

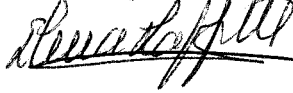
012234126
TD
359

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
SECRETARÍA GENERAL

Queda registrada esta Tesis Doctoral
al folio 059 número 242 del libro
correspondiente.

Sevilla, 3-10-07

El Jefe del Negociado de Tesis



CARACTERIZACIÓN DE LAS ALTERACIONES GENÉTICAS EN LA POBLACIÓN DE HEMOFÍLICOS DE ANDALUCÍA

Olga Fernández López



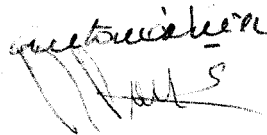
DIRECTORES DE TESIS

JOSE RAUL GARCIA LOZANO



ANTONIO NUÑEZ ROLDAÑ

Mosario Pérez Garrido



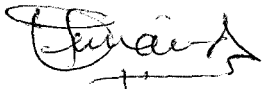
**Tesis Doctoral presentada por Dña. Olga Fernández López
para optar al grado de Doctor en Biología por la
Universidad de Sevilla**



Doy mi autorización a la Biblioteca de esta Facultad para que mi Tesis Doctoral
CARACTERIZACIÓN DE LAS ALTERACIONES GENÉTICAS EN
LA POBLACIÓN ~~DE~~ DE HEMOFÍLICOS DE ANDALUCÍA

Sea consultada, según la modalidad/es indicadas:

- Consulta en depósito.
- Préstamo interbibliotecario.
- Reproducción parcial.
- Reproducción total.
- Tipo de usuarios.
- Otros términos.

Firmado: Olga Fernández López


Sevilla, a 25 de Mayo de 2008

**D. JOSÉ RAUL GARCÍA LOZANO, DOCTOR EN MEDICINA Y CIRUGÍA, Y
FACULTATIVO ESPECIALISTA DE ÁREA DEL SERVICIO DE INMUNOLOGÍA
DE LOS HOSPITALES UNIVERSITARIOS VIRGEN DEL ROCÍO DE SEVILLA.**

CERTIFICA:

Que la Licenciada Dña. OLGA FERNÁNDEZ LÓPEZ, ha realizado el trabajo de investigación que lleva por título: "**CARACTERIZACIÓN DE LAS ALTERACIONES GENÉTICAS EN LA POBLACIÓN DE HEMOFÍLICOS DE ANDALUCÍA**" bajo mi Dirección, reuniendo las condiciones necesarias para ser leída y defendida como tesis para optar al grado de Doctor en Biología.

Para que conste y a los efectos oportunos, expido la presente Comunicación en Sevilla a 27 de Septiembre de 2007.



Fdo: Dr. José Raul García Lozano

DIRECTOR DE LA TESIS

**Dña. ROSARIO PÉREZ GARRIDO, DOCTORA EN MEDICINA Y CIRUGÍA, JEFA
DE SECCIÓN DE LA UNIDAD DE HEMOFILIA DEL SERVICIO DE
HEMATOLOGÍA Y HEMOTERAPIA DE LOS HOSPITALES UNIVERSITARIOS
VIRGEN DEL ROCÍO DE SEVILLA**

CERTIFICA:

Que la licenciada Dña. OLGA FERNÁNDEZ LÓPEZ, ha realizado el trabajo de investigación que lleva por título: "**CARACTERIZACIÓN DE LAS ALTERACIONES GENÉTICAS EN LA POBLACIÓN DE HEMOFÍLICOS DE ANDALUCÍA**" bajo mi Dirección, reuniendo las condiciones necesarias para ser leída y defendida como tesis para optar al grado de Doctor en Biología.

Para que conste y a los efectos oportunos, expido la presente Comunicación en Sevilla a 27 de Septiembre de 2007



Fdo: Dra. Rosario Pérez Garrido

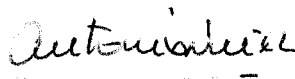
DIRECTORA DE LA TESIS

**D. ANTONIO NÚÑEZ ROLDÁN, DOCTOR EN MEDICINA Y CIRUGÍA, JEFE DEL
SERVICIO DE INMUNOLOGÍA DE LOS HOSPITALES UNIVERSITARIOS
VIRGEN DEL ROCÍO Y PROFESOR ASOCIADO DEL DEPARTAMENTO DE
MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA.**

CERTIFICA:

Que la licenciada Dña. OLGA FERNÁNDEZ LÓPEZ, ha realizado el trabajo de investigación que lleva por título: "**CARACTERIZACIÓN DE LAS ALTERACIONES GENÉTICAS EN LA POBLACIÓN DE HEMOFÍLICOS DE ANDALUCÍA**" bajo mi Dirección, reuniendo las condiciones necesarias para ser leída y defendida como tesis para optar al grado de Doctor en Biología.

Para que conste y a los efectos oportunos, expido la presente Comunicación en Sevilla a 27 de Septiembre de 2007.



Fdo: Dr. Antonio Núñez Roldán

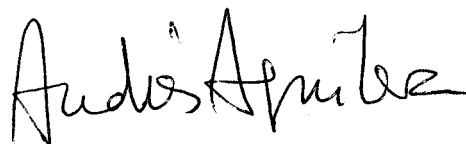
DIRECTOR DE LA TESIS

**D. ANDRÉS AGUILERA LÓPEZ, CATEDRÁTICO DEL DEPARTAMENTO DE
GENÉTICA DE LA FACULTAD DE BIOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE
SEVILLA**

CERTIFICA:

Que ha actuado como tutor de la Tesis Doctoral presentada por la licenciada Dña. OLGA FERNÁNDEZ LÓPEZ, titulada: "**CARACTERIZACIÓN DE LAS ALTERACIONES GENÉTICAS EN LA POBLACIÓN DE HEMOFÍLICOS DE ANDALUCÍA**", reuniendo su autora, a mi juicio, las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor en Biología.

Para que conste y a los efectos oportunos, expido la presente Comunicación en Sevilla a 27 de Septiembre de 2007



Fdo: Dr. Andrés Aguilera López

TUTOR DE LA TESIS

Publicaciones derivadas del trabajo desarrollado durante la presente tesis doctoral

- The spectrum of mutations in Southern Spanish patients with hemophilia A and identification of 28 novel mutations. **Fernández-López O**, García-Lozano J.R, Núñez-Vázquez R, Pérez-Garrido R, Núñez-Roldán A. *Haematologica* 2005 May; 90(5): 707-10.
- Characterization of sequence breakpoints in two haemophilic patients with large FVIII gene deletions. **Fernández-López O**, García-Lozano J.R, Núñez-Vázquez R, Pérez-Garrido R, Núñez-Roldán A. *Haemophilia* 2007 Sep; 13(5): 682-4.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	2
2. PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO Y OBJETIVOS	40
3. PACIENTES Y MÉTODOS	45
4. RESULTADOS	75
5. DISCUSIÓN	111
6. CONCLUSIONES	149
7. BIBLIOGRAFÍA	152
8. APÉNDICE	179

1. INTRODUCCIÓN

1.1. HEMOSTASIA

1.1.1. FACTORES DE COAGULACIÓN

1.1.2. HEMOSTASIA PRIMARIA

1.1.3. HEMOSTASIA SECUNDARIA O COAGULACIÓN

1.1.3.1. Vía extrínseca

1.1.3.2. Vía intrínseca

1.1.4. REGULACIÓN DE LA COAGULACIÓN

1.1.4.1. Inhibidor de la vía del Factor Tisular

1.1.4.2. Antitrombina III

1.1.4.3. Sistema de la proteína C

1.2. ENFERMEDADES HEMORRÁGICAS HEREDITARIAS

1.2.1. ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND

1.2.2. ENFERMEDADES AUTOSÓMICAS RECESIVAS

1.2.3. ENFERMEDADES LIGADAS AL CROMOSOMA X: HEMOFILIA A

y B

1.3. HEMOFILIAS

1.3.1. ESTRUCTURA DE LOS GENES Y PROTEÍNAS

1.3.1.1. Gen y proteína FVIII

1.3.1.2. Gen y proteína FIX

1.3.2. BASES MOLECULARES DE LAS HEMOFILIAS

1.3.2.1. Mutaciones en sitios CpG

1.3.2.2. Hemofilia A: mutaciones en el gen FVIII

1.3.2.3. Hemofilia B: mutaciones en el gen FIX

1.3.3. TRATAMIENTO Y COMPLICACIONES

2. PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO Y OBJETIVOS

2.1. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

2.2. OBJETIVOS

2.2.1. Objetivos iniciales

2.2.2. Objetivos "a posteriori"

2.3. DISEÑO EXPERIMENTAL

3. PACIENTES Y MÉTODOS

3.1. PACIENTES

3.1.1. PACIENTES INCLUIDOS EN EL ESTUDIO

3.1.2. OTROS PACIENTES INCLUIDOS EN EL ESTUDIO

3.1.3. CONTROLES

3.2. EXTRACCIÓN DE ADN

3.2.1. PROTEINASA K

3.2.2. ADN PURIFICADO

3.3. ESTUDIO DE LA INVERSIÓN DEL INTRÓN 22

3.3.1. CEBADORES

3.3.2. CONDICIONES DE PCR

3.3.3. PARÁMETROS DE PCR

3.3.4. ELECTROFORESIS

3.4. ESTUDIO DE LA INVERSIÓN DEL INTRÓN 1

3.4.1. CEBADORES

3.4.2. CONDICIONES DE PCR

3.4.3. PARÁMETROS DE PCR

3.4.4. ELECTROFORESIS

3.5. SECUENCIACIÓN

3.5.1. CEBADORES PARA LA AMPLIFICACIÓN DEL GEN FVIII Y FIX

3.5.2. CONDICIONES DE LA MEZCLA PARA LA AMPLIFICACIÓN DEL
GEN FVIII Y EL FIX

3.5.3. PARÁMETROS

3.5.4. ELECTROFORESIS

3.5.5. PURIFICACIÓN

3.5.6. SECUENCIACIÓN

3.5.6.1. Secuenciador automático ABI Prism 310 (Perkin-Elmer)

3.5.6.2. Secuenciador automático CEQ 8000 (Beckman-Coulter)

3.5.7. ALINEACIÓN DE LAS SECUENCIAS

3.6. ESTUDIO DE HAPLOTIPOS

3.6.1. PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

3.6.1.1. Cebadores para la amplificación de los sitios polimórficos ALW NI en el intrón 7 (G>A), Bcl I en el intrón 18 (T>A) y Hind III en el intrón 19 (C>T)

3.6.1.2. Condiciones de la mezcla para la amplificación de los sitios polimórficos ALW NI, Bcl I y Hind III

3.6.1.3. Parámetros de PCR

3.6.1.4. Digestión

3.6.2. "STR" (Short Tandem Repeat)

