su actividad es medida indirectamente. Así, el FVIII no es una enzima sino un cofactor en la activación del FX por el FIXa. Todos los métodos de medida del FVIII miden actividad según generen FXa en presencia de calcio y fosfolípidos. El FXa se estima directamente mediante absorbancia espectroscópica, como es el caso del método cromogénico que usa un sustrato cromogénico, o de forma indirecta mediante la medición de la formación de fibrina por la trombina. Durante años, la técnica más empleada para medir el FVIII fue la basada en el método de una etapa. No obstante, dicho ensayo tiene limitaciones como la interferencia que puede provocar la presencia del anticoagulante lúpico y, más importante, que la detección de un nivel normal de FVIII con el método de una etapa no excluye el diagnóstico de hemofilia A leve. Varias publicaciones informan que un subgrupo de pacientes

con hemofilia A leve presentan discrepancias entre los resultados de los distintos métodos que analizan la actividad del FVIII (Keeling et al., 1999; Parquet-Gernez, Mazurier, & Goudemand, 1988; Poulsen et al., 2009). Esta discrepancia se ha descrito hasta en un 20% de los pacientes con hemofilia A leve. Por lo general, en la considerada discrepancia estándar o tipo 1, el resultado de la determinación de FVIII por método de una etapa es de más del doble que el obtenido en el ensayo de coagulación por método cromogénico, aunque en algunos casos, el resultado puede ser hasta cinco veces superior (Potgieter, Damgaard, & Hillarp, 2015).

La mayoría de las mutaciones publicadas en pacientes con este tipo de discrepancia se localizan en los dominios A1, A2, A3 y excepcionalmente en C2. Entre ellas, encontramos p.Arg550His, p.Ala303Glu, p.Ser308Leu o p.Met1966Ile e implican una dosificación de FVIII más alta por el método de una etapa que por el método cromogénico.

En sentido contrario (discrepancia inversa) se han implicado mutaciones "missense" como p.Glu340Lys, p.Arg1708His, p.Ile388Thr o p.Glu739Lys y ocasionan un nivel de FVIII superior cuando se determina por el método cromogénico que cuando se utiliza el método en una etapa (J. Oldenburg & Pavlova, 2010). Los mecanismos implicados en estas discrepancias implican una mayor inactivación del FVIIIa debido a una disociación aumentada de la subunidad A₂ (Pipe, Eickhorst, McKinley, Saenko, & Kaufman, 1999). La sustitución de aminoácidos que alteran la carga o la hidrofobicidad determinan una inestabilidad y interrupción de las interacciones con otras proteínas, una disminución de la activación del FVIII por la trombina o sustituciones que requieren una concentración superior de FIXa (Roelse et al., 2000; Trossaert et al., 2008).

1.8. Portadoras de hemofilia

Una vez que se ha identificado el defecto genético en el paciente se puede analizar de forma rápida y con total garantía la presencia de la mutación responsable de la hemofilia en las posibles portadoras, superando las incertidumbres de hace años, cuando la información sobre el estado de portadora se basaba en un cálculo de probabilidades según el árbol genealógico y los niveles de factor VIII plasmático (Klein et al., 1977).

El primer paso en el estudio de posibles portadoras es la correcta elaboración del "árbol genealógico", o genealogía de una familia en la que existen pacientes hemofílicos. Esto permite ubicar a cada una de las mujeres y valorar, según la relación de parentesco con los varones afectados, sus probabilidades teóricas de ser portadora. Así, se puede hablar de:

- Portadoras obligadas: Aquellas que con seguridad son portadoras (todas las hijas de un varón afectado de hemofilia; las mujeres con más de un hijo hemofílico, excepto por embarazo gemelar, y las mujeres con un hijo hemofílico que tengan, además, antecedentes de otros varones hemofílicos por vía materna como hermanos, tíos o primos).

- Portadoras posibles: Aquellas que pueden serlo por el árbol genealógico familiar, pero que no existe certeza completa (las mujeres con un solo hijo hemofílico y sin antecedentes familiares; todas las hijas de una mujer "portadora obligada"; todas las mujeres con antecedentes familiares de hemofilia por vía materna).

Los casos esporádicos, aquellos en los que no existen antecedentes familiares en una mujer que tiene un hijo varón afectado, y que suponen aproximadamente un 30-40% de los casos, constituyen un grupo de especial interés diagnóstico, ya que son de gran trascendencia para el consejo genético. En la mayoría de ellos, la mujer es portadora porque heredó la alteración de su madre portadora de manera silenciosa (sin afectados) o porque se dio una "mutación de novo" en el gameto paterno (espermatozoide). Otras veces las células germinales paternas tienen más espermatozoides mutados aunque en otras células del organismo como el hígado o la sangre periférica no está presente, evento conocido como "mosaicismo o mosaico en línea germinal" (Kasper & Buzin, 2009).

También existe la posibilidad de que el estudio genético de una madre de un caso esporádico no sea portadora cuando se estudia el ADN procedente de sangre periférica, debido a que la alteración se origina de novo únicamente en el óvulo origen del paciente hemofílico o está presente en otros óvulos (mosaicismo germinal). El riesgo residual de recurrencia en estos últimos casos se sitúa en alrededor del 10%, por lo que se recomienda siempre ofrecer un diagnóstico prenatal (Kasper & Lin, 2007; E. F. Tizzano, Cornet, Domènech, & Baiget, 2003).

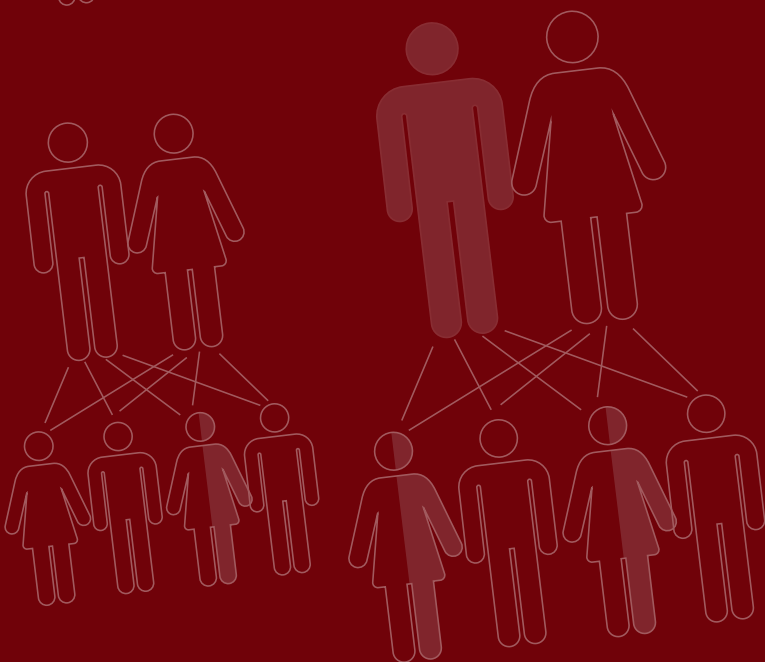
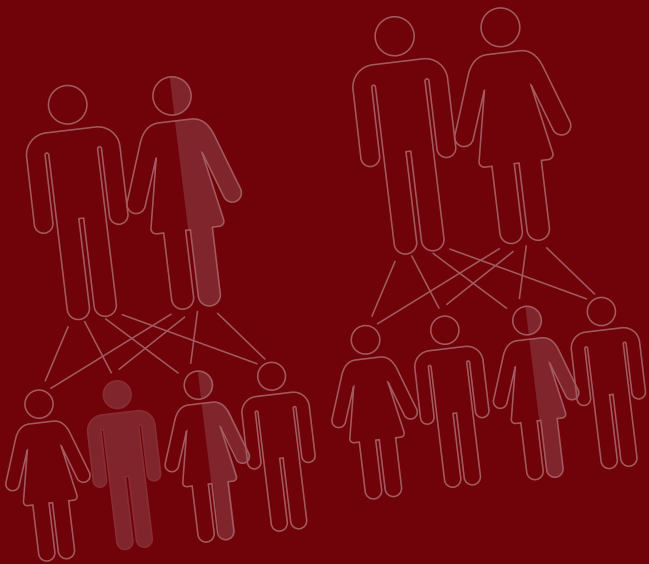
Por tanto, se puede ofrecer a las mujeres de familias con hemofilia la posibilidad de acceder a un consejo genético adecuado y optar libremente por la opción reproductiva que consideren más adecuada. El consejo genético tiene como objetivo facilitar a los futuros padres, con un riesgo conocido de tener un hijo hemofílico, una adecuada información que les capacite para tomar decisiones acerca de las opciones reproductivas posibles, así como proporcionar apoyo psicológico durante dicho proceso. En la Ley 14/2006, de 26 de mayo, (BOE núm. 126, de 27 de mayo de 2006) se regula la aplicación de las técnicas de reproducción humana asistida en la prevención y tratamiento de enfermedades de origen genético,

El asesoramiento genético no se limita a la mención de un riesgo de recurrencia. Incluye todo un proceso por el cual es posible asegurar que la familia conoce las implicaciones de la enfermedad, la forma cómo se hereda, la probabilidad de que vuelva a suceder y las alternativas que existen para que, disponiendo de todos estos elementos, puedan elegir la opción que consideren más correcta.

Las opciones reproductivas en portadoras para evitar tener un hijo con hemofilia se basan en el diagnóstico prenatal, diagnóstico genético preimplantatorio (DGP), donación de óvulos y embriones y en el diagnóstico genético no invasivo. Nuestro centro es referencia en Andalucía para DPG.



2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

- El estudio de las familias con hemofilia A en Andalucía permitirá establecer un mapa de distribución del espectro mutacional. La identificación de las alteraciones genéticas en portadoras posibilitará ofrecer un adecuado consejo genético, así como establecer un tratamiento específico en pacientes hemofílicos con alto riesgo de desarrollo de inhibidores.

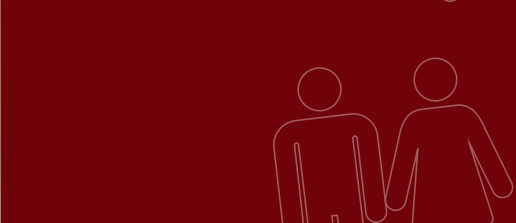
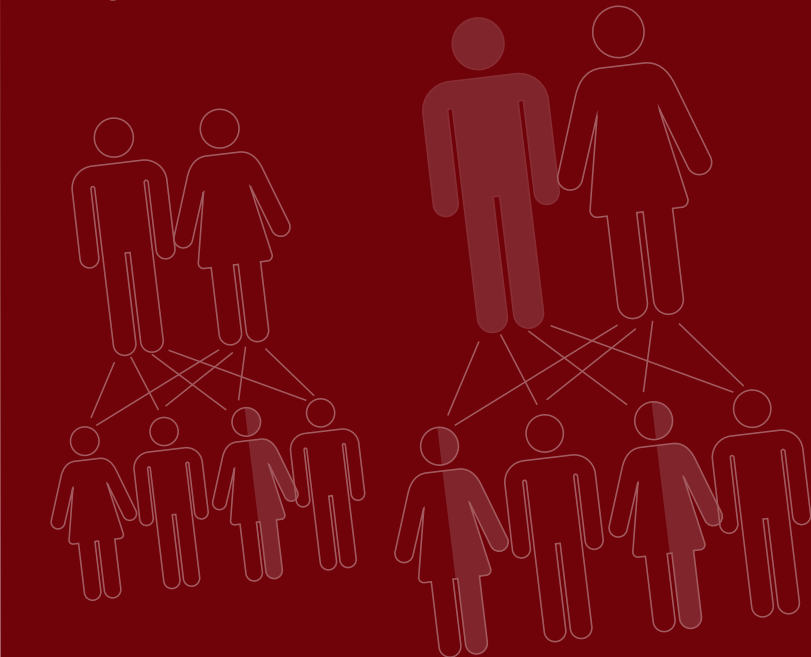
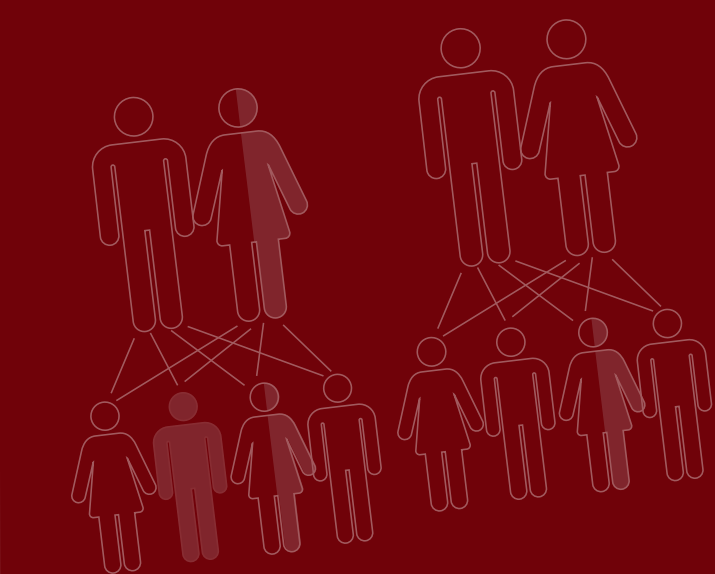
Objetivos

Objetivo principal:

- Identificación y caracterización del espectro mutacional de los pacientes con hemofilia A en Andalucía y su distribución según el tipo de gravedad.

Objetivos secundarios:

- Realización de un árbol genealógico de cada familia con la finalidad de identificar el estatus de portadora de las mujeres de cada familia.
- Identificación de mutaciones de alto riesgo para la formación de inhibidor.
- Identificación de mutaciones asociadas a discrepancias en la determinación del FVIII de la coagulación.



3. MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

El grupo de Coagulopatías Congénitas Hemorrágicas dependiente de la Asociación Andaluza de Hematología y Hemoterapia posee un Registro Andaluz de Hemofilias en el que están incluidas las 335 familias de Hemofilia A.

3.1. Pacientes

El estudio molecular de hemofilia de los pacientes incluidos en el Registro Andaluz de Hemofilia pertenecientes a los distintos Servicios de Hematología de Andalucía se ha realizado desde el año 2002 en nuestro Centro.

Incluimos en el estudio un total de 335 familias no emparentadas con hemofilia A, pertenecientes a dicho registro. Todos los pacientes firmaron un consentimiento informado.

Del total de familias, 171 fueron ya comunicados en una tesis doctoral en el año 2007 en el área de Biología (Fernández O., 2008) o han formado parte de distintas comunicaciones científicas a congresos nacionales e internacionales (Fernandez O, JR, Núñez R, & Pérez R, 2007; Núñez R, 2005; Núñez R, Pérez R, & García-Lozano JR, 2013).

A los pacientes se les realizó un árbol genealógico comprobando que no estaban emparentados entre ellos como mínimo en tres generaciones. En cada familia se estudió la mutación en los varones hemofílicos. Una vez identificada la alteración genética responsable de la hemofilia se estudiaron las mujeres de la familia para identificar su estatus de portadora, empezando por las primeras generaciones. En las mujeres que resultaron no portadoras se excluyó al resto de su descendencia del estudio (fig 12).

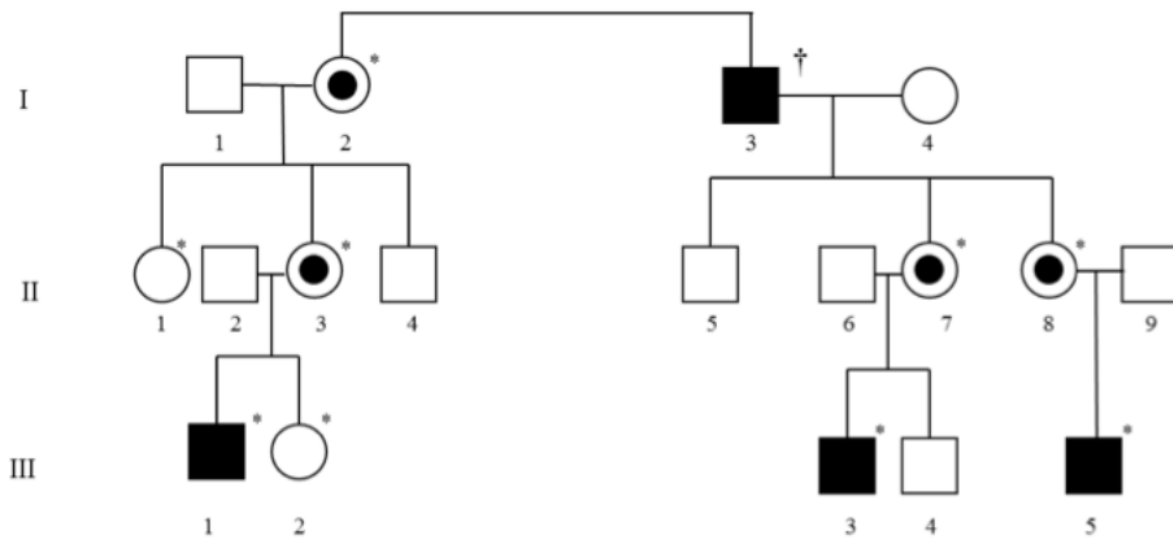


Figura 12. Arbol genealógico de la familia A-9. Tres hemofílicos vivos y 4 portadoras identificadas. La mujer II-1 y III-2 resultaron no portadoras de la mutación familiar (Inv22).

* Estudio genético realizado.

Los pacientes se consideraron como caso "familiar" cuando existían otros hemofílicos en generaciones anteriores, y como "esporádico" cuando solo había un hemofílico en la familia o una sola generación afectada (el paciente hemofílico podía tener hermanos afectados).

Los pacientes fueron clasificados según los valores de FVIII siguiendo los criterios del comité de estandarización de la Sociedad Internacional de Trombosis y Hemostasia. En todo paciente que recibió tratamiento sustitutivo se investigó la presencia de inhibidor frente al FVIII por técnica Bethesda modificada de Nijmegen (Verbruggen et al., 1995).

Presentaron hemofilia A grave 189 pacientes pertenecientes a 142 familias no emparentadas, 73 hemofilia moderada en 36 familias y 352 pacientes se incluyeron como hemofílicos leves distribuidos en 159 familias (fig. 13, 14). Se estudiaron a 1106 mujeres de estas familias para determinar su estatus de portadora.

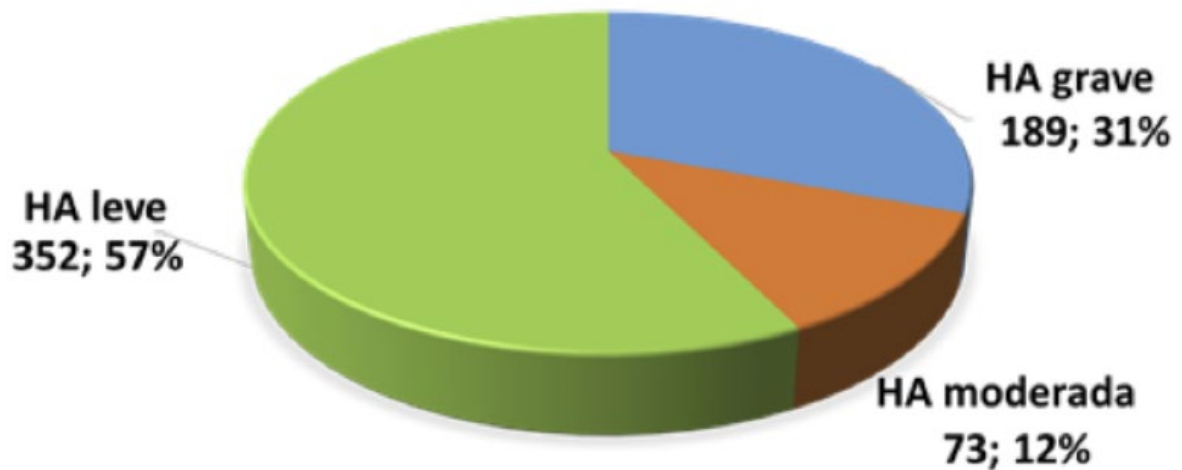


Figura 13. Número y porcentaje de pacientes según la gravedad de la hemofilia.

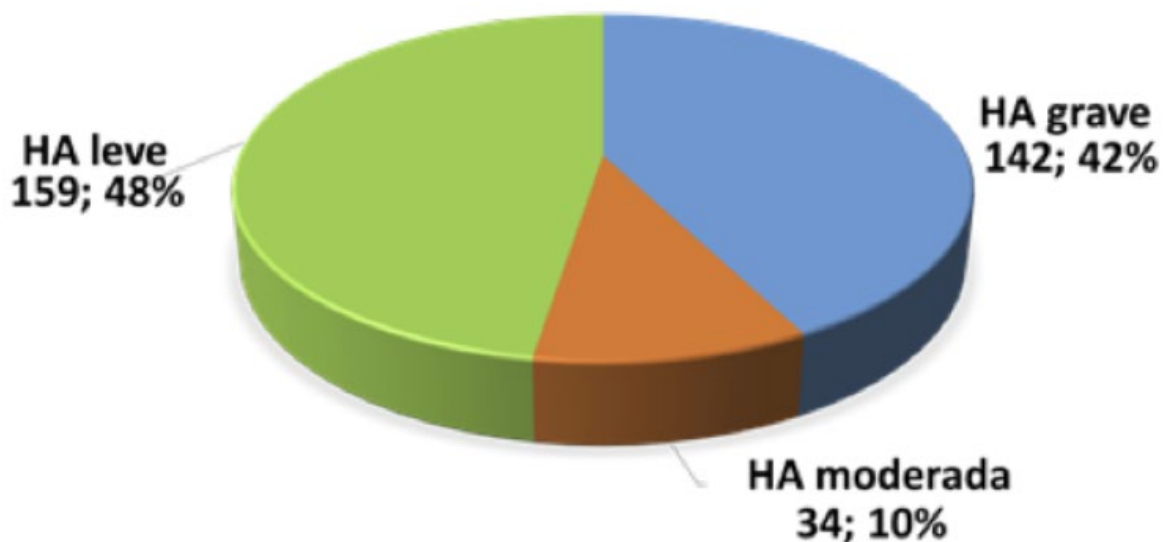


Figura 14. Número y porcentaje de familias según la gravedad de la hemofilia

3.1.1. Controles

Para comprobar que las mutaciones de cambio de aminoácido identificadas en este estudio y no descritas previamente no estaban presentes en nuestra población sana, se utilizaron como controles 50 mujeres no emparentadas donantes de médula ósea y sin antecedentes de hemofilia familiar. Todos los controles estaban incluidos en el banco de donantes de médula ósea. Los controles se incluyeron en el estudio después de obtener el consentimiento informado.

A partir de 2010 se desarrolló un método para conocer el efecto patológico de las mutaciones "missense" (Adzhubei et al., 2010). Hemos utilizado el programa informático PolyPhen-2 (Polymorphism Phenotyping v2) que predice el impacto de la sustitución de un aminoácido en la estabilidad y función de las proteínas humanas, en nuestro caso en la hemofilia A (Adzhubei, Jordan, & Sunyaev, 2013).

3.1.2. Algoritmo de trabajo

Según la gravedad de la hemofilia los pacientes siguieron dos vías de estudio diferentes. En los pacientes con hemofilia A grave se estudiaron inicialmente las mutaciones recurrentes, en primer lugar la Inv22 seguido del estudio de la Inv1.

Aquellos pacientes negativos para ambas inversiones y todos los hemofílicos moderados y leves fueron estudiados mediante la amplificación de los 26 exones del gen del F8 y secuenciación directa (fig. 15). Este método es útil asimismo para detectar la presencia de alguna delección de exón único o de varios exones que está presente en aproximadamente el 5% de los casos graves (Haemophilia A mutation database. <http://www.factorviii-db.org>).

En cada familia el estudio se inició en un varón hemofílico. Una vez identificada la mutación responsable de la hemofilia, el estudio se extendió al resto de la familia con la finalidad de identificar las portadoras. En el caso de no disponer de un probando hemofílico vivo se realizó el estudio en una portadora obligada.

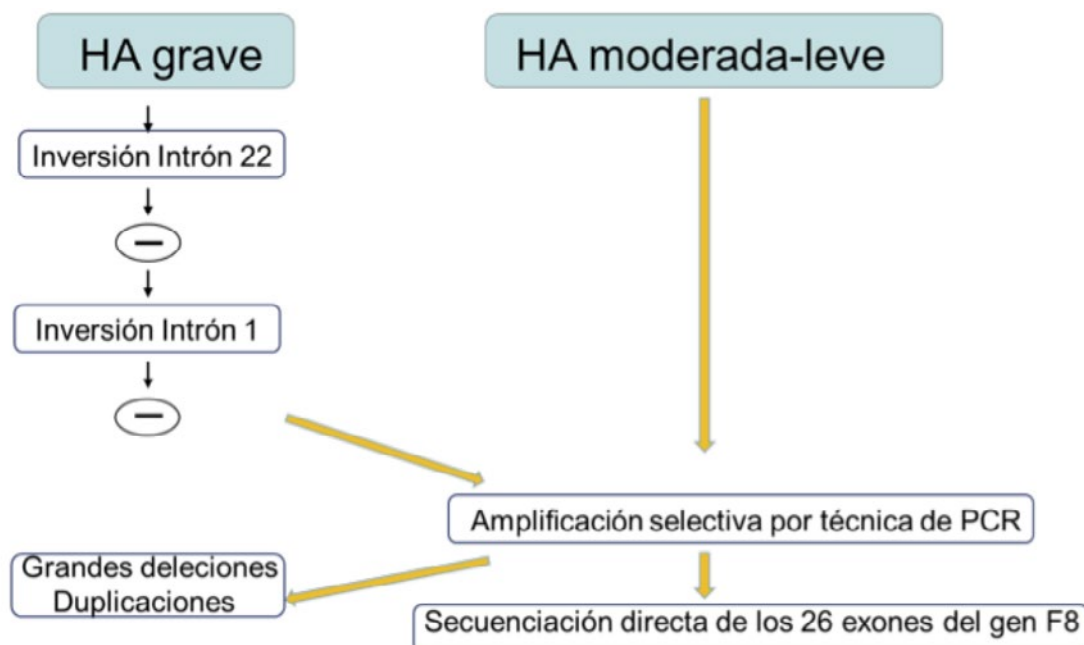


Figura 15. Secuencia de estudio en hemofilia A: DNA de pacientes.

3.2. Extracción de ADN

Como material de partida, se utilizó sangre periférica obtenida por venopunción y recogida directamente en tubos estériles con EDTA como anticoagulante y congelada a -20°C . El ADN fue extraído a partir de células totales con el kit comercial "QIAamp DNA Mini Kit" (Qiagen®) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN así obtenido se conservó a -20°C hasta su utilización.

3.3. Estudio mutacional

3.3.1. Inversión del intrón 22

La inversión del intrón 22 se realizó mediante la técnica de PCR descrita por Liu y col., (Liu, Nozari, & Sommer, 1998).

3.3.1.1. Cebadores

Los tres cebadores utilizados (A, Q y P) se describen en la tabla 3, y fueron resuspendidos en agua destilada a una concentración de $12\mu\text{M}$, $30\mu\text{M}$ y $20\mu\text{M}$, respectivamente. En la figura 16 se muestra la localización de los cebadores y la orientación de las secuencias relevantes, así como el tamaño del producto amplificado en un paciente con inversión, un individuo normal y una portadora.

Nombre	Cebadores
A	5'CACAAGGGGGAAGAGTGTGAGGGTGTGGGATAAGA3'
Q	5'GGCCCTACAACCATTCTGCCTTTCACTTTCAGTGCAATA3'
P	5'GCCCTGCCTGTCCATTACACTGATGACATTATGCTGAC3'

Tabla 3. Cebadores utilizados en la PCR de la Inv22.

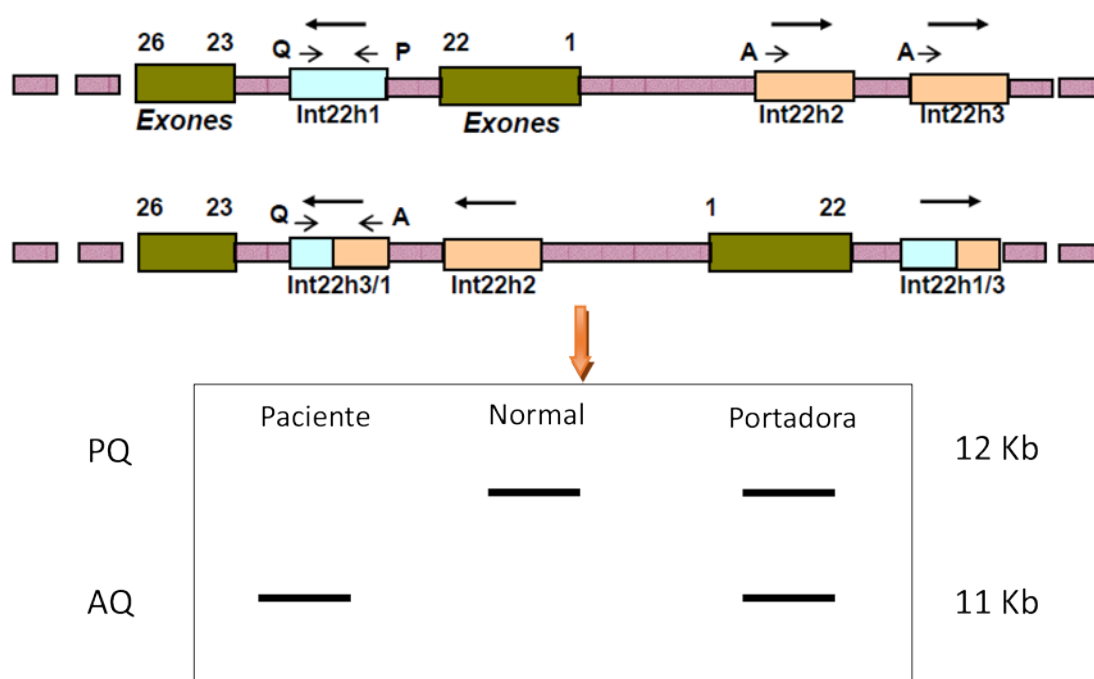


Figura 16. Esquema de la prueba de PCR.

3.3.1.2. Condiciones de mezcla de PCR

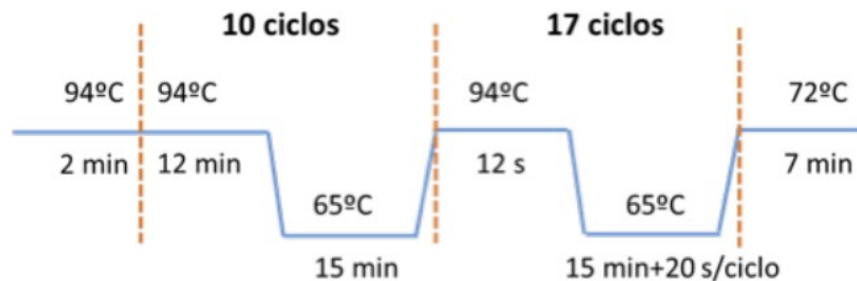
Los reactivos utilizados para la amplificación se describen en la tabla 4.