3.6.2.1. Cebadores para la amplificación de las regiones de repetición en Intrón 1, Intrón 13 e Intrón 22

3.6.2.2. Condiciones de la mezcla para la amplificación de las regiones de repetición

3.6.2.3. Parámetros de PCR

3.6.2.4. Análisis del tamaño de los fragmentos

3.6.2.4.1. Preparación de las muestras para la electroforesis Capilar

3.7. ESTUDIO DE GRANDES DELECCIONES

3.7.1. CARACTERIZACIÓN DE LA DELECCIÓN DEL EXÓN 8-9

3.7.2. CARACTERIZACIÓN DE LA DELECCIÓN DEL EXÓN 15

3.8. APÉNDICE

4. RESULTADOS

4.1. HEMOFILIA A

4.1.1. DESCRIPCIÓN GENERAL DE LAS MUTACIONES

4.1.1.1. Tipo de mutaciones encontradas

4.1.1.2. Mutaciones no descritas previamente

4.1.2. DESCRIPCIÓN DE LAS MUTACIONES IDENTIFICADAS EN PACIENTES CON HEMOFILIA A GRAVE

4.1.2.1. Inversiones: Inv22 e Inv1

4.1.2.2. Pequeñas deleciones o inserciones

4.1.2.3. Mutaciones de codón de parada

4.1.2.4. Mutaciones de cambio de aminoácido

4.1.2.5. Grandes deleciones

4.1.2.6. Mutaciones en la zona de procesamiento del ARN

4.1.3. DESCRIPCIÓN DE LAS MUTACIONES IDENTIFICADAS EN PACIENTES CON HEMOFILIA A MODERADA

4.1.3.1. Mutaciones de cambio de aminoácido

4.1.3.2. Mutaciones en la zona de procesamiento del ARN

4.1.4. DESCRIPCIÓN DE LAS MUTACIONES IDENTIFICADAS EN PACIENTES CON HEMOFILIA A LEVE

4.1.4.1. Mutaciones de cambio de aminoácido

4.1.4.2. Mutaciones en la zona de procesamiento del ARN

4.1.5. MUTACIONES “*DE NOVO*”

4.1.6. INHIBIDORES DEL FACTOR VIII

4.2. HEMOFILIA B

4.2.1. DESCRIPCIÓN GENERAL DE LAS MUTACIONES

4.2.1.1. Tipo de mutaciones encontradas

4.2.1.2. Mutaciones nuevas

4.2.2. DESCRIPCIÓN DE LAS MUTACIONES IDENTIFICADAS EN PACIENTES CON HEMOFILIA B GRAVE

4.2.3. DESCRIPCIÓN DE LAS MUTACIONES IDENTIFICADAS EN PACIENTES CON HEMOFILIA B MODERADA

4.2.4. DESCRIPCIÓN DE LAS MUTACIONES IDENTIFICADAS EN PACIENTES CON HEMOFILIA B LEVE

4.2.5. MUTACIONES “*DE NOVO*”

4.2.6. INHIBIDORES DEL FACTOR IX

4.3. CORRELACIÓN ENTRE CAMBIO DE AMINOÁCIDO NO DESCRITO PREVIAMENTE EN EL GEN FVIII Y HEMOFILIA

4.3.1. RASTREO EN LA POBLACIÓN GENERAL DE LOS CAMBIOS DE AMINOÁCIDO NO DESCRITOS PREVIAMENTE

4.3.2. CAMBIO DE AMINOÁCIDO EN CASOS CON ANTECEDENTES FAMILIARES

4.5. CARACTERIZACIÓN DE LOS PUNTOS DE ROTURA DE LAS DOS GRANDES DELECCIONES IDENTIFICADAS EN PACIENTES CON HEMOFILIA A GRAVE

4.5.1. Delección de los exones 8 y 9

4.5.1.1. Estudio de portadoras

4.5.2. Delección del exón 15

4.5.2.1. Estudio de portadora

4.6. ANÁLISIS DE HAPLOTIPOS

4.6.1. Población general de Andalucía

4.6.2. Pacientes con inversión del intrón 22

4.6.3. Pacientes con las mutaciones recurrentes p.R593C, p.R2150H, y p.R1966Q

4.6.3.1. Mutación p.R593C

4.6.3.2. Mutación p.R2150H

4.6.3.3. Mutación p.R1966Q

4.6.4. Pacientes que comparten mutaciones nuevas de cambio de aminoácido

5. DISCUSIÓN

6. CONCLUSIONES

7. BIBLIOGRAFÍA

8. APÉNDICE

INTRODUCCIÓN

1.1. LA HEMOSTASIA

La hemostasia se refiere al conjunto de procesos que controlan la fluidez de la sangre y la integridad del sistema vascular. La palabra “hemostasia” proviene de dos palabras griegas: *haimo* que significa “sangre” y *stasia* que significa “detención”. Cuando un vaso sanguíneo se daña, se ponen en marcha una serie de mecanismos, conocidos como mecanismos hemostáticos, que por una parte impiden la pérdida de sangre, y por otra contribuyen a la reparación del daño vascular y tisular.

La hemostasia comprende un gran número de reacciones e interacciones complejas en las que participan componentes sanguíneos y componentes de la pared de los vasos. Los mecanismos hemostáticos se pueden agrupar en hemostasia primaria, en la que las plaquetas se adhieren a la zona de la pared dañada y se agregan entre sí, y hemostasia secundaria, o también llamada coagulación, donde tiene lugar la formación y estabilización del coágulo de fibrina. Los componentes sanguíneos responsables de la hemostasia secundaria se denominan factores de coagulación.

1.1.1. Factores de la coagulación

Los factores de coagulación son proteínas plasmáticas que interaccionan entre ellas y con las células para producir la hemostasia en los organismos vivos. Estos factores, casi todos enzimas, circulan como proenzimas inactivos, y según el modelo clásico, se activan unos a otros secuencialmente mediante una cascada de reacciones enzimáticas que culminan en la formación de trombina y en la consiguiente formación del tapón de fibrina. Los factores de coagulación se representan con la palabra Factor y un número romano, de acuerdo con el orden de su descubrimiento (Factor I al XIII), de éstos el Factor VI no ha sido asignado, el Factor IV es mejor conocido como iones calcio y otros no recibieron números romanos como el quinínogeno de elevado peso molecular y la precalicreína. La forma activa de la proteína se designa con el número romano y el subíndice “a”. El sistema de nomenclatura adoptado por el Comité Internacional para Nomenclatura de Factores de

Coagulación de la Sangre y los sinónimos más frecuentemente utilizados, así como algunas características de estos factores se muestran en la tabla 1.

La clonación y secuenciación de los componentes del sistema de coagulación en los últimos 30 años del siglo XX ha permitido identificar sus estructuras proteicas. Los factores de coagulación se pueden agrupar como:

1. Zimógenos dependientes de vitamina K. Protrombina (FII), FVII, FIX, y FX.
2. Cofactores solubles. FV, FVIII y FvW. Los factores V y VIII son lábiles, por lo que no se encuentran presentes en el plasma almacenado.
3. El factor XI y otros factores de "contacto" (FXII, precalicreína y quinínogeno de elevado peso molecular). Estos factores están involucrados en la fase inicial de la vía intrínseca.
4. Cofactor asociado a células. Factor tisular (FT).
5. Fibrinógeno.
6. FXIII.

Tabla 1. Características de los factores de coagulación.

Factor	Sinónimo	Forma activa	Nivel Plasmático (µG/ML)	Localización Cromosoma
Factor I (FI)	Fibrinógeno	Glicoproteína adhesiva	2.000-4000	4q23-q32
Factor II (FII)	Protrombina	Serín proteasa y vitamina-K dependiente	60-70	11p11-q12
Factor III (FIII)	Factor tisular	Cofactor asociado a células	-	1p21-p22
Factor V (FV)	Proacelerina	Cofactor	12	1q21-q25
Factor VII (FVII)	Proconvertina, autoprotrombina I	Serín proteasa y vitamina-K dependiente	3-6	13q34
Factor VIII (FVIII)	Factor antihemofílico A	Cofactor	8-12	Xq28
Factor IX (FIX)	Factor Christmas, autoprotrombina II	Serín proteasa y vitamina-K dependiente	18-24	Xq27.1-q27.2
Factor X (FX)	Factor de Stuart-Prower, trombocinasa	Serín proteasa y vitamina-K dependiente	30-40	13q34
Factor XI (FXI)	Antecedente plasmático de tromboplastina	Serín proteasa	52	4q32-q35
Factor XII (FXII)	Factor de Hageman	Proteasa	60	5q33
Factor XIII* (FXIII)	Protransglutaminasa	Transglutaminasa	240	Cadena-A 6p24-p25 Cadena-B 1q31-q32
Precalicreína	Factor de Fletcher	Proteasa	35	4q35
Quinínogeno de alto peso molecular (QAPM)	Factor de Fitzgerald-Williams-Flaujeauc	Proteasa	150	3q26
Factor von Willebrand (FvW)		Cofactor	12	12q13.2

* Toda la cadena A del factor XIII se halla formando un complejo con la cadena B del factor XIII; sólo la mitad de la cadena B del factor XIII se encuentra formando parte de dicho complejo, el resto está libre en el plasma.

Los factores dependientes de vitamina K se sintetizan en el hígado y son proteínas que se caracterizan por la presencia en su molécula de una región N-terminal rica en ácido γ -carboxiglutámico (dominio Gla). La proteína se sintetiza con estos residuos en la forma de ácido glutámico, y debe sufrir un procesamiento post-traduccional de carboxilación para la conversión de dichos residuos en γ -carboxiglutámico (Gla) (Stenflo J 1977). Estos residuos Gla son necesarios para la unión de esta proteína a las superficies fosfolipídicas negativas, en las que los iones calcio, cofactores esenciales en la mayoría de reacciones presentes en la hemostasia secundaria, actúan de puentes de unión (Mann KG 1990). La carboxilación de los residuos de ácido glutámico la lleva a cabo el enzima γ -glutamylcarboxilasa, la cual utiliza un derivado de vitamina K como cofactor.

Los factores V y VIII se sintetizan en el hígado y se denominan cofactores solubles, y son homólogos en la estructura de sus genes, en la secuencia de aminoácidos y en la estructura de sus dominios proteínicos. La organización de dominios es la siguiente: A1-A2-B-A3-C1-C2. Los dominios A y C del FV tienen un 40% de homología con los dominios A y C de FVIII. Por el contrario los dominios B tienen escasa homología y se desconoce si tienen homología con otras proteínas.

El factor von Willebrand (FvW) es sintetizado en células endoteliales y en megacariocitos, pero se desconoce como se regula la función tisular específica. El factor vW es una glucoproteína multimérica grande que sirve como transportador del FVIII, y es necesaria para la adhesión plaquetaria normal a los componentes de la pared del vaso. Es sintetizada como un prepolipéptido con una secuencia señal de 22 aminoácidos, un polipéptido precursor de 741 aminoácidos denominado antígeno del FvW y la cadena polipeptídica del FvW maduro (Bonthron D 1986). La proteína madura contiene tres dominios A, tres dominios B, dos dominios C y cuatro dominios D. El factor VIII se une a la región amino-terminal del FvW, en los primeros 272 aminoácidos de la subunidad proteica madura (Foster P 1987).

El factor XI se sintetiza en el hígado (Bolton-Maggs PH 1992), y aunque se sintetiza como cadena única, circula como un homodímero unido por un puente disulfuro (Fujikawa K 1995). Cada subunidad contiene 4 repeticiones de

un fragmento estructural denominado "manzana". Se han designado funciones específicas a estos dominios manzana como sitios de unión a QAPM, protrombina, plaquetas, FIX, trombina y FXIIa (Baglia FA 1995a, Baglia FA 1995b, Baglia FA 1993, Baglia FA 1996)

El factor XII y la precalicreína son precursores zimógenos de proteasas. La precalicreína tiene 4 dominios manzana y es muy similar al FXI. El QEPM es un cofactor no enzimático que circula formando un complejo con FXI y con la precalicreína. Las tres proteínas se sintetizan en el hígado (Saito H 1995). El FXII, el QAPM, y la precalicreína son responsables de la activación de la fase de contacto de la coagulación sanguínea.

El factor tisular (FT) es el receptor celular y cofactor para FVIIa y se expresa constitutivamente en muchos tejidos extravasculares. Está compuesto por 263 aminoácidos organizados en tres dominios: un dominio extracelular de 219 aminoácidos, una porción transmembrana de 23 residuos y un dominio intracitoplásmico de 21. El FT se encuentra disponible en la cara apical de las células endoteliales vasculares. La expresión polarizada del FT permite que el FVIIa interactúe específicamente con aquellas células endoteliales que han sido suficientemente dañadas o estimuladas para expresar el FT.

El fibrinógeno es una glucoproteína dimérica, sintetizada en el hígado, que se encuentra en el plasma y en las plaquetas y forma la malla estructural que consolida al tampón plaquetario inicial en un coágulo hemostático sólido. Cada subunidad contiene tres cadenas polipeptídicas unidas por puentes disulfuro (Gardlund B 1977), que se denominan cadenas A α , B β y γ . Las secuencias genómicas de las tres cadenas muestran gran similitud, lo que sugiere que se originaron por la duplicación de un gen ancestral (Doolittle R 1979; Kant JA 1985).

El factor XIII es una protransglutaminasa compuesta por las subunidades A y B, que es activada por trombina en presencia de calcio (Lai T-S 1995). La cadena A contiene el sitio activo de cisteína, mientras que la cadena B no es enzimáticamente activa y funciona como una proteína transportadora. El factor XIIIa entrelaza proteínas entre el carbono γ de la glutamina en una proteína y el

grupo amino ϵ de la lisina en otro. Además de encontrarse en el plasma, el factor XIII también se encuentra en plaquetas, monocitos, y macrófagos.