Reactivos	Volumen	Concentración final
ADN	3 μ L	25 ng/ μ L
Tampón PCR (Expand Long "casero")	2,5 μ L	1X
Cebador A (12 μ M)	1 μ L	0,5 μ M
Cebador Q (30 μ M)	1 μ L	1,2 μ M
Cebador P (20 μ M)	1 μ L	0,8 μ M
DMSO 100%	1,4 μ L	0,06%
DNTPs ¹	5 μ L	500 μ L
Taq Polimerasa (DyNAzyme EXT™, FINNZYMES)	1 μ L	0,04 U/ μ L
ddH ₂ O	9,1 μ L	-----
Total	25 μ L	-----

Tabla 4. Reactivos para amplificación de PCR. 162,5 μ M de dGTP y deaza-dGTP, 125 μ L del resto de nucleótidos

3.3.1.3. Parámetros de PCR

Los parámetros utilizados para la amplificación fueron los siguientes:



3.3.1.4. Electroforesis

Los fragmentos amplificados se sometieron a electroforesis en gel de agarosa sumergido en tampón TBE 0.5X. La concentración de agarosa para los fragmentos del estudio de la Inv22 fue del 0,4%. El procedimiento es el siguiente:

- Se disuelve la cantidad deseada de agarosa en TBE 0.5X y se calienta hasta su disolución total en un horno microondas. Se deja enfriar ligeramente y se añade bromuro de etidio a una concentración final de 0.5mg/ml. Posteriormente se vierte sobre un molde previamente sellado y se deja enfriar hasta que solidifique.
- Se mezclan 4ml del producto de PCR con 1ml de tampón de carga 5X y se dispensa en los pocillos del gel sumergido en TBE 0.5X, reservando un pocillo para el marcador de peso molecular (Escala de 1Kb, Amersham Biosciences).
- Se somete a electroforesis en tampón TBE 0.5X a 25V durante toda la noche.
- Las bandas se visualizan con un transiluminador de luz ultravioleta.

3.3.2. Inversión del intrón 1

La inversión del intrón 1 se realizó mediante la técnica de PCR descrita por Bagnall y col. en 2002 (Bagnall et al., 2002).

3.3.2.1. Cebadores

Los cebadores utilizados se describen en la tabla xx y fueron resuspendidos en el laboratorio en agua destilada a una concentración de 100µM.

Nombre	Cebadores
9F	5'GTTGTTGGGAATGGTTACGG3'
9cR	5'CTAGCTTGAGCTCCCTGTGG3'
Int 1h-2F	5'GGCAGGGATCTTGTGGTAAA3'
Int 1h-2R	5'TGGGTGATATAAGCTGCTGCTGA3'

Tabla 5. Cebadores utilizados en la PCR de la Inv1.

Para detectar la inversión se prepararon dos reacciones de amplificación por cada muestra, una incluye la pareja de cebadores 9F y 9cR, más el cebador Int 1h-2F y la otra la pareja Int 1h-2F e Int 1h2R más el cebador 9F. En la figura 17 se muestra la localización de los cebadores y la orientación de las secuencias relevantes, así como el tamaño del producto amplificado en un paciente con inversión, un individuo normal y una portadora.

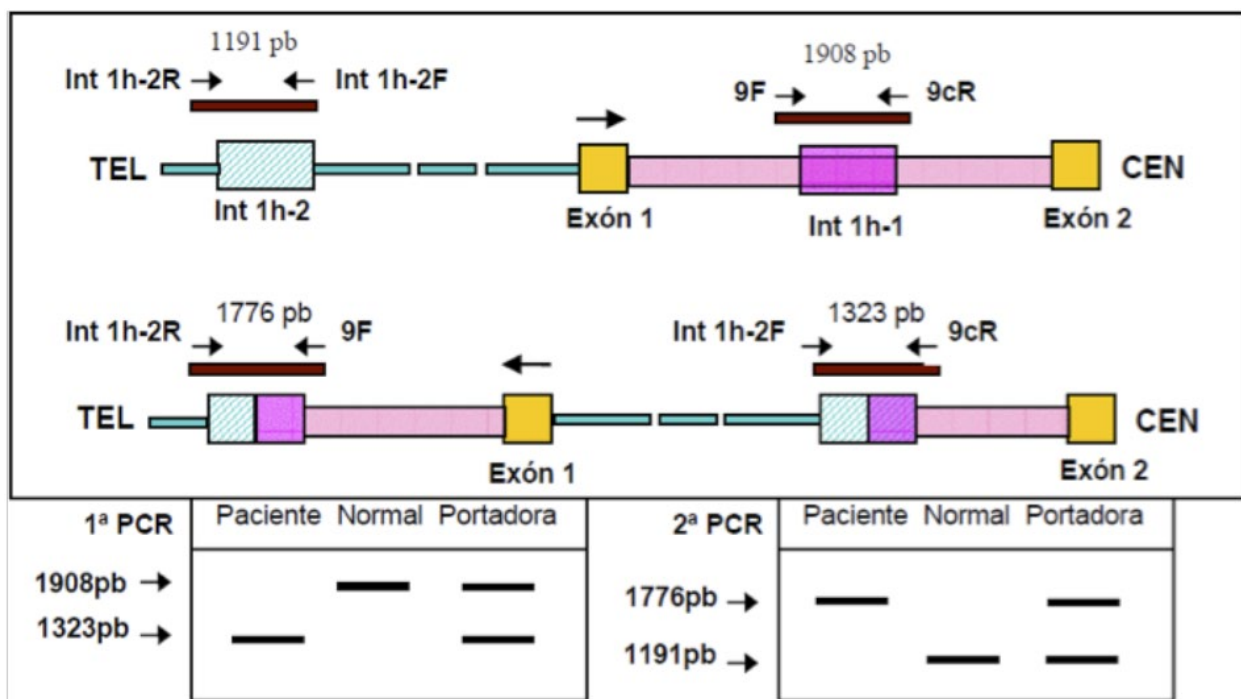


Figura 17. Esquema de la prueba de PCR.

Después de la primera reacción se obtiene un producto de 1908 pb para un ADN normal y una banda de 1323 pb para un paciente con la inversión, mientras que en caso de una mujer portadora presentaría las dos bandas. En la segunda reacción el producto será una banda de 1191 pb para un ADN normal y una banda de 1776 pb en un paciente con inversión. En el caso de una portadora se obtendrían las dos bandas.

3.3.2.2. Condiciones de la mezcla de PCR

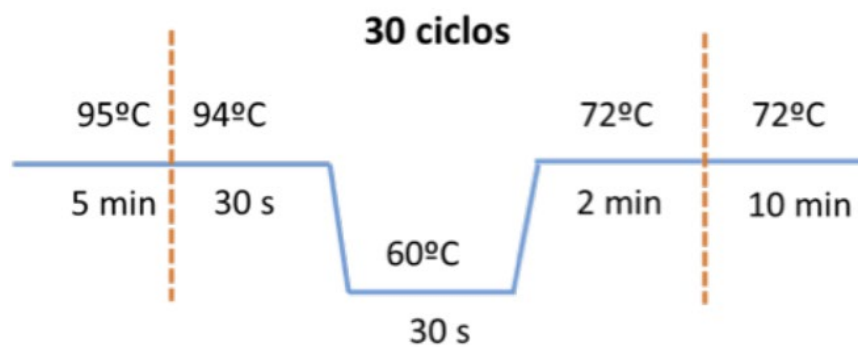
Los reactivos utilizados para la amplificación se describen a continuación (tabla 6):

Reactivos	Volumen	Concentración final
ADN	3 μL	10 ng/ μL
Tampón PCR 10X	3 μL	1X
Cebador 1	0,2 μL	0,7 μM
Cebador 2	0,2 μL	0,7 μM
Cebador 3	0,2 μL	0,7 μM
DMSO 100%	1,5 μL	0,05 %
DNTPs2 (25mM)	0,4 μL	300 μL
Taq Polimerasa (Amersham Biosciences)	0,5 μL	0,08 U/ μL
ddH ₂ O	21 μL	-----
Total	30 μL	-----

Tabla 6. Reactivos utilizados para la amplificación PCR

3.3.2.3. Parámetros de PCR

Los parámetros utilizados para la amplificación fueron los siguientes:



3.3.2.4. Electroforesis

Para la visualización de los fragmentos amplificados se siguió el mismo procedimiento que en el apartado 3.3.1.4. Solo se introdujeron 2 cambios marcados por el tamaño del producto de PCR: se utilizó agarosa al 1% y la electroforesis se realizó a 100V durante 30 min.

3.3.3. Secuenciación

3.3.3.1. Cebadores para la amplificación del gen FVIII

Los 26 exones del gen FVIII fueron amplificados mediante PCR con cebadores descritos por David y col. en 1994 (David et al., 1994). Los cebadores fueron resuspendidos en el laboratorio en agua destilada a una concentración de 100µM. En la tabla 6 se describen los cebadores y el tamaño de los fragmentos amplificados.

Exón	Cebadores	Tamaño del fragmento amplificado (pb)
1	E1F 5'AATCCTATCGGTTACTGCTTA3' E1R 5'AGCATCACAAACCATCCTAAC3'	430
2	E2F 5'TGGAAGCATTACTTCCAGCT3' E2R 5'AACTGCAACCTCAAGATTGG3'	276
3	E3F 5'TGCTTCTCCACTGTGACCT3' E3R 5'ATCTAGTAAATGTTAAGAAATACA3	355
4	E4F 5'GTACAGTGGATATAGAAAGGAC3' E4R 5'GATTCAGTTGTTTGTACTTCTC3	318
5	E5F 5'CTTACTGTCAAGTAACTGATG3' E5R 5'CTTCATTCTGAACAGTAATG3'	279
6	E6F 5'TCCCACTTATTGTCATGGAC3' E6R 5'TACAGAACTCTGGTGCTGAA3'	421
7	E7F 5'GGCAAGAGCTGTTGGTTTG3' E7R 5'TGTCCAGTAAATTTTATTAAGT3	459
8	E8F 5'CCATATAGCCTGCAGAACAT3' E8R 5'CTGATGCTCAGCTATGTTAG3	548
9	E9F 5'CTAACATAGCTGAGCATCAG3' E9R 5'AGATCATGTCCATTGGAGACAA3'	417
10	E10F 5'CTAGCCTCAAATTACTATAATG3' E10R 5'ACTTTAGACTGGAGCTTGAG3	346
11	E11F 5'TGCGACTTTAGCTTCCACTT3' E11R 5'ACTGACCTATATTGCAAACCA3'	445
12	E12F 5'TGCCATCGCTTTTCATCATAG3' E12R 5'CATCATTATCTGGACATCAC3	319
13	E13F 5'AACAATCTACTTTTTTGGGAAGA3' E13R 5'AGCATACGAATGGCTAGTGA3'	424
14	E14-1 5'ACAGGCATAGTACAACAGCA3' E14-2 5'CTTGGCTATTCATTAAACCTG3'	1007
	E14-3 5'TCCATCAGACAATTTGGCAG3' E14-4 5'CTACATTTTGCTAGTGCTC3'	1061
	E14-5 5'AGTAGGAAAGGGTGAATTTAC3' E14-6 5'AGGTCCTTCTGATAAATGTGA3'	1088
	E14-7 5'AGCAGTCATTTCTTACAAGGA3' E14-8 5'GTTGATAGGTGAGGTTGAC3	348
	E15F 5'AGATGAAGTGGTTAACTATGC3' E15R 5'GTGGGAATACATTATAGTCAG	417

Exón	Cebadores	Tamaño del fragmento amplificado (pb)
16	E16F 5'AGCATCCATCTTCTGTACCA3' E16R 5'TCAGTAGATTCCAGAATGACA3	346
17	E17F 5'TGTCATTCTGGAATCTACTGA3' E17R 5'CACTCCCACAGATACTCT3'	445
18	E18F 5'AGAGTATATCTGTGGGAGTG3' E18R 5'CTTAAGAGCATGGAGCTTGT3	319
19	E19F 5'GCAAGCACTTTGCATTTGAG3' E19R 5'AGCAACCATTCCAGAAAGGA3	424
20	E20F 5'ACGTTGAGTACAGTTCTTGG3' E20R 5'ACTAATAGAAGCATGGAGATG3'	314
21	E21F 5'CAGCTTAGATTAACCTTTCTC3' E21R 5'GAGTGAATGTGATACATTCC3	226
22	E22F 5'AAATAGGTTAAATAAAAGTGTTA3' E22R 5'GTCCAATATCTGAAATCTGC3	262
23	E23F 5'GTCTTATGTAGATGTTGGATG3' E23R 5'AGTCTCAGGATAACTAGAACA3	349
24	E24F 5'GCTCAGTATAACTGAGGCTG3' E24R 5'CTCTGAGTCAGTTAAACAGT3'	248
25	E25F 5'AGTGCTGTGGTATGGTTAAG3' E25R 5'TTGCTCTGAAAATTTGGTCATA3	371
26	E26F 5'GGTTAATCCTGGACTACTG3' E26R 5'GTGTCTGCTAGGATTTAGCA3	373

Tabla 6. Cebadores utilizados para la amplificación del gen FVIII.

3.3.3.2. Condiciones de la mezcla para la amplificación del gen FVIII

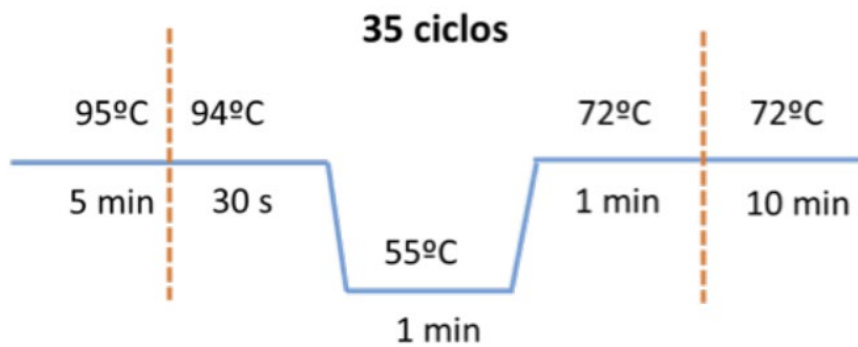
Los reactivos utilizados para la amplificación están descritos en la tabla 7.

Reactivos	Volumen	Concentración final
ADN	3 µL	10 ng/µL
Tampón PCR 10X	3 µL	1X
Cebador 1	0,1 µL	0,3 µM
Cebador 2	0,1 µL	0,3 µM
dNTPs (25mM)	0,4 µL	300 µL
Cl2Mg (25 mM)	0,5 µL	0,42 mM
Taq Polimerasa (Amersham Biosciences)	0,5 µL	0,03 U/µL
ddH2O	22,7 µL	-----
Total	30 µL	-----

Tabla 7. Reactivos utilizados para la amplificación del gen FVIII.

3.3.3.3. Parámetros de PCR

Los parámetros utilizados para la amplificación fueron los siguientes:



3.3.3.4. Electroforesis y purificación

Para la visualización de los fragmentos amplificados se aplicó el mismo procedimiento que en el apartado 3.3.1.4, pero se utilizó agarosa al 2% y la electroforesis se realizó a 200V durante 15 min.

Los productos de PCR se purificaron mediante columnas de sephacryl S-400.

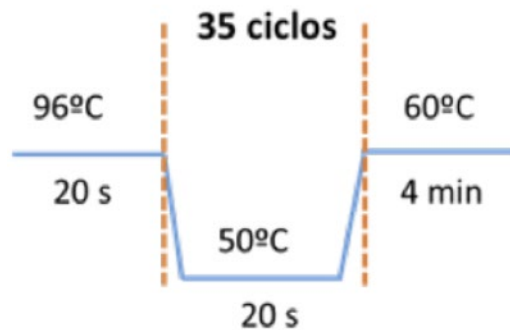
3.3.3.5. Reacción de secuenciación

La secuenciación de los productos de PCR se realizó en un secuenciador automático CEQ 8000 (Beckman-Coulter). Después de purificar los productos de PCR, se reamplificaron utilizando "CEQ Dye Terminator Cycle Sequencing with Quick Start Kit", con las siguientes condiciones (tabla 8):

Reactivos	Cantidad
ADN	1 µL del producto de PCR
"DTCS Quick Start Master Mix"	4 µL
Cebadores (3 µM)	1 µL
ddH ₂ O	4 µL

Tabla 8. Reactivos para reamplificación PCR.

El ciclo de secuenciación se llevó a cabo en un termociclador bajo las siguientes condiciones:



Tras la amplificación se lleva a cabo una precipitación con etanol:

- Añadir a cada tubo 10 μ l de ddH₂O y 4ml de solución de parada (mezclar en el momento 2ml de acetato sódico 3M pH 5.2 y 2ml de EDTA-Na₂ pH 8.0)
- Añadir a cada tubo 60 μ l de etanol/ddH₂O 95% (v/v), previamente enfriado a -20°C, mezclar y centrifugar a 14.000 rpm a 4°C durante 15min. Retirar sobrenadante.
- Lavar 2 veces con 200 μ l de etanol/ddH₂O 70% (v/v) previamente enfriado a -20°C. Centrifugar a 14.000 str
- 5min a 4°C. Retirar sobrenadante
- Secar.
- Resuspender en 40 μ l de tampón de carga (Sample Loading Solution).

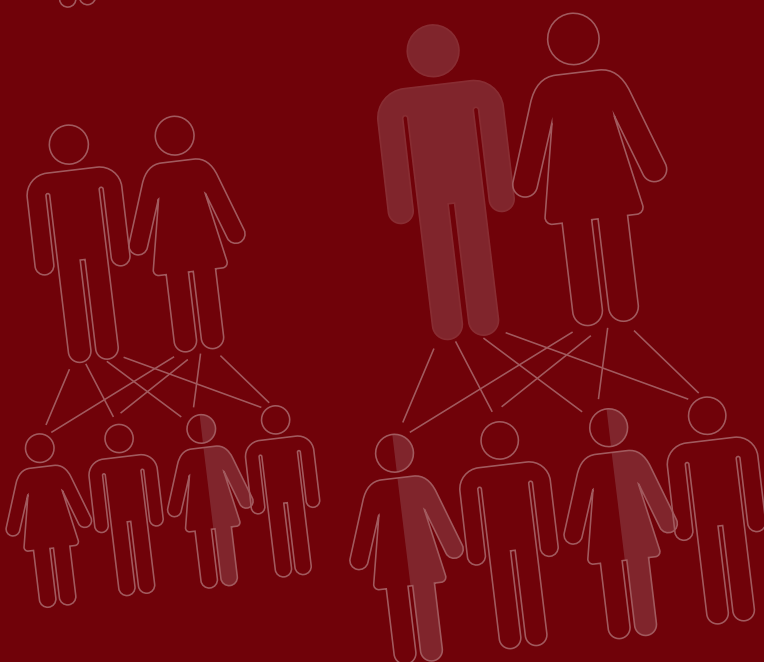
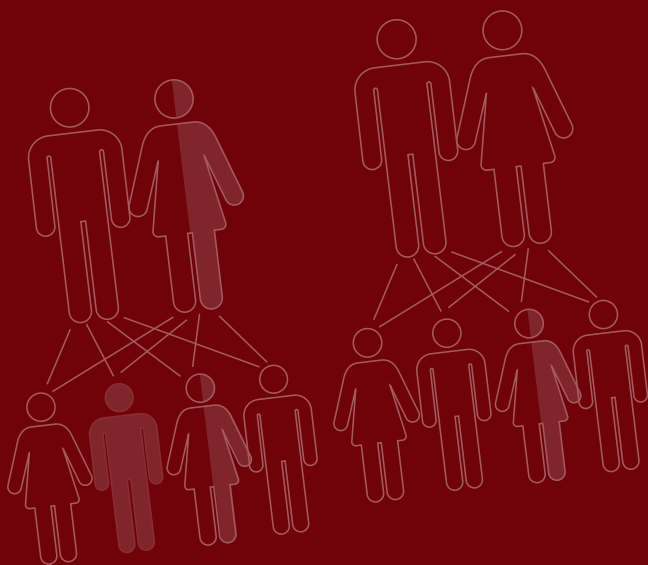
La electroforesis se llevó a cabo en el secuenciador CEQ 8000 según las instrucciones del fabricante.

3.3.3.6. Alineación de las secuencias

Las secuencias obtenidas fueron alineadas con las secuencias genómicas publicadas para el gen de coagulación humano FVIII (GenBank Accession nos AY769950). La nomenclatura utilizada para nombrar a nucleótidos y aminoácidos fue la seguida por las bases de datos internacionales de la hemofilia A.



4. RESULTADOS



4. RESULTADOS

4.1. Descripción general de las mutaciones

En este estudio se incluyeron un total de 614 pacientes con hemofilia A (189 graves, 73 moderados y 352 leves) pertenecientes a 335 familias (142 graves, 34 moderadas y 159 leves) del Registro Andaluz de Hemofilia.

La mutación responsable de la hemofilia se identificó en 586 pacientes, que representan el 95,4% de los casos estudiados (tabla 9). En 28 pacientes (4,6%) no se identificó ninguna mutación responsable de la hemofilia. El perfil mutacional encontrado fue el siguiente: mutaciones de cambio de aminoácidos en un 72,9%, Inv22 en el 14,8%, mutaciones de codón de parada en un 3%, pequeñas deleciones e inserciones en el 4,7%, grandes deleciones 1%, mutaciones en la zona de procesamiento de ARN en un 3,1% e Inv1 en el 1% de los casos (fig.18).

Tipo de hemofilia	Pacientes	Pacientes con mutación identificada (%)
Grave	189	185 (97,9)
Moderada	73	71 (97,2)
Leve	352	330 (93,7)
Total	614	586 (95,4)

Tabla 9. Pacientes incluidos y número de pacientes con mutación identificada según la gravedad de la hemofilia.

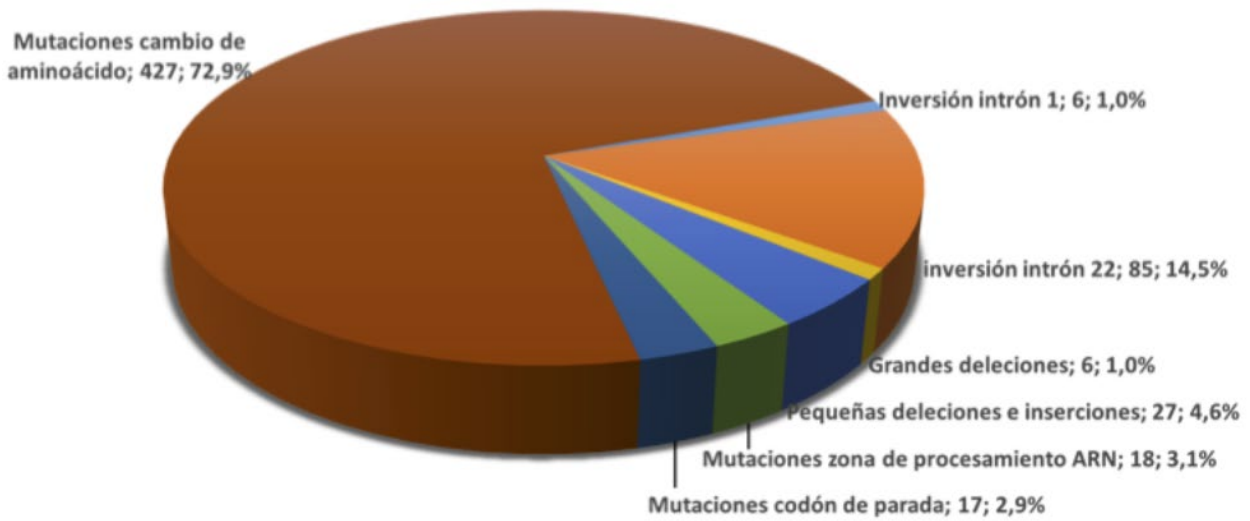


Figura 18. Distribución de las mutaciones en los pacientes con hemofilia A.

En nuestra serie de forma global en 189 casos las familias fueron consideradas esporádicas (59%) y 130 como casos familiares (41%) (fig. 19). Si consideramos solo las familias con hemofilia A grave, los casos esporádicos representaron un 67,6%, mientras que en el grupo de pacientes moderados fue un 50% y un 54,7% en las familias leves.

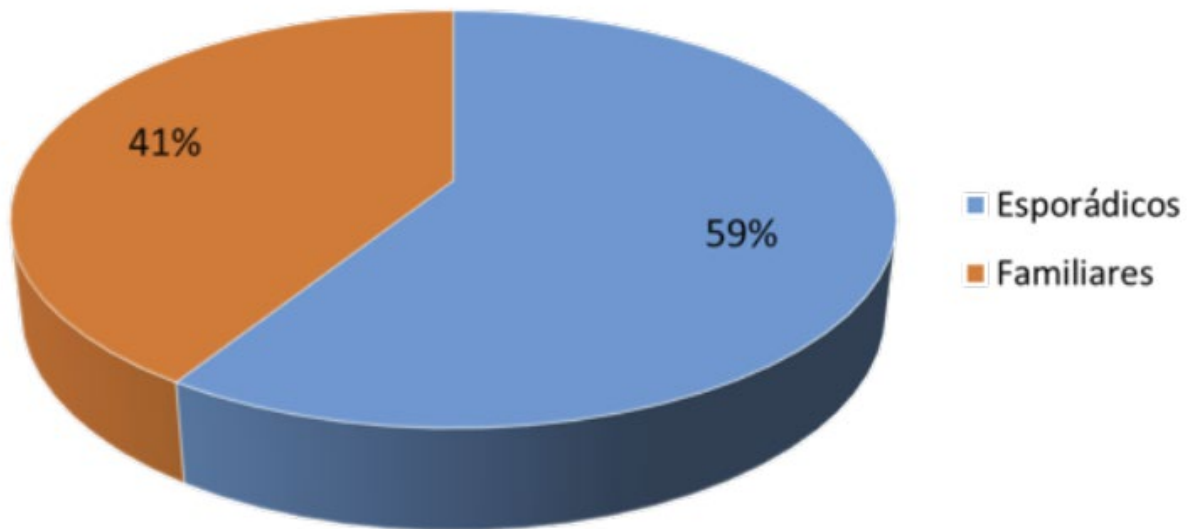


Figura 19. Distribución de casos esporádicos y familiares en hemofilia A.

En los casos de hemofilia A grave, para saber el origen de la mutación en las 139 familias identificadas genéticamente fue necesario excluir a 24 de ellas por no tener disponibilidad de la madre para el estudio genético. En 8 casos la madre no fue portadora, resultando 8 hemofílicos con mutación de novo: 4 mutaciones sin sentido, 2 pequeñas deleciones y 2 mutaciones en la zona de procesamiento de ARN, todos casos aislados. En 107 casos (93%) encontramos que la madre sí fue portadora de la mutación, de las cuales se pudo estudiar a la abuela del propósitus en 22 casos. De ellas, la abuela resultó portadora en 12 ocasiones (fig. 20).

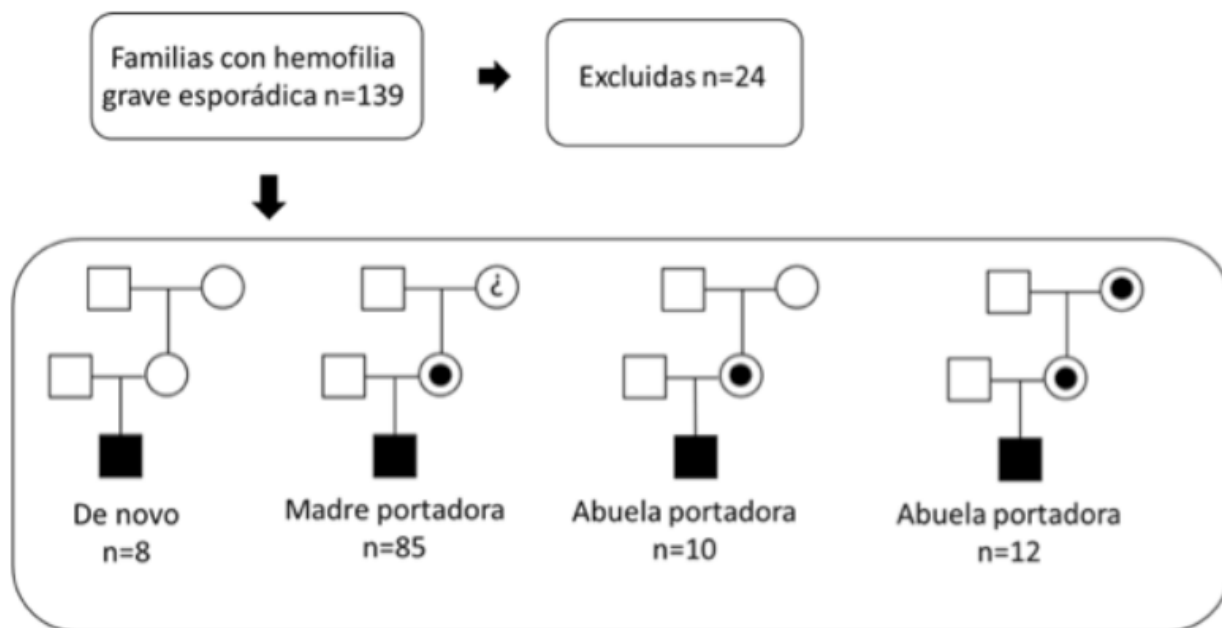


Figura 20. Casos de hemofilia A grave con mutación identificada. Casos de novo y con madre y abuelas portadoras.

En los pacientes con hemofilia A grave, la mutación se identificó en 139 familias (185 pacientes) de las 142 estudiadas (97,8%). Las dos mutaciones recurrentes más frecuentes fueron la Inv22 y la Inv1 en 66 familias, 44,6% y 2,87% respectivamente. La frecuencia del resto de mutaciones, agrupándolas por tipo de mutación, fue del 20,1% para las mutaciones de cambio de aminoácido, 12,2% para las mutaciones sin sentido, 12,9% para las pequeñas deleciones e inserciones y 4,3% tanto para las grandes deleciones como para las mutaciones de la zona de procesamiento de ARN. El número de portadoras en las familias con hemofilia A grave fue de 280.

De las 139 familias con hemofilia A grave caracterizadas, las 94 consideradas esporádicas presentaron el siguiente espectro mutacional: Inv22 (n:35), Inv1 (n:2), mutaciones sin sentido (n:14), mutaciones de cambio de aminoácidos "missense" (n:18), mutaciones en la zona de procesamiento de ARN (n:5), pequeñas deleciones o inversiones (n:14) y grandes deleciones (n: 6).

En los pacientes con hemofilia A moderada la mutación fue identificada en 32 familias, con 71 pacientes afectados, siendo las mutaciones de cambio de aminoácido "missense" las más representadas en este grupo con un 92,9% de los casos. También se identificaron una familia con mutación en la zona de procesamiento del ARN, otra con una pequeña delección y un paciente con una gran delección, que en el estudio ampliado se diagnosticó de síndrome de Klinefelter, con un total de 5 pacientes afectados. Las familias clasificadas como moderadas en las que no se encontró la mutación fueron 2 (2,73%). Las portadoras identificadas en este grupo fueron 101.

En el grupo de 159 familias con hemofilia A leve, la mutación fue identificada en 146 familias (91,8%) con 330 pacientes hemofílicos. Al igual que en el grupo de hemofilia moderada, el tipo de mutación más representada fue la de cambio de aminoácido "missense" en 140 familias (319 pacientes) y con menor frecuencia las mutaciones en la zona de procesamiento de ARN en 5 familias (11 pacientes). En 13 familias (8,2%) con 22 pacientes diagnosticados no se encontró la mutación responsable. El número de mujeres de estas familias identificadas como portadoras fue de 421.

En la figura 21 se recoge el espectro mutacional según la gravedad de la hemofilia, en el que destacan las mutaciones de cambio de aminoácidos, presente en pacientes tanto leves como graves y moderados.

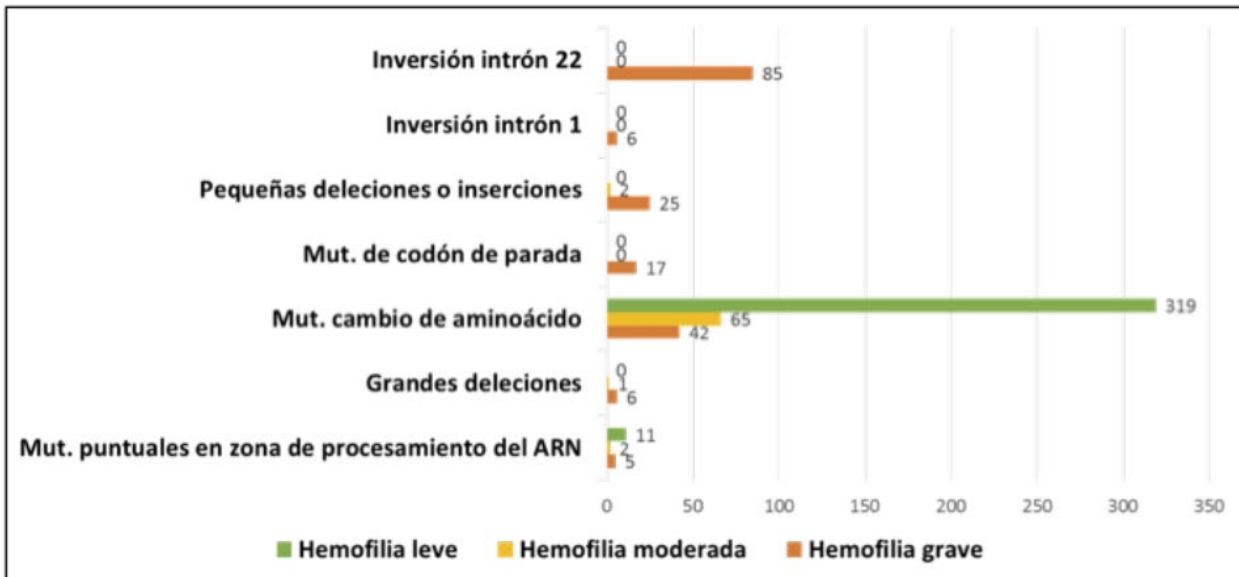


Figura 21. Espectro mutacional y nº de pacientes según la gravedad de la hemofilia.

La distribución global de las familias estudiadas según las provincias se refleja en la figura 22 y tabla 10.

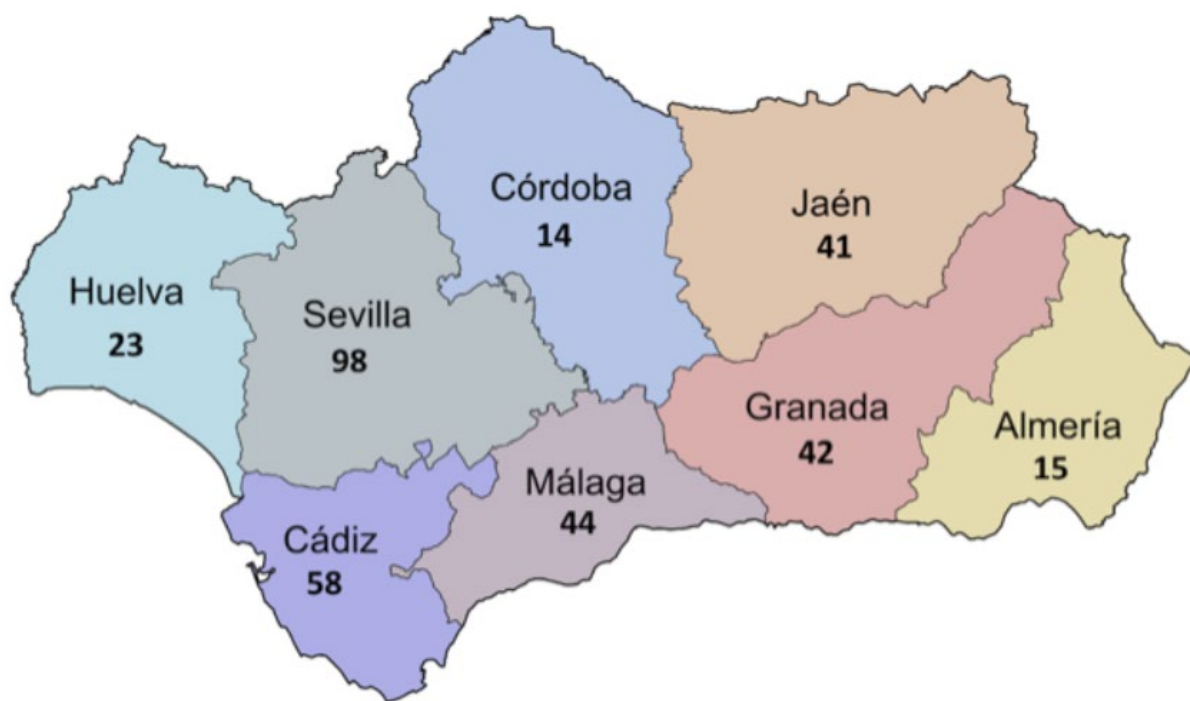


Figura 22. Distribución por provincias de familias estudiadas en Andalucía.

	Grave	Moderada	Leve	Total
Sevilla	43	9	46	98
Cádiz	26	7	25	58
Málaga	18	5	21	44
Granada	18	4	20	42
Jaen	16	3	22	41
Huelva	10	2	11	23
Almería	6	2	7	15
Córdoba	5	2	7	14

Tabla 10. Distribución por provincias de familias estudiadas en Andalucía según la gravedad de la hemofilia en Andalucía.

4.2. Mutaciones en pacientes con hemofilia A grave

4.2.1. Inversión intrón 22

Se identificaron 62 familias no relacionadas con Inv22, lo que representa el 43,6% del global de familias consideradas como graves en el Registro y el 18,5% respecto al total. En 35 familias (56,4%) se trataron de casos esporádicos y en 27 (43,6%) hubo antecedentes conocidos. El número de hemofílicos con esta mutación fue de 85 que representa un 45% respecto a los pacientes con hemofilia A grave y 13,8% del total de pacientes (fig. 23). El estudio de portadoras en las familias implicadas resultó en la identificación de 138 portadoras de la mutación Inv22 (tabla 11).

En familias con antecedentes de hemofilia A grave en las que no existía ningún hemofílico vivo se identificó la Inv22 en 8 familias entre las que se diagnosticaron 24 portadoras. En todos los casos el hemofílico había fallecido y el diagnóstico se realizó mediante el estudio directo de una portadora obligada.

De los pacientes considerados espontáneos, en 8 casos se pudo estudiar la abuela del propóitus. De ellas, 5 casos fueron no portadoras por lo que el cromosoma X afecto procedía posiblemente del abuelo no hemofílico. En ningún caso, la mutación se produjo de novo en el propóitus, siendo por tanto en todos los casos la madre portadora de la Inv22. En un caso, la madre presentó un mosaicismo germinal al constatarse la presencia de la mutación en más de un óvulo y no detectarse la mutación en ADN de linfocitos de sangre periférica. En los tres casos en los que la abuela fue identificada como portadora se extendió el estudio al resto de la familia.

Entre los pacientes con esta mutación, 8 (9,4%) desarrollaron un inhibidor frente al FVIII, uno de baja respuesta y siete de alta respuesta, de los cuales 5 recibieron tratamiento de inmunotolerancia (ITI) con éxito, uno está pendiente de iniciarlo y dos pacientes presentaron inhibidor de larga evolución con fracaso al ITI.

4.2.2. Inversión intrón 1

Con respecto a la Inv1, se identificaron 4 familias con esta mutación, 2 espontáneas y 2 familiares, con un total de 6 pacientes (tabla 11), que representan el 3,2% del grupo de pacientes graves (fig. 23). Se identificaron 14 portadoras en las familias implicadas. Ningún paciente desarrolló inhibidor.

	Antecedentes (E/F)	Nº familias	Nº hemofílicos	Nº portadoras	Inhibidor (%)
Inversión intrón 22	35/27	62	85	124	8 (9,4%)
Inversión intrón 1	2/2	4	6	14	0

Tabla 11: Familias y pacientes con inversión intrón 1 e inversión intrón 22. E: esporádico. F: familiar

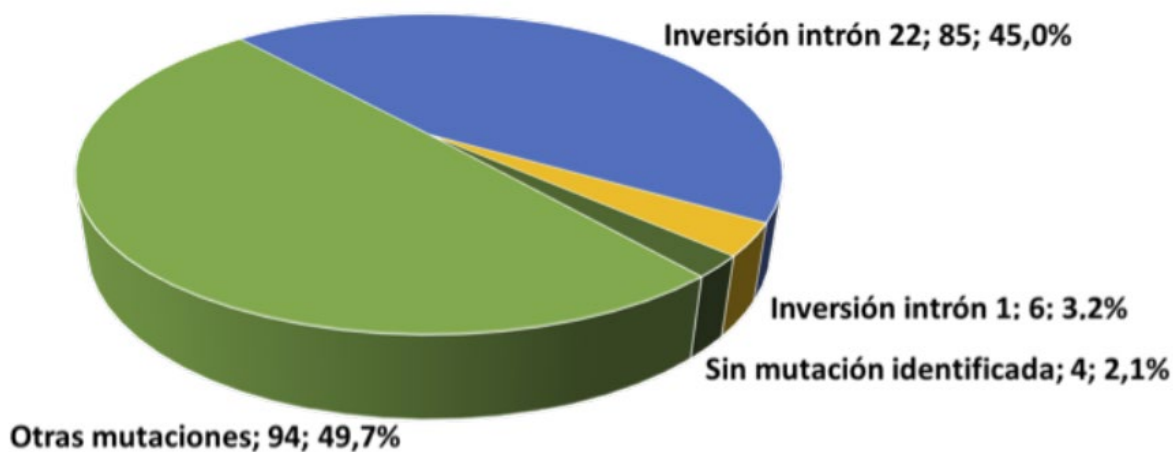


Figura 23. Número y porcentaje de Inv22 e Inv1 en pacientes con hemofilia A grave.

4.2.3. Mutaciones sin sentido

Se identificaron 17 familias no relacionadas con mutaciones puntuales que ocasionan un efecto "sin sentido", dando lugar a un codón de parada y a una proteína de FVIII truncada. Este grupo supone un 11,9% de las familias con hemofilia grave y un 2,9% del total. Cada familia presentó un único paciente hemofílico vivo. El número de casos esporádicos fue de 14 (82,3%), mientras que en 3 (17,7%) casos se recogieron antecedentes familiares. En los casos esporádicos se estudió a la madre en 11 casos y encontramos que 4 de ellas no eran portadoras de la mutación, por lo que se asume que la mutación de novo se produjo en el hemofílico. Las portadoras identificadas fueron 23 casos.

Todas las mutaciones sin sentido fueron únicas salvo la p.Arg814* y p.Arg2166* que se repetían en tres y dos familias respectivamente.

Las 14 mutaciones identificadas se localizaron en los 6 dominios, en los exones 6, 8, 9, 12, 14, 15, 16, 18, 21, 23, 25 y 26. El cambio de nucleótido más repetido, en 10 casos, es el de citidina por timidina. Ocho de estas mutaciones (p.Arg814*, p.Arg2166*, p.Arg2326*, p.Arg1960*, p.Arg1985*, p.Arg446*, p.Arg355*, p.Arg602*) están localizadas en sitios CpG.

Cinco de los pacientes con mutaciones sin sentido (29%) desarrollaron inhibidor: dos transitorios, uno de baja de respuesta y dos de alta respuesta, que fueron sometidos a tratamiento de inmunotolerancia con éxito. Los tres pacientes que presentaron la mutación p.Arg2166* desarrollaron un inhibidor.

En la figura 24 se muestra la localización de las mutaciones sin sentido identificadas en los dominios de la proteína del FVIII.

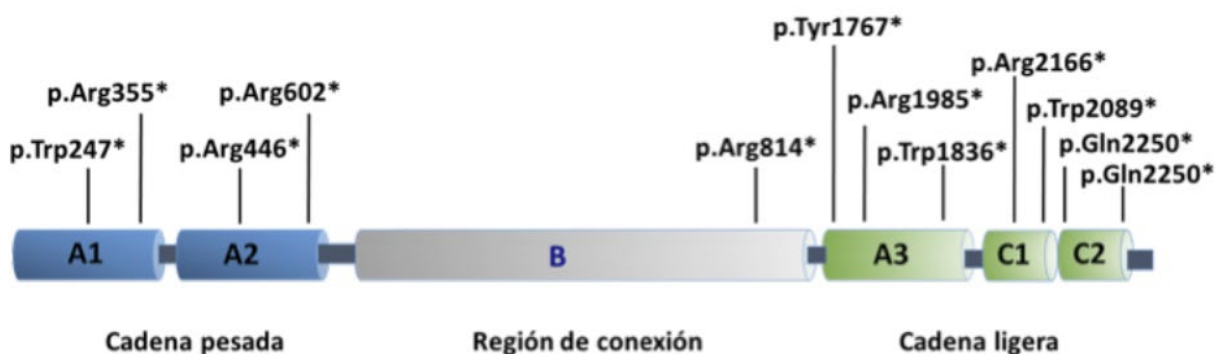


Figura 24. Localización en los dominios de la proteína de FVIII de las mutaciones sin sentido en hemofilia A grave.

Todas las mutaciones han sido descritas previamente en la base de datos internacional. En la tabla 11 se reflejan las características de las mutaciones sin sentido identificadas en esta serie.

Mutaciones puntuales sin sentido								
Identificación familiar	Mutación	Nº Exón	Dominio	Cambio nucleótido	Cambio codón	Nº de hemofílicos	Inhibidor	Nº en base de datos*
A-7	p.Gln2250*	25	C2	c.6748C>T	CAA>TAA	1	No	2
A-19/A-187	p.Arg814*	14	B	c.2440C>T	CGA>TGA	2	No	32
A-70	p.Tyr1767*	15	A3	c.5301C>G	TAC>TAG	1	Si	3
A-82/								
A-120/A-349	p.Arg2166*	23	C1	c.6496C>T	CGA>TGA	3	Si (3)	34
A-88	p.Arg2326*	26	C2	c.6976C>T	CGA>TGA	1	No	22
A-97	p.Arg1960*	18	A3	c.5878C>T	CGA>TGA	1	No	20
A-105	p.Trp247*	6	A1	c.741G>A	TGG>TGA	1	No	2
A-122	p.Trp2089*	21	C1	c.6266G>A	TGG>TAG	1	Si (1)	3
A-129	p.Trp1836*	16	A3	c.5507G>A	TGG>TAG	1	No	1
A-156	p.Arg1985*	18	A3	c.5953C>T	CGA>TGA	1	No	31
A-276	p.Arg446*	9	A2	c.1336C>T	CGA>TGA	1	No	22
A-286	p.Gln1097*	14	B	c.3289C>T	CAA>TAA	1	No	1
A-309	p.Arg355*	8	A1	c.1063C>T	CGA>TGA	1	No	27
A-365	p.Arg602*	12	A2	c.1804C>T	CGA>TGA	1	No	20

Tabla 11. Mutaciones sin sentido en las familias con hemofilia A grave.

*Número de pacientes recogido en Factor VIII Variant Database (<http://www.factorviii-db.org/>).

4.2.4. Mutaciones de cambio de aminoácido “missense”

Se identificaron 22 mutaciones diferentes de cambio de aminoácido en 28 familias con 42 pacientes afectados, que representa un 18,7% de las familias con hemofilia A grave. En 10 casos (35,7%) hubo antecedentes familiares frente a 18 (64,3%) en los que la hemofilia fue de novo. Las portadoras identificadas en estas familias fueron 49. Una familia (A-272) no presentó propositus vivo en el momento del estudio. Todos los dominios resultaron afectados en este subgrupo, y excepcionalmente el dominio B (fig. 25).

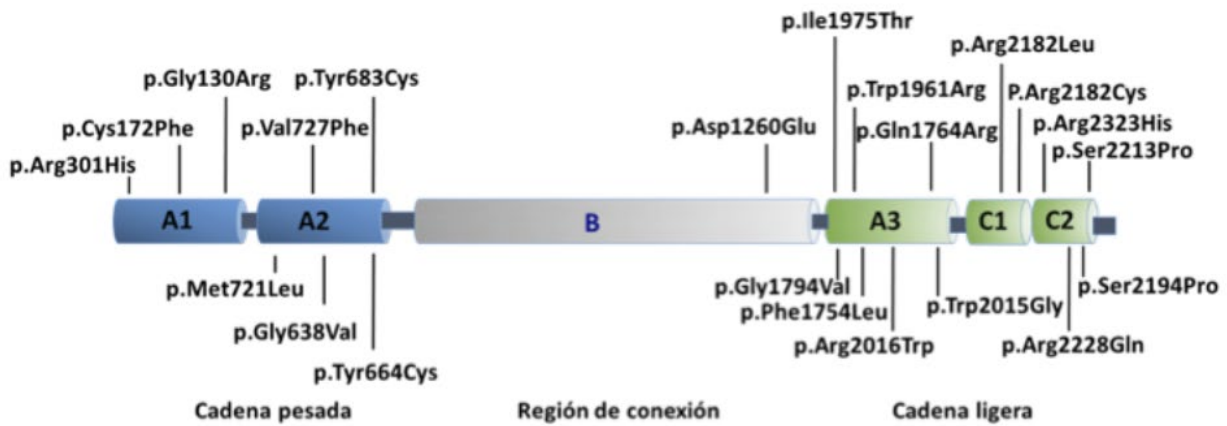


Figura 25. Localización en los dominios de la proteína de FVIII de las mutaciones “missense” en hemofilia A grave.

La mutación p.Arg2016Trp que afecta al dominio A3 se identificó en 5 familias no relacionadas con 10 pacientes afectados. Las mutaciones p.Cys172Phe y p.Tyr683Cys en los dominios A1 y A2, respectivamente, se identificaron en dos familias cada una, siendo el resto de mutaciones únicas.

Seis de estas mutaciones no habían sido previamente descritas en la base de datos internacional: p.Gly1794Val, p.Arg2182Leu, p.Ser2213Pro, p.Met721Leu, p.Trp2015Gly y p.Ser2194Pro, en 11 de los pacientes, 5 casos esporádicos y 6 con historia familiar de hemofilia (tabla 12).

Solo 6 de las 22 mutaciones se localizaron en sitios CpG: p.Arg2323His, p.Arg2182Leu, p.Arg2016Trp, p.Arg2228Gln, p.Arg2182Cys y p.Arg301His. Tan solo 2 pacientes pertenecientes a dos familias con una de las mutaciones recurrentes, p.Arg2016Trp, presentaron inhibidor, los dos de alta respuesta sometidos a inmunotolerancia, con éxito en uno de ellos.

En la tabla 12 se recogen las mutaciones de cambio de aminoácidos incluidas en este grupo de familias con hemofilia A grave.

Mutaciones puntuales de cambio de aminoácido "missense"								
Identificación familiar	Mutación	Nº Exón	Dominio	Cambio nucleótido	Cambio codón	Nº de hemofílicos	inhibidor	Nº en base de datos*
A-3/A-77	p.Cys172Phe	4	A1	c.515G>T	TGC>TTC	2	No	3
A-12	p.Asp1260Glu	14	B	c.3780C>G	GAC>GAG	1	No	16
A-25	p.Ile1975Thr	18	A3	c.5924T>C	ATT>ACT	3	No	2
A-31	p.Trp1961Arg	18	A3	c.5891A>G	TGG>CGG	1	No	2
A-84	p.Gln1764Arg	15	A3	c.5291A>G	CAG>CGG	3	No	1
A-89	p.Gly130Arg	3	A1	c.388G>C	GGA>CGA	1	No	2
A-92	p.Gly1794Val	15	A3	c.5381G>T	GGA>GTA	2	No	0
A-114	p.Phe1754Leu	15	A3	c.5260T>C	TTC>CTC	1	No	2
A-126	p.Arg2323His	26	C2	c.6968G>A	CGC>CAC	1	No	3
A-147	p.Arg2182Leu	23	C1	c.6545G>T	CGC>CTC	1	No	0
A-221/A-234/ A-244/A-275/ A-361	p.Arg2016Trp	19	A3	c.6046C>T	CGG>TGG	10	Si (2)	61
A-251	p.Ser2213Pro	24	C2	c.6637T>C	TCC>CCC	1	No	0
A-254	p.Arg2228Gln	24	C2	c.6683G>A	CGA > CAA	1	No	37
A-257	p.Val727Phe	14	A2	c.2179G>T	GTT>TTT	4	No	2
A-272	P.Arg2182Cys	23	C1	c.6544C>T	CGC>TGC	1	No	16
A-280/A-281	p.Tyr683Cys	13	A2	c.2048A>G	TAT>TGT	2	No	5
A-285	p.Gly638Val	13	A2	c.1913G>T	GGC>GTC	2	No	1
A-308	p.Met721Leu	14	A2	c.2163G>A	ATG>ATA	1	No	0
A-332	p.Trp2015Gly	19	A3	C6043T>C	TGG>CGG	1	No	0
A-374	p.Arg301His	7	A1	c.902G>A	CGC>CAC	1	No	28
A-382	p.Ser2194Pro	24	C2	c.6637T>C	TCC>CCC	1	No	0
A-394	p.Tyr664Cys	13	A2	c.2048A>G	TAT>TGT	1	No	5

Tabla 12. Mutaciones de cambio de aminoácido "missense" en las familias con hemofilia A grave. *Número de pacientes recogido en Factor VIII Variant Database (<http://www.factorviii-db.org/>).

4.2.5. Pequeñas deleciones e inserciones

Se identificaron 18 familias no relacionadas con pequeñas deleciones e inserciones, que ocasionan una alteración en el marco de lectura (frameshift), que suponen un 12,7% de familias con hemofilia grave y un 5,4% del total. Las mutaciones consistieron en 9 pequeñas deleciones y 3 pequeñas inserciones. El número de hemofílicos con este tipo de mutación fue de 25 mientras que las portadoras identificadas en estas familias fueron 43. El número de familias con casos esporádicos fue de 14, mientras que en las otras 4 existían antecedentes familiares. En los hemofílicos esporádicos se estudió a la madre en 12 de las 14 casos, y encontramos que 2 de ellas no eran portadoras de la mutación por lo que se asumió que la mutación de novo se produjo en el hemofílico.

En una familia (A-108), la mutación identificada, p.Asp186_Leu187delinsVal responsable de la sustitución de un residuo de ácido aspártico y un residuo de leucina (186, 187) por un residuo de valina, no produjo una alteración del marco de lectura ("inframe"). En el resto de las familias la deleción o inserción supuso una alteración en el marco de lectura, que condiciona la creación de codón de terminación prematura.

Cuatro pacientes (16%) desarrollaron inhibidor frente al FVIII, uno transitorio, uno de baja de respuesta y dos de alta respuesta con éxito al tratamiento de inmunotolerancia.

Tres familias presentaron mutaciones no descritas previamente en la base de datos internacional: la deleción p.Pro545fs* (familia A-173) localizada en el dominio A2 y la deleción p.Arg-1985Gln*45 (familia A-206) en el dominio A3 y la p.Lys1712fs*18 (familia A-396) también en el dominio A3.

Las pequeñas deleciones e inserciones representan un número escaso dentro del grupo de las hemofilias graves. Sin embargo, existen algunas mutaciones recurrentes como es el caso de las mutaciones p.Ile1213Phefs*5 y p.Thr1609Asnfs*3 que estuvieron presentes en cinco y tres familias de nuestra casuística respectivamente, y que están ampliamente descritas en la base de datos internacional.

La descripción de las mutaciones y la localización de las mismas en los distintos dominios de la proteína del FVIII se muestran en la tabla 13 y en la figura 26.

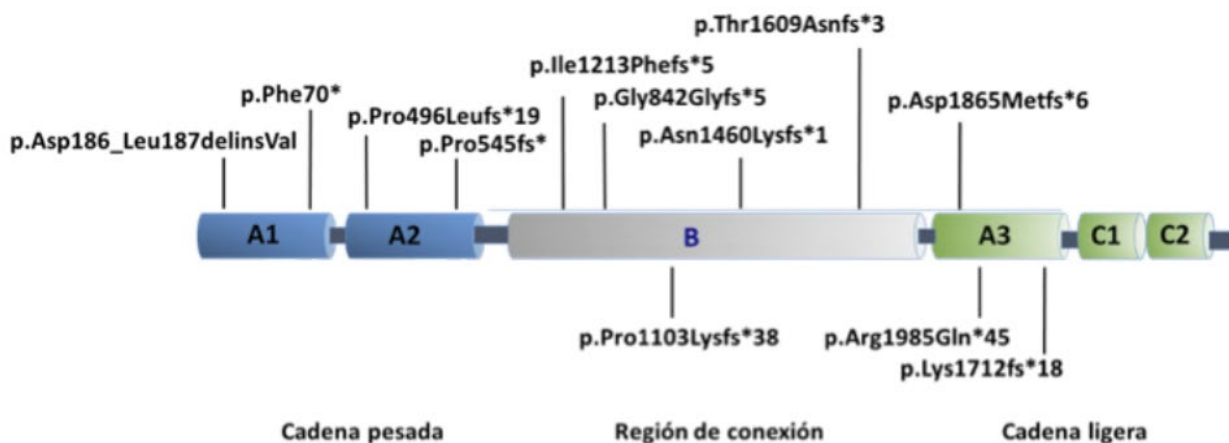


Figura 26. Localización en los dominios de la proteína de FVIII de las mutaciones pequeñas deleciones e inserciones en hemofilia A grave.

Pequeñas deleciones e inserciones									
Identificación familiar	Mutación	Tipo mutación	Nº Exón	Dominio	Cambio nucleótido	Nº bases	Nº de hemofílicos	Inhibidor	Nº en base de datos*
A-28/ A-76/ A-150/ A-159/ A-274	p.Ile1213Phefs*5	Del	14	B	c.3637delA	1	7	No	115
A-36	p.Gly842Glyfs*5	Del	14	B	c.2526_2527delAG	2	1	No	1
A-58	p.Pro1103Lysfs*38	Dup	14	B	c.3305dupAAAGAGGG	8	1	Si	1
A-79	p.Pro496Leufs*19	Del	10	A2	c.1485delC	1	1	No	3
A-106	p.Asp1865Metfs*6	Del	17	A3	c.5590delA	1	1	No	1
A-108	p.Asp186_Leu187delinsVal	Del	4	A1	c.557_559delACT	3	3	No	1
A-149	p.Asn1460Lysfs*1	Dup	14	B	C.4379dupA	1	1	Si	66
A-163	p.Phe70*	Del	2	A1	c.209_212delTTTG	4	1	No	17
A-173	p.Pro545fs*	Del	11	A2	c.1634delC	1	3	No	0
A-181/ A-362/ A-368	p.Thr1609Asnfs*3	Dup	14	B	c.4825dupA	1	4	Si (1)	21
A-206	p.Arg1985Gln*45	Del	18	A3	c.5954delG	1	1	Si	0
A-396	p.Lys1712fs*18	Del	14	A3	c.5136delG	1	1	No	0

Tabla 13. Pequeñas deleciones e inserciones en las familias con hemofilia A grave.

* Número de pacientes recogido en Factor VIII Variant Database (<http://www.factorviii-db.org/>).

4.2.6. Mutaciones en zona de procesamiento de ARN (splicing)

Se identificaron 6 familias no relacionadas con este tipo de mutación, que suponen un 4,2% de familias con hemofilia grave y un 1,8% del total. El número de casos esporádicos fue de 5, mientras que solo un caso presentó antecedentes familiares. El número de hemofílicos fue de 5, con una familia (A-217) sin propósitos vivo. Las portadoras identificadas en este grupo fueron 6.

La familia A-66 presentó una mutación que consistió en un cambio G→A en el nucleótido 1 del sitio dador del intrón 4. En las familias A-208 y A-217 se identificó una mutación en el nucleótido -2 del intrón 1 que consiste en un cambio de A→G. La familia A-242 presentó una mutación en el intrón 6 que origina un cambio en el nucleótido 1 que consiste en un cambio de G→A. La familia A-294 se identifica un cambio en el nucleótido 6 del intrón 19 que condiciona un cambio de T→A.

La mutación IVS20-1G>A no había sido descrita previamente en la base de datos internacional y consistía en un cambio de guanosina por adenosina en el nucleótido en posición -1 del sitio dador del intrón 20.

Ningún paciente de este grupo presentó inhibidor.

Las características de las mutaciones de este grupo se presentan en la tabla 14.

Mutaciones en zona de procesamiento de ARN (splicing)							
Identificación familiar	Mutación	Tipo mutación	Nº intrón	Nº bases	Nº de hemofílicos	Inhibidor	Nº en base de datos*
A-98	c.602-1G>A	Puntual	4	1	1	No	2
A-208/A-217	c.144-2A>G	Puntual	1	1	1	No	2
A-242	c.787+1G>A	Puntual	6	1	0	No	2
A-294	c.6115+6T>A	Puntual	19	1	1	No	1
A-366	c.6188-1G>A	Puntual	20	1	1	No	0

Tabla 14. Mutaciones en la zona de procesamiento de ARN en hemofilia A grave.

*Número de pacientes recogido en Factor VIII Variant Database (<http://www.factorviii-db.org/>).

4.2.7. Grandes deleciones

Se identificaron 6 familias no relacionadas con grandes deleciones, que representan un 4,2% de las familias con hemofilia grave y un 1.8 del total de familias incluidas. El número de pacientes hemofílicos fue de 6, uno por familia.

No se encontraron antecedentes familiares en ninguna de ellas.

En dos de los pacientes se analizaron los puntos de corte. En la familia A-169 el punto de rotura 5' se localizó dentro del exón 8 en el nucleótido 59,318, mientras que la rotura en 3' se encontró en el intrón 9, nucleótido 65.505, que ocasionó una deleción de 3.185 pares de bases que afecta a una porción del exón 8 y la totalidad del exón 9.

En la familia A-55, la deleción afectó al exón 15. Los puntos de corte se localizaron en el intrón 14, nucleótido 111.980, para el extremo 5' y en el intrón 15, nucleótido 119.463, en el extremo 3'.

En las 4 familias restantes no se determinaron los puntos de rotura. En la familia A-247 todos los exones amplificaron excepto el exón 11. En las otras tres familias, A-266, A273 y A340, la ausencia de amplificación afectó a varios exones, concretamente desde el exón 2 al 13, desde el 15 al 22 y desde el 16 al 22, respectivamente. En la tabla 15 se reflejan las características de la mutaciones descritas.

Se identificaron 7 portadoras en las dos familias en las que se caracterizó los puntos de rotura. En ambas familias, la madre y la abuela resultaron portadoras de hemofilia.

Cuatro pacientes, todos ellos con la deleción afectando a dos dominios de la proteína del FVIII, desarrollaron un inhibidor de alta respuesta. El paciente A-169 realizó ITI con éxito, mientras que en el paciente A-266 la ITI resultó inefectiva. Los pacientes A-273 y A-340 estaban en ITI en el momento de cerrar el estudio. Los dos pacientes, A-55 y A-247, con afectación de un solo dominio también desarrollaron un inhibidor, uno de ellos transitorio de baja respuesta, que se reactivó después de tratamiento sustitutivo intensivo con FVIII.