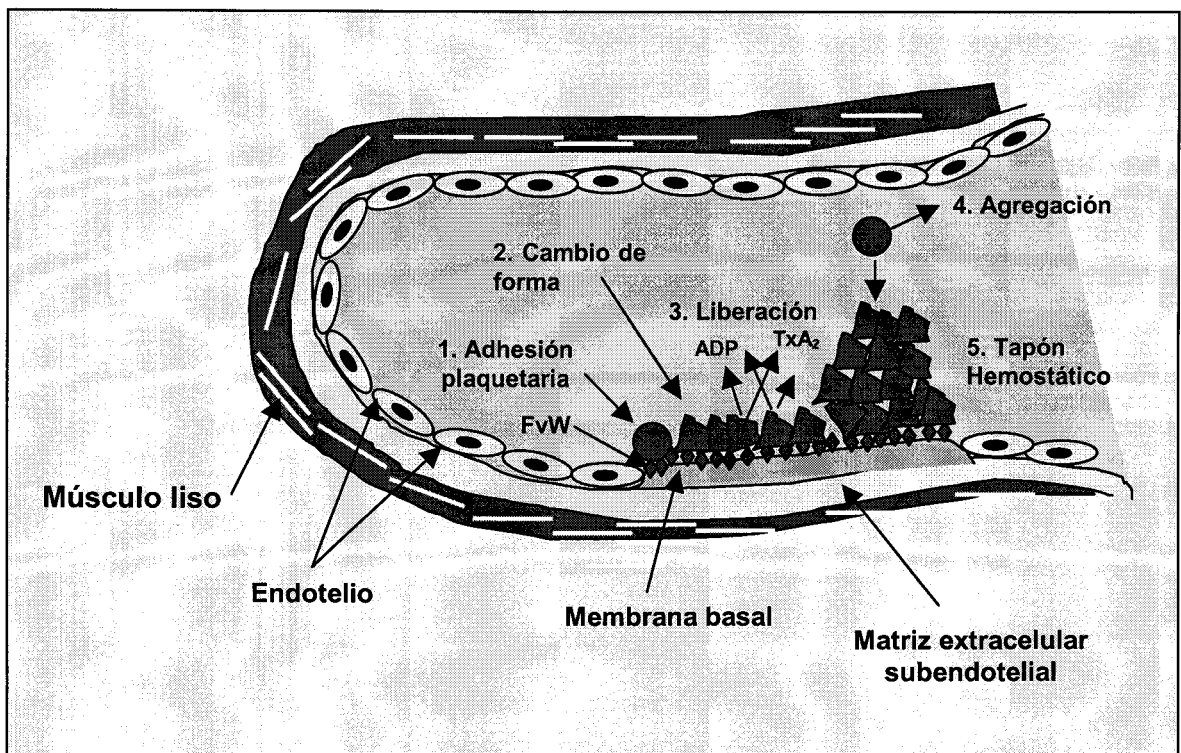
1.1.2. Hemostasia primaria

La hemostasia primaria es el conjunto de mecanismos que generan un primer tapón hemostático instantáneo en el vaso dañado. Estos mecanismos comprenden vasoconstricción, adhesión y agregación de las plaquetas. Se inician al cabo de unos segundos de producirse la lesión y tiene una importancia enorme para detener la salida de la sangre en los capilares, arteriolas pequeñas y vénulas. Los componentes principales de la hemostasia primaria son, por lo tanto, los vasos sanguíneos y las plaquetas, aunque también participan otros componentes plasmáticos.

Las plaquetas sufren una serie de reacciones como adhesión, cambios morfológicos, liberación del contenido de los gránulos, y agregación que conducen a la formación del tapón plaquetario (figura 1) (George JN 2000; Majerus PW 2001). El inicio de la adhesión plaquetaria necesita la interacción entre las plaquetas y el factor von Willebrand (FvW), el cual media la adhesión plaquetaria y sirve de puente entre el tejido y las plaquetas, uniendo el colágeno expuesto en las zonas de daño vascular y la glicoproteína de la membrana plaquetaria Ib-V-IX (GPIb-V-IX). La superficie de las plaquetas contiene también otros receptores para colágeno (glicoproteína Ia-IIa, GPIa-IIa) que contribuyen al anclaje de las plaquetas al tejido dañado (Clemetson KJ 2001). La adhesión plaquetaria está acompañada 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 pseudopodio extenso que ayuda a anclar las plaquetas (Majerus PW 2001). Las plaquetas adherentes secretan tromboxano A₂ y liberan el contenido de sus gránulos, ADP (difosfato de adenosina), calcio, y serotonina, 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 (Woodside DG

2001). Estas proteínas forman puentes entre las plaquetas durante la formación del agregado plaquetario. La formación del tapón plaquetario primario está coordinada temporal y espacialmente con la activación del sistema de coagulación de la sangre, conduciendo a la generación de trombina y la formación de la red de fibrina (Hemostasia secundaria) (Monroe DM 2002).

Figura 1. Principales fenómenos que intervienen en la hemostasia primaria

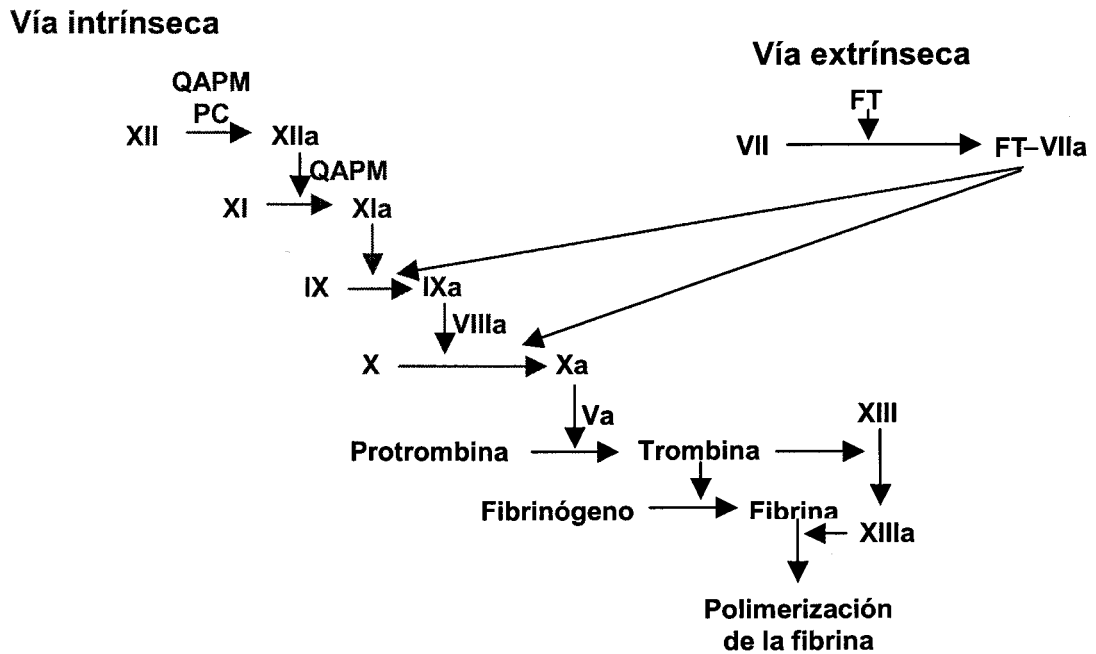


1.1.3. Hemostasia secundaria o coagulación

El tapón plaquetario formado en la hemostasia primaria no tiene consistencia suficiente para detener la hemorragia, por lo que debe iniciarse el mecanismo de coagulación para formar el coágulo de fibrina más estable y consistente. El sistema de coagulación, como ya se ha comentado antes, lo forman diversas proteínas, casi todas enzimas. Existen dos vías para iniciar la coagulación sanguínea, la vía extrínseca y la vía intrínseca (figura 2) (Mann KG 1999).

En la vía extrínseca, la cascada de coagulación se inicia por exposición del FT al torrente circulatorio. Esto ocurre fundamentalmente tras la rotura de un vaso, pero también puede iniciarse por activación plaquetaria o por activación de monocitos. El FT actúa como cofactor de FVIIa presente en la circulación, y el complejo FVII-FT activa al FX. La vía intrínseca de la coagulación se inicia, generalmente, tras la exposición de la sangre a una serie de moléculas, como el colágeno (que la pared vascular expone tras la lesión), lo cual conduce a una serie de reacciones en cadena en las que están implicados los factores del sistema de contacto (precalicreína, QAPM, y FXII), cuyo resultado es la activación de FXI. Ambas vías convergen en la activación de FX, dando lugar a una vía final común. Estas dos vías de iniciación de la coagulación no están realmente separadas, sino que existen interconexiones entre ambas, así como diversos mecanismos de retroalimentación positivos y negativos que controlan la velocidad y extensión de la activación de la coagulación (Lane DA 1996).

Figura 2. Modelo clásico de cascada de coagulación.



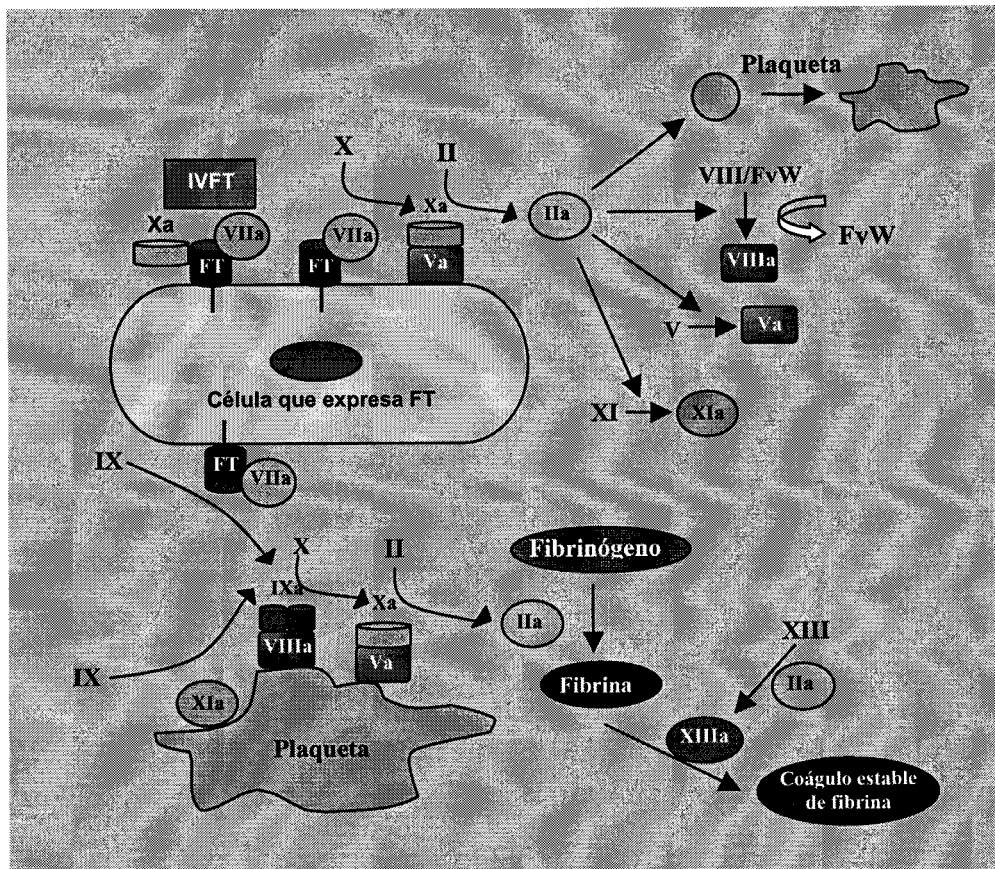
1.1.3.1. Vía extrínseca

La activación fisiológica de la coagulación sanguínea transcurre principalmente por la vía extrínseca. En ella, el FT juega un papel fundamental como iniciador del sistema de coagulación (Rapaport SI 1995). El FT es una proteína de membrana que está presente en la superficie de determinados tipos celulares tales como células del endotelio, plaquetas y monocitos, pero no se encuentra expuesto a la sangre circulante (Ruf W 1994). Tras la exposición del FT en el lugar de la lesión, una fracción de FVII en sangre es activada a través de una serie de mecanismos que no se conocen completamente, y la unión de FVIIa al FT inicia la coagulación (figura 3). El complejo resultante FVIIa/FT, activa a FX y FIX, y tanto el FXa como el FIXa formados activan a su vez a FVII, lo que constituye un mecanismo de amplificación. El FXa activa a la protrombina (FII) en presencia de FVa, fosfolípidos y calcio. La trombina formada por el complejo FVIIa/FT no es suficiente para activar al fibrinógeno pero si es importante para iniciar una serie de acontecimientos, como es la activación de plaquetas y de FV, FVII FXI y disociar a FVIII de FVW (Oliver J

1990; Monroe DM 1996), que favorece un aumento posterior en la generación de trombina.