Las deleciones de los pacientes A-266 y A-340 estaban registradas en la base de datos internacional. Concretamente, en el caso A-340, 8 familias estaban registradas con la deleción de los exones 15 al 22, aunque con una extensión de pares de bases diferentes. En 5 de los 6 pacientes en los que se ofreció información sobre el inhibidor, también lo desarrollaron.

Las deleciones de las 4 familias restantes son mutaciones de novo y no se encontraron reflejadas en la base de datos internacional.

Grandes deleciones						
Identificación familiar	Mutación	Dominio	Nº de bases	Nº de hemofílicos	Inhibidor	Nº en base de datos*
A-55	Del exón 15	A3	7481	1	Si	0
A-169	Del exones 8-9	A1, A2	3185	1	Si	0
A-247	Del exón 11	A2	-	1	Si	0
A-266	Del exones 2-13	A1, A2	-	1	Si	1
A-273	Del exones 16-22	B, A3	-	1	Si	0
A-340	Del exones 15-22	B, A3	-	1	Si	8

Tabla 15. Grandes deleciones en las familias con hemofilia A grave.

*Número de pacientes recogido en Factor VIII Variant Database (<http://www.factorviii-db.org/>).

4.3. Mutaciones en pacientes con hemofilia A moderada

4.3.1. Mutaciones de cambio de aminoácido “missense”

En las familias con hemofilia A moderada la mutación más representada fue la que implicaba un cambio de aminoácido, que se identificó en 28 familias no relacionadas, que supone un 82,3% de las familias, con 66 pacientes afectados.

En 16 familias se encontraron antecedentes, mientras que en 12 familias la hemofilia fue de novo. El número de portadoras identificadas en este grupo fue de 101.

Diez de las 14 mutaciones estuvieron representadas en una sola familia cada una. Dos mutaciones fueron recurrentes; la mutación p.Arg2016Trp localizada en el dominio A3 que predice un cambio de aminoácido de arginina por triptófano) identificada en 7 familias (19 pacientes) y la mutación p.Arg2169His en el dominio C1 que predice el cambio de arginina por histidina también se encontró en 7 familias (21 pacientes). Ambas mutaciones se localizaron en zonas CpG.

Una familia presentó una mutación tipo polimorfismo con efecto no sinónimo p.Asp1260Glu, descrita en la base de datos internacional en 16 pacientes. No se encontró ningún otro cambio en la secuencia codificante. Esta variación se localizó en el dominio B del FVIII.

Dos mutaciones localizadas en el dominio A1 no estaban descritas en la base de datos internacional. En la familia A-339 se identificó la mutación p.Gly89Val localizada en el exón 3 por un cambio de GàT en el nucleótido 89 que predice un cambio de aminoácido de Glicina por Valina.

En la familia A-367, se identificó la mutación p.His286Tyr localizada en el exón 7 con un cambio en el nucleótido 286 de G→T que origina un cambio de Histidina por Tirosina.

Tres mutaciones se asociaron al desarrollo de inhibidor. Dos pacientes (A-193 y A-204) con la mutación recurrente p.Arg2169His; el primero de ellos con un inhibidor de alta respuesta que recibió ITI con buena respuesta inicial y respuesta anamnésica tras la administración de concentrados de FVIII. El segundo paciente presentó un inhibidor de baja respuesta y desaparición espontánea y reactivación después de tratamiento sustitutivo con motivo de sendas intervenciones quirúrgicas.

Otro pacientes (A-48) con la mutación p.Glu132Asp desarrolló un inhibidor de alta respuesta con fracaso a ITI e inhibidor permanente actualmente en tratamiento a demanda con agentes bai pás.

Un cuarto paciente (A-83) con la mutación p.Trp2248Cys presentó un inhibidor transitorio de bajo título, actualmente en tratamiento con concentrados de FVIII a demanda.

En la tabla 16 se recogen las características de las mutaciones de cambio de aminoácido en familias con hemofilia A moderada y en la figura 27 se muestra la localización de las mismas en los dominios de la proteína FVIII.

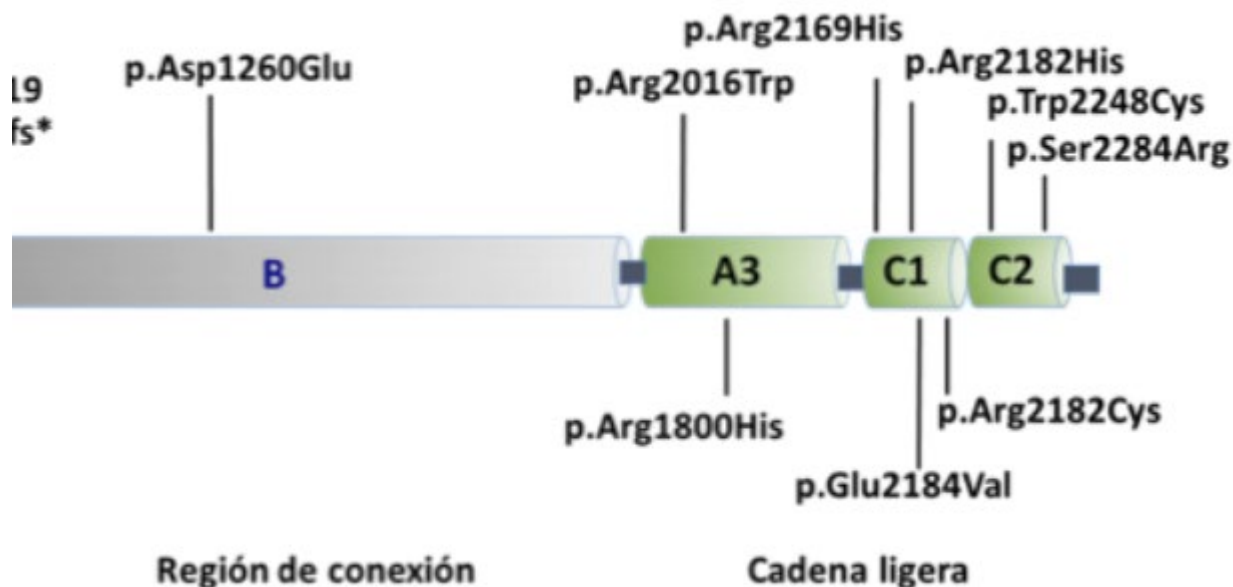


Figura 27. Localización en los dominios de la proteína de FVIII de las mutaciones de cambio de aminoácidos en hemofilia A moderada.

Hemofilia A moderada de cambio de aminoácido “missense”								
Identificación familiar	Mutación	Tipo mutación	Nº Exón	Dominio	Cambio nucleotídico	Nº bases hemofílicas	Inhibidor	Nº en base de datos*
A-2/A-68/ A-102/A-198/ A-225/A-324/ A-350	p.Arg2016Trp	Puntual	19	A3	c.6046C>T	1	No	61
A-22/A-117/ A-193/A-204/ A-205/A-293/ A-295	p.Arg2169His	Puntual	23	C1	c.6506G>A	1	Si (2)	103
A-26	p.Asp186Asn	Puntual	4	A1	c.556G>A	1	No	1
A-42/A228	p.Arg2182His	Puntual	23	C1	c.6545G>A	1	No	36
A-48	p.Glu132Asp	Polimorfismo	4	A1	c.396A>C	1	Si	1
A-63/A292	p.Arg1800His	Puntual	16	A3	c.5399G>A	1	No	32
A-83	p.Trp2248Cys	Puntual	25	C2	c.6744G>T	1	Si	42
A-104	p.Glu2184Val	Puntual	23	C1	c.6551A>T	1	No	1
A-128	p.Asp1260Glu	Puntual	14	B	c.3780C>G	1	No	16
A-246	p.Ser2284Arg	Puntual	25	C2	c.6850A>C	1	No	1
A-265	p.Arg31His	Puntual	7	A1	c.902G>A	1	No	28
A-272	p.Arg2182Cys	Puntual	23	C1	c.6544C>T	1	No	16
A-339	p.Gly89Val	Puntual	3	A1	c.266G>T	1	No	0
A-367	p.His286Tyr	Puntual	7	A1	c.857C>T	1	No	0

Tabla 16. Mutaciones de cambio de aminoácidos “missense” en las familias con hemofilia A moderada.
*Número de pacientes recogido en Factor VIII Variant Database (<http://www.factorviii-db.org/>).

4.3.2. Mutaciones en zona de procesamiento de ARN (splicing)

Una mutación puntual responsable de un cambio de aminoácido en la zona de procesamiento de ARN se identificó en una familia (A-11) con 2 pacientes hemofílicos moderados y una portadora. Esta mutación determina un cambio en el tercer nucleótido de A→G en el sitio aceptor del intrón 7 (tabla 17).

Mutaciones en zona de procesamiento de ARN (splicing)							
Identificación familiar	Mutación	Tipo mutación	Nº Intrón	Nº de bases	Nº de hemofílicos	Inhibidor	Nº en base de datos*
A-11	c.1009+3A>G	Puntual	7	1	2	No	0

Tabla 17. Mutaciones en zona de procesamiento de ARN en una familia con hemofilia A moderada.
*Número de pacientes recogido en Factor VIII Variant Database (<http://www.factorviii-db.org/>).

4.3.3. Pequeñas deleciones

Se encontró una pequeña deleción en un paciente sin antecedentes familiares, con hemofilia A moderada (A-230), en el exón 8 que consiste en una deleción de 15 nucleótidos entre los codones 398 y 403, que predice un cambio de aminoácido en el codón 398 de leucina por tirosina y la pérdida de 5 aminoácidos (399-403) (tabla 18). El efecto de esta mutación es "inframe", que ocasiona una proteína de FVIII no truncada, puesto que afecta únicamente a 5 aminoácidos lo que explica el fenotipo moderado de este paciente.

Pequeñas deleciones									
Identificación familiar	Mutación	Tipo mutación	Nº exón	Dominio	Cambio nucleótido	Nº bases	Nº de hemofílicos	Inhibidor	Nº en base de datos*
A-230	p.Leu417Tyr	Del	8	A1	c.1250_1265	15	1	No	0

Tabla 18. Pequeña deleción ("inframe") en una familia con hemofilia A moderada.
*Número de pacientes recogido en Factor VIII Variant Database (<http://www.factorviii-db.org/>).

4.3.4. Grandes deleciones

Un paciente (A-69) sin antecedentes familiares con fenotipo varón presentó una hemofilia moderada diagnosticada al año de vida (tabla 19). El estudio cromosómico realizado a los 12 años con motivo de retraso puberal reveló un cariotipo 46,XXY compatible con síndrome de Klinefelter. Los tres hermanos del paciente no estuvieron afectados (fig. 28). El análisis de marcadores mostró dos cromosomas X idénticos, que sugiere una no separación en la segunda división meiótica. El estudio de mutaciones fue compatible con una deleción de los exones 1 al 12 en uno de los alelos del gen del F8, sin encontrar alteraciones en el otro alelo. La madre presentó dos genes de F8 completos. El análisis de repeticiones altamente polimórficos (CAG) en el primer exón del gen del receptor de andrógeno mediante PCR y que permitió distinguir entre alelos maternos y paternos e identificar el estatus de inactivación. En este paciente el número de repeticiones fue idéntico en cada alelo, por lo que se confirmó que había heredado dos cromosomas X maternos idénticos. Ya que no se detectó ninguna otra mutación en el otro gen del F8 de la madre y del paciente, se puede asumir que el patrón de inactivación del cromosoma X del alelo normal del F8 con predominancia del alelo explicaría su fenotipo hemorrágico moderado-grave. La gran deleción de los 12 primeros exones se detectó solo en uno de los alelos del gen del F8 del paciente, indicando que la deleción se debe considerar un evento postcigótico (Venceslá et al., 2012).

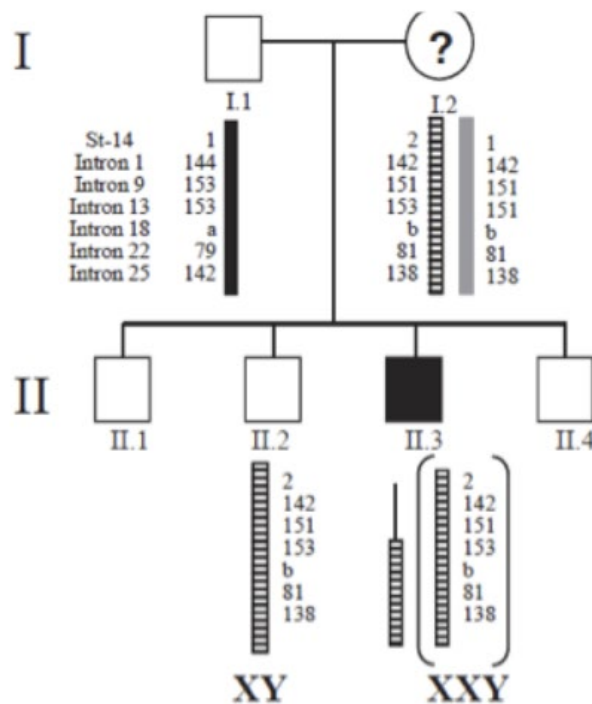


Figura 28. Árbol genealógico de la familia A-69. Paciente con síndrome de Klinefelter y hemofilia A moderada (46, XXY). El análisis de marcadores indica que ha heredado los mismos dos cromosomas de su madre. Se encontró una deleción de los exones 1-12 en uno de los cromosomas X. Uno de los hermanos heredó el mismo cromosoma X sin estar afectado (Venceslá et al., 2012).

Grandes deleciones						
Identificación familiar	Mutación	Dominio	Nº de bases	Nº de hemofílicos	Inhibidor	Nº en base de datos*
A-69	Del exones 1-12	A1, A2	-	1	No	1

Tabla 19. Mutación gran deleción en una familia con hemofilia A moderada.
*Número de pacientes recogido en Factor VIII Variant Database (<http://www.factorviii-db.org/>).

4.4. Mutaciones en pacientes con hemofilia A leve

En el grupo de pacientes con hemofilia A leve se identificaron un total de 47 mutaciones diferentes agrupadas en 45 mutaciones puntuales de cambio de aminoácido (95,7%) y 2 mutaciones de la zona de procesamiento de ARN (4,2%) distribuidas en 146 familias. El número de hemofílicos con la mutación identificada fue de 330 (93,8%) del total de 352 pacientes afectados (fig.29).

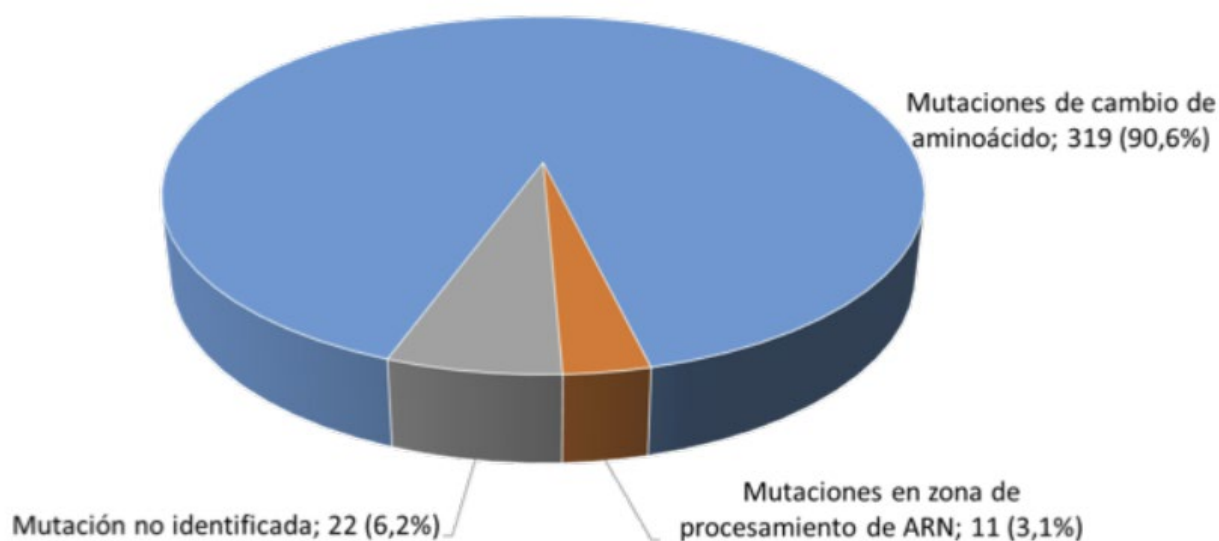


Figura 29. Distribución de mutaciones en pacientes con hemofilia A leve.

4.4.1. Mutaciones puntuales de cambio de aminoácido “missense”

Entre las 45 mutaciones puntuales encontradas, 22 se identificaron en más de una familia, resultando las más frecuentemente representadas p.Arg612Cys en 23 familias (55 pacientes), p.Arg1985Gln en 14 familias (35 pacientes), p.Arg2169His en 13 familias (39 pacientes) y p.Arg1708His en 6 familias (6 pacientes). Estas mutaciones recurrentes se relacionaron con sitios CpG. Otras mutaciones como p.Gly1769Arg, p.Ile192Thr y p.Gln2208EGlu se identificaron en 5 familias (8, 8 y 10 pacientes, respectivamente). Por el contrario, 26 mutaciones solo estuvieron presentes en una única familia.

Se encontraron antecedentes familiares en 65 (46,4%) familias y fueron consideradas como esporádicas 75 (53,6%). Las mutaciones siguientes fueron encontradas tanto con carácter familiar como esporádico: p.Gly1769Arg, p.Ser1807Thr, p.Ile192Thr, p.Met1842Ile, p.Gln2208Arg, p.Arg1708His, p.Arg1985Gln, p.Arg2169His, p.Arg550His, p.Arg612Cys, p.Ser308Leu, p.Ser308Leu, p.Val285Ala.

Algunas de las mutaciones identificadas en este grupo de pacientes con hemofilia A leve también se describieron en familias catalogadas como moderadas, como es el caso de las mutaciones p.Arg2169His, p.His293Leu, p.Leu2343Pro, p.Lys395Asn, p.Leu261Pro, p.Met2274Lys, p.Met681Ile, p.Asn1762Lys y p.Tyr738Cys.

Las mutaciones no descritas de este grupo en la base de datos internacional fueron 6. La mutación p.Met1992Tre, identificada en un paciente (A-327) se localizó en el codón 1992 del exón 18 y consiste en un cambio de nucleótido T→G que predice el cambio de aminoácido de metionina por treonina. La mutación p.Met1992Ile se identificó en un paciente (A-355) en el codón 1992 del exón 18 e implica el cambio de nucleótido de G→A que predice el cambio de metionina por isoleucina. La mutación p.Ser587Leu, descrita en un paciente (A-348), se localizó en el dominio A2 con un cambio de nucleótido en la posición en el codón 597 de C→T que predice un cambio de aminoácido de serina por leucina. La mutación p.Ser2059Pro se identificó en un paciente (A-377) y se localizó en el exón 20 determinando un cambio de nucleótido T→C que supone un cambio de serina por prolina. La mutación p.Arg2071Tre descrita también en un solo paciente (A-372) se localizó en el codón 2071 del exón 21 con un cambio de nucleótido G→C que predice un cambio de arginina por treonina en la proteína de FVIII. Finalmente, la mutación p.Ser2284Asn descrita en un paciente (A-403) localizada en el dominio C2 determina el cambio de nucleótido en posición 2284 del exón 25 y predice el cambio de serina por asparagina.

En este grupo de mutaciones, 6 no se encontraron descritas en la base de datos internacional (tabla 20). La p.Met1992Ile, en la familia A-355, de carácter espontáneo, se localizó en el exón 18, dominio A3 y consiste en cambio de G→A y predice un cambio de aminoácido de treonina

por isoleucina en la proteína del FVIII. La mutación p.Met1992Tre se encontró en un familia y se localizó en el codón 1992, exón 18, dominio A3 que consiste en un cambio de T→C y predice un cambio de aminoácido de metionina por treonina. La mutación p.Ser587Leu se identificó en una familia de carácter espontáneo se localizó en el codón 587, exón 12, dominio A2, que consiste en cambio de C→T y predice cambio de aminoácido de leucina por serina. La mutación p.Ser2059Pro en un paciente esporádico, codón 2059, exón 20, dominio C1, que supone un cambio de T→C y predice cambio de serina por prolina. La p.Arg2071Tre, también en un paciente de carácter espontáneo, codón 2071, exón 21, dominio C1, que consiste en el cambio de C→T y predice cambio de aminoácido de arginina por treonina. Finalmente, la mutación p.Ser2284Asn se identificó en un paciente, espontáneo, en el codón 2284, exón 25, dominio C2, supone un cambio de G→A que predice el cambio de serina por asparagina. Ninguna de estas mutaciones de novo se localizaron en sitios CpG a pesar de estar implicado el aminoácido arginina en 2 de ellas.

En la tabla 20 se caracterizan las mutaciones de cambio de aminoácido en hemofilia A leve distribuidas a lo largo de todo el gen.

El desarrollo de inhibidor, menos frecuente en pacientes con hemofilia A leve, se produjo en 9 pacientes, en relación con algunas de las mutaciones descritas como de riesgo. Un único paciente de los 64 identificados con la mutación p.Arg612Cys, 7 de los 39 pacientes con la mutación p.Arg2169His y un paciente con la mutación p.Trp2248Cys presentaron esta complicación del tratamiento. Ningún paciente realizó ITI. Todos fueron inhibidores de alto título, tratados con agentes baipás y se constató la desaparición del inhibidor en 3-6 meses, persistiendo a título bajo con respuesta anamnésica en dos pacientes tratados con CCPa (familias A-22 y A-117) en los que se mantiene el tratamiento a demanda con agentes baipás.

Entre las mutaciones de cambio de aminoácido en hemofilia A leve encontramos las siguientes mutaciones discrepantes. Entre las tipo 1 identificamos las mutaciones p.Arg550Cys localizada en el dominio A2 en 4 familias (6 pacientes), p.Arg550His en el dominio A2 en 3 familias (5 pacientes) y p.Ser1810Pro situada en el dominio A3 en 4 familias (18 pacientes). Como discrepancias tipo 2 identificamos una sola mutación, p.Arg1708His localizada en el dominio A3 en 6 familias (6 pacientes).

Identificamos mutaciones que cursan con FVIII mayor al 30%: p.Gln2208Glu en 4 familias, p.Arg1715Gln, p.Gln2208Arg y p.His2101Asp en tres familias; Val285Ala, p.Ala1843Thr y p.Arg550His en dos familias; p.Met681Ile, p.Arg1708His, p.Arg2169Cys, p.Met2274Glu y p.Ser1807Thr en una familia cada una, con un total de 63 pacientes afectados. Una de ellas, p.Q2208Arg se caracteriza por presentar un factor más elevado en relación con el aumento de la edad.

Hemofilia A leve de cambio de aminoácido "missense"									
Identificación familiar	Mutación	Tipo mutación	Nº Exón	Dominio	Cambio nucleótido	Nº bases	Nº de he-mofílicos	Inhibidor	Nº en base de datos*
A-8/A-16/A-32/A-49/ A-53/A-56/A-74/ A-75/A-100/A-137/ A-139/A-164/A-178/ A-179/A-180/A-185/ A-212/A-245/A-250/ A-343/A-360/A-369/ A-378/A-388	p.Arg612Cys	Puntual	12	A2	c.1834C>T	1	64	Si (1)	137
A-17	p.Ser180Thr	Puntual	16	A3	c.5420G>C	1	1	No	2
A-22/A-66/A-109/ A-116/A-117/ A-154/A-155/ A-196/A-223/ A-287/A-313/ A-333/A-392	p.Arg2169His	Puntual	23	C1	c.6506G>A	1	39	Si (7)	103
A-23	p.Met2274Lys	Puntual	25	C2	c.6821T>A	1	3	No	1
A-33/A-47/A-54/ A-136/A-153/ A-160/A-182/ A-209/A-222/ A-231/A-233/ A-277/A-296/A-379	p.Arg1985Gln	Puntual	18	A3	c.5954G>A	1	34	No	69
A-35	p.Glu576Lys	Puntual	11	A2	c.1726G>A	1	2	No	1
A-38/A-61/A-93	p.Val285Ala	Puntual	7	A1	c.854T>C	1	7	No	2
A-40/A-157/A-171/ A-319/A-380	p.Gln2208Glu	Puntual	24	C2	c.6622C>G	1	10	No	27
A-50/A-240/A-252	p.Arg1715Gln	Puntual	14	A3	c.5144G>A	1	4	No	3
A-64	P.Lys399Glu	Puntual	8	A2	c.1195A>G	1	4	No	4
A-57	p.Tyr738Cys	Puntual	14	A2	c.2213A>C	1	1	No	1
A-65/A-144/A-326	p.Ala723Thr	Puntual	14	A2	c.2167G>A	1	7	No	25
A-71	p.Trp2248Cys	Puntual	25	C2	c.6744G>A	1	1	Si (1)	42
A-86/A-165/A-202	p.His2101Asp	Puntual	22	C1	c.6301C>G	1	3	No	1
A-87	p.Met681Ile	Puntual	13	A2	c.2043G>A	1	3	No	1
A-90/A-135	p.Pro1844Leu	Puntual	16	A3	c.5531C>T	1	5	No	3
A-95/A-174	p.His180Tyr	Puntual	4	A1	c.538C>T	1	8	No	2
A-96	p.His293Leu	Puntual	7	A1	c.878A>T	1	6	No	1
A-103/A-118/ A-121/A-190	p.Ser1810Pro	Puntual	16	A3	c.5428T>C	1	18	No	6
A-107/A-201	p.Thr252Ile	Puntual	6	A1	c.755C>T	1	5	No	10
A-110	p.Val502Asp	Puntual	10	A2	c.1505T>A	1	1	No	3
A-111	p.Leu2343Pro	Puntual	26	C2	c.7028T>C	1	2	No	1
A-123/A-188/A-338	p.Ser308Leu	Puntual	7	A1	c.923C>T	1	6	No	28
A-125	p.Arg1800His	Puntual	16	A3	c.5399G>A	1	2	No	32

Hemofilia A leve de cambio de aminoácido "missense"

Identificación familiar	Mutación	Tipo mutación	Nº Exón	Dominio	Cambio nucleótido	Nº bases	Nº de he-mofílicos	Inhibidor	Nº en base de datos*
A-132/A-183/A-307	p.Arg2323His	Puntual	26	C2	c.6968G>A	1	3	No	3
A-138/A-186/ A-214/A-215/A-316	p.Gly1769Arg	Puntual	15	A3	c.5305G>A	1	8	No	9
A-141/A-259	p.Ala1843Thr	Puntual	16	A3	c.5527G>A	1	10	No	3
A-161/A-167/ A-269/A-358/	p.Arg50Cys	Puntual	11	A2	c.1648C>T	1	6	No	58
A-162	p.Lys395Asn	Puntual	8	A2	c.1185G>C	1	1	No	1
A-298	p.Gly1729Glu	Puntual	4	A1	c.5186G>A	1	6	No	1
A-335	p.His1980Asp	Puntual	18	A3	c.5938C>G	1	1	No	2
A-270	p.Glu2018Gly	Puntual	19	A3	c.6053A>G	1	2	No	1
A-200	p.Leu261Pro	Puntual	6	A1	c.782T>C	1	1	No	1
A-203/A-237/ A-239/A-320	p.Gln2208Arg	Puntual	24	C2	c.6623A>G	1	5	No	5
A-207/A-300	p.Asn1762Lys	Puntual	15	A3	c.5316T>A	1	5	No	1
A-210	p.Arg2169Cys	Puntual	23	C1	c.6505C>T	1	5	No	5
A-226/A-318/A-354	p.Arg550His	Puntual	11	A2	c.1649G>A	1	5	No	44
A-227/A-278/ A-303/A-341/ A-356/A-375	p.Arg1708His	Puntual	14	A3	c.5123G>A	1	6	No	19
A-248/A-262/ A-359/A-383/A-387	p.Ile192Thr	Puntual	4	A1	c.575T>C	1	8	No	7
A-260	p.Arg2178Cys	Puntual	23	C1	c.6532C>T	1	1	No	69
A-267	p.Met1842Ile	Puntual	1	A3	c.5526G>A	1	1	No	3
A-283	p.Pro2319Leu	Puntual	26	C2	c.6956C>T	1	3	No	30
A-327	p.Met1992Tyr	Puntual	18	A3	c.5975T>C	1	1	No	0
A-348	p.Ser587Leu	Puntual	12	A2	c.1860C>T	1	1	No	0
A-355	p.Met1992Ile	Puntual	18	A3	c.5976G>A	1	1	No	0
A-372	p.Arg2071Tyr	Puntual	21	C1	c.6213G>A	1	1	No	0
A-377	p.Ser2059Pro	Puntual	20	C1	c.6175T>C	1	1	No	0
A-403	p.Ser2284Asn	Puntual	25	C2	c.6851G>A	1	1	No	0

Tabla 20. Mutaciones de cambio de aminoácidos "missense" en las familias con hemofilia A leve.

*Número de pacientes recogido en Factor VIII Variant Database (<http://www.factorviii-db.org/>).

4.4.2. Splicing

Dos mutaciones en la zona de procesamiento de ARN fueron encontradas en 11 pacientes agrupados en cinco familias, con 12 portadoras identificadas. La mutación c.1752+5G>T localizada en el intrón 11 en el nucleótido +5 que condiciona un cambio de C→T se encontró en 4 familias, tres con carácter esporádico y una familiar. La otra mutación, c.5586+5G>A fue identificada en una familia diagnosticada de novo en el intrón 16 en el nucleótido +5 y predice un cambio de G por T (tabla 21).

En ninguno de estos pacientes se constató desarrollo de inhibidor frente al FVIII.

Mutaciones en zona de procesamiento de ARN (splicing)

Identificación familiar	Mutación	Tipo mutación	Nº intrón	Nº bases	Nº de hemofílicos	Inhibidor	Nº en base de datos*
A-191/A-199/ A-268/A-279	c.1752+5G>T	Puntual	11	1	9	No	1
A-370	c.5586+5G>A	Puntual	16	1	2	No	1

Tabla 21. Mutaciones en zona de procesamiento de ARN en una familia con hemofilia A moderada.
*Número de pacientes recogido en Factor VIII Variant Database (<http://www.factorviii-db.org/>).

4.5. Discrepancias

Entre las mutaciones descritas como responsables de discrepancias entre la determinación del FVIII por método en una etapa o por método cromogénico en nuestra serie encontramos:

- Discrepancias estándar o tipo 1:
 - Mutación p.Arg550Cys localizada en el dominio A1 se identificó en 4 familias (A-161, A-167, A-269, A-358) (6 pacientes). Consiste en un cambio de nucleótido C→T que predice un cambio de aminoácido de arginina por cisteína en la proteína de FVIII. El valor medio de la dosificación de FVIII por método coagulativo fue de 38 U/dL frente a 18 U/dL por el método cromogénico.
 - Mutación p.Arg550His en el dominio A3 se encontró en 3 familias (A-226, A-318, A-354) (5 pacientes), supone un cambio de G→A que predice un cambio de aminoácido de arginina por histidina. El valor medio de la dosificación de FVIII por método coagulativo fue de 25 U/dL frente a 15 U/dL por el método cromogénico.

- Mutación p.Val285Ala en el dominio A1 se identificó en tres familias (A-38, A-61, A-93) (7 pacientes). Consiste en un cambio T→C y predice un cambio de aminoácido de valina por alanina. El valor medio de la dosificación de FVIII por método coagulativo fue de 32 U/dL frente a 17 U/dL por el método cromogénico.
- Discrepancias inversas o tipo 2:
- Mutación p.Arg1708His localizada en el dominio A3, se confirmó en 6 familias (A-227, A-278, A-303, A-341, A-356, A-375) (6 pacientes). Consiste en un cambio G→A y predice un cambio de aminoácido de arginina por histidina. En este caso la dosificación media de FVIII por método coagulativo fue de 20 U/dL frente a U/dL por el método cromogénico.

4.6. Mutaciones no descritas

En el registro se identificaron 21 mutaciones no descritas en la base internacional, de las cuales un 52% eran hemofilias A graves, 19% moderadas y 29% leves (fig. 30)

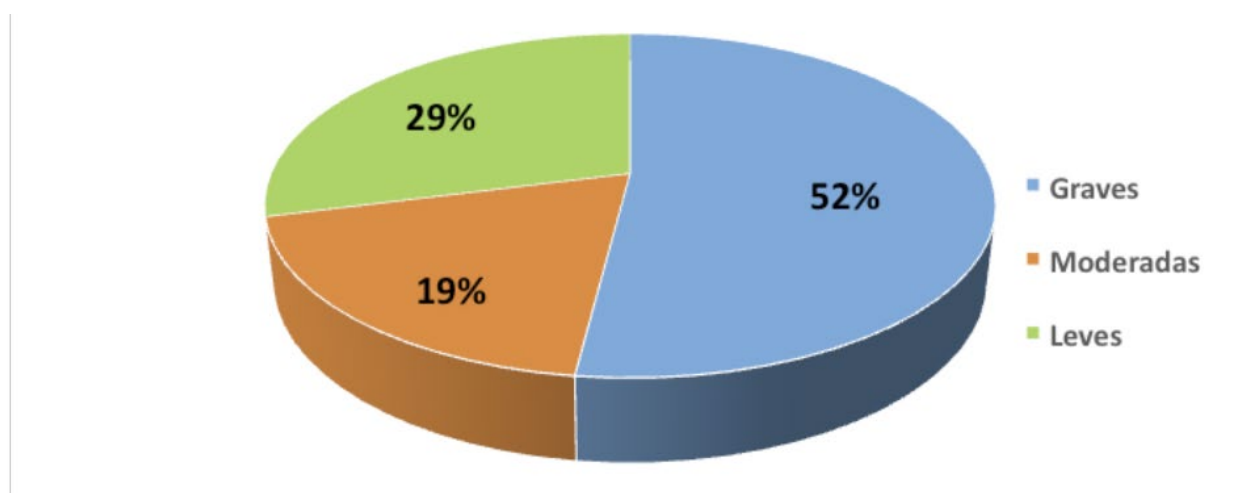


Figura 30. Distribución de las mutaciones no descritas en Factor VIII Variant Database (<http://www.factorviii-db.org/>) según la gravedad de la hemofilia.

En el grupo de pacientes con hemofilia A grave se identificaron 11 mutaciones diferentes. Las mutaciones puntuales de cambio de aminoácido fueron las más frecuentes con 6, seguidas por 3 pequeñas deleciones, una gran deleción y una mutación puntual en la zona de procesamiento de ARN (tabla 22).

En el grupo de pacientes con hemofilia moderada, 4 familias presentaron una mutación puntual no descrita previamente, dos por cambio de aminoácido, una en la zona de procesamiento de ARN y una por pequeña delección con efecto "inframe" (tabla 23).

En los pacientes leves, en 6 familias se identificaron sendas mutaciones puntuales "missense" no descritas con anterioridad (tabla 24).

Todas las mutaciones no descritas se presentaron como familias únicas, con un paciente en cada una excepto la familia A-92 con dos pacientes afectados (abuelo y nieto).

Todos los casos fueron esporádicos excepto dos familias con hemofilia A grave (A-92 y A-382) y una familia leve (A-372). Tanto en la familia A-382 como A-372 se constató un familiar hemofílico (abuelo) fallecido sin estudio genético.

Todas las mutaciones de cambio de aminoácido "missense" no descritas se comprobaron patológicas cuando se aplicó la herramienta informática PolyPhen-2, software disponible vía web en el que introduciendo el cambio de aminoácido resultante, predice la probabilidad de que la mutación sea causante de la hemofilia (fig. 31).

Mutaciones en hemofilia A grave no descritas							
Identificación familiar	Mutación	Efecto	Nº Exón/ Intrón	Dominio	Cambio nucleótido	Nº de hemofílicos	E/F
A-92	p.Gly1794Val	Missense	15	A3	c.5381G>T	2	F
A-147	p.Arg2182Leu	Missense	23	C1	c.6545G>T	1	E
A-251	p.Ser2213Pro	Missense	24	C2	c.6637T>C	1	E
A-308	p.Met721Leu	Missense	14	A2	c.2163G>A	1	E
A-332	p.Trp2015Gly	Missense	19	A3	C6043T>C	1	E
A-382	p.Ser2194Pro	Missense	24	C2	c.6637T>C	1	F
A-173	p.Pro545fs*	Frameshift	11	A2	c.1634delC	1	E
A-206	p.Arg1985Gln*45	Frameshift	18	A3	c.5954delG	1	E
A-396	p.Lys1712fs*18	Frameshift	14	A3	c.5136delG	1	E
A-366	IVS20-1G>A	Splicing	20	-	c.6188-1G>A	1	E
A-247	Del exón 11	Gran del	11	A2	-	1	E

Tabla 22. Mutaciones no descritas en Factor VIII Variant Database (<http://www.factorviii-db.org/>) en hemofilia A grave.

Mutaciones en hemofilia A moderada no descritas							
Identificación familiar	Mutación	Efecto	Nº Exón/ Intrón	Dominio	Cambio nucleótido	Nº de hemofílicos	E/F
A-339	p.Gly89Val	Missense	3	A1	c.266G>T	1	E
A-367	p.His286Tyr	Missense	7	A1	c.857C>T	1	E
A-11	IVS7+3A>G	Splicing	7	-	c.1009+3A>G	1	E
A-230	p.Leu417Tyr	Inframe	8	A1	c.1250_1265	1	E

Tabla 23. Mutaciones no descritas en Factor VIII Variant Database (<http://www.factorviii-db.org/>) en hemofilia A moderada.

Mutaciones en hemofilia A leve no descritas							
Identificación familiar	Mutación	Efecto	Nº Exón	Dominio	Cambio nucleótido	Nº de hemofílicos	E/F
A-327	p.Met1992Tre	Missense	18	A3	c.5975T>C	1	E
A-348	p.Ser587Leu	Missense	12	A2	c.1860C>T	1	E
A-355	p.Met1992Ile	Missense	18	A3	c.5976G>A	1	E
A-372	p.Arg2071Tre	Missense	21	C1	c.6213G>A	1	F
A-377	p.Ser2059Pro	Missense	20	C1	c.6175T>C	1	E
A-403	p.Ser2284Asn	Missense	25	C2	c.6851G>A	1	E

Tabla 24. Mutaciones no descritas en Factor VIII Variant Database (<http://www.factorviii-db.org/>) en hemofilia A leve.

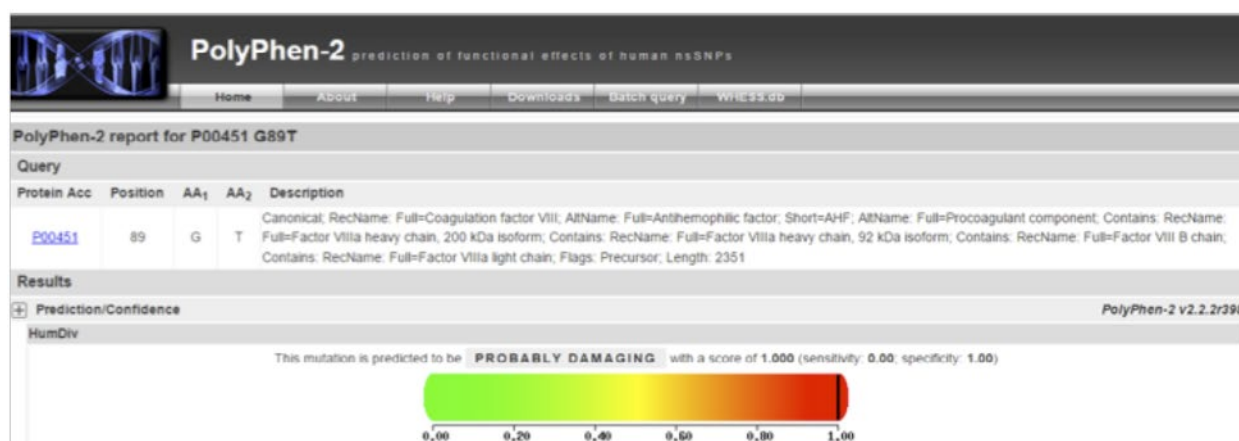


Figura 31. Imagen de la herramienta PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/index.shtml>), en la que se observa la predicción del impacto del cambio de aminoácido en la estructura y función del FVIII correspondiente a la mutación p.Gly89Val.

4.7. Estudio de portadoras

En nuestra serie el estudio de las 335 familias registradas identificó 802 portadoras de hemofilia A y 304 no portadoras. Entre las mujeres portadoras 280 pertenecían a familias graves, 101 a moderadas y 421 a leves. La información sobre el estado de portadoras se comunicó junto con el tipo de mutación. La identificación de la alteración genética responsable de la hemofilia permitió ofrecer a las portadoras de hemofilia y sus parejas las opciones reproductivas, reguladas en nuestro Sistema de Salud Pública.

En una familia (A-259) con dosificación de FVIII del 28% y la mutación p.Ala1843Thr se estudiaron a 5 mujeres de 4 generaciones (fig. 32). En la segunda generación encontramos que el paciente hemofílico (II-2), hijo de la portadora (I-1) se unió a una mujer no emparentada que resultó ser portadora (II-1) de la misma mutación. De esta relación nació un hijo sano, una hija portadora y otra hija homocigota (III-3) para esta mutación y que por tanto puede ser considerada hemofílica, con una dosificación de FVIII similar al de los varones hemofílicos. Esta "hemofílica" se casó con un varón sano teniendo como descendencia a dos hijos hemofílicos (IV-2, IV-3) y una portadora (IV-1).

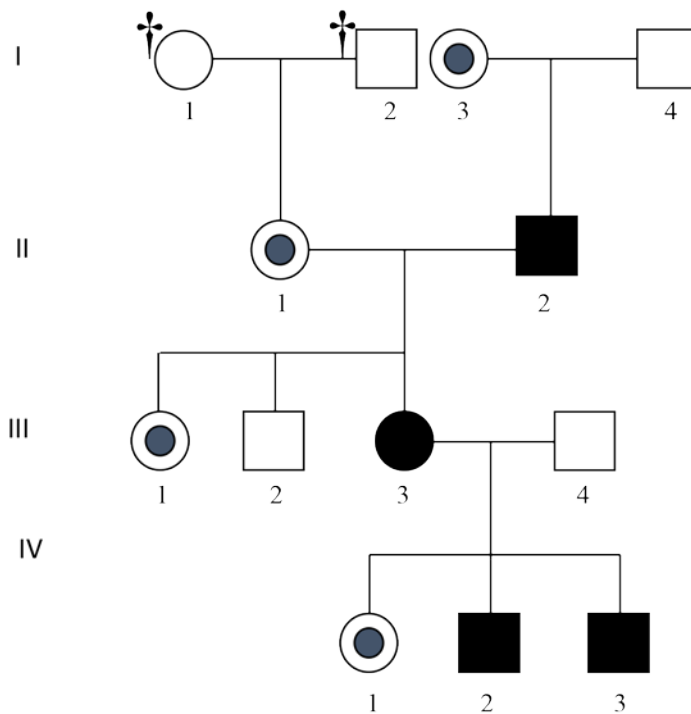


Figura 32. Árbol genealógico de la familia A-259

En otra familia (A-37) con hemofilia a grave por Inv22, un paciente hemofílico (II-2) se emparentó con una portadora de otra comunidad (II-3) también con la Inv22. Como descendencia tienen un hijo sano fecundado mediante la técnica de diagnóstico genético preimplantatorio (fig. 33).

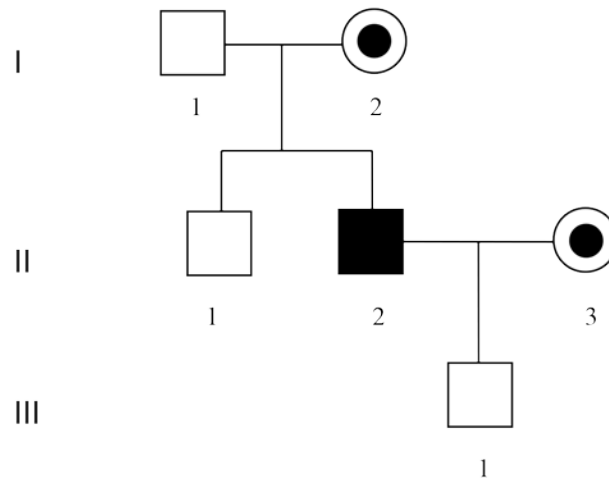
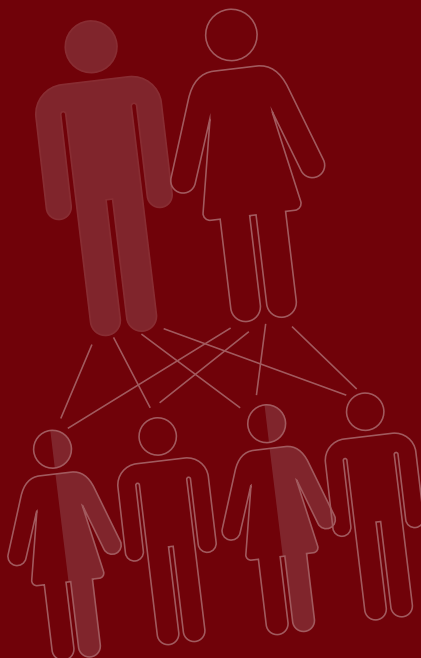
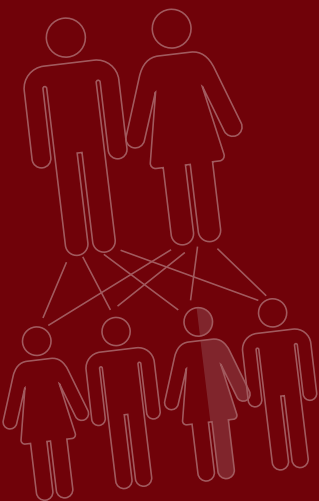
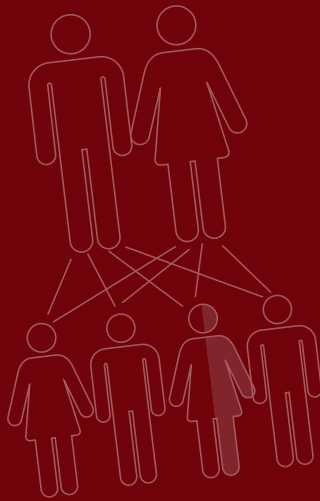


Figura 33. Árbol genealógico de la familia A-37



5. DISCUSIÓN



5. DISCUSIÓN

La hemofilia A es la coagulopatía congénita hemorrágica grave más frecuente que afecta al ser humano, causada por un espectro mutacional heterogéneo en el gen del F8 de la coagulación. Su incidencia se estima entre 1:5.000 y 1:10.000 en varones (Kemball-Cook et al., 1998). En las últimas décadas el número de mutaciones descritas como responsables de esta entidad se ha incrementado de forma sustancial, con más de 1200 mutaciones identificadas hasta la fecha como queda reflejado en la base de datos internacional (<http://www.factorviii-db.org/>). Este avance ha impulsado el diagnóstico en hemofilia ya que ha permitido la detección de portadoras y la posibilidad de ofrecer un consejo genético fiable, así como establecer una correlación genotipo-fenotipo hemorrágico, el conocimiento de mutaciones responsables de valores de FVIII discrepantes y de mutaciones asociadas a un mayor riesgo de desarrollo de inhibidor tanto en hemofilia grave como leve y moderada (Samantha C. Gouw et al., 2012).

En nuestra comunidad, el Grupo Andaluz de Coagulopatías Congénitas a través de nuestro centro como referencia para el estudio genético en hemofilia, ha desarrollado el diagnóstico de la mutación responsable de la gran mayoría de familias con hemofilia registradas en Andalucía.

En este registro el porcentaje de pacientes con hemofilia A identificados como graves, moderadas y leves, 30,7%, 12% y 57,3% respectivamente, se corresponde con el comunicado en otros registros nacionales e internacionales. Los datos referidos a España, están disponibles desde el año 2009 cuando se publicó un registro nacional (Aznar et al., 2009) con una distribución de pacientes con hemofilia grave, moderada y leve de 32,8%, 13,3% y 52,3% respectivamente. Datos similares se obtuvieron en otras cohortes como la del Reino Unido (Green et al., 2008), Estados Unidos (Soucie, Evatt, & Jackson, 1998), Canadá (Rydz et al., 2013) (tabla 25).

	Graves. n (%)	Moderadas. n (%)	Leves n (%)	Total
Canadá	413 (37.4)	168 (15,2%)	525 (47.6)	1102
USA	1140 (43)	684 (26%)	834 (31)	2159
Reino Unido	694 (42.3)	267 (16.3)	680 (41,4)	1641
España	(32,8)	(13,3)	(52,3)	
Nuestra serie	189 (30,7)	73 (12)	352 (57,3)	614

Tabla 25. Distribución de pacientes con hemofilia A según la gravedad en distintos registros.

Encontramos 116 mutaciones diferentes en 319 familias no relacionadas con un total de 586 pacientes, demostrando un alto grado de heterogeneidad de las mutaciones del gen del F8. Se consiguió identificar la mutación en un 92% de las familias. Si consideramos la gravedad de la hemofilia la identificación de la mutación responsable fue de 97,9%, 94,5% y 92,2% según se tratara de hemofilia grave, moderada o leve, similar a las descritas en otras series (Green et al., 2008; Margaglione et al., 2008; J. Oldenburg & Pavlova, 2006).

A pesar de los avances en los métodos de identificación de mutaciones, en un pequeño grupo de pacientes con hemofilia, no se encuentra una alteración genética causal después de la secuenciación de la región completa codificante del gen del F8 incluyendo las zonas de procesamiento de ARN, la región del promotor y la zona 3'. En nuestra serie, en un 5,4% de los pacientes no se identificó la mutación, resultado comparable al 11% en una cohorte italiana, 9% en la serie canadiense o un 6% en la cohorte de pacientes belgas (Lannoy et al., 2012; Margaglione et al., 2008; Rydz et al., 2013).

Se han identificado mutaciones o "rearrangements" en regiones no codificantes del gen del F8 consideradas responsables del fenotipo de hemofilia A, así como mutaciones en genes que codifican otras proteínas que interactúan con el FVIII afectando a su vida media o al transporte de la misma (Pezeshkpoor, Pavlova, Oldenburg, & El-Maarri, 2014).

En un estudio reciente, la aplicación de herramientas bioinformáticas para comparar la secuencia intrónica del gen del F8 con las mutaciones patogénicas del F8 ya conocidas, junto con el estudio del pedigree familiar permitió la identificación de variantes intrónicas en el gen del F8. Estas nuevas técnicas de secuenciación supondrán una herramienta eficiente para el cribado completo del gen del F8 y una reducción en la tasa de pacientes con hemofilia cuya mutación no sea identificada (Bach, Wolf, Oldenburg, Müller, & Rost, 2015).

La designación de un paciente hemofílico como familiar o esporádico es a menudo imprecisa. El término esporádico define el caso de un paciente aislado, pero también se aplica en los casos de una familia con más de un hermano afecto, sin otros antecedentes. Por el contrario, un caso se considera familiar cuando existe algún hemofílico en alguna generación anterior o un primo con hemofilia.

Posiblemente, la mayoría de los casos esporádicos detectados en una familia sin antecedentes de hemofilia sean mutaciones nuevas, ya que es poco probable que la mutación haya persistido durante varias generaciones sin expresarse. Los casos aislados se pueden originar en la madre o en la abuela, aunque también pueden producirse como una mutación durante la fecundación del óvulo o en el inicio del desarrollo embrionario del individuo afecto. La mayoría de las mutaciones en hemofilia ocurren durante la espermatogénesis masculina, generalmente en el abuelo materno del caso esporádico. Otras variantes se deben a cambios que suceden en los estadios tempranos del embrión o que la madre haya tenido una mutación germinal (Becker et al., 1996; Ranjan et al., 2008)

Existen varios factores que contribuyen al predominio de mutaciones en la línea germinal masculina; una de ellas es el gran número de replicaciones involucradas. Las células germinales masculinas sufren hasta la pubertad 30 divisiones, además de las necesarias para la formación del espermatozoide. El número de divisiones que requieren los gametos en un hombre de 25 años es de aproximadamente 265, y para un hombre de 50 años se eleva a unas 840. En contraste, el número de divisiones celulares en el sexo femenino desde el cigoto hasta el huevo maduro es aproximadamente de 24 (Alcántara Ortigoza MA., 2012).

Otro factor implicado son los llamados sitios calientes, como es el dinucleótido CpG. Una mayoría de las mutaciones de cambio de aminoácido tienen lugar en estas áreas específicas. La metilación del ADN ocurre principalmente en el residuo del C de este dinucleótido, donde una C se transforma fácilmente en una T a través del proceso de desaminación. Las metilaciones ocurren en mayor proporción en el ADN del espermatozoide que en el ADN del óvulo. Por último, las mutaciones complejas ocurren con más frecuencia en la meiosis y, generalmente, en los estadios tardíos de la formación del espermatozoide o del ovocito maduro, de forma que las inversiones suelen ocurrir en la meiosis masculina y las grandes deleciones en la femenina (Kasper & Buzin, 2009).

En relación a la presencia o no de antecedentes familiares, hace algunas décadas se estimaba que la prevalencia de la hemofilia esporádica suponía un tercio del total de los casos de hemofilia. La disponibilidad de un consejo genético basado en el conocimiento de las alteraciones genéticas subyacentes ha contribuido a la variación de este dato. Kasper et al. describen que en el caso de la hemofilia A grave el 50-55% de los casos son esporádicos, mientras que en hemofilia A moderada/leve los casos esporádicos representan el 30% (Kasper & Lin, 2007). En una reciente publicación se considera que el 50% de los nuevos diagnósticos de hemofilia son casos esporádicos (Mårtensson et al., 2016). En nuestra serie, los casos esporádicos globales fueron un 59% y los casos considerados familiares un 41%. Si consideramos solo las familias con hemofilia A grave, los casos esporádicos representaron un 67,6%, mientras que en el grupo de pacientes moderados fue un 50% en los hemofílicos moderados y un 54,7% en los pacientes leves.

En la mayoría de las madres portadoras de los casos aislados de hemofilia la mutación se identifica en las células somáticas y, por tanto, pueden tener otro hijo con hemofilia (Castaldo et al., 2007).

En nuestra serie, de las formas esporádicas identificadas genéticamente, en 107 casos (93%) encontramos que la madre sí fue portadora de la mutación. La alta prevalencia de portadoras está en consonancia con la reflejada en la literatura, un 85% aproximadamente (Kasper & Lin, 2007; Ljung & Sjörin, 1999). En nuestra serie, y considerando que solo un pequeño número de abuelas maternas estuvieron disponibles para el estudio genético, las abuelas identificadas como portadoras en las familias con casos de hemofilia esporádica fue del 54%, superior a la comunicada en la literatura, en la que solo un pequeño número de estas abuelas maternas (20%) presentaron la mutación. En el caso de la Inv22, las madres de los pacientes que se presentan como casos

únicos tienen un 98% de probabilidades de ser portadoras de la alteración genética (Castaldo et al., 2007), debido a que la mayoría de estas madres heredaron de su padre (abuelo sano materno del propólitus) esta inversión generada como evento de novo durante la espermatogénesis. En nuestra serie, de las 35 familias esporádicas con esta inversión, en 29 de ellas dispusimos de información sobre la madre y en el 100% de los casos se encontró la mutación en la madre.

Normalmente es posible confirmar el estado de portadora mediante el estudio de Inv1 e Inv22 y la secuenciación de ADN, aunque un resultado negativo no descarta la posibilidad de transmitir la hemofilia a la descendencia. En algunas familias esporádicas, madres consideradas no portadoras en base al estudio genético han tenido más de un hijo con la misma mutación, y por tanto deben ser portadoras de un mosaicismo, portando la mutación en una parte de sus células gonadales y somáticas. Estudios previos de mosaicismo han mostrado frecuencias variables entre el 10% en hemofilia grave y el 20% de forma global (Kasper & Buzin, 2009; Leuer et al., 2001; Mårtensson et al., 2016). Estos mosaicismos son más frecuentes en familias con mutaciones puntuales y ocurren durante la mitosis en contraste con las inversiones que parecen tener lugar durante la meiosis (Leuer et al., 2001).

Aunque en nuestra casuística las madres no portadoras solo engendraron un hijo afecto no podemos descartar la presencia de este tipo de alteraciones. Técnicas recientes como la secuenciación de nueva generación (next generation sequencing) y PCR digital ofrecen mayor sensibilidad para la detección de un número pequeño de moléculas de ADN mutado (Hindson et al., 2011).

Dentro del espectro mutacional identificado, en los pacientes con hemofilia A grave el tipo de mutaciones encontradas fueron concordantes con otras series (tabla 26). La mayoría de las mutaciones identificadas conllevan un alelo nulo (inversiones, grandes deleciones, inserciones/deleciones, mutaciones sin sentido), mientras que las mutaciones puntuales de cambio de aminoácido representaron solo el 22%

	Nuestra serie	Italia1	Alemania2
Pacientes	185	874	753
Inv I22	85 (46)	451 (52)	338 (45)
Inv I1	6 (3,2)	19 (2)	22 (3)
Sin sentido	17 (9,2)	77 (9)	97 (13)
Missense	42 (22,7)	143 (16)	112 (15)
Pequeñas del/ins	25	136 (15)	120 (16)
Splicing	5	31 (4)	30 (4)
Grandes deleciones	6	13 (1)	37(5)
Otras	-	4 (0)	-

Tabla 26. Mutaciones en el gen del F8 en pacientes con hemofilia A grave.

1 Margaglione et al., 2008. 2 J. Oldenburg & Pavlova, 2006.

El espectro mutacional en hemofilia moderada y leve difiere significativamente del observado en hemofilia A grave. La mayoría de las mutaciones identificadas son mutaciones puntuales por cambio de aminoácidos que representan entre el 70-90% según las series. Las mutaciones se distribuyen en toda la secuencia del gen del F8, afectando a todos los dominios, pero especialmente A2, exón 11 y C1, exón 23. Por el contrario, estas mutaciones fueron excepcionales en el dominio B. Este hecho refuerza la idea de que sustituciones de cambio de aminoácido dentro de este dominio son poco importantes (Johannes Oldenburg & El-Maarri, 2006). En hemofilia A leve identificamos 45 mutaciones de cambio de aminoácido en 319 pacientes. Destacan la mutación p.Arg612Cys con 64 pacientes, p.Arg2169His con 39 pacientes leves y 21 pacientes clasificados como moderados y p.Arg1985Gln con 34 pacientes.

La gran mayoría de los pacientes con la mutación p.Arg612Cys procedía del extremo sur oriental de la provincia de Sevilla, en la comarca denominada Sierra Sur, de difícil acceso y mal comunicada hasta mediados de los años 50, con lo que es presumible la existencia de un efecto fundador. Otra mutación, p.Ser1810Pro, identificada en 4 familias (18 pacientes), se encontró sólo en etnia gitana. Esta mutación ha sido registrada en la base de datos internacional únicamente en pacientes de nuestro país (Cid et al., 2008; Fernández-López, García-Lozano, Núñez-Vázquez, Pérez-Garrido, & Núñez-Roldán, 2005; Martín-Salces et al., 2010).

También quedan representadas la mutaciones en la zona de procesamiento de ARN entre un 4-9% y en menor medida pequeñas delecciones/inserciones. Ocasionalmente se han encontrado mutaciones en la región del promotor (Bogdanova et al., 2007; Eckhardt et al., 2013; Margaglione et al., 2008)

A medida que se han encontrado mutaciones en diversos genes causantes de trastornos monogénicos, se ha descubierto que la correlación entre el genotipo y el fenotipo es generalmente incompleta debido al efecto modificador de otros genes y a la asociación de polimorfismos, factores epigenéticos, celulares o de tejido, algunos de ellos todavía no bien estudiados (E. F. Tizzano, Cornet, Domènech, & Baiget, 2002).

En hemofilia el fenotipo hemorrágico está generalmente relacionado con el tipo de mutación responsable de la enfermedad, que es el principal determinante de la actividad del FVIII (Pavlova & Oldenburg, 2013). En ausencia de estudios funcionales, la relación entre causa y efecto no siempre es clara y sólo en algunas mutaciones podemos comprender perfectamente como el defecto genético es el causante de la hemofilia, como sucede en grandes delecciones, Inv22 e Inv1 o mutaciones sin sentido, en las que el gen queda interrumpido y la traducción de la proteína es terminada de forma prematura. En el caso de mutaciones de cambio de aminoácidos "missense" y en particular en las mutaciones no descritas en la base de datos (Factor VIII Variant Database) se puede generar confusión con polimorfismos sin significación patológica, debido a la gran capacidad mutacional del gen F8. Esto se refleja en el gran número de mutaciones descritas, que se incrementa continuamente (Elmahmoudi et al., 2012; Hua et al., 2010;

Pinto, Ghosh, & Shetty, 2016). Entre las 335 familias estudiadas, 21 de ellas (6,2%) presentaron mutaciones no descritas en dicha base. El programa informático PolyPhen-2 nos permitió predecir que estas mutaciones eran responsables de la hemofilia que presentan estas familias con mutaciones no descritas previamente, descartando que se tratara de polimorfismos (Adzhubei et al., 2013).

En hemofilia A grave la Inv22 representa la mutación más frecuente con aproximadamente un 40-50% de los casos. En nuestra serie la presencia de esta inversión fue de un 44% de las familias con 85 pacientes afectados (46%), muy similar a la reflejada en otras series (tabla 27). Únicamente la serie canadiense describe una cifra inferior que los autores atribuyen a que los pacientes con esta mutación de dos centros no fueron incluidos.

Población hemofilia A grave	Inv22/total, n	Inv22, %
Bagnall et al., 2002 (Reino Unido)	94/209	45
Mantilla-Capacho et al. 2007 (Mexico)	14/31	45,1
Rydz et al. 2013 (Canada)	129/413	31,2
E. F. Tizzano, Domènech, Altisent, Tusell, & Baiget, 1994 (España)	42/102	41,1
Margaglione et al. 2008 (Italia)	454/874	52
Oldenburg et al. 2006 (Alemania)	338/753	45
Nuestra serie	85/185	46

Tabla 27. Pacientes con Inv22 respecto al total de hemofílicos A graves.