El factor FXa formado por acción del complejo FVIIa/FT no alcanza eficazmente la superficie plaquetaria, debido en parte a su rápida inhibición en la fase fluida por la antitrombina III (ATIII) y por el inhibidor de la vía del FT (IVFT) (Monroe DM 1996; Rapaport SI 1989). Sin embargo, una vez unido a la plaqueta, el FXa se encuentra relativamente protegido de la acción inhibitoria de la ATIII. A diferencia del FXa, el FIXa se encuentra mucho más capacitado para viajar a través de la fase fluida y formar complejos en la superficie plaquetaria, pues es inhibido más lentamente por la ATIII y no es neutralizado por el IVFT. Así, el FIXa es capaz de mantenerse a la espera por más tiempo que FXa, hasta que las plaquetas sean activadas y expresen lugares de unión específicos para el FIXa (Monroe DM 2002; Hoffman M 2003a; Hoffman M 2003b).

Figura 3. Modelo celular de hemostasia



Una vez que las plaquetas son activadas, los FVIIIa y FVa se unen a éstas y son responsables del anclaje y orientación de FIX y FX, respectivamente, lo que permite la expresión de la actividad coagulante. El complejo FIXa/FVIIIa (complejo “tenasa”) en la superficie plaquetaria activa a FX y posibilita el ensamblaje del complejo FXa/FVa (complejo “protrombinasa”), el cual fomenta una generación explosiva de trombina. De esta forma, la única fuente efectiva de FXa para el ensamblaje del complejo “protrombinasa” plaquetario la constituye el complejo FIXa/FVIIIa plaquetario (Hoffman M 1995; Rapaport SI 1995).

La trombina, a su vez, convierte el fibrinógeno en fibrina, que polimeriza a fibrina insoluble por acción de FXIIIa. El factor FXIIIa es una transglutaminasa que une entre sí las moléculas de fibrina mediante enlaces covalentes, estabilizando de esta manera el coágulo inicialmente soluble (Hoffman R 2000).

El factor XIa formado por la activación de la trombina se asocia a la superficie plaquetaria, donde puede activar más FIX (Oliver J 1999; Sinha D 1984). Por tanto, parece que la activación del FXIa potencia la actividad tenasa plaquetaria y sirve como mecanismo “estimulante” para potenciar la generación de trombina (Hoffman R 2000).

1.1.3.2. Vía intrínseca (o sistema de contacto)

La segunda vía de activación de la coagulación es la denominada vía intrínseca, la cual se pone en marcha a consecuencia de un traumatismo en la pared del vaso. Es más lenta que la vía extrínseca y comienza con la activación del FXII. Esta activación tiene lugar por exposición de FXII a superficies cargadas negativamente, tales como la membrana basal de la pared del vaso sanguíneo o plaquetas activadas. El factor XII activa a la precalicreína a calicreína la cual es, a su vez, un potente activador de FXII, formándose mediante este mecanismo de retroalimentación positivo, cantidades apreciables de FXIIa. En la misma superficie, este FXIIa activa a FXI, generando FXIa. Para ello se requiere un cofactor no enzimático, el QAPM, el cual circula en plasma formando un complejo con el FXI, por un lado, y con la precalicreína por otro. El papel de este cofactor es llevar a los proenzimas FXI

y precalicreína, a las proximidades de FXIIa, ya que el QAPM se une fuertemente a las superficies negativas, al igual que FXII. Estas reacciones no requieren la presencia de calcio (Thompson RE 1977).

El factor XIa activa a su vez a FIX para dar FIXa. Esta reacción tiene lugar sobre la misma superficie, y requiere la presencia de calcio. El complejo FIX/FVIII, en presencia de calcio, activa a FX para dar FXa (Walsh PN 2001). El resto de reacciones son comunes para las dos vías.

1.1.4. Regulación de la coagulación sanguínea

Una vez que se ha formado el coágulo de fibrina en un área de lesión, el proceso de coagulación debe finalizar para evitar la oclusión trombótica en las áreas adyacentes normales de la vasculatura. Las proteínas que intervienen en la regulación se describen en la tabla 2.

Tabla 2. Componentes del sistema de regulación de coagulación sanguínea

Proteínas	Función
Inhibidor de la vía del factor tisular (IVTF)	Inhibe al complejo VIIa/FT y a FX
Antitrombina III (ATIII)	Inhibe trombina, XIIa, XIa, IXa, Xa y VIIa
Proteína C activa (PCa)	Inactiva proteolíticamente a los factores FVIIIa y FVa
Proteína S	Cofactor de proteína C activa
Trombina	Unida a trombomodulina sobre células endoteliales intactas activa a la proteína C
FV	Cofactor de la proteína C activa, previa activación por parte de la proteína C

1.1.4.1. Inhibidor de la vía del Factor Tisular (IVFT)

Este inhibidor regula la actividad catalítica del complejo VIIa/FT (figura 3) y fue purificado por primera vez y clonado a mediados de los años 80. Pertenece a la familia de los inhibidores de proteasas tipo Kunitz (Wun TC 1988), siendo la fuente endógena principal del mismo IVFT, el endotelio vascular. El IVFT es liberado después de la infusión de heparina, lo que eleva sus niveles plasmáticos en varios órdenes de magnitud (Sandset PM 1988). El

IVFT inhibe a FX directamente, mientras que la inhibición de FVIIa requiere de la presencia simultánea de FXa.

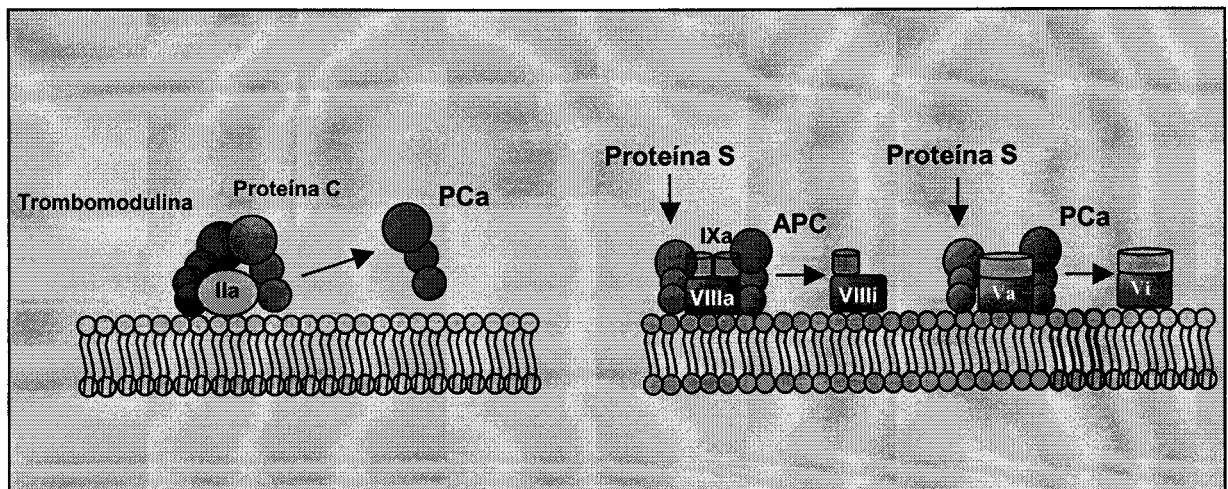
1.1.4.2. Antitrombina III (ATIII)

La ATIII es el inhibidor más importante de la coagulación, es un miembro de la familia de inhibidores de serín proteasas conocida como serpinas (Carrell RV 1987). La ATIII neutraliza a la trombina en presencia de heparina, la cual acelera el proceso. Además de la trombina, otras proteínas de la coagulación son inactivadas por la ATIII: FXIIa, FXIa, FIXa, FXa y FVIIa, proceso que también ocurre en presencia de heparina (Griffith MJ 1982, Sheffield W 1995). La potenciación de la eficiencia de ATIII mediante heparina es la base molecular para el uso de heparina como un anticoagulante terapéutico. El papel fisiológico de la ATIII es limitar el proceso de coagulación a sitios de daño vascular y a proteger la circulación de enzimas liberadas.

1.1.4.3. Sistema de la proteína C (PC)

La superficie del endotelio constituye el sitio principal para la activación de la proteína C. La vía de la PC se inicia cuando la trombina se enlaza a la trombomodulina presente en la superficie de las células endoteliales (Esmon CT 1989), y este complejo formado (complejo trombina-trombomodulina) es un activador potente de la PC. Una vez que se forma la PCa, ésta inactiva a FVa y FVIIIa por ruptura proteolítica, limitando así la posterior formación de trombina (figura 4) (Dahlbäck B 2005). La PCa se une a su cofactor, la proteína S, e inactiva todo el FVa o FVIIIa unido a membrana (Dahlbäck B 2004; Mann KG 2003).

Figura 4. Sistema de la proteína C



1.2. ENFERMEDADES HEMORRÁGICAS HEREDITARIAS (COAGULOPATÍAS CONGÉNITAS)

Las enfermedades hemorrágicas hereditarias o coagulopatías congénitas son debidas a deficiencias de alguna de las proteínas plasmáticas implicadas en la cascada de la coagulación sanguínea. Estas deficiencias están causadas por mutaciones en los genes que codifican para la proteína correspondiente. La mayoría de los genes responsables se encuentran localizados en cromosomas autosómicos y, por tanto, las enfermedades a las que dan lugar siguen un patrón de herencia mendeliana clásica. Sin embargo, los genes FVIII y FIX se localizan en el cromosoma X y las enfermedades a las que dan lugar siguen un patrón de herencia ligada al sexo.

La enfermedad hemorrágica hereditaria más frecuente es la enfermedad de von Willebrand (EVW), que tiene una prevalencia del 1-2% en la población general (Rodeghiero F 2001), siendo debida a un defecto en la calidad o cantidad del factor von Willebrand. Tras la EVW, las hemofilias A y B, debidas a deficiencias de las proteínas FVIII y FIX de la coagulación, respectivamente, son las enfermedades hemorrágicas hereditarias de mayor incidencia. La hemofilia A afecta a uno de cada 5.000-10.000 varones, mientras que la hemofilia B afecta a uno de cada 30.000 varones (Tuddenham EG 1994). Las

deficiencias de otros factores de coagulación que causan enfermedades hemorrágicas son generalmente mucho más raras que las hemofilias, con prevalencias en la población general que varían entre 1: 500.000 y 1: 2.000.000 (Peyvandi F 1999).

1.2.1. Enfermedad de von Willebrand

La enfermedad de von Willebrand está causada por defectos cuantitativos o cualitativos del FvW y la prevalencia, como ya se ha comentado antes, es del 1-2% en la población general (Rodeghiero F 2001). Los pacientes con esta enfermedad tienen un defecto en la hemostasia primaria causado por una adhesión deficiente de las plaquetas al colágeno subendotelial expuesto (Ruggeri ZM 2003).

Hay tres tipos principales de enfermedad von Willebrand. En la enfermedad tipo 1 aproximadamente el 70% de los pacientes tienen al menos una mutación en el gen FvW, la mayoría de estas mutaciones son cambios de aminoácidos, que ocurren a lo largo de todo el gen, y el patrón de herencia es autosómico dominante, aunque algunas muestran penetrancia incompleta. Aproximadamente el 15% de los pacientes tienen más de una mutación, en su mayor parte como heterocigoto compuesto (Peyvandi F 2006).