La otra inversión descrita en pacientes con hemofilia A grave es la que afecta al intrón 1. Con una menor prevalencia que en la Inv22, esta alteración se encuentra de forma recurrente en algunas poblaciones como la española o la británica con un 3-5% (Bagnall et al., 2002; Eduardo F. Tizzano, Cornet, & Baiget, 2003), frente a otras series en las que es muy infrecuente como en la población italiana (Salviato, Belvini, Radossi, & Tagariello, 2004) o incluso ausente como en las cohortes húngara o mexicana (Andrikovics et al., 2003; Mantilla-Capacho et al., 2007).

Respecto a las grandes deleciones en nuestra casuística se identificaron 6 pacientes con hemofilia A grave y un fenotipo severo, como cabría esperar. No obstante, identificamos un paciente varón con una gran deleción de los exones 1 al 12 del gen del F8 que se comporta como una hemofilia moderada (FVIII: 3%). El estudio del cariotipo mostró una dotación cromosómica 46,XXY, compatible con síndrome de Klinefelter con dos cromosomas X maternos idénticos que sugieren una no disrupción en la segunda división meiótica, cuya expresividad desde el punto de vista hemostático se traduce en una hemofilia moderada (Venceslá et al., 2012). Existe otro caso publicado en el año 1965 con este síndrome y hemofilia A asociada, aunque sin estudio genético realizado (Chipail, Leu, & Dragomir, 1965).

En el caso de pequeñas inserciones o deleciones la mayoría de estas mutaciones producen alteraciones del marco de lectura debido a que el número de nucleótidos insertado va a producir un codón de parada en algún momento originando una proteína truncada. Con este tipo de mutación identificamos 19 familias con 27 pacientes. Aunque algunos autores han descrito fenotipos moderados cuando la mutación se produce en zonas de poli-A (Samantha C. Gouw et al., 2012, p. 8), en nuestra casuística, excepto una familia (A-230) con dos pacientes con hemofilia A moderada, el resto presentaron una hemofilia A grave. Dos de estas mutaciones fueron recurrentes, p.Ile1213Phefs*5 y pThr1609Asnfs*3 en cinco y tres familias respectivamente. Ambas se localizaron en regiones de 7 a 9 nucleótidos de adenina en el exón 14, donde las pequeñas deleciones e inserciones se producen con más frecuencia que en zonas con ausencia de estas series de adeninas (Kunkel & Alexander, 1986). (Green et al., 2008)

Cuando la deleción o inserción implica a tres nucleótidos o un múltiplo de 3, la alteración no afecta al marco de lectura al producir deleción o inserción de uno o más aminoácidos sin alterar el resto de la proteína del FVIII. Son las llamadas mutaciones "inframe". En nuestra serie se incluyeron dos familias con este tipo de mutación. La familia A-108 (tres hemofílicos) presentó la deleción p.Asp186_Leu187delinsVal que provoca la sustitución de un residuo de ácido aspártico y un residuo de leucina por un residuo de valina y se comporta como una hemofilia A grave. En la familia A-240 (un hemofílico) se identificó una deleción en el exón 8 de 15 nucleótidos implica la pérdida de 5 aminoácidos dando lugar una hemofilia moderada. En una serie del Reino Unido, que reunió un tercio de los hemofílicos, se recogieron cuatro casos con este tipo de mutaciones "inframe", dos de ellas catalogadas como hemofilia grave, una moderada y otra leve con un nivel de factor del 20% (Green et al., 2008).

Dentro de las mutaciones puntuales, las mutaciones sin sentido van a dar lugar a un codón de parada que al producir una proteína truncada origina una hemofilia A grave. En nuestra serie se identificaron 17 familias, 11,9% de los casos graves.

La mayoría fueron mutaciones únicas, excepto p.Arg814* identificada en 2 familias con 2 pacientes y p.Arg2166* en 3 familias con 3 pacientes.

Las mutaciones puntuales en la zona de procesamiento del ARN pueden dar lugar a hemofilia grave, moderada o leve. En la población estudiada encontramos 5 mutaciones (c.602-1G>A, c.144-2A>G, c.787+1G>A, c.6115+6T>A y c.6188-1G>A) en 6 familias clasificadas como graves (A-98, A-208, A217, A-242, A294, A-366); una mutación (c.1009+3A>G) en una familia moderada (A-11); y dos mutaciones (c.1752+5G>T, c.5586+5G>A) en cinco familias leves (A-191, A-199, A-268, A-279 y A-370). De estas ocho mutaciones, seis están descritas en la base de datos internacional con un tipo de gravedad coincidente con las encontradas en nuestra serie. Las otras dos mutaciones, una grave y otra moderada no se encontraron registradas. Porcentualmente suponen un 4% en el grupo de hemofilias graves, 2,8% en las moderadas y 3,4% en las leves. En la cohorte italiana este tipo de mutaciones representaron el 4% de las hemofilias graves, 16% de las moderadas y 5% de las leves (Margaglione et al., 2008).

Las mutaciones de cambio de aminoácido “missense” se identificaron en 427 pacientes (73%). La gran mayoría de pacientes con hemofilia A leve (96%) presentaron esta mutación. Como mutaciones recurrentes encontramos p.Arg612Cys en 23 familias (55 pacientes), p.Arg1985Gln en 14 familias (35 pacientes), p.Arg2169His en 20 familias (60 pacientes), p.Arg1708His en 6 familias (6 pacientes) y p.Arg2016Trp en 12 familias (30 pacientes). Sin embargo, pacientes con una misma mutación “missense” pueden presentar una actividad de FVIII variable y dar lugar a distintos fenotipos hemorrágicos, de manera que incluso en una misma familia pueden clasificarse como graves/moderados o como moderados/leves (M. D. Carcao, van den Berg, Ljung, Mancuso, & PedNet and the Rodin Study Group, 2013). En nuestro estudio destacan las siguientes mutaciones de este tipo con fenotipo variable:

- p.Arg2016Trp se identificó en 11 familias con 29 pacientes, 19 con hemofilia moderada y 10 con hemofilia grave. En la base de datos internacional se recogen 61 familias con esta mutación, de las cuales 19 son señaladas como graves, 17 moderadas, 13 leves, 2 como leves/moderadas y una como moderada/grave. En 10 registros no se incluye información sobre los valores de FVIII.
- p.Arg301His se identificó en dos familias (A-265 y A-264) con sendos hemofílicos, uno moderado y otro grave. En el registro internacional se incluyen 28 pacientes con esta mutación, 15 con fenotipo leve, 10 moderado y 1 leve.
- p.Asp1260Glu se encontró en 2 familias (A-12 y A-128) con 3 hemofílicos, 1 con fenotipo grave y 2 moderado. En la base de datos internacional se incluyen 16 familias, de ellas 6 informadas como graves y tres como moderadas.
- p.Arg2169His se mostró ampliamente representada en nuestra serie con 20 familias identificadas, 7 consideradas moderadas (21 pacientes) y 13 leves (39 pacientes). En dos familias (A-22 y A-117) se constató variabilidad intrafamiliar con 11 pacientes moderados y 10 leves. En la base internacional se incluyen 103 familias informadas mayoritariamente como leves (n:53) o moderadas (n:32), en 10 casos como leves/moderadas y en 1 como moderada/grave.
- p.Trp2248Cys se identificó en un paciente leve (A-71) y otro moderado (A-83). En la base internacional esta mutación es informada en 42 familias con una variabilidad importante intra e interfamiliar: 2 familias graves, 14 moderadas, 19 leves y 4 leves/moderadas.
- p.Arg1800His se describió en dos familias clasificadas como moderadas (A-63 y A-292) con 3 hemofílicos y una familia leve (A-125) con 2 hemofílicos. En la base internacional se recogen 7 familias graves, 15 moderadas, 8 leves y 2 moderadas/leves.
- p.Ser2284Asn se identificó en una familia (A-246) con 4 pacientes considerados hemofílicos moderados y en otra familia (A-403) con un hemofílico leve.

Esta variabilidad fenotípica afecta, por tanto, a las mutaciones de cambio de aminoácido “misense” ya que las mutaciones sin sentido resultan siempre en una hemofilia A grave (E. Santagostino et al., 2010). Para la mayoría de mutaciones de cambio de aminoácido no existen bases moleculares que expliquen la variabilidad fenotípica. Se ha especulado con la presencia de otra mutación o variante polimórfica, no detectada, que afectara al gen del F8, a efectos epistáticos de otro loci sobre la expresión del gen, a desestabilización de la proteína, el plegamiento incorrecto o la alteración de regiones estructurales y funcionalmente importantes. Sengupta et al., exploraron las posibles causas de esta heterogeneidad fenotípica mediante el análisis de 766 mutaciones de cambio de aminoácidos, mostrando cuatro determinantes relacionados con la expresión fenotípica de hemofilia A grave: I) Mutaciones en residuos conservados. II) Residuos mutados “ocultos” en la estructura terciaria de la proteína. III) Mutaciones que inducen un cambio estérico. IV) Cambios en el potencial electrostático de superficie que pueden afectar las interacciones de la molécula de FVIII. No se asoció por el contrario, con el tipo de aminoácido sustituido, el dominio del residuo mutado o la alteración de la estructura local (Sengupta et al., 2015). Otras explicaciones menos probables incluirían las diferencias en los métodos empleados en los diferentes laboratorios (Poulsen et al., 2009).

5.1. Mutaciones discrepantes

En general se puede asumir que en la mayoría de los hemofílicos existe una buena correlación en la determinación del FVIII por el método coagulativo en una etapa y el cromogénico. Sin embargo, especialmente en pacientes con hemofilia A leve la existencia de discrepancias entre los valores de FVIII obtenidos por los dos métodos es ampliamente conocida (Duncan, Duncan, Tunbridge, & Lloyd, 1994; Parquet-Gernez et al., 1988). Inicialmente se describió la discrepancia tipo 1 o estándar, en la que el valor del FVIII hallado por el método en una etapa es superior al obtenido por el método cromogénico. Posteriormente, varios estudios comunicaron la existencia de las llamadas discrepancias inversas o tipo 2, en las que pacientes con niveles reducidos de FVIII medido por el método de una etapa presentaban valores superiores por el método cromogénico.

En nuestra serie, de las 146 familias con hemofilia A leve, 16 (10,9%) presentaron discrepancias en la medición del FVIII, de las cuales 10 familias (6,8%) fueron de tipo 1 y 6 (4,1%) de tipo 2. Estos datos son concordante con los publicados por Trossaert et al., en una cohorte de 173 familias con hemofilia (Trossaert et al., 2011) y similares a los del grupo del hospital de La Fe (Valencia) con un 15% de los casos discrepantes (Cid et al., 2008). En otras series, sin embargo la frecuencia de resultados discrepantes fue superior, entre 33% y 48% de los pacientes (Duncan et al., 1994; A. C. Goodeve & Peake, 2003). Se han relacionado una serie de mutaciones con estas discrepancias. Respecto a las de tipo 1 se han identificado las siguientes mutaciones: p.Ala303Glu, p.Ala303Pro, p.Ser308Leu, p.Arg546Trp, p.Arg550His, p.Arg717Leu, p.Leu1951Phe, pHis1973Leu. La mayoría de estas mutaciones se localizan en los dominios A1, A2 y A3 (Hill, Deam, Gordon, & Dolan, 2005; Jacquemin, Lavend’homme, et al., 2000; J. Oldenburg & Pavlova, 2010).

En nuestra serie se identificaron algunas de estas mutaciones mencionadas. p.Arg550Cys se encontró en 4 familias con 6 pacientes, p.Arg550His en 3 familias y 5 pacientes, p.Val285Ala en 3 familias y 7 pacientes.

Los mecanismos implicados en estas discrepancias implican una mayor inactivación del FVIIIa debido a una disociación aumentada de la subunidad A2 (Pipe et al., 1999), una mayor inestabilidad de las interacciones con otras proteínas por sustitución de aminoácidos que alteran la carga o la hidrofobicidad. En la mayoría de los laboratorios, la gravedad de la hemofilia se determina por método de una etapa, que puede conllevar sobreestimaciones del nivel de FVIII y por tanto potencialmente dar lugar a un infradiagnóstico de esta coagulopatía.

Además, el FVIII se comporta como un reactante de fase aguda por lo que puede estar elevado en muchos estados inflamatorios inespecíficos o sangrados que también contribuyan a resultados normales de los tiempos de coagulación, especialmente el tiempo de tromboplastina parcial activado. Estos pacientes, con discrepancias tipo 1, pueden presentar sangrados relevantes al ser sometidos a intervenciones quirúrgicas o sufrir traumatismos graves, al no estar diagnosticados adecuadamente de hemofilia (Pavlova, Delev, Pezeshkpoor, Müller, & Oldenburg, 2014). Habitualmente, dichos pacientes tienen antecedentes hemorrágicos compatibles con los bajos niveles obtenidos por método cromogénico.

Respecto a las discrepancias inversas o tipo 2 también existen mutaciones específicas. Entre ellas se han descrito p.Glu340Lys, p.Tyr365Cys, p.Ile388Thr, p.Glu739Lys, p.Arg1658His, p.Arg1708His y p.Phe2146Ser. (Cid et al., 2008; Mumford et al., 2002; J. Oldenburg & Pavlova, 2010; Schwaab et al., 1995; Trossaërt et al., 2008) En nuestro registro solo la mutación p.Arg1708His fue identificada en 6 familias con un paciente hemofílico cada una de ellas. Esta mutación junto con Arg1639His se localiza en el dominio A3 en uno de los sitios de "clivaje" de la trombina. Se considera que estaría implicada una disminución de la activación del FVIII por la trombina o mutaciones que requieren una concentración superior de FIXa (Cid et al., 2008).

Los pacientes con discrepancias tipo 2 presentan habitualmente un fenotipo hemorrágico poco significativo y el diagnóstico suele realizarse de manera fortuita por el hallazgo de un TPTA prolongado (Trossaërt et al., 2008). En los 6 pacientes de nuestra serie no se constató un sangrado significativo.

Se recomienda por tanto, para evitar ambigüedades en la interpretación correcta de los resultados de FVIII medidos por un único método, el uso de ambos métodos, el de una etapa y el cromogénico, para el diagnóstico inicial de pacientes con sintomatología hemorrágica sugestiva de hemofilia, especialmente en casos leves.

La clasificación de la hemofilia en grave, moderada y leve según el nivel de FVIII descrita en 1958 por Biggs y MacFarlane (Biggs & Macfarlane, 1958) y refrendada por White et al., en 2001

(White et al., 2001) continúa siendo la definición vigente para el SSC ISTH. Dado que según la misma se considera hemofilia leve aquella con dosificación de FVIII entre el 5 y 40%. Este punto de corte es inferior al considerado como normal por encima del 50%, por lo que se establece una zona de confusión para los pacientes con valores de FVIII entre el 40 y 50%. Con frecuencia, el diagnóstico de este subgrupo es complicado debido a la normalidad o mínima alteración del TPTA. Es muy poco probable que estos pacientes presentes sintomatología hemorrágica espontánea y únicamente requerirán soporte hemostático en el caso de traumatismos significativos o intervenciones quirúrgicas mayores (Blanchette et al., 2014).

En estos pacientes adquiere especial relevancia el estudio genético que confirmará el diagnóstico de hemofilia. En nuestra serie 24 familias con una dosificación de FVIII superior al 30 IU/ml fueron identificadas con 13 mutaciones de cambio de aminoácidos localizadas a través de todos los dominios del gen del F8: p.Gln2208Glu en 4 familias, p.Arg1715Gln, p.Gln208189Arg y p.His2101Asp en 3 familias, p.Val285Ala, p.Ala1843Thr y p.Arg550His en 2 familias, p.Met6821Ile, p.Arg1708His, p.Arg1988His, p.Arg2169Cys, p.Met2274Glu y p.Ser1807Thr en una familia respectivamente.

Se ha descrito la influencia de los distintos reactivos usados para el TPTa y la variabilidad en la sensibilidad para detectar deficiencias leves de factores. De esta forma, un TPTa normal no siempre traduce una hemostasia normal y no debería asumirse que todos los reactivos confieren una similar sensibilidad para la deficiencia de FVIII (Bowyer, Kitchen, & Makris, 2011).

Es recomendable, por tanto, ante la sospecha de clínica de hemofilia leve, la determinación del FVIII a pesar de un TPTA dentro del rango de la normalidad.

5.2. Mutaciones relacionadas con el aumento de FVIII con la edad

Respecto a la edad, se ha comunicado un incremento de la actividad de FVIII edad-dependiente en pacientes con hemofilia A leve, cuyas causas no son bien conocidas. Se ha especulado que el tipo de mutación o determinados polimorfismos podrían correlacionarse con este incremento en los valores del FVIII (Miesbach, Alesci, Krekeler, & Seifried, 2009; Morange et al., 2005). También podrían ser consecuencia de un aumento simultáneo con la edad del FVIII y del FvW, el estabilizador del FVIII circulante, también descrito en personas sanas (Peerlinck & Jacquemin, 2010).

En nuestra serie identificamos 5 familias con la mutación p.Gln2208Glu localizada en el dominio C2, con 10 hemofílicos implicados. Se caracterizan por una hemofilia A leve con niveles de factor VIII del 20% al diagnóstico en edad pediátrica y un fenotipo hemorrágico muy leve. Se objetivó un aumento progresivo de los valores de FVIII hasta alcanzar la normalidad de forma repetida en

la edad adulta. En la base de datos internacional se recogen 27 familias con esta mutación, con una dosificación de FVIII entre el 14 y el 48%. Se puede especular con la posible influencia de mutaciones en los elementos reguladores del gen del F8, en la secuencia no codificante. Esto ha sido bien descrito en una hemofilia B, conocida como Leyden, descrita en 1970, en Holanda (Veltkamp, Meilof, Remmelts, van der Vlerk, & Loeliger, 1970). Este subtipo de hemofilia afecta a varones que presentan sintomatología en la infancia y que mejoran gradualmente durante la adolescencia (Briët, Bertina, van Tilburg, & Veltkamp, 1982). La secuenciación del gen del F9 y de los sitios de procesamiento del ARN en estas familias identificó mutaciones puntuales en la región proximal del promotor. (Crossley, Winship, Austen, Rizza, & Brownlee, 1990; Reijnen, Peerlinck, Maasdam, Bertina, & Reitsma, 1993; Reitsma, Bertina, Ploos van Amstel, Riemens, & Briët, 1988). Estos sitios son reconocidos como elementos reguladores potenciales y se ha hipotetizado con la disrupción de los sitios de unión para el activador de la transcripción y por tanto impedir la expresión del gen del F9, al menos hasta la pubertad. Estas mutaciones son de interés puesto que demuestran como mutaciones puntuales pueden estar asociadas con alteraciones en la expresión temporal de los genes (Funnell & Crossley, 2014).

5.3. Mutaciones de alto riesgo para el desarrollo de inhibidor

En relación con el tratamiento de la hemofilia A, éste se basa en la administración de concentrados del factor VIII por vía intravenosa. Los inhibidores producidos contra el factor exógeno suponen la complicación más grave en el paciente hemofílico con una frecuencia global estimada del 10-12%, siendo superior en el grupo de pacientes con hemofilia grave con un 30%.

Diferentes estudios han demostrado que el principal factor genético para el desarrollo de un inhibidor en hemofilia A es el tipo de mutación en el gen del F8. Las mutaciones consideradas de alto riesgo suponen una mayor susceptibilidad para su formación, de forma que las grandes deleciones/inserciones, mutaciones sin sentido que afectan a la cadena ligera (dominios A3, C1 y C2) y en menor grado la inversión del intrón 22 confieren un riesgo aumentado para la formación de inhibidor de 7-10 veces cuando se compara con los defectos moleculares que causan hemofilias con fenotipo leve o moderado (S. C. Gouw et al., 2011; J. Oldenburg et al., 2002).

Los pacientes con Inv22 no tienen FVIII circulante producido endógenamente y por tanto cabría esperar que esta mutación se asociara a un alto porcentaje de aparición de inhibidor. Sin embargo, la aparición de inhibidor es variable oscilando según las series entre el 4 y el 60% (Viel et al., 2009; Xue et al., 2010), aunque en grandes series sólo un 20% de estos pacientes acaban desarrollándolo (Samantha C. Gouw et al., 2012; Wight & Paisley, 2003). Recientemente, Sauna et al, han descubierto un posible mecanismo para explicar este hecho. Basado en la estructura del gen del F8 con la Inv22, estos individuos producen dos ARNm (F8I22I y F8B, según los autores) conteniendo los exones del F8, que juntos incluyen los 26 exones del ARNm completo y

expresan la secuencia de aminoácidos del FVIII como dos cadenas polipeptídicas no secretadas. Estas dos proteínas (FVIII221 y FVIII B) han sido identificadas en las células mononucleares de sangre periférica y en muestras hepáticas de pacientes con la Inv22 en niveles similares al FVIII y FVIII B en personas normales. Los autores postulan que estos polipéptidos proporcionan tolerancia al FVIII infundido (Pandey et al., 2013; Sauna et al., 2015).

En nuestra serie la prevalencia de inhibidores entre los pacientes con Inv22 es del 9,4%, datos concordante con amplia variabilidad de resultados publicados en la literatura.

En la Inv1 el riesgo de desarrollo de un inhibidor se considera similar al de los pacientes con Inv22. En nuestro estudio la Inv1 se identificó en un 2,9% de las familias con hemofilia A grave, sin que ningún paciente haya presentado inhibidor, coincidiendo con otras series publicadas (Miller et al., 2012; Sanna et al., 2008; Xue et al., 2010).

En pacientes con grandes deleciones el riesgo de desarrollo de inhibidor puede variar entre un 21% cuando implica un dominio frente a más del 80% cuando se encuentran implicados varios dominios (Johannes Oldenburg et al., 2004; Salviato, Belvini, Are, Radossi, & Tagariello, 2002). Los seis pacientes con grandes deleciones incluidos en nuestra casuística desarrollaron inhibidor, incluyendo dos pacientes con afectación de un solo dominio. Uno de ellos con deleción parcial del exón 15 desarrolló un inhibidor transitorio de baja respuesta, con respuesta anamnésica al tratamiento intensivo con concentrados FVIII.

Las mutaciones consistentes en pequeñas deleciones e inserciones, a menudo conducen a alteraciones del marco de lectura y secundariamente a un codón de parada produciendo un fenotipo grave, lo que haría esperar una prevalencia de inhibidor similar a la referida para mutaciones sin sentido. Sin embargo, esto no ocurre probablemente por la existencia de mutaciones en zonas de repeticiones de adeninas que por un mecanismo endógeno de reparación del marco de lectura durante la formación del ARNm, permite producir pequeñas cantidades de proteína normal suficientes para generar inmunotolerancia y secundariamente una baja prevalencia de inhibidor. Así, se ha descrito que las pequeñas deleciones/inserciones que afectan a secuencias de adeninas del exón 14 fueron asociadas a un bajo riesgo de formación de inhibidor (3%). Sin embargo, las pequeñas deleciones/inversiones localizadas fuera de las secuencias de repeticiones de adeninas (non A run) están asociadas a un relativo alto riesgo de formación de inhibidor del 20% al 25% (Boekhorst et al., 2008; Salviato et al., 2007). El porcentaje de inhibidores en pacientes con esta mutación en nuestra serie fue del 16%.

Las mutaciones puntuales sin sentido resultan también en una proteína de FVIII truncada, originando un fallo en el desarrollo de inmunotolerancia hacia el FVIII. Son, por tanto, responsables de un fenotipo grave y tiene alto riesgo de desarrollo de inhibidor con una incidencia superior al 30% (Samantha C. Gouw et al., 2012). Oldenburg et al., observaron que el riesgo era el doble en sujetos con mutaciones sin sentido localizados en la cadena ligera (dominios A3, C1 y

C2) cuando se comparaban con mutaciones en la cadena pesada (dominios A1, A2 y B). Esto puede ser explicado por la transcripción de la proteína intracelular FVIII_B que resultaría en cierta tolerancia a las mutaciones del gen del F8 comprendidas entre el exón 22 y 26 del gen del F8 (Margaglione et al., 2008). En nuestra serie el 29% (5/17) de los pacientes con mutaciones puntuales sin sentido desarrollaron inhibidor, todos localizados en la cadena ligera (fig. 34). La mutación p.Arg2166* se encontró en tres familias con un paciente cada una de ellas, destacando la formación de inhibidor en los tres. De los 34 casos registrados en la base de datos internacional con esta mutación, 24 tienen información sobre inhibidor, estando presente en el 37,5% (n:9) de los pacientes.

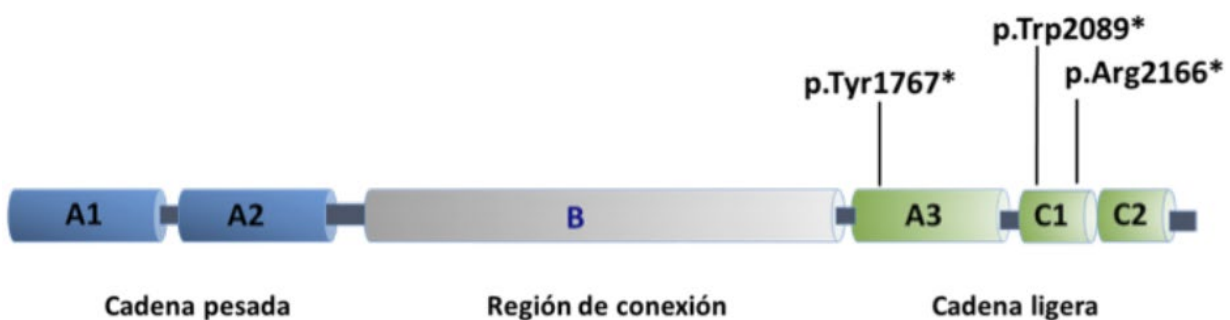


Fig 34. Localización en los dominios de la proteína de FVIII de las mutaciones de cambio de aminoácido sin sentido que desarrollaron inhibidor.

Frente a estas mutaciones de alto riesgo como son las grandes deleciones o las mutaciones sin sentido, las mutaciones de cambio de aminoácido "missense" representan un menor riesgo (<10%) (Eckhardt. Blood 2013). Suponen las mutaciones más prevalentes en hemofilia A y son responsables de todas las severidades de la enfermedad, dependiendo de la localización de la mutación. Los pacientes con este tipo de mutaciones son tolerantes a su propio factor alterado y expresan un FVIII completo con el cambio de aminoácido correspondiente, que es secretado de forma variable y/o disfuncionante según la naturaleza y localización del residuo mutante, pero con una diferencia del FVIII terapéutico de solamente un aminoácido (Peerlinck et al., 1999). A pesar de la descripción de unas 1000 mutaciones de este tipo únicamente se han identificado unas 80 de estas mutaciones en pacientes con inhibidor, aunque con un subgrupo de un alto riesgo. Algunas mutaciones específicas, localizadas en el dominio A2 de la cadena pesada y en los dominios A3, C1 y C2 de la cadena ligera del FVIII, se han asociado con un alto riesgo de desarrollo de inhibidor. El estudio de una amplia cohorte de pacientes (n: 895) con hemofilia A leve-moderada y mutaciones puntuales de cambio de aminoácido "missense" del grupo de estudio INSIGHT mostró 19 mutaciones (p.Leu431Phe, p.Arg550Cys, p.Arg612Cys,

p.Asn637Ser, p.Pro1780Gln, p.Phe1794Val, p.Arg1800Gly, p.Pro1873Leu, p.Arg2016Trp, p.Asp2093Gly, p.Phe2120Cys, p.Tyr2124Cys, p.Arg2169His, p.Arg2178Cys, p.Glu2247Asp, p.Trp2248Cys, p.Val2251Ala, p.His2328Asp, Stop2352Cys) asociadas a mayor riesgo de inhibidor. Las más prevalentes fueron p.Arg612Cys (9%), p.Arg2169His (5%), p.Asn637Ser (5%), and p.Arg550Cys (3%) (Eckhardt et al., 2013).

En nuestra serie 15 pacientes de los 437 con mutaciones puntuales de cambio de aminoácido "missense" desarrollaron inhibidor (3,4%) (fig. 35). Resultados similares se recogen en la literatura; en la serie de Olderburg, con 912 pacientes un 5% con este tipo de mutación desarrollaron inhibidor y Gouw et al., comunicaron una incidencia acumulada de inhibidor en pacientes con mutaciones puntuales de cambio de aminoácido del 6%. Se considera que mutaciones localizadas en los exones 4, 14, 16, 18, 24 y 25 se asocian a mayor riesgo de formación de inhibidor (David, Santos, Johnson, Tuddenham, & McVey, 2003; S. C. Gouw et al., 2011).

La mayoría de estas mutaciones se localizaron en la cadena ligera (dominios A3, C1 y C2) como también se ha reflejado en la literatura que establece una asociación de mutaciones en la cadena ligera e inhibidor del 12% frente a un 3,9% si se localiza en la cadena pesada (A. C. Goodeve & Peake, 2003). Estas mutaciones en pacientes con hemofilia A leve-moderada se localizan alrededor de los residuos 482-501 del dominio A2 y en la unión de los dominios C1-C2 (Peerlinck & Jacquemin, 2006).

La mutación p.Arg2169His localizada en el exón 23 del dominio C1 origina el mayor número de inhibidores de este grupo (54%). En la base de datos internacional esta mutación presenta inhibidor en el 25,6% (25/70), mientras en nuestro registro 15% (9/60) desarrollaron inhibidor.

Para la mutación p.Trp2248Cys en el dominio C2, se menciona la presencia de inhibidor en el 32,1% (9/28) de los casos de la base de datos internacional. Los dos pacientes con esta mutación de nuestro registro, uno leve y otro moderado, desarrollaron inhibidor.

Otra de las mutaciones asociada a mayor riesgo de formación de inhibidor es la p.Arg612Cys en el dominio A2. Un 15,4% (17/110) de las entradas de la base internacional desarrollaron inhibidor. En la serie de Hay et al. esta asociación fue del 14% (7/49) (Bril et al., 2004). En nuestro registro sólo un paciente de los 64 incluidos desarrolló inhibidor. Esta baja incidencia puede ser explicada en base a que la gran mayoría de estos pacientes han sido tratados con desmopresina, sin necesidad de administrar concentrados de FVIII, minimizando con ello el riesgo de desarrollo de inhibidor.

El alto riesgo de formación de inhibidor en este tipo de mutaciones sugiere que esta parte de la molécula de FVIII es especialmente inmunógena. Algunos de estos pacientes con hemofilia leve mostraron valores residuales de FVIII (9%) al mismo tiempo que presentaban un nivel elevado de

inhibidor. Estudios más detallados revelaron que el anticuerpo neutralizaba el FVIII transfundido pero no el endógeno, especulándose con la posibilidad de que el anticuerpo esté dirigido contra un epítipo normal del FVIII, carente en la molécula alterada, y que produciría una respuesta antigénica al epítipo desconocido del FVIII transfundido (R. d’Oiron, Pipe, & Jacquemin, 2008).

La zona de unión de los dominios C1/C2 es especialmente inmunógena, quizás por localizarse allí la unión al FvW y a los fosfolípidos de membrana. Cualquier cambio molecular puede afectar a la estructura tridimensional y alterar la inmunogenicidad, lo que apoyaría la observación de que la incidencia de inhibidor en las mutaciones de cambio de aminoácido missense dependen más de su localización que de la severidad del fenotipo del paciente.

Para determinar por qué algunas de estas mutaciones localizadas en los dominios mencionados están más frecuentemente asociadas a inhibidores, se ha analizado el FVIII producido por pacientes con hemofilia A leve/moderada mostrando que mutaciones en los residuos Arg512, Arg2169, Arg2168 o Ala 2220 eliminan epítipos del FVIII reconocidos por anticuerpos monoclonales inhibitorios (Roseline d’Oiron et al., 2004; Jacquemin, Benhida, et al., 2000).