La enfermedad tipo 2 presenta varios subtipos, 2N, 2A, 2B y 2M, y está asociado con un defecto cualitativo en el FvW, que afecta la estructura multimérica de la proteína. El tipo 2N tiene una herencia autosómica recesiva y el resto de subtipos un patrón de herencia autosómico dominante (Peyvandi F 2006).

Por último la enfermedad tipo 3, se refiere a una deficiencia total (homocigoto o heterocigoto compuesto) y tiene un patrón de herencia autosómica recesiva (Sadler JE 1998). Familiares heterocigotos pueden ser clasificados como tipo 1 pero frecuentemente son asintomáticos.

La enfermedad es clínicamente heterogénea y la gravedad de los síntomas depende no solamente de la naturaleza de la mutación que causa la enfermedad, sino también de si los dos alelos están afectados. Las manifestaciones clínicas más comunes son menorragia y epistaxis; la

hemartrosis y hemorragia en músculos ocurre solamente en los casos más graves, tipo 3 (poco común), en los cuales el factor vW está ausente (Bolton-Maggs PHB 2003).

Los tipos de anomalías genéticas encontradas son de todo tipo, aunque principalmente mutaciones de cambio de aminoácido. Varias formas de la enfermedad de von Willebrand son tratadas con concentrados de FvW, en función de los episodios hemorrágicos (Mannucci PM 2004 (von Willebrand)).

1.2.2. Enfermedades autosómicas recesivas

Las deficiencias de factores de coagulación como deficiencias de fibrinógeno, protrombina, FV, FV combinado con FVIII, FVII, FX, FXI, y FXIII, tienen generalmente una prevalencia en la población general que varían entre 1: 500.000 y 1: 2.000.000. No obstante, en poblaciones donde los matrimonios consanguíneos son frecuentes, como en países musulmanes y en el sur de la India, estas deficiencias son más frecuentes y juntas pueden alcanzar prevalencias más elevadas que las de la hemofilia B, representando un problema clínico y social significativo. En los últimos años, el número de pacientes con defectos de coagulación autosómicos está aumentando en países europeos con un alto porcentaje de inmigración procedente del Medio Oriente, India, Pakistan y el Norte de Africa (Peyvandi F 2002).

En general, las deficiencias de factores que se transmiten con un patrón autosómico recesivo tienden a ser menos graves que la hemofilia A y B, siendo frecuentes síntomas de sangrado como epistaxis y menorragia, muy raros en hemofílicos (Peyvandi F 2002). Las únicas excepciones son las deficiencias de factores X y XIII, caracterizadas por la aparición de síntomas a edad temprana, tales como hemorragias en el sistema nervioso central y en el cordón umbilical al nacer.

Los tipos de mutaciones encontradas en pacientes con defectos de coagulación autosómicos son de todo tipo, aunque principalmente mutaciones de cambio de aminoácido. Para cada defecto de coagulación hay múltiples mutaciones y la mayoría de ellas son únicas en cada familia. La relación entre genotipo y fenotipo no siempre está bien definida y aunque las deficiencias graves están generalmente asociadas con mutaciones deletéreas, hay un

número de casos con deficiencia grave asociada con mutaciones de cambio de aminoácido (Peyvandi F 2002).

Como consecuencia de la rareza de estas deficiencias, y la menor gravedad de los síntomas, el tratamiento actual de los episodios hemorrágicos no está bien establecido, a diferencia de lo que ocurre en hemofilia A y B (Peyvandi F 1999).

Los factores que intervienen en el inicio de vía intrínseca, FXII, precalicreína y QAPM, no originan problemas hemorrágicos (Mannucci PM 2002). En la tabla 3 se recogen algunas de las características más importantes de este tipo de enfermedades.

Tabla 3. Características de las enfermedades autosómicas recesivas.

Deficiencia de Factor		Incidencia en población general	Patrón hereditario	Tipo de mutaciones encontradas	Clinica
Fibrinógeno	Deficiencia tipo I	1: 1 millón	AR	Todo tipo de defectos moleculares, principalmente mutaciones de cambio de aminoácido.	- Síntomas frecuentes: hemorragia en articulaciones y cordón umbilical, epistaxis y menorragia.
	Deficiencia tipo II				
Protrombina	Deficiencia tipo I	1: 2 millones	AR	- deficiencias tipo I: mutaciones de cambio de aminoácido, codón de parada y 1 pequeña deleción - deficiencia tipo II: mutaciones de cambio de aminoácido	- Síntomas frecuentes: hemartrosis y hematomas en músculos, epistaxis y menorragia.
	Deficiencia tipo II				
FV	Deficiencia tipo I	1: 1 millón	AR	Todo tipo de defectos moleculares, principalmente mutaciones de cambio de aminoácido.	- Síntomas frecuentes: epistaxis y menorragia. - Síntomas poco frecuentes: hemartrosis y hematomas, raramente sangrado gastrointestinal.
	Deficiencia tipo II				
FVII	Deficiencia tipo I	1: 500,000	AR	Todo tipo de defectos moleculares, principalmente mutaciones de cambio de aminoácido.	- Síntomas frecuentes: Epistaxis y menorragia.
	Deficiencia tipo II				
FV combinado con FVIII	Deficiencia tipo II	1: 1 millón	AR	Todo tipo de defectos moleculares, principalmente mutaciones de cambio de aminoácido.	- Síntomas frecuentes: Epistaxis, menorragia y sangrados leves después de extracciones dentales.
FX	Deficiencia tipo I	1: 1 millón	AR	Todo tipo de defectos moleculares a excepción de mutaciones de codón de parada.	- Síntomas frecuentes: Hematomas, hemartrosis y hemorragias gastrointestinales desde edad temprana, también sangrado del cordón umbilical.
	Deficiencia tipo II				
FXI	Deficiencia tipo I	1: 1 millón	AR	Todo tipo de defectos moleculares a excepción de mutaciones de codón de parada.	- Síntomas hemorrágicos muy leves, solo después de un trauma u operación.
FXIII	Deficiencia tipo I	1: 2 millones	AR	Todo tipo de defectos moleculares a excepción de mutaciones de codón de parada.	- Síntomas hemorrágicos graves como sangrado del cordón umbilical y del sistema nervioso central.

1.2.3. Enfermedades recesivas ligadas al cromosoma X: Hemofilias A y B

Las referencias escritas más antiguas de lo que parece ser hemofilia son atribuidas a textos judíos (Talmud) del siglo II. En estos textos se afirmaba que un niño no necesitaba ser circuncidado si dos hermanos de éste ya habían muerto previamente mediante este procedimiento (Ingram GIC 1976). En el siglo XII, Maimonides describió una familia en la cual varios varones habían muerto por hemorragia después de heridas sin importancia. La primera descripción moderna de hemofilia es atribuida al doctor John Conrad en 1803, quién describió una historia familiar de hemofilia, que abarcaba tres generaciones (Otto JC 1803). Sin embargo, el primer uso de la palabra "hemofilia" aparece en un escrito de Hopff en 1928 (Hopff F 1928). Aggeler y col. (1952) y Biggs y col. (1952) reconocieron y describieron los dos tipos de hemofilia, siendo Soulier y col. los que sugirieron el uso de hemofilia A y B para diferenciar las dos enfermedades (Soulier JP 1953). A la hemofilia también se le conoce como "enfermedad real", porque varios miembros de familias reales europeas estuvieron afectados por ella. La reina Victoria de Inglaterra (1837-1901) fue portadora de la enfermedad y a partir de ella la enfermedad se extendió a las familias reales de España, Alemania y Rusia. Quizás el individuo afectado más famoso fue el hijo del Zar Nicolás II de Rusia, Tsarevich Alexis (Ingram GIC 1976).

Las hemofilias A y B son debidas a la deficiencia de los factores VIII y IX, respectivamente, siguiendo ambas enfermedades un patrón de herencia recesiva ligada al sexo (figura 5). Como ya se ha comentado anteriormente, la hemofilia A afecta a uno de cada 5.000-10.000 varones, mientras que la hemofilia B afecta a uno de cada 30.000 varones (Tuddenham EG 1994). Clínicamente, las hemofilias se clasifican en forma grave, moderada y leve, según los niveles de factor en el plasma de <1%, 1-5% y 6-30%, respectivamente (tabla 4).

Figura 5. Herencia en hemofilia

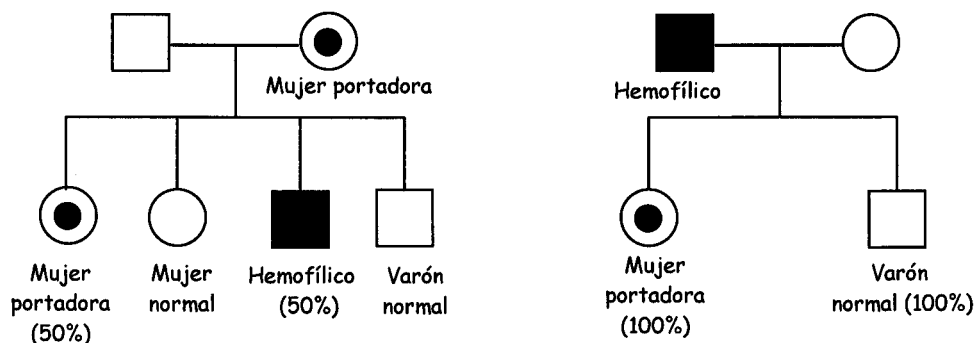


Tabla 4. Clasificación de hemofilia

Concentración de factor (VIII o FIXC)	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.

Los pacientes con hemofilia grave sangran de forma espontánea o después de un golpe sin importancia, un promedio de 20 a 30 veces por año e incluso algunas veces con más frecuencia (Mannucci PM 2002). Los síntomas clásicos de la hemofilia son episodios hemorrágicos que afectan a articulaciones, músculos, órganos internos, y cerebro, siendo la gravedad de los mismos dependiente del grado de deficiencia de la proteína implicada (menos factor = más sangrado) (Dahlbäck B 2000). Lo que caracteriza a la hemofilia grave son las hemorragias espontáneas en articulaciones (hemartrosis) y músculos, dolorosas y destructivas si el paciente no está tratado adecuadamente. La mayoría de niños con hemofilia grave experimentan su primera hemorragia en una articulación a la edad de 4 años, pero ya habrán tenido hemorragias en otras zonas antes de esa edad (Pollmann H 1999). Por otro lado, la hemofilia moderada es diagnosticada en la

mayoría de los casos a la edad de 5 años, y la hemofilia leve puede ser diagnosticada mucho más tarde después de un golpe o una operación.

La hemofilia es diagnosticada inicialmente bien porque existe una historia familiar conocida o después de un episodio hemorrágico, siendo las pruebas rutinarias de coagulación las que confirman el diagnóstico. Estas pruebas se componen de unas pruebas básicas, que analizan varios factores o componentes a la vez, y de otras específicas, que permiten la cuantificación individual de los distintos factores.

La hemofilia A, debida a la deficiencia de FVIII, debe ser distinguida de la enfermedad de von Willebrand mediante ensayos del factor von Willebrand. La historia familiar (herencia autosómica) y los síntomas hemorrágicos (menorragia, epistaxis) difieren de la hemofilia A. Como se ha comentado anteriormente, existen varios subtipos de enfermedad de von Willebrand (Rodeghiero F 2002), incluyendo uno en el que existe una unión defectuosa del factor VIII al factor vW (Tuley EA 1991). En estos casos, la cantidad de factor von Willebrand presente es normal pero la unión es anormal. Este diagnóstico debe ser excluido en familias con una aparente hemofilia A moderada o leve, en particular si algunas mujeres de la familia tienen una concentración baja de FVIII.

No existen diferencias clínicas entre la hemofilia A y B, y por tanto un ensayo del factor IX es lo que confirma el diagnóstico de hemofilia B. Al igual que para el factor VIII la concentración de FIX no cambia con la edad, excepto en el caso de pacientes con mutación en la región promotora del gen (factor IX Leyden), en los cuales la concentración de FIX aumenta con los cambios hormonales que se producen en la pubertad.

1.3. HEMOFILIAS

Las hemofilias A y B son, como hemos definido anteriormente, las enfermedades hemorrágicas hereditarias de mayor incidencia en la población general y siguen un patrón de herencia recesiva ligada al sexo, y se deben a la deficiencia de los factores VIII y IX, respectivamente.

1.3.1. Estructura de los genes y proteínas

1.3.1.1. Gen y proteína FVIII

El gen del FVIII está localizado en la parte más distal del brazo largo del cromosoma X (Xq28). Es un gen extremadamente largo, con una estructura compleja que abarca 186 Kb y que está constituido por 26 exones (figura 6) (Gitschier J 1984). Este gen es inusual ya que dentro del intrón 22 tiene dos genes adicionales, F8A (Levinson B 1990) y F8B (Levinson B 1992). Existen dos copias más de F8A que se son extragénicas y se encuentran a unas 500 Kb hacia la región telomérica (Levinson B 1990; Naylor JA 1995). La función de los genes F8A y F8B es desconocida.

La cadena polipeptídica está compuesta de 2351 aminoácidos, la cual incluye un péptido señal de 19 aminoácidos y una proteína madura de 2332 aminoácidos (Wood WI 1984, Vehar GA 1984, Toole JJ 1984). Tres tipos de dominios internos se distinguen en la proteína madura: 3 dominios A, un dominio B de gran tamaño y dos dominios C (Vehar GA 1984). Los dominios A tienen una homología importante con la ceruloplasmina (proteína de unión al cobre), y con el factor FV (Church WR 1984). Los dominios C están estructuralmente relacionados con los dominios C del factor V. El dominio B es único y no tiene homología con ninguna otra proteína conocida (Lenting PJ 1998). Los tamaños de los dominios A1, A2, y A3 son 336, 345, y 335 residuos de aminoácidos, respectivamente; el dominio B es el más grande con 908 residuos, y los residuos C1 y C2 comprenden 155 y 152 residuos, respectivamente. Tres pequeños dominios ácidos, designados a1, a2, y a3, conectan, respectivamente, los dominios A1 y A2, el dominio A2 y la porción amino-terminal del dominio B, y la porción carboxi-terminal del dominio B al

dominio A3. La organización de dominios resultante para la cadena polipeptídica única de FVIII es A1-a1-A2-a2-B-a3-A3-C1-C2 (Vehar GA 1984).

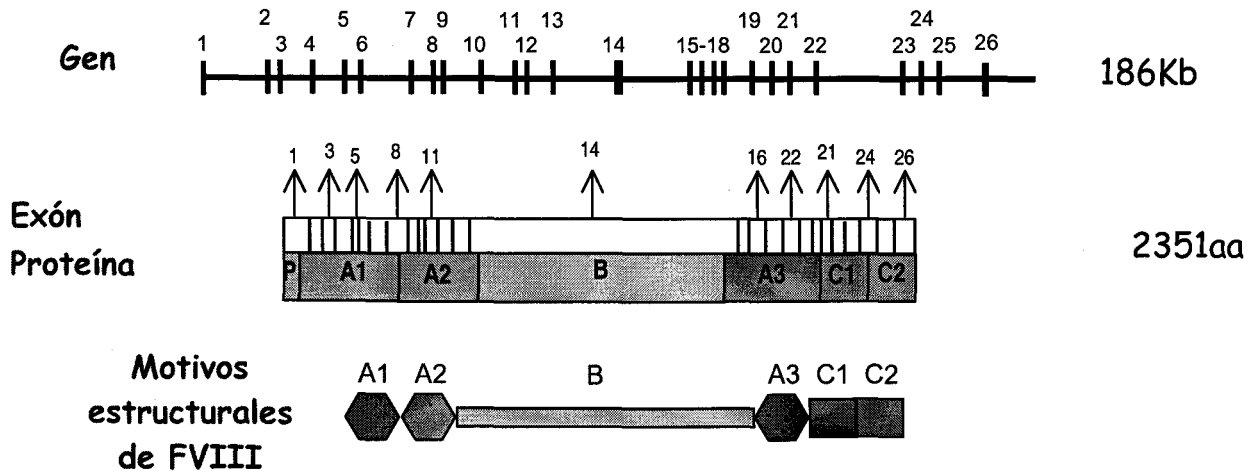


Figura 6. Relación entre la estructura del gen y la estructura proteínica de FVIII.

(En la proteína, P se refiere a la secuencia propéptido guía).

El factor VIII es activado por la trombina o por el FXa mediante escisión en los residuos arginina 372, 740, y 1689 (figura 7) (Eaton D 1986). La primera escisión se produce en el residuo Arg1689 y genera una cadena pesada de tamaño 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). Esto produce una molécula heterotrimérica compuesta por los dominios A1 y A2 unidos de forma no covalente con una cadena ligera A3-C1-C2 mediante iones calcio. En la circulación, el FVIII es transportado y protegido por el FvW (Weiss HJ 1977, Tuddenham EG 1982). La activación del FVIII también produce la liberación del FVIIIa del FvW (Hamer RJ 1987, Saenko EL 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 (Hoffman R 2000). Diferentes regiones de FVIII están implicadas en la interacción con otras proteínas como FIX y FX (figura 8).

Figura 7. Activación de la proteína FVIII

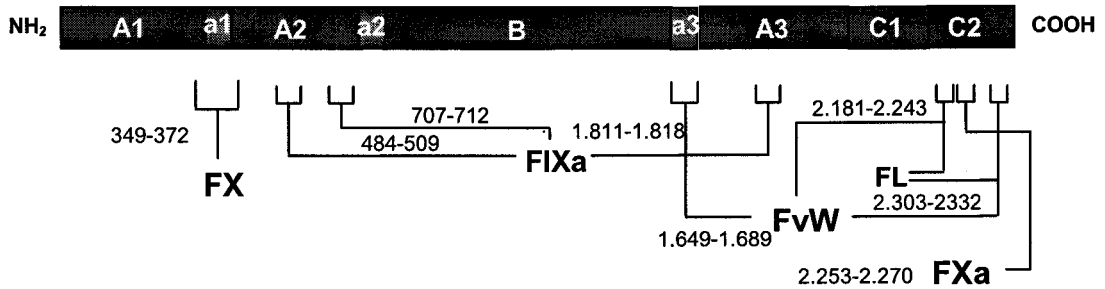
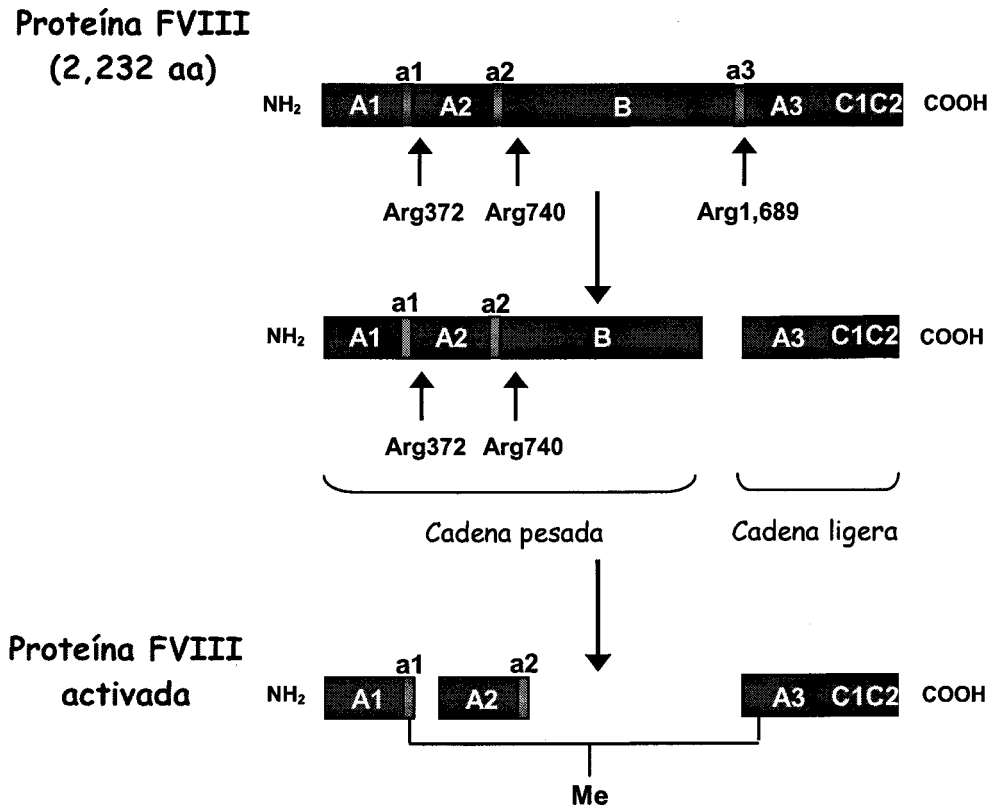


Figura 8. Sitios de interacción de la proteína FVIII. Los números indican las posiciones de los aminoácidos. Los sitios de interacción del FVIII con fosfolípidos (FL) y otros factores de coagulación, FvW, FIXa, FX, FXa, están también indicados (Graw J 2005).

1.3.1.2. Gen FIX

El factor IX es una serín proteasa dependiente de vitamina K. La proteína está compuesta de 415 aminoácidos, y tiene una estructura proteínica similar al resto de factores de coagulación dependientes de vitamina K como el FVII, FX, y la proteína C. El gen del FIX se encuentra en el brazo largo del cromosoma X en la región Xq27 (Camerino G 1984), y es considerablemente más pequeño y menos complejo que el gen FVIII, ya que abarca solo 33.5Kb y comprende 8 exones (figura 9) (Yoshitake S 1985).

La proteína se sintetiza como un precursor de 454 aminoácidos incluyendo una pre y pro-secuencia de 27 y 19aa, respectivamente, que son eliminadas mediante proteólisis antes de liberar la proteína a la circulación. La pre-secuencia (péptido señal) asegura la secreción a partir del hepatocito, y el pro-péptido proporciona un sitio de reconocimiento para la interacción con la γ -glutamylcarboxilasa, la cual es responsable de la modificación post-translacional de los primeros 12 residuos de ácido glutámico en el dominio Gla de la proteína madura (Galeffi P 1987). El resto de dominios que comprenden la proteína son el dominio ácido γ -carboxiglutámico (Gla), dos dominios similares al factor de crecimiento epidérmico (FCE), un péptido de activación (PA) y un dominio catalítico serín proteasa (D. Lillicrap 1998).

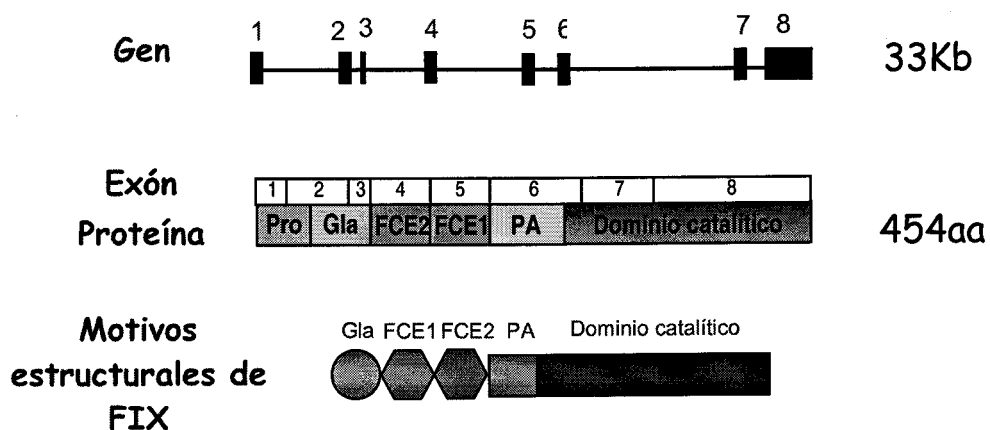
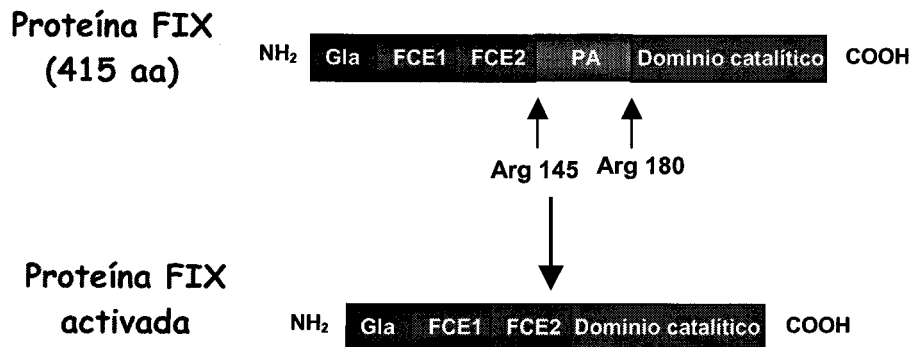


Figura 9. Relación entre la estructura del gen y la estructura proteínica de FIX. (En la proteína, Pro se refiere a la secuencia pre-pro guía. PA, se refiere al péptido de activación).