Fig 35. Localización de las mutaciones de cambio de aminoácido “missense” en los dominios de la proteína FVIII que desarrollaron inhibidor.

Las mutaciones puntuales en la zona donde tiene lugar el procesamiento de ARN tienen una baja proporción de inhibidor, atribuido al procesamiento de pequeñas cantidades de moléculas de una forma normal. La recopilación de datos en la base internacional, mostró que de 54 pacientes con este tipo de alteración sólo un 2,2% presentó inhibidor (A. Goodeve, 2003). Ninguno de los 18 pacientes incluidos (5 graves, 2 moderados y 11 leves) en nuestra serie desarrolló inhibidor. Sin embargo, se han comunicado resultados opuestos en una serie de 664 hemofílicos graves; entre los 25 pacientes con esta mutación, 11 (44%) desarrollaron inhibidor, atribuido a la completa pérdida de transcripción del FVIII (Boekhorst et al., 2008). La variabilidad en los resultados podría atribuirse al pequeño tamaño de las series.

5.4. Portadoras de Hemofilia

El estudio de la mutación responsable de la hemofilia en los familiares del paciente y especialmente en las posibles portadoras se realiza de forma rápida y con total garantía cuando se conoce dicha mutación. La identificación de las mujeres portadoras tiene una doble implicación, por un lado el cuidado de la salud de las pacientes y por otro, la relacionada con su descendencia. Las portadoras de hemofilia con frecuencia están libres de sintomatología hemorrágica a lo largo de la vida, aunque el sangrado menstrual excesivo con frecuencia está presente (Shankar, Chi, & Kadir, 2008). Sin embargo, la inactivación al azar de un cromosoma X en portadoras puede determinar un nivel de factor significativamente más bajo, comparable al de varones con hemofilia leve (Lyon, 2002). En el caso de portadoras con FVIII reducido tienen una mayor tendencia hemorrágica especialmente en situaciones de estrés hemostático como las cirugías (Paroskie, Gailani, DeBaun, & Sidonio, 2015; Plug et al., 2006). Incluso considerando portadoras con niveles de FVIII normales se ha comunicado una mayor tendencia hemorrágica medida por el índice de Tosetto (Tosetto, Castaman, & Rodeghiero, 2013), cuando se compara con la población general. Los datos sobre calidad de vida en portadoras indican que tienen peores resultados que las mujeres no portadoras, especialmente en áreas relacionadas con el dolor y salud general (Gilbert, Paroskie, Gailani, Debaun, & Sidonio, 2015).

En el plano emocional también se han constatado limitaciones en las portadoras de hemofilia. La concienciación y formación de las portadoras de hemofilia gira en torno a su carácter de transmisoras y cuidadoras de pacientes con hemofilia.

Una encuesta realizada a un total de 105 portadoras y familiares puso de manifiesto que la gran mayoría de las portadoras se estudiaron con el objeto de definir su estado, en referencia a su faceta de futura madre que transmite una enfermedad y no para detectar trastornos de la hemostasia, que pudieran generarle a ella problemas como paciente. Otro dato fue que la razón para acudir al hospital se basaba en su rol de colaboración en el manejo del tratamiento de sus hijos o hermanos, y en menor medida como pacientes de una patología (Dunn, Miller, Griffioen, & Lee, 2008). El sentimiento de culpa es el gran protagonista de la mayoría de las relaciones de las portadoras con sus hijos al que se suma el estrés de la cuidadora crónica, aspecto éste muy reconocido desde hace años (Street, Ljung, & Lavery, 2008).

La identificación del estatus de portadora es fundamental a la hora de ofrecer un consejo genético adecuado.

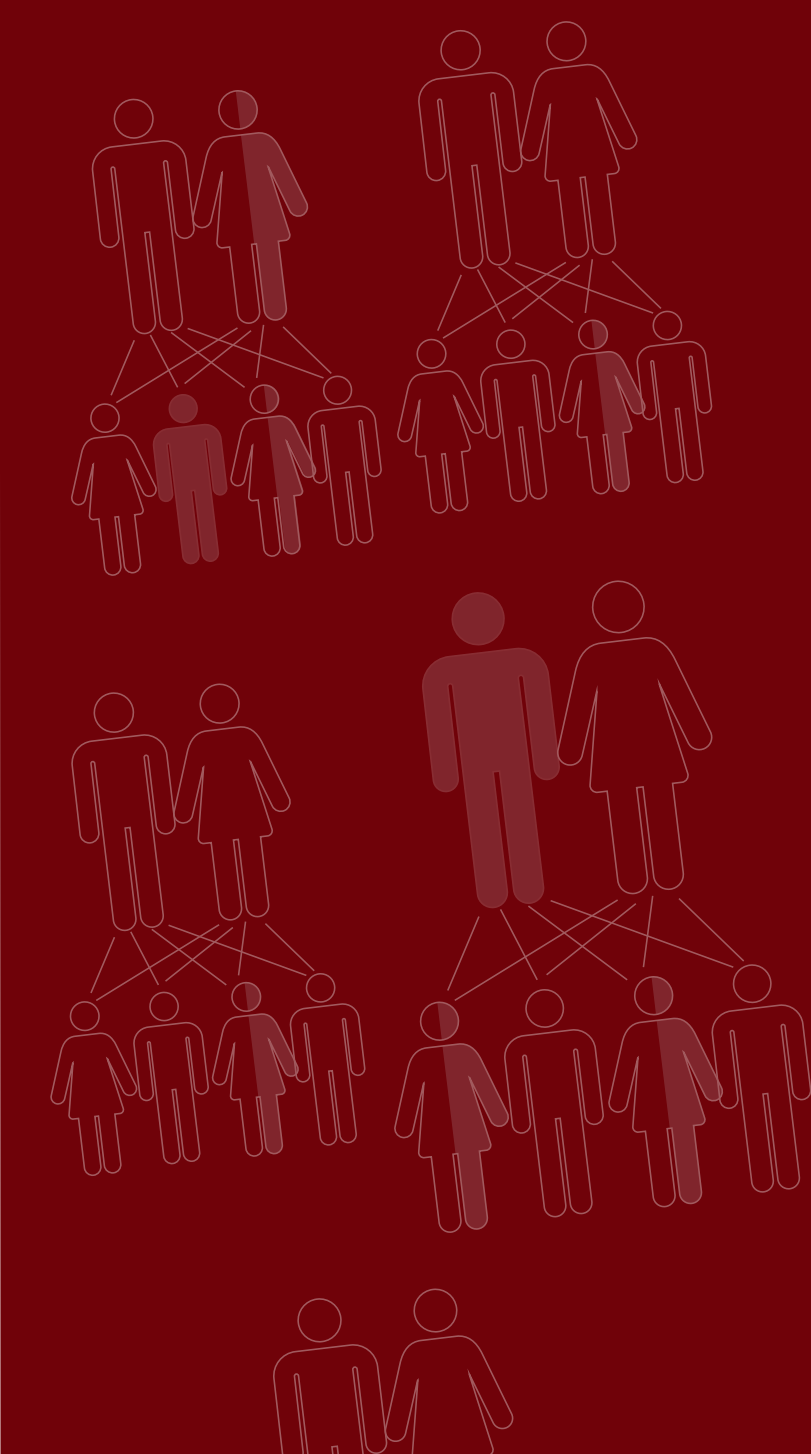
En nuestra serie se identificaron 802 portadoras en las 335 familias registradas. Entre ellas, 381 pertenecían a familias graves/moderadas. Esta información permite elegir a las parejas con hemofilia entre las distintas opciones reproductivas disponibles en la actualidad. En Andalucía la Guía de Reproducción Humana Asistida en el Sistema Andaluz de Salud regula los aspectos relacionados con la descendencia (Servicio de Andaluz Salud. Consejería de Salud. Junta de Andalucía, 2015).

Entre las mujeres estudiadas como portadoras, identificamos una portadora homocigota con la mutación p.Ala1843Thr (familia A-259). En la base de datos internacional solo se describen otros dos pacientes con esta característica, una comunicada por el hospital La Fe de Valencia y otra por un centro desconocido, con un nivel de FVIII cercano al 30%. En estas pacientes, al tener los dos cromosomas X afectados con la mutación implica que todos sus hijos serán hemofílicos y todas sus hijas portadoras. En nuestra paciente el árbol genealógico reveló que procedía de la provincia de Jaén y sus antepasados familiares afectados eran originarios de un mismo pueblo y de su pedanía. Estos datos favorecerían la idea de un ancestro común para esta mutación. La perpetuación de una mutación a lo largo de generaciones se suele asociar con mutaciones que dan fenotipo leve (Fernández-López et al., 2005).

En nuestro registro otra portadora identificada con la Inv22 (familia A-142) formó pareja con un hemofílico (familia A-37) que presentaba la misma mutación. Para tener descendencia libre de enfermedad esta pareja optó por el método de diagnóstico genético preimplantacional (DPG) que les permitió la gestación de un hijo libre de hemofilia.

El DGP permite el análisis genético a preembriones obtenidos por técnicas de fecundación in vitro antes de ser transferidos al útero, lo que posibilita seleccionar aquellos libres de carga genética asociada a hemofilia. Este procedimiento combina la fecundación in vitro (FIV) mediante técnica de microinyección espermática (ICSI) y el diagnóstico genético por hibridación in situ. El diagnóstico genético se realiza mediante biopsia embrionaria en uno o dos blastómeros del embrión en estadio de 6-8 células, aproximadamente en el día 3 del desarrollo embrionario. El porcentaje de "seguridad" diagnóstica es del 99%, aunque se recomienda el diagnóstico prenatal posterior. La eficacia global del DGP depende del número de embriones disponibles, siendo la tasa de recién nacidos alrededor del 15%. El primer nacimiento de un niño hemofílico libre de la mutación familiar por esta técnica se publicó en el año 2006, en una portadora con la mutación p.Arg1708Cys (p.R1689C) del F8 (Michaelides, Tuddenham, Turner, Lavender, & Lavery, 2006). Diferentes centros han desarrollado el DGP en hemofilia (Fiorentino et al., 2006; Gutiérrez-Mateo et al., 2009; Sánchez-García et al., 2006; Tomi et al., 2005).

El hospital Universitario Virgen del Rocío es el centro de referencia para esta técnica en nuestra comunidad. En nuestra serie 30 parejas se sometieron a este procedimiento con un total de 51 ciclos con el resultado de 10 niños sanos nacidos de 9 parejas (Fernández et al., 2015).



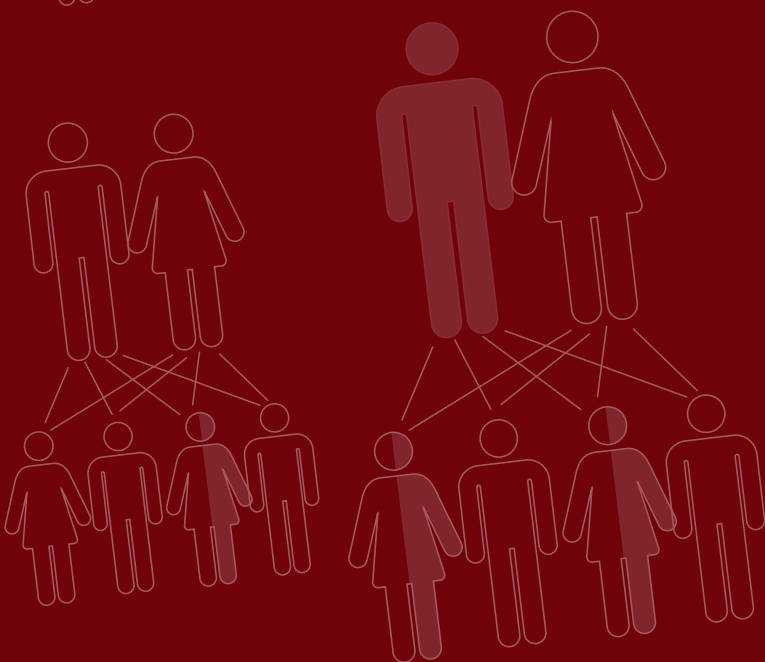
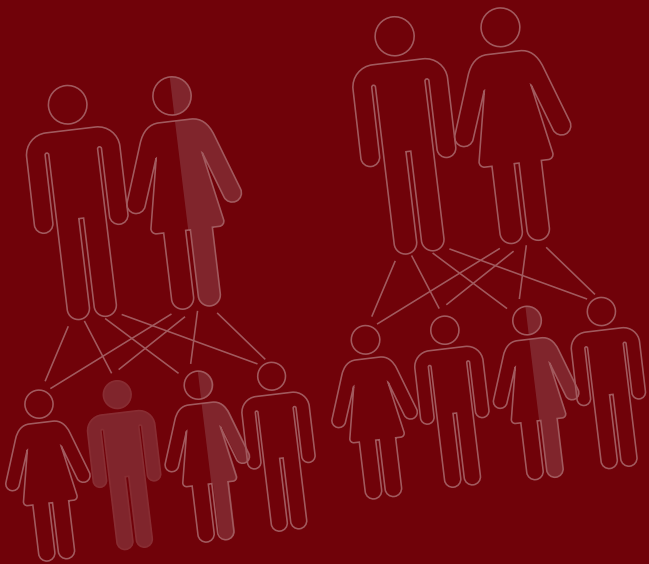
6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1. Las mutaciones identificadas en los pacientes con hemofilia A en Andalucía mostraron un espectro similar al descrito en otras poblaciones. Se encontraron 116 mutaciones diferentes en 319 familias no relacionadas con un total de 586 pacientes, detectándose un alto grado de heterogeneidad. De ellas, 21 mutaciones (6,2%) no se encontraron descritas previamente. En hemofilia A grave la mutación más prevalente fue la Inv22, mientras que en hemofilia A moderada y leve predominaron las mutaciones puntuales por cambio de aminoácido missense.
2. Determinadas mutaciones de cambio de aminoácido "missense" presentan fenotipos variables incluso dentro de una misma familia.
3. Se identificaron 802 portadoras, 280 en familias con hemofilia A grave, 101 en moderadas y 421 en leves. En un caso de hemofilia A leve una mujer mostró la mutación en homocigosis.
4. En las 146 familias con hemofilia A leve, 16 (10,9%) presentaron mutaciones asociadas a discrepancias en la medición del FVIII, de las cuales 10 casos (6,8%) fueron de tipo 1 y 6 (4,1%) de tipo 2.
5. En hemofilia grave presentaron inhibidor el 13,5% de los pacientes, 8,9% en los casos con Inv22, 20% en las mutaciones sin sentido y en el 100% de las grandes deleciones. En hemofilia moderada y leve la formación de inhibidor fue menor, en un 3,4% de los pacientes, mientras que una mutación específica p.Arg2169His alcanzó un 15%.
6. El algoritmo de análisis para el diagnóstico molecular de las familias con hemofilia A en Andalucía permitió identificar la mutación en el 95,4% de los pacientes estudiados.



7. BIBLIOGRAFÍA



7. BIBLIOGRAFÍA

1. Adzhubei, I., Jordan D. M., & Sunyaev S. R. (2013). Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2. *Current Protocols in Human Genetics / Editorial Board, Jonathan L. Haines ... [et Al.]*, Chapter 7, Unit 7.20.
2. Aggeler, P. M., White, S. G., Glendening, M. B., Page, E. W., Leake, T. B., & Bates, G. (1952). Plasma thromboplastin component (PTC) deficiency; a new disease resembling hemophilia. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)*, 79(4), 692–694.
3. Alcalay, M., & Deplas, A. (2002). Rheumatological management of patients with hemophilia. Part II: Muscle hematomas and pseudotumors. *Joint, Bone, Spine: Revue Du Rhumatisme*, 69(6), 556–559.
4. Alcántara Ortigoza MA. (2012). Aspectos clínicos y moleculares de la hemofilia tipo A. *Genética clínica. El Manual Moderno*.
5. Andrikovics, H., Klein, I., Bors, A., Nemes, L., Marosi, A., Várdai, A., & Tordai, A. (2003). Analysis of large structural changes of the factor VIII gene, involving intron 1 and 22, in severe hemophilia A. *Haematologica*, 88(7), 778–784.
6. Aznar, J. A., Lucía, F., Abad-Franch, L., Jiménez-Yuste, V., Pérez, R., Batlle, J., ... Cortina, V. R. (2009). Haemophilia in Spain. *Haemophilia: The Official Journal of the World Federation of Hemophilia*, 15(3), 665–675.
7. Bach, J. E., Wolf, B., Oldenburg, J., Müller, C. R., & Rost, S. (2015). Identification of deep intronic variants in 15 haemophilia A patients by next generation sequencing of the whole factor VIII gene. *Thrombosis and Haemostasis*, 114(4), 757–767.
8. Bagnall, R. D., Waseem, N., Green, P. M., & Giannelli, F. (2002). Recurrent inversion breaking intron 1 of the factor VIII gene is a frequent cause of severe hemophilia A. *Blood*, 99(1), 168–174.
9. Barrowcliffe, T. W., Raut, S., Sands, D., & Hubbard, A. R. (2002). Coagulation and chromogenic assays of factor VIII activity: general aspects, standardization, and recommendations. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 28(3), 247–256.

10. Becker, J., Schwaab, R., Möller-Taube, A., Schwaab, U., Schmidt, W., Brackmann, H. H., ... Oldenburg, J. (1996). Characterization of the factor VIII defect in 147 patients with sporadic hemophilia A: family studies indicate a mutation type-dependent sex ratio of mutation frequencies. *American Journal of Human Genetics*, 58(4), 657–670.
11. Biggs, R., Douglas, A. S., Macfarlane, R. G., Dacie, J. V., Pitney, W. R., & Merskey, null. (1952). Christmas disease: a condition previously mistaken for haemophilia. *British Medical Journal*, 2(4799), 1378–1382.
12. Blanchette, V. S., Key, N. S., Ljung, L. R., Manco-Johnson, M. J., van den Berg, H. M., Srivastava, A., & Subcommittee on Factor VIII, Factor IX and Rare Coagulation Disorders of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Hemostasis. (2014). Definitions in hemophilia: communication from the SSC of the ISTH. *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH*, 12(11), 1935–1939.
13. Boekhorst, J., Lari, G. R., D'Oiron, R., Costa, J. M., Nováková, I. R. O., Ala, F. A., ... VAN Heerde, W. L. (2008). Factor VIII genotype and inhibitor development in patients with haemophilia A: highest risk in patients with splice site mutations. *Haemophilia: The Official Journal of the World Federation of Hemophilia*, 14(4), 729–735.
14. Bogdanova, N., Markoff, A., Eisert, R., Wermes, C., Pollmann, H., Todorova, A., ... Horst, J. (2007). Spectrum of molecular defects and mutation detection rate in patients with mild and moderate hemophilia A. *Human Mutation*, 28(1), 54–60.
15. Bogdanova, N., Markoff, A., Pollmann, H., Nowak-Göttl, U., Eisert, R., Dworniczak, B., ... Horst, J. (2002). Prevalence of small rearrangements in the factor VIII gene F8C among patients with severe hemophilia A. *Human Mutation*, 20(3), 236–237.
16. Bolton-Maggs, P. H. B., & Pasi, K. J. (2003). Haemophilias A and B. *Lancet (London, England)*, 361(9371), 1801–1809.
17. Bottema, C. D., Ketterling, R. P., Vielhaber, E., Yoon, H. S., Gostout, B., Jacobson, D. P., ... Sommer, S. S. (1993). The pattern of spontaneous germ-line mutation: relative rates of mutation at or near CpG dinucleotides in the factor IX gene. *Human Genetics*, 91(5), 496–503.
18. Bowyer, A., Kitchen, S., & Makris, M. (2011). The responsiveness of different APTT reagents to mild factor VIII, IX and XI deficiencies. *International Journal of Laboratory Hematology*, 33(2), 154–158.
19. Brackmann, H. H. (1984). Induced immunotolerance in factor VIII inhibitor patients. *Progress in Clinical and Biological Research*, 150, 181–195.
20. Briët, E., Bertina, R. M., van Tilburg, N. H., & Veltkamp, J. J. (1982). Hemophilia B Leyden: a sex-linked hereditary disorder that improves after puberty. *The New England Journal of Medicine*, 306(13), 788–790.

21. Bril, W. S., MacLean, P. E., Kaijen, P. H. P., van den Brink, E. N., Lardy, N. M., Fijnvandraat, K., ... Voorberg, J. (2004). HLA class II genotype and factor VIII inhibitors in mild haemophilia A patients with an Arg593 to Cys mutation. *Haemophilia: The Official Journal of the World Federation of Hemophilia*, 10(5), 509–514.
22. Carcao, M. (2014). Changing paradigm of prophylaxis with longer acting factor concentrates. *Haemophilia: The Official Journal of the World Federation of Hemophilia*, 20 Suppl 4, 99–105.
23. Carcao, M. D., van den Berg, H. M., Ljung, R., Mancuso, M. E., & PedNet and the Rodin Study Group. (2013). Correlation between phenotype and genotype in a large unselected cohort of children with severe hemophilia A. *Blood*, 121(19), 3946–3952, S1.
24. Castaldo, G., D'Argenio, V., Nardiello, P., Zarrilli, F., Sanna, V., Rocino, A., ... Salvatore, F. (2007). Haemophilia A: molecular insights. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 45(4), 450–461.
25. Castaman, G., & Fijnvandraat, K. (2014). Molecular and clinical predictors of inhibitor risk and its prevention and treatment in mild hemophilia A. *Blood*, 124(15), 2333–2336.
26. Chipail, A., Leu, E. G., & Dragomir, C. (1965). [Klinefelter's syndrome associated with hemophilia A in an 8-year-old child]. *Pediatrics*, 14(5), 461–465.
27. Choo, K. H., Gould, K. G., Rees, D. J., & Brownlee, G. G. (1982). Molecular cloning of the gene for human anti-haemophilic factor IX. *Nature*, 299(5879), 178–180.
28. Cid, A. R., Calabuig, M., Cortina, V., Casaña, P., Haya, S., Moret, A., ... Aznar, J. A. (2008). One-stage and chromogenic FVIII:C assay discrepancy in mild haemophilia A and the relationship with the mutation and bleeding phenotype. *Haemophilia: The Official Journal of the World Federation of Hemophilia*, 14(5), 1049–1054.
29. Collins, P. W., Chalmers, E., Hart, D. P., Liesner, R., Rangarajan, S., Talks, K., ... UK Haemophilia Centre Doctors. (2013). Diagnosis and treatment of factor VIII and IX inhibitors in congenital haemophilia: (4th edition). UK Haemophilia Centre Doctors Organization. *British Journal of Haematology*, 160(2), 153–170.
30. Crossley, M., Winship, P. R., Austen, D. E., Rizza, C. R., & Brownlee, G. G. (1990). A less severe form of Haemophilia B Leyden. *Nucleic Acids Research*, 18(15), 4633.
31. d'Oiron, R., Lavergne, J.-M., Lavend'homme, R., Benhida, A., Bordet, J.-C., Negrier, C., ... Jacquemin, M. (2004). Deletion of alanine 2201 in the FVIII C2 domain results in mild hemophilia A by impairing FVIII binding to VWF and phospholipids and destroys a major FVIII antigenic determinant involved in inhibitor development. *Blood*, 103(1), 155–157.
32. d'Oiron, R., Pipe, S. W., & Jacquemin, M. (2008). Mild/moderate haemophilia A: new insights into molecular mechanisms and inhibitor development. *Haemophilia: The Official Journal of the World Federation of Hemophilia*, 14 Suppl 3, 138–146.

33. David, D., Moreira, I., Lalloz, M. R., Rosa, H. A., Schwaab, R., Morais, S., ... Lavinha, J. (1994). Analysis of the essential sequences of the factor VIII gene in twelve haemophilia A patients by single-stranded conformation polymorphism. *Blood Coagulation & Fibrinolysis: An International Journal in Haemostasis and Thrombosis*, 5(2), 257–264.
34. David, D., Santos, I. M. A., Johnson, K., Tuddenham, E. G. D., & McVey, J. H. (2003). Analysis of the consequences of premature termination codons within factor VIII coding sequences. *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH*, 1(1), 139–146.
35. Duncan, E. M., Duncan, B. M., Tunbridge, L. J., & Lloyd, J. V. (1994). Familial discrepancy between the one-stage and two-stage factor VIII methods in a subgroup of patients with haemophilia A. *British Journal of Haematology*, 87(4), 846–848.
36. Dunn, N. F., Miller, R., Griffioen, A., & Lee, C. A. (2008). Carrier testing in haemophilia A and B: adult carriers' and their partners' experiences and their views on the testing of young females. *Haemophilia: The Official Journal of the World Federation of Hemophilia*, 14(3), 584–592.
37. Eckhardt, C. L., van Velzen, A. S., Peters, M., Astermark, J., Brons, P. P., Castaman, G., ... INSIGHT Study Group. (2013). Factor VIII gene (F8) mutation and risk of inhibitor development in nonsevere hemophilia A. *Blood*, 122(11), 1954–1962.
38. Elmahmoudi, H., Khodjet-el-khil, H., Wigren, E., Jlizi, A., Zahra, K., Pellechia, D., ... Gouider, E. (2012). First report of molecular diagnosis of Tunisian hemophiliacs A: identification of 8 novel causative mutations. *Diagnostic Pathology*, 7, 93.
39. Evatt, B. L., Black, C., Batorova, A., Street, A., & Srivastava, A. (2004). Comprehensive care for haemophilia around the world. *Haemophilia: The Official Journal of the World Federation of Hemophilia*, 10 Suppl 4, 9–13.
40. Fay, P. J., & Jenkins, P. V. (2005). Mutating factor VIII: lessons from structure to function. *Blood Reviews*, 19(1), 15–27.
41. Fernández, R. M., Peciña, A., Sánchez, B., Lozano-Arana, M. D., García-Lozano, J. C., Pérez-Garrido, R., ... Antiñolo, G. (2015). Experience of Preimplantation Genetic Diagnosis for Hemophilia at the University Hospital Virgen Del Rocío in Spain: Technical and Clinical Overview. *BioMed Research International*, 2015, 406096.
42. Fernández O. (2008). Caracterización de las alteraciones genéticas en la población de hemofílicos de Andalucía. Sevilla.
43. Fernandez O, JR, G.-L., Núñez R, & Pérez R. (2007). A founder factor VIII mutation, P.S1791P, In individuals of the gypsy ethnic group. Presented at the European Society for Paediatric Haematology and Immunology (ESPHI), Atenas.

44. Fernández-López, O., García-Lozano, J.-R., Núñez-Vázquez, R., Pérez-Garrido, R., & Núñez-Roldán, A. (2005). The spectrum of mutations in Southern Spanish patients with hemophilia A and identification of 28 novel mutations. *Haematologica*, 90(5), 707–710.
45. Fiorentino, F., Biricik, A., Nuccitelli, A., De Palma, R., Kahraman, S., Iacobelli, M., ... Baldi, M. (2006). Strategies and clinical outcome of 250 cycles of Preimplantation Genetic Diagnosis for single gene disorders. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 21(3), 670–684.
46. Franchini, M., Zaffanello, M., & Lippi, G. (2010). The use of desmopressin in mild hemophilia A. *Blood Coagulation & Fibrinolysis: An International Journal in Haemostasis and Thrombosis*, 21(7), 615–619.
47. Funnell, A. P. W., & Crossley, M. (2014). Hemophilia B Leyden and once mysterious cis-regulatory mutations. *Trends in Genetics: TIG*, 30(1), 18–23.
48. George, J. N. (2000). Platelets. *Lancet (London, England)*, 355(9214), 1531–1539.
49. Ghosh, K., & Shetty, S. (2009). Immune response to FVIII in hemophilia A: an overview of risk factors. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 37(2), 58–66.
50. Gilbert, L., Paroskie, A., Gailani, D., Debaun, M. R., & Sidonio, R. F. (2015). Haemophilia A carriers experience reduced health-related quality of life. *Haemophilia: The Official Journal of the World Federation of Hemophilia*, 21(6), 761–765.
51. Gitschier, J., Wood, W. I., Goralka, T. M., Wion, K. L., Chen, E. Y., Eaton, D. H., ... Lawn, R. M. (1984). Characterization of the human factor VIII gene. *Nature*, 312(5992), 326–330.
52. Goodeve, A. (2003). The incidence of inhibitor development according to specific mutations--and treatment? *Blood Coagulation & Fibrinolysis: An International Journal in Haemostasis and Thrombosis*, 14 Suppl 1, S17-21.
53. Goodeve, A. (2008). Molecular genetic testing of hemophilia A. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 34(6), 491–501.
54. Goodeve, A. C., & Peake, I. R. (2003). The molecular basis of hemophilia A: genotype-phenotype relationships and inhibitor development. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 29(1), 23–30.
55. Gouw, S. C., van den Berg, H. M., Oldenburg, J., Astermark, J., de Groot, P. G., Margaglione, M., ... van der Bom, J. G. (2012). F8 gene mutation type and inhibitor development in patients with severe hemophilia A: systematic review and meta-analysis. *Blood*, 119(12), 2922–2934.

56. Gouw, S. C., Van Der Bom, J. G., Van Den Berg, H. M., Zewald, R. A., Ploos Van Amstel, J. K., & Mauser-Bunschoten, E. P. (2011). Influence of the type of F8 gene mutation on inhibitor development in a single centre cohort of severe haemophilia A patients. *Haemophilia: The Official Journal of the World Federation of Hemophilia*, 17(2), 275–281.
57. Green, P. M., Bagnall, R. D., Waseem, N. H., & Giannelli, F. (2008). Haemophilia A mutations in the UK: results of screening one-third of the population. *British Journal of Haematology*, 143(1), 115–128.
58. Gringeri, A., Mantovani, L. G., Scalone, L., Mannucci, P. M., & COCIS Study Group. (2003). Cost of care and quality of life for patients with hemophilia complicated by inhibitors: the COCIS Study Group. *Blood*, 102(7), 2358–2363.
59. Gutiérrez-Mateo, C., Sánchez-García, J. F., Fischer, J., Tormasi, S., Cohen, J., Munné, S., & Wells, D. (2009). Preimplantation genetic diagnosis of single-gene disorders: experience with more than 200 cycles conducted by a reference laboratory in the United States. *Fertility and Sterility*, 92(5), 1544–1556.
60. Hartmann, J., & Croteau, S. E. (2016). 2017 Clinical trials update: Innovations in hemophilia therapy. *American Journal of Hematology*, 91(12), 1252–1260.
61. Hay, C. R. M. (2006). The epidemiology of factor VIII inhibitors. *Haemophilia: The Official Journal of the World Federation of Hemophilia*, 12 Suppl 6, 23-28-29.
62. Hill, M., Deam, S., Gordon, B., & Dolan, G. (2005). Mutation analysis in 51 patients with haemophilia A: report of 10 novel mutations and correlations between genotype and clinical phenotype. *Haemophilia: The Official Journal of the World Federation of Hemophilia*, 11(2), 133–141.
63. Hindson, B. J., Ness, K. D., Masquelier, D. A., Belgrader, P., Heredia, N. J., Makarewicz, A. J., ... Colston, B. W. (2011). High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Analytical Chemistry*, 83(22), 8604–8610.
64. Hodgkinson, A., & Eyre-Walker, A. (2011). Variation in the mutation rate across mammalian genomes. *Nature Reviews. Genetics*, 12(11), 756–766.
65. Hoffman, M., & Monroe, D. M. (2001). A cell-based model of hemostasis. *Thrombosis and Haemostasis*, 85(6), 958–965.
66. Hollestelle, M. J., Thinnes, T., Crain, K., Stiko, A., Kruijt, J. K., van Berkel, T. J., ... van Mourik, J. A. (2001). Tissue distribution of factor VIII gene expression in vivo--a closer look. *Thrombosis and Haemostasis*, 86(3), 855–861.
67. Hopff F. (1823). *Ubre die haemophilie order die erbliche Anlage zu tödliche blutungen*. Zurich.