El FIX puede activarse a través del FXIa (vía intrínseca) (Walsh PN 1984) o por el complejo FVIIa/FT (vía extrínseca) (Jesty J 1983, Osterud B 1977). La activación completa requiere la fragmentación de dos enlaces (Arg 145 y Arg 180), y la liberación del péptido de activación (figura 10) (Di Scipio RG 1978).

Figura 10. Activación de la proteína FIX.



La función de FIX es la descrita anteriormente: en combinación con su cofactor, FVIII, en la superficie de un fosfolípido de membrana, activa a FX. Al igual que FVIII, la función de FIX requiere la interacción de varias de sus regiones con diferentes moléculas, entre ellas su cofactor VIIIa (figura 11). Fisiológicamente, la actividad del FIX se expresa principalmente en la superficie de las plaquetas activadas, y hay datos que sugieren que las plaquetas expresan una proteína de unión al receptor para el FIX que promueve la unión con el complejo factor IXa/VIIIa (London FS 1992).

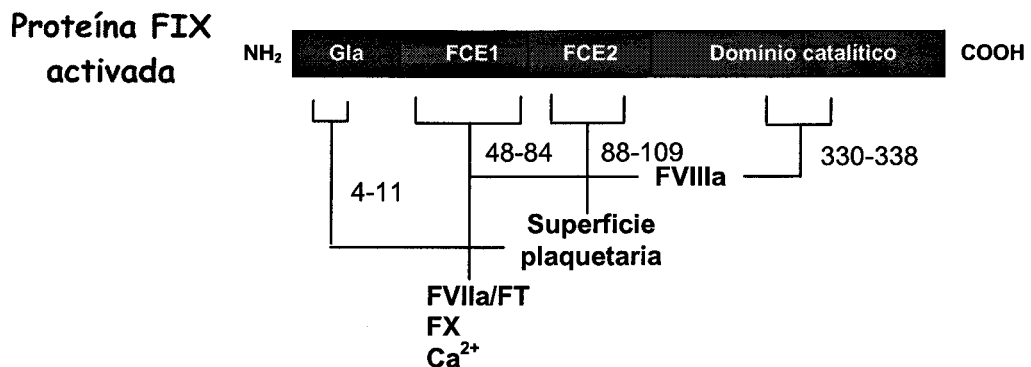


Figura 11. Sitios de interacción de la proteína FIX. Los números indican las posiciones de los aminoácidos. También están indicados los sitios de interacción con FVIIIa, FX, FVIIa/FT, Ca²⁺, y la superficie plaquetaria (Rao Z 1995, Mathur A 1999, Wilkinson FH 2002, Fribourg C 2006)

1.3.2. Bases moleculares de la hemofilia

Los genes de los factores VIII y IX fueron clonados y secuenciados en 1982 (Kurachi K 1982) y 1984 (Gitschier J 1984), respectivamente. Esta clonación ha dado lugar a importantes avances en la caracterización molecular de los defectos que causan las hemofilias. Se han secuenciado estos genes en cientos de pacientes, y como consecuencia de ello se han identificado gran número de anomalías genéticas, haciendo evidente que la base molecular de las hemofilias es extremadamente diversa ([Http://europium.csc.mrc.ac.uk](http://europium.csc.mrc.ac.uk); Stenson PD 2003). Las mutaciones identificadas en ambos genes incluyen mutaciones puntuales, deleciones, inserciones, y reordenamientos/inversiones. Por lo general, los reordenamientos/inversiones son bastante raros en la población hemofílica con excepción de dos inversiones comunes en pacientes con hemofilia A grave, la inversión del intrón 1 y la inversión del intrón 22, que suponen aproximadamente un 20% de los casos totales (40-55% de los casos graves) (Antonarakis SE 1995a, Bagnall RD 2002). El 80% restante de los casos en hemofilia A es debido sobre todo a mutaciones puntuales, que consisten en sustituciones de un nucleótido, y deleciones o inserciones de una o pocas bases, distribuidas a lo largo de todo el gen ([Http://europium.csc.mrc.ac.uk](http://europium.csc.mrc.ac.uk); Stenson PD 2003). Las deleciones e inserciones de gran tamaño son menos frecuentes (<5%) y son, generalmente, causantes de hemofilia grave ([Http://europium.csc.mrc.ac.uk](http://europium.csc.mrc.ac.uk); Stenson PD 2003). En hemofilia B, más del 70% se debe a mutaciones puntuales, aproximadamente un 20% a pequeñas deleciones e inserciones y el porcentaje restante a grandes deleciones e inserciones.

Dentro de las mutaciones puntuales podemos diferenciar:

- Mutaciones de cambio de aminoácido, la sustitución de un nucleótido produce un cambio de aminoácido en la proteína codificada (figura 12).
- Mutaciones de codón de parada, donde el triplete correspondiente cambia a uno de los tres de fin de mensaje (TAA, TAG, TGA) (figura 13).
- 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. A consecuencia de

estas mutaciones, uno o más intrones permanecen en el ARN maduro y pueden alterar la generación del producto proteico.

Las pequeñas deleciones e inserciones son definidas arbitrariamente como deleciones e inserciones de menos de 50 pares de bases (pb), y cuando éstas se refieren a un número de bases que no es múltiplo de tres se cambia el marco de lectura original y la secuencia de aminoácido a partir del punto de la mutación será diferente a la proteína original, apareciendo con frecuencia un codón de parada prematuro (figura 14).

Figura 12. Mutación de cambio de aminoácido

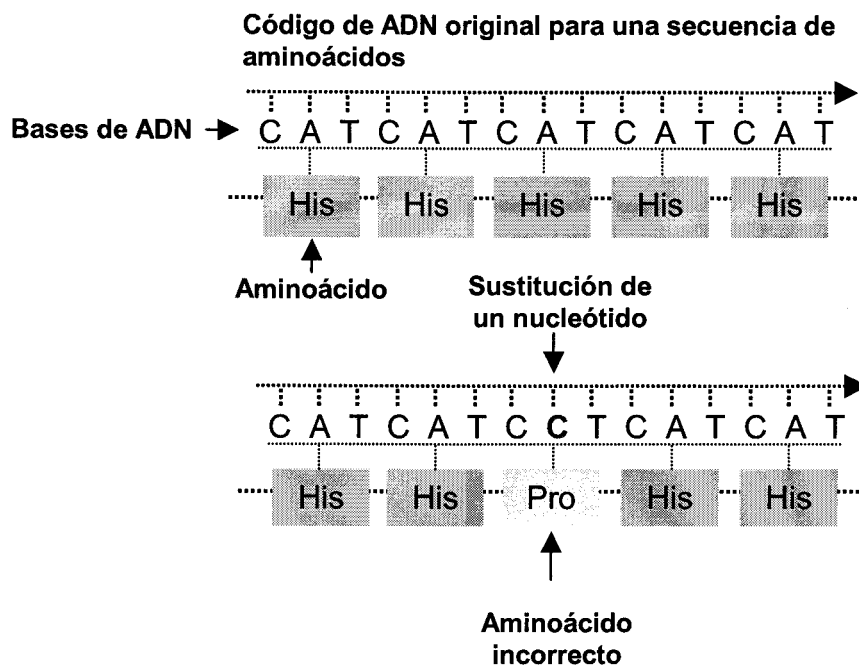


Figura 13. Mutación de codón de parada

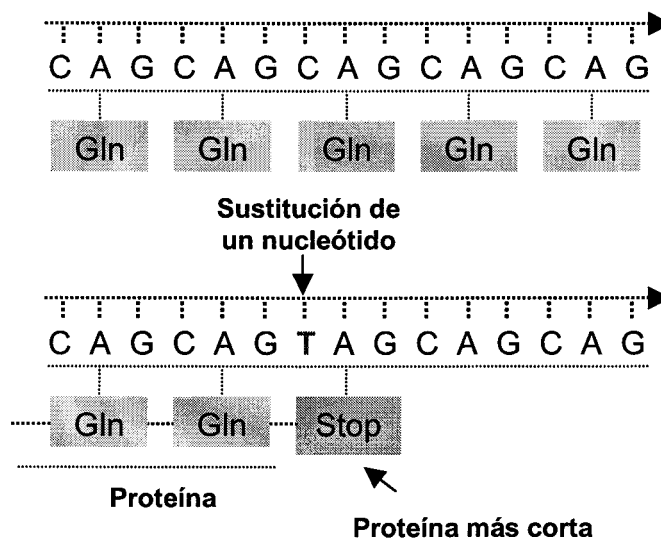
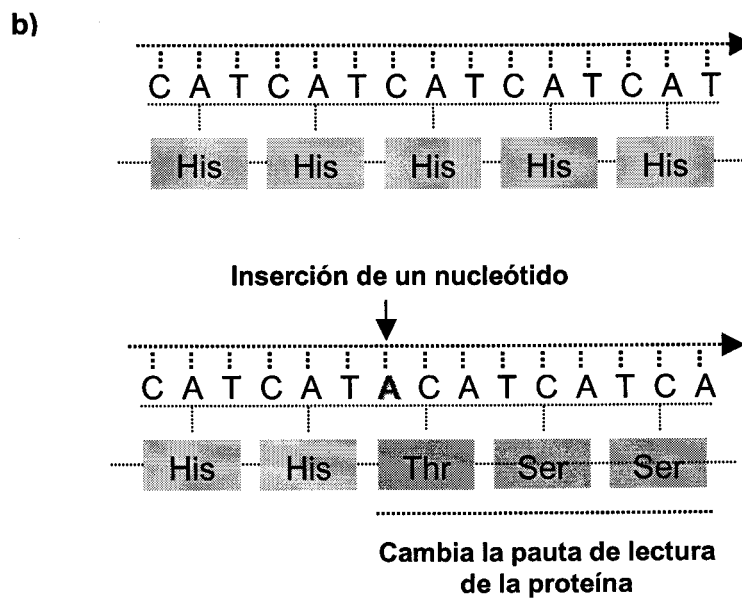
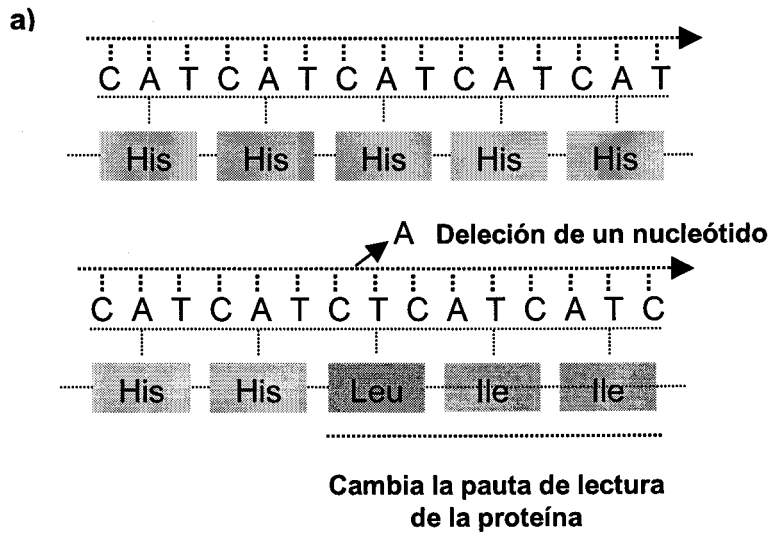


Figura 14. Mutaciones de cambio de la pauta de lectura. Pequeña deleción (a).

Pequeña inserción (b).



1.3.2.1. Mutaciones en sitios CpG

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 5' a una guanina (5'-CG-3'). Estos residuos de citosina metilados (5-metilcitosina) son propensos a sufrir deaminación espontánea y dar lugar a timidina, el cual no es reconocido como anormal por el mecanismo de reparación del ADN de las células, ya que la timidina se produce de forma natural. Posterior a la replicación se produce, por tanto, la introducción del par de bases AC en la nueva cadena, en lugar de la secuencia GC original (Lewin B 1994). El dinucleótido CG, también representado por CpG donde la "p" representa que están enlazados por un fosfato, 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. Se ha estimado que la frecuencia de transiciones C a T o G a A en sitios CpG es 20 veces más elevada que en sitios no CpG (Bottema CD 1993).

Más del 30% de todas las mutaciones puntuales que se detectan en hemofilia A y B ocurren en sitios CpG dentro del gen FVIII (70 dinucleótidos CG), y FIX (21 dinucleótidos CG), respectivamente (Vogel F 1977, Pechet L 1978, Kurachi). Además, cuatro de los 6 codones de arginina (CGT, CGC, CGA, y CGG) contienen dinucleótidos CpG, lo cual explica porqué la arginina es el amino ácido más mutado.

Una alta frecuencia de mutaciones puntuales recurrentes en hemofilia A y B (codón de parada y cambio de aminoácido), ocurren en sitios CpG, indicando que es un "hotspot" para mutaciones en los genes FVIII y FIX, respectivamente. 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 han sido informadas en la base de datos en 53 y 37 ocasiones, respectivamente ([Http://europium.csc.mrc.ac.uk](http://europium.csc.mrc.ac.uk)), y ocurren en sitios CpG.

1.3.2.2. Mutaciones propias del gen FVIII

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) (Antonarakis SE 1995a). Esta inversión se produce debido a la existencia de dos regiones (int22h2 e int22h3) localizadas a unas 500Kb del gen FVIII hacia la región telomérica, homólogas a una secuencia que se encuentra en el intrón 22 (int22h1) pero en orientación opuesta (Levinson B 1990; Naylor J 1995). La inversión tiene lugar por una recombinación homóloga intracromosómica entre int22h1 y una de las dos copias teloméricas, resultando un gen FVIII truncado a partir del exón 22 (Lakich D 1993) (figura 15). En células germinales masculinas existe una probabilidad 10 veces mayor de 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 JP 1994).

Una inversión similar que implica al intrón 1 del gen FVIII ha sido descrita en aproximadamente el 5% de los pacientes con hemofilia A grave (Bagnall RD 2002). Este reordenamiento es la consecuencia de una recombinación intracromosómica entre una región homóloga al intrón 1 (int1h2) localizada a 140Kb hacia el telómero (se encuentra en orientación opuesta) y una región dentro del intrón 1 (int1h1) (figura 16).

Figura 15. Representación esquemática de la inversión del intrón 22

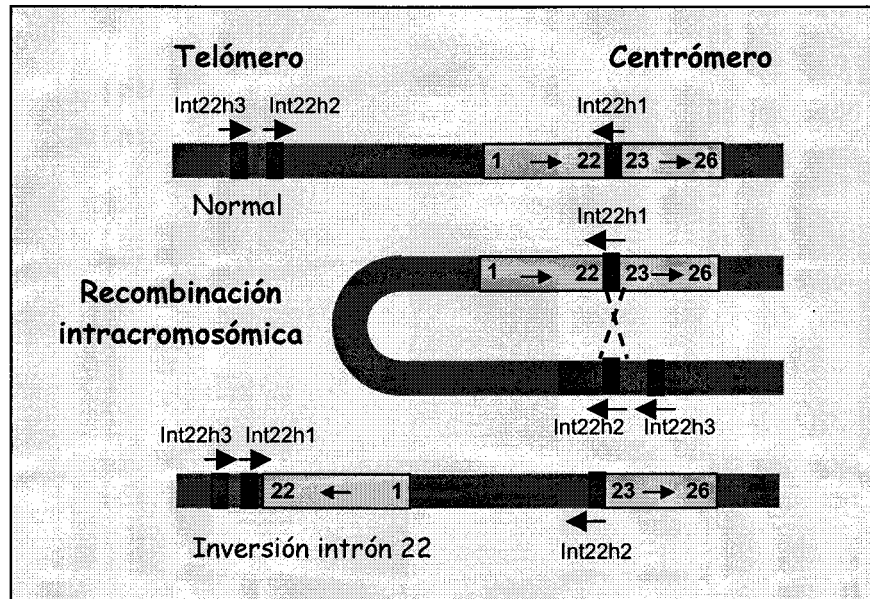
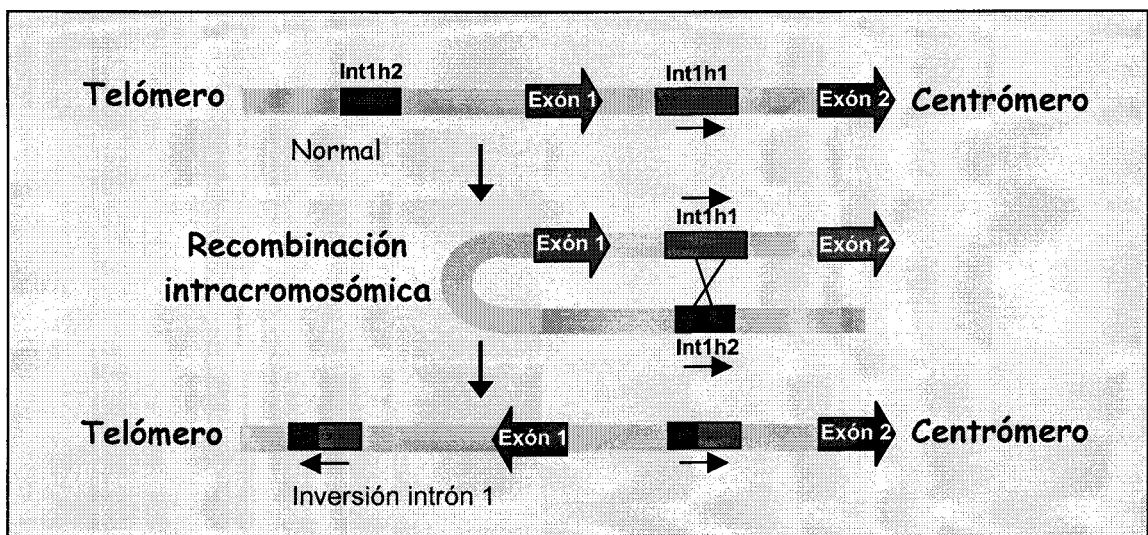


Figura 16. Representación esquemática de la inversión del intrón 1



Las grandes deleciones en el gen FVIII son definidas arbitrariamente como deleciones de más de 50pb en tamaño y pueden variar hasta la deleción completa del gen. Los datos más recientes de la base de datos internacional de hemofilia A, HAMSTeRS, tiene recopiladas más de 120 grandes deleciones. La mayoría de estas deleciones abarcan varias kilobases, pero los puntos de rotura y empalme han sido caracterizados sólo en algunos casos (Van the Water N 1998; Vidal F 2002). Algunos estudios recientes indican que las recombinaciones mediadas por elementos LINE y *Alu* pueden jugar un papel significativo en la patogénesis de estas mutaciones (Vidal F 2002; Rossetti LC 2004; Nakaya SM 2004; Van de Water N 1998). Al menos 49 regiones relacionadas con secuencias *Alu* se han identificado en la secuencia del gen FVIII (Rossetti LC 2004). Actualmente sólo se ha informado de tres grandes inserciones, todas como consecuencia de elementos repetitivos que se han incorporado en el exón 14 del gen FVIII. Kazazian y col. identificaron la inserción de elementos L-1 (Kazazian HH 1988) y Sukarova y col. identificaron la inserción de un elemento repetitivo *Alu* (Sukarova E 2001). Todas las grandes deleciones e inserciones dan lugar a hemofilia grave

En cuanto a las pequeñas deleciones e inserciones, generalmente dan lugar a cambios en la pauta de lectura que resultan en la aparición de un codon de parada prematuro, predominando las deleciones o inserciones de un solo nucleótido (Cooper DN 1998). Un tipo de mutación muy frecuente son las deleciones o inserciones 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 (Young M 1997). 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, pero aún no se han informado inserciones en los exones 3, 7, 10, 15, 16, y 23 (Oldenburg J 2006b).

Las mutaciones puntuales (aproximadamente 85% mutaciones de cambio de aminoácido, 15% mutaciones de codón de parada) son el defecto genético más común. Con respecto a las mutaciones de cambio de aminoácido, éstas pueden dan 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, y se han descrito incluso mutaciones que afectan a la metionina de inicio (codon -19) y al codon de terminación (2332) (Goodeve 2003). Como ya se ha comentado, más del 30% de estas mutaciones ocurren en uno de los 70 sitios CpG dentro del gen FVIII, aunque estos solo representan el 2% de la secuencia codificante (Vogel F 1977).

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.

La distribución de los diferentes tipos de mutaciones en la última actualización de la base de datos de mutaciones para la hemofilia A (HAMSTeRS, 2005) se describe en la siguiente tabla.

Tabla 5. Distribución de los diferentes tipos de mutaciones. HAMSTeRS, 2005.

Tipo de mutación	Número de mutaciones observadas	Porcentaje (%)
Mutaciones de cambio de aminoácido	583	47,7
Mutaciones de codón de parada	131	10,7
Mutaciones puntuales en zona de procesamiento del ARN	95	7,8
Pequeñas deleciones e inserciones	272	22,3
Grandes deleciones e inserciones	140	11,5
Total	1221	100

1.3.2.3. Mutaciones propias del gen FIX

El patrón de mutaciones genéticas en hemofilia B es sustancialmente diferente al de hemofilia A (www.kcl.ac.uk/ip/petergreen/haemBdatabase.html), y no existe una mutación común en el gen FIX como ocurre con la inversión 22 y la inversión del intrón 1 en el gen FVIII. En la edición más reciente de la base de datos de hemofilia B (13ª edición, 2004) aparecen registrados 2.891 pacientes, y 1053 mutaciones diferentes (tabla 6). De éstas, el 71,3% se corresponde con mutaciones puntuales (dos tercios son mutaciones de cambio de aminoácido), el 20% a pequeñas deleciones/inserciones, y el 8,7% restante a son grandes deleciones/inserciones. Las mutaciones se distribuyen a lo largo de todo el gen, y como cabría esperar, en los exones 1 y 6 se localizan pocas mutaciones debido a la falta de importancia de sus aminoácidos (pre péptido y péptido de activación), mientras que en los exones 4, 5 y 8 se localizan una gran cantidad de mutaciones, evidenciando la importancia de las regiones FCE y dominio catalítico codificados por estos exones (base de datos de Hemofilia B).

Tabla 6. Distribución de los diferentes tipos de mutaciones. Base de datos de mutaciones de Hemofilia B – 2004.

Tipo de mutación	Número de mutaciones observadas	Porcentaje (%)
Mutaciones puntuales	751	71,3
Pequeñas deleciones e inserciones	211	20
Grandes deleciones e inserciones	91	8,7
Total	1053	100

Al igual que ocurre en hemofilia A, entre las mutaciones que aparecen con más frecuencia en la base de datos, muchas se localizan en dinucleótidos CG, implicando cambios CG→TG o CA. Y al igual que en hemofilia A, más del 30% de las mutaciones puntuales que se detectan en hemofilia B ocurren en sitios CpG, por lo que se le considera un “hotspot” para mutaciones (Pechet L 1978; Kurachi K 1982).

Aproximadamente, el 20-30% de los casos de hemofilia B leve son debidos a mutaciones fundadoras. Estas mutaciones pueden ser transmitidas a

lo largo de generaciones persistiendo, por tanto, en la población. Mediante el estudio de haplotipo del gen correspondiente se puede demostrar que pacientes que comparten una misma mutación y que en principio no están emparentados pudieron estarlo en generaciones anteriores (Thorland EC 1995). El análisis de haplotipo consiste en el estudio de ciertos marcadores polimórficos que se encuentran en el ADN genómico y que permiten un seguimiento del cromosoma portador del gen defectuoso (Goodeve AC 1998). Estos