68. Hua, B., Yan, Z., Liang, Y., Yan, M., Fan, L., Li, K., ... Zhao, Y. (2010). Identification of seven novel mutations in the factor VIII gene in 18 unrelated Chinese patients with hemophilia A. *Chinese Medical Journal*, 123(3), 305–310.
69. Ingram, G. I. (1976). The history of haemophilia. *Journal of Clinical Pathology*, 29(6), 469–479.
70. Jacquemin, M., Benhida, A., Peerlinck, K., Desqueper, B., Vander Elst, L., Lavend'homme, R., ... Saint-Remy, J. M. (2000). A human antibody directed to the factor VIII C1 domain inhibits factor VIII cofactor activity and binding to von Willebrand factor. *Blood*, 95(1), 156–163.
71. Jacquemin, M., Lavend'homme, R., Benhida, A., Vanzielegheem, B., d'Oiron, R., Lavergne, J. M., ... Saint-Remy, J. M. (2000). A novel cause of mild/moderate hemophilia A: mutations scattered in the factor VIII C1 domain reduce factor VIII binding to von Willebrand factor. *Blood*, 96(3), 958–965.
72. Kasper, C. K., & Buzin, C. H. (2009). Mosaics and haemophilia. *Haemophilia: The Official Journal of the World Federation of Hemophilia*, 15(6), 1181–1186.
73. Kasper, C. K., & Lin, J. C. (2007). Prevalence of sporadic and familial haemophilia. *Haemophilia: The Official Journal of the World Federation of Hemophilia*, 13(1), 90–92.
74. Kaufman RJ, Antonorakis SE, & Fay PJ. (2006). In *Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice*, 5th edition. (pp. 151–175). Lippincott Williams and Wilkins.
75. Keeling, D. M., Sukhu, K., Kemball-Cook, G., Waseem, N., Bagnall, R., & Lloyd, J. V. (1999). Diagnostic importance of the two-stage factor VIII:C assay demonstrated by a case of mild haemophilia associated with His1954-->Leu substitution in the factor VIII A3 domain. *British Journal of Haematology*, 105(4), 1123–1126.
76. Kemball-Cook, G., Tuddenham, E. G., & Wacey, A. I. (1998). The factor VIII Structure and Mutation Resource Site: HAMSTeRS version 4. *Nucleic Acids Research*, 26(1), 216–219.
77. Kemball-Cook G, and Gomez K. (2010). Molecular basis of hemophilia A. In Lee CA, Bern-top EE, Hoots WK. (Ed.), *Textbook oh Hemophilia* (2nd ed, pp. 24–32). Wiley-Blackwell.
78. Kempton, C. L., Soucie, J. M., Miller, C. H., Hooper, C., Escobar, M. A., Cohen, A. J., ... Abshire, T. C. (2010). In non-severe hemophilia A the risk of inhibitor after intensive factor treatment is greater in older patients: a case-control study. *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH*, 8(10), 2224–2231.
79. Klein, H. G., Aledort, L. M., Bouma, B. N., Hoyer, L. W., Zimmerman, T. S., & DeMets, D. L. (1977). A co-operative study for the detection of the carrier state of classic hemophilia. *The New England Journal of Medicine*, 296(17), 959–962.

80. Klopp, N., Oldenburg, J., Uen, C., Schneppenheim, R., & Graw, J. (2002). 11 hemophilia A patients without mutations in the factor VIII encoding gene. *Thrombosis and Haemostasis*, 88(2), 357–360.
81. Kreuz, W., & Ettingshausen, C. E. (2014). Inhibitors in patients with haemophilia A. *Thrombosis Research*, 134 Suppl 1, S22-26.
82. Kunkel, T. A., & Alexander, P. S. (1986). The base substitution fidelity of eucaryotic DNA polymerases. Mispairing frequencies, site preferences, insertion preferences, and base substitution by dislocation. *The Journal of Biological Chemistry*, 261(1), 160–166.
83. Lakich, D., Kazazian, H. H., Antonarakis, S. E., & Gitschier, J. (1993). Inversions disrupting the factor VIII gene are a common cause of severe haemophilia A. *Nature Genetics*, 5(3), 236–241.
84. Lambing, A., Kachalsky, E., & Kuriakose, P. (2011). Liver transplantation in the haemophilia patient. *Haemophilia: The Official Journal of the World Federation of Hemophilia*, 17(5), e981-984.
85. Lannoy, N., Abinet, I., Bosmans, A., Lambert, C., Vermylen, C., & Hermans, C. (2012). Computational and molecular approaches for predicting unreported causal missense mutations in Belgian patients with haemophilia A. *Haemophilia: The Official Journal of the World Federation of Hemophilia*, 18(3), e331-339.
86. Lannoy, N., & Hermans, C. (2010). The “royal disease”--haemophilia A or B? A haematological mystery is finally solved. *Haemophilia: The Official Journal of the World Federation of Hemophilia*, 16(6), 843–847.
87. Lenting, P. J., van Mourik, J. A., & Mertens, K. (1998). The life cycle of coagulation factor VIII in view of its structure and function. *Blood*, 92(11), 3983–3996.
88. Leuer, M., Oldenburg, J., Lavergne, J. M., Ludwig, M., Fregin, A., Eigel, A., ... Olek, K. (2001). Somatic mosaicism in hemophilia A: a fairly common event. *American Journal of Human Genetics*, 69(1), 75–87.
89. Levinson, B., Kenwrick, S., Gamel, P., Fisher, K., & Gitschier, J. (1992). Evidence for a third transcript from the human factor VIII gene. *Genomics*, 14(3), 585–589.
90. Levinson, B., Kenwrick, S., Lakich, D., Hammonds, G., & Gitschier, J. (1990). A transcribed gene in an intron of the human factor VIII gene. *Genomics*, 7(1), 1–11.
91. Liu, Q., Nozari, G., & Sommer, S. S. (1998). Single-tube polymerase chain reaction for rapid diagnosis of the inversion hotspot of mutation in hemophilia A. *Blood*, 92(4), 1458–1459.
92. Ljung, R. C., & Sjörin, E. (1999). Origin of mutation in sporadic cases of haemophilia A. *British Journal of Haematology*, 106(4), 870–874.

93. Lyon, M. F. (2002). X-chromosome inactivation and human genetic disease. *Acta Paediatrica* (Oslo, Norway: 1992). Supplement, 91(439), 107–112.
94. Macfarlane, R. G. (1964). AN ENZYME CASCADE IN THE BLOOD CLOTTING MECHANISM, AND ITS FUNCTION AS A BIOCHEMICAL AMPLIFIER. *Nature*, 202, 498–499.
95. Mahlangu, J. N., Ragni, M., Gupta, N., Rangarajan, S., Klamroth, R., Oldenburg, J., ... Robinson, B. (2016). Long-acting recombinant factor VIII Fc fusion protein (rFVIII-Fc) for perioperative haemostatic management in severe haemophilia A. *Thrombosis and Haemostasis*, 116(1).
96. Manco-Johnson, M. J., Abshire, T. C., Shapiro, A. D., Riske, B., Hacker, M. R., Kilcoyne, R., ... Evatt, B. L. (2007). Prophylaxis versus episodic treatment to prevent joint disease in boys with severe hemophilia. *The New England Journal of Medicine*, 357(6), 535–544.
97. Mannucci, P. M., & Franchini, M. (2013). Is haemophilia B less severe than haemophilia A? *Haemophilia: The Official Journal of the World Federation of Hemophilia*, 19(4), 499–502.
98. Mannucci, P. M., & Tuddenham, E. G. (2001). The hemophilias--from royal genes to gene therapy. *The New England Journal of Medicine*, 344(23), 1773–1779.
99. Mantilla-Capacho, J. M., Beltrán-Miranda, C. P., Luna-Záizar, H., Aguilar-López, L., Esparza-Flores, M. A., López-Guido, B., ... Jaloma-Cruz, A. R. (2007). Frequency of intron 1 and 22 inversions of Factor VIII gene in Mexican patients with severe hemophilia A. *American Journal of Hematology*, 82(4), 283–287.
100. Margaglione, M., Castaman, G., Morfini, M., Rocino, A., Santagostino, E., Tagariello, G., ... AICE-Genetics Study Group. (2008). The Italian AICE-Genetics hemophilia A database: results and correlation with clinical phenotype. *Haematologica*, 93(5), 722–728.
101. Mårtensson, A., Ivarsson, S., Letelier, A., Manderstedt, E., Halldén, C., & Ljung, R. (2016). Origin of mutation in sporadic cases of severe haemophilia A in Sweden. *Clinical Genetics*, 90(1), 63–68.
102. Martín-Salces, M., Venceslá, A., Álvarez-Román, M. T., Rivas, I., Fernandez, I., Butta, N., ... Jiménez-Yuste, V. (2010). Clinical and genetic findings in five female patients with haemophilia A: Identification of a novel missense mutation, p.Phe2127Ser. *Thrombosis and Haemostasis*, 104(4), 718–723.
103. Matzinger, P. (2002). The danger model: a renewed sense of self. *Science* (New York, N.Y.), 296(5566), 301–305.
104. Michaelides, K., Tuddenham, E. G. D., Turner, C., Lavender, B., & Lavery, S. A. (2006). Live birth following the first mutation specific pre-implantation genetic diagnosis for haemophilia A. *Thrombosis and Haemostasis*, 95(2), 373–379.

105. Miesbach, W., Alesci, S., Krekeler, S., & Seifried, E. (2009). Age-dependent increase of FVIII:C in mild haemophilia A. *Haemophilia: The Official Journal of the World Federation of Hemophilia*, 15(5), 1022–1026.
106. Miller, C. H., Benson, J., Ellingsen, D., Driggers, J., Payne, A., Kelly, F. M., ... Hemophilia Inhibitor Research Study Investigators. (2012). F8 and F9 mutations in US haemophilia patients: correlation with history of inhibitor and race/ethnicity. *Haemophilia: The Official Journal of the World Federation of Hemophilia*, 18(3), 375–382.
107. Monroe, D. M., Hoffman, M., & Roberts, H. R. (2002). Platelets and thrombin generation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 22(9), 1381–1389.
108. Morange, P. E., Tregouet, D. A., Frere, C., Saut, N., Pellegrina, L., Alessi, M. C., ... Juhan-Vague, I. (2005). Biological and genetic factors influencing plasma factor VIII levels in a healthy family population: results from the Stanislas cohort. *British Journal of Haematology*, 128(1), 91–99.
109. Mumford, A. D., Laffan, M., O'Donnell, J., McVey, J. H., Johnson, D. J. D., Manning, R. A., & Kemball-Cook, G. (2002). A Tyr346-->Cys substitution in the interdomain acidic region a1 of factor VIII in an individual with factor VIII:C assay discrepancy. *British Journal of Haematology*, 118(2), 589–594.
110. Naylor, J. A., Buck, D., Green, P., Williamson, H., Bentley, D., & Giannelli, F. (1995). Investigation of the factor VIII intron 22 repeated region (int22h) and the associated inversion junctions. *Human Molecular Genetics*, 4(7), 1217–1224.
111. Nogami, K. (2016). Bispecific antibody mimicking factor VIII. *Thrombosis Research*, 141 Suppl 2, S34-35. [https://doi.org/10.1016/S0049-3848\(16\)30361-9](https://doi.org/10.1016/S0049-3848(16)30361-9)
112. Núñez R. (2005). Factor VIII Inhibitors in Mild Haemophilia A. Incidence in Patients with Arg2150His Mutation in South of Spain. In *Journal of Thrombosis and Haemostasis* (Vol. 3, Supplement 1, p. Abstract P0820). Sydney.
113. Núñez R, Pérez R, & García-Lozano JR. (2013). Espectro mutacional de la hemofilia A en Andalucía. Presented at the XXIX Congreso Nacional de la SETH, Sevilla.
114. Oldenburg, J., Brackmann, H. H., & Schwaab, R. (2000). Risk factors for inhibitor development in hemophilia A. *Haematologica*, 85(10 Suppl), 7-13-14.
115. Oldenburg, J., & El-Maarri, O. (2006). New insight into the molecular basis of hemophilia A. *International Journal of Hematology*, 83(2), 96–102.
116. Oldenburg, J., El-Maarri, O., & Schwaab, R. (2002). Inhibitor development in correlation to factor VIII genotypes. *Haemophilia: The Official Journal of the World Federation of Hemophilia*, 8 Suppl 2, 23–29.

117. Oldenburg, J., & Pavlova, A. (2006). Genetic risk factors for inhibitors to factors VIII and IX. *Haemophilia: The Official Journal of the World Federation of Hemophilia*, 12 Suppl 6, 15–22.
118. Oldenburg, J., & Pavlova, A. (2010). Discrepancy between one-stage and chromogenic factor VIII activity assay results can lead to misdiagnosis of haemophilia A phenotype. *Hämostaseologie*, 30(4), 207–211.
119. Oldenburg, J., Schröder, J., Brackmann, H. H., Müller-Reible, C., Schwaab, R., & Tuddenham, E. (2004). Environmental and genetic factors influencing inhibitor development. *Seminars in Hematology*, 41(1 Suppl 1), 82–88.
120. Pandey, G. S., Yanover, C., Miller-Jenkins, L. M., Garfield, S., Cole, S. A., Curran, J. E., ... PATH (Personalized Alternative Therapies for Hemophilia) Study Investigators. (2013). Endogenous factor VIII synthesis from the intron 22-inverted F8 locus may modulate the immunogenicity of replacement therapy for hemophilia A. *Nature Medicine*, 19(10), 1318–1324.
121. Paroskie, A., Gailani, D., DeBaun, M. R., & Sidonio, R. F. (2015). A cross-sectional study of bleeding phenotype in haemophilia A carriers. *British Journal of Haematology*, 170(2), 223–228.
122. Parquet-Gernez, A., Mazurier, C., & Goudemand, M. (1988). Functional and immunological assays of FVIII in 133 haemophiliacs--characterization of a subgroup of patients with mild haemophilia A and discrepancy in 1- and 2-stage assays. *Thrombosis and Haemostasis*, 59(2), 202–206.
123. Pavlova, A., Delev, D., Pezeshkpoor, B., Müller, J., & Oldenburg, J. (2014). Haemophilia A mutations in patients with non-severe phenotype associated with a discrepancy between one-stage and chromogenic factor VIII activity assays. *Thrombosis and Haemostasis*, 111(5), 851–861.
124. Pavlova, A., & Oldenburg, J. (2013). Defining severity of hemophilia: more than factor levels. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 39(7), 702–710.
125. Peerlinck, K., & Jacquemin, M. (2006). Characteristics of inhibitors in mild/moderate haemophilia A. *Haemophilia: The Official Journal of the World Federation of Hemophilia*, 12 Suppl 6, 43–47.
126. Peerlinck, K., & Jacquemin, M. (2010). Mild haemophilia: a disease with many faces and many unexpected pitfalls. *Haemophilia: The Official Journal of the World Federation of Hemophilia*, 16 Suppl 5, 100–106.

127. Peerlinck, K., Jacquemin, M. G., Arnout, J., Hoylaerts, M. F., Gilles, J. G., Lavend'homme, R., ... Vermylen, J. (1999). Antifactor VIII antibody inhibiting allogeneic but not autologous factor VIII in patients with mild hemophilia A. *Blood*, 93(7), 2267–2273.
128. Pezeshkpoor, B., Pavlova, A., Oldenburg, J., & El-Maarri, O. (2014). F8 genetic analysis strategies when standard approaches fail. *Hämostaseologie*, 34(2), 167–173.
129. Pinto, P., Ghosh, K., & Shetty, S. (2016). F8 gene mutation profile in Indian hemophilia A patients: Identification of 23 novel mutations and factor VIII inhibitor risk association. *Mutation Research*, 786, 27–33.
130. Pipe, S. W., Eickhorst, A. N., McKinley, S. H., Saenko, E. L., & Kaufman, R. J. (1999). Mild hemophilia A caused by increased rate of factor VIII A2 subunit dissociation: evidence for nonproteolytic inactivation of factor VIIIa in vivo. *Blood*, 93(1), 176–183.
131. Plug, I., Mauser-Bunschoten, E. P., Bröcker-Vriends, A. H. J. T., van Amstel, H. K. P., van der Bom, J. G., van Diemen-Homan, J. E. M., ... Rosendaal, F. R. (2006). Bleeding in carriers of hemophilia. *Blood*, 108(1), 52–56.
132. Potgieter, J. J., Damgaard, M., & Hillarp, A. (2015). One-stage vs. chromogenic assays in haemophilia A. *European Journal of Haematology*, 94 Suppl 77, 38–44.
133. Poulsen, A. L., Pedersen, L. H., Hvas, A.-M., Poulsen, L. H., Thykjaer, H., & Ingerslev, J. (2009). Assay discrepancy in mild haemophilia A: entire population study in a National Haemophilia Centre. *Haemophilia: The Official Journal of the World Federation of Hemophilia*, 15(1), 285–289.
134. Ranjan, R., Biswas, A., Meena, A., Akhter, M. S., Yadav, B. K., Ahmed, R. H., & Saxena, R. (2008). Importance of investigating somatic and germline mutations in hemophilia A: a preliminary study from All India Institute of Medical Sciences, India. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 389(1–2), 103–108.
135. Reijnen, M. J., Peerlinck, K., Maasdam, D., Bertina, R. M., & Reitsma, P. H. (1993). Hemophilia B Leyden: substitution of thymine for guanine at position -21 results in a disruption of a hepatocyte nuclear factor 4 binding site in the factor IX promoter. *Blood*, 82(1), 151–158.
136. Reitsma, P. H., Bertina, R. M., Ploos van Amstel, J. K., Riemens, A., & Briët, E. (1988). The putative factor IX gene promoter in hemophilia B Leyden. *Blood*, 72(3), 1074–1076.
137. Reitter, S., Sturn, R., Horvath, B., Freitag, R., Male, C., Muntean, W., ... Austrian Molecular Haemophilia Study Group. (2010). Spectrum of causative mutations in patients with haemophilia A in Austria. *Thrombosis and Haemostasis*, 104(1), 78–85.
138. Rick, M. E., Walsh, C. E., & Key, N. S. (2003). Congenital bleeding disorders. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program*, 559–574.

139. Roelse, J. C., De Laaf, R. T., Timmermans, S. M., Peters, M., Van Mourik, J. A., & Voorberg, J. (2000). Intracellular accumulation of factor VIII induced by missense mutations Arg593-->Cys and Asn618-->Ser explains cross-reacting material-reduced haemophilia A. *British Journal of Haematology*, 108(2), 241–246.
140. Roosendaal, G., & Lafeber, F. P. (2006). Pathogenesis of haemophilic arthropathy. *Haemophilia: The Official Journal of the World Federation of Hemophilia*, 12 Suppl 3, 117–121.
141. Rossiter, J. P., Young, M., Kimberland, M. L., Hutter, P., Ketterling, R. P., Gitschier, J., ... de Moerloose, P. (1994). Factor VIII gene inversions causing severe hemophilia A originate almost exclusively in male germ cells. *Human Molecular Genetics*, 3(7), 1035–1039.
142. Rydz, N., Natalia, R., Leggo, J., Jayne, L., Tinlin, S., Shawn, T., ... David, L. (2013). The Canadian “National Program for hemophilia mutation testing” database: a ten-year review. *American Journal of Hematology*, 88(12), 1030–1034.
143. Saenko, E. L., Shima, M., & Sarafanov, A. G. (1999). Role of activation of the coagulation factor VIII in interaction with vWf, phospholipid, and functioning within the factor Xase complex. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 9(7), 185–192.
144. Sahud, M. A. (2000). Factor VIII inhibitors. Laboratory diagnosis of inhibitors. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 26(2), 195–203.
145. Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., & Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science (New York, N.Y.)*, 230(4732), 1350–1354.
146. Salviato, R., Belvini, D., Are, A., Radossi, P., & Tagariello, G. (2002). Large FVIII gene deletion confers very high risk of inhibitor development in three related severe haemophiliacs. *Haemophilia: The Official Journal of the World Federation of Hemophilia*, 8(1), 17–21.
147. Salviato, R., Belvini, D., Radossi, P., Sartori, R., Pierobon, F., Zanotto, D., ... Tagariello, G. (2007). F8 gene mutation profile and ITT response in a cohort of Italian haemophilia A patients with inhibitors. *Haemophilia: The Official Journal of the World Federation of Hemophilia*, 13(4), 361–372.
148. Salviato, R., Belvini, D., Radossi, P., & Tagariello, G. (2004). Factor VIII gene intron 1 inversion: lower than expected prevalence in Italian haemophilic severe patients. *Haemophilia: The Official Journal of the World Federation of Hemophilia*, 10(2), 194–196.
149. Sánchez-García, J. F., Gallardo, D., Navarro, J., Márquez, C., Gris, J. M., Sánchez, M. A., ... Vidal, F. (2006). A versatile strategy for preimplantation genetic diagnosis of haemophilia A based on F8-gene sequencing. *Thrombosis and Haemostasis*, 96(6), 839–845.

150. Sánchez-García, J. F., Gallardo, D., Ramírez, L., & Vidal, F. (2005). Multiplex fluorescent analysis of four short tandem repeats for rapid haemophilia A molecular diagnosis. *Thrombosis and Haemostasis*, 94(5), 1099–1103.
151. Sanna, V., Zarrilli, F., Nardiello, P., D'Argenio, V., Rocino, A., Coppola, A., ... Castaldo, G. (2008). Mutational spectrum of F8 gene and prothrombotic gene variants in haemophilia A patients from Southern Italy. *Haemophilia: The Official Journal of the World Federation of Hemophilia*, 14(4), 796–803.
152. Santagostino, E., Mancuso, M. E., Rocino, A., Mancuso, G., Mazzucconi, M. G., Tagliaferri, A., ... Mannucci, P. M. (2005). Environmental risk factors for inhibitor development in children with haemophilia A: a case-control study. *British Journal of Haematology*, 130(3), 422–427.
153. Santagostino, E., Mancuso, M. E., Tripodi, A., Chantarangkul, V., Clerici, M., Garagiola, I., & Mannucci, P. M. (2010). Severe hemophilia with mild bleeding phenotype: molecular characterization and global coagulation profile. *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH*, 8(4), 737–743.
154. Sauna, Z. E., Lozier, J. N., Kasper, C. K., Yanover, C., Nichols, T., & Howard, T. E. (2015). The intron-22-inverted F8 locus permits factor VIII synthesis: explanation for low inhibitor risk and a role for pharmacogenomics. *Blood*, 125(2), 223–228.
155. Schwaab, R., Oldenburg, J., Schwaab, U., Johnson, D. J., Schmidt, W., Olek, K., ... Tuddenham, E. G. (1995). Characterization of mutations within the factor VIII gene of 73 unrelated mild and moderate haemophiliacs. *British Journal of Haematology*, 91(2), 458–464.
156. Sengupta, M., Sarkar, D., Ganguly, K., Sengupta, D., Bhaskar, S., & Ray, K. (2015). In silico analyses of missense mutations in coagulation factor VIII: identification of severity determinants of haemophilia A. *Haemophilia: The Official Journal of the World Federation of Hemophilia*, 21(5), 662–669.
157. Servicio de Andaluz Salud. Consejería de Salud. Junta de Andalucía. (Ed.). (2015, Diciembre). *Guía de Reproducción Humana Asistida en el Sistema Andaluz de Salud*. Retrieved from www.juntadeandalucia.es/servicioandaluzdesalud.
158. Shankar, M., Chi, C., & Kadir, R. A. (2008). Review of quality of life: menorrhagia in women with or without inherited bleeding disorders. *Haemophilia: The Official Journal of the World Federation of Hemophilia*, 14(1), 15–20.
159. Sharathkumar, A., Lillicrap, D., Blanchette, V. S., Kern, M., Leggo, J., Stain, A. M., ... Carcao, M. D. (2003). Intensive exposure to factor VIII is a risk factor for inhibitor development in mild hemophilia A. *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH*, 1(6), 1228–1236.

160. Soucie, J. M., Evatt, B., & Jackson, D. (1998). Occurrence of hemophilia in the United States. The Hemophilia Surveillance System Project Investigators. *American Journal of Hematology*, 59(4), 288–294.
161. Srivastava, A., Brewer, A. K., Mauser-Bunschoten, E. P., Key, N. S., Kitchen, S., Llinas, A., ... Treatment Guidelines Working Group on Behalf of The World Federation Of Hemophilia. (2013). Guidelines for the management of hemophilia. *Haemophilia: The Official Journal of the World Federation of Hemophilia*, 19(1), e1-47.
162. Stenson, P. D., Ball, E. V., Mort, M., Phillips, A. D., Shiel, J. A., Thomas, N. S. T., ... Cooper, D. N. (2003). Human Gene Mutation Database (HGMD): 2003 update. *Human Mutation*, 21(6), 577–581.
163. Stoilova-McPhie, S., Villoutreix, B. O., Mertens, K., Kembball-Cook, G., & Holzenburg, A. (2002). 3-Dimensional structure of membrane-bound coagulation factor VIII: modeling of the factor VIII heterodimer within a 3-dimensional density map derived by electron crystallography. *Blood*, 99(4), 1215–1223.
164. Street, A. M., Ljung, R., & Lavery, S. A. (2008). Management of carriers and babies with haemophilia. *Haemophilia: The Official Journal of the World Federation of Hemophilia*, 14 Suppl 3, 181–187.
165. ter Avest, P. C., Fischer, K., Mancuso, M. E., Santagostino, E., Yuste, V. J., van den Berg, H. M., ... CANAL Study Group. (2008). Risk stratification for inhibitor development at first treatment for severe hemophilia A: a tool for clinical practice. *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH*, 6(12), 2048–2054.
166. Tizzano, E. F., Cornet, M., & Baiget, M. (2003). Inversion of intron 1 of the factor VIII gene for direct molecular diagnosis of hemophilia A. *Haematologica*, 88(1), 118–120.
167. Tizzano, E. F., Cornet, M., Domènech, M., & Baiget, M. (2002). Modifier genes in haemophilia: their expansion in the human genome. *Haemophilia: The Official Journal of the World Federation of Hemophilia*, 8(3), 250–254.
168. Tizzano, E. F., Cornet, M., Domènech, M., & Baiget, M. (2003). Exclusion of mosaicism in Spanish haemophilia A families with inversion of intron 22. *Haemophilia: The Official Journal of the World Federation of Hemophilia*, 9(5), 584–587.
169. Tizzano, E. F., Domènech, M., Altisent, C., Tusell, J., & Baiget, M. (1994). Inversions in the factor VIII gene in Spanish hemophilia A patients. *Blood*, 83(12), 3826.
170. Tomi, D., Griesinger, G., Schultze-Mosgau, A., Eckhold, J., Schöpfer, B., Al-Hasani, S., ... Schwinger, E. (2005). Polar body diagnosis for hemophilia a using multiplex PCR for linked polymorphic markers. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society*, 53(3), 277–280.

171. Toole, J. J., Knopf, J. L., Wozney, J. M., Sultzman, L. A., Buecker, J. L., Pittman, D. D., ... Orr, E. C. (1984). Molecular cloning of a cDNA encoding human antihemophilic factor. *Nature*, 312(5992), 342–347.
172. Tosetto, A., Castaman, G., & Rodeghiero, F. (2013). Bleeders, bleeding rates, and bleeding score. *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH*, 11 Suppl 1, 142–150.
173. Trossaert, M., Boisseau, P., Quemener, A., Sigaud, M., Fouassier, M., Ternisien, C., ... Bezieau, S. (2011). Prevalence, biological phenotype and genotype in moderate/mild hemophilia A with discrepancy between one-stage and chromogenic factor VIII activity. *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH*, 9(3), 524–530.
174. Trossaert, M., Regnault, V., Sigaud, M., Boisseau, P., Fressinaud, E., & Lecompte, T. (2008). Mild hemophilia A with factor VIII assay discrepancy: using thrombin generation assay to assess the bleeding phenotype. *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH*, 6(3), 486–493.
175. Vehar, G. A., Keyt, B., Eaton, D., Rodriguez, H., O'Brien, D. P., Rotblat, F., ... Capon, D. J. (1984). Structure of human factor VIII. *Nature*, 312(5992), 337–342.
176. Veltkamp, J. J., Meilof, J., Remmelts, H. G., van der Vlerk, D., & Loeliger, E. A. (1970). Another genetic variant of haemophilia B: haemophilia B Leyden. *Scandinavian Journal of Haematology*, 7(2), 82–90.
177. Venceslá, Á., Baena, M., Garrido, R. P., Núñez, R., Velasco, F., Rosell, J., ... Tizzano, E. F. (2012). F8 gene dosage defects in atypical patients with severe haemophilia A. *Haemophilia: The Official Journal of the World Federation of Hemophilia*, 18(5), 708–713.
178. Verbruggen, B., Novakova, I., Wessels, H., Boezeman, J., van den Berg, M., & Mauser-Bunschoten, E. (1995). The Nijmegen modification of the Bethesda assay for factor VIII:C inhibitors: improved specificity and reliability. *Thrombosis and Haemostasis*, 73(2), 247–251.
179. Vidal, F., Farssac, E., Tusell, J., Puig, L., & Gallardo, D. (2002). First molecular characterization of an unequal homologous alu-mediated recombination event responsible for hemophilia. *Thrombosis and Haemostasis*, 88(1), 12–16.
180. Viel, K. R., Ameri, A., Abshire, T. C., Iyer, R. V., Watts, R. G., Lutcher, C., ... Howard, T. E. (2009). Inhibitors of factor VIII in black patients with hemophilia. *The New England Journal of Medicine*, 360(16), 1618–1627.
181. White, G. C., Rosendaal, F., Aledort, L. M., Lusher, J. M., Rothschild, C., Ingerslev, J., & Factor VIII and Factor IX Subcommittee. (2001). Definitions in hemophilia. Recommendation of the scientific subcommittee on factor VIII and factor IX of the scientific and standardization committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *Thrombosis and Haemostasis*, 85(3), 560.

182. WHO Scientific Group on Inherited Blood Clotting Disorders. World Health Organization. (1972). Inherited blood clotting disorders. Report of a WHO scientific group. Retrieved from ("Inherited blood clotting disorders. Report of a WHO scientific group," no 504. 1972. autor WHO Scientific Group on Inherited Blood Clotting Disorders. World Health Organization. <http://www.who.int/iris/handle/10665/40981>
183. Wight, J., & Paisley, S. (2003). The epidemiology of inhibitors in haemophilia A: a systematic review. *Haemophilia: The Official Journal of the World Federation of Hemophilia*, 9(4), 418–435.
184. Witmer, C., & Young, G. (2013). Factor VIII inhibitors in hemophilia A: rationale and latest evidence. *Therapeutic Advances in Hematology*, 4(1), 59–72.
185. Xue, F., Zhang, L., Sui, T., Ge, J., Gu, D., Du, W., ... Yang, R. (2010). Factor VIII gene mutations profile in 148 Chinese hemophilia A subjects. *European Journal of Haematology*, 85(3), 264–272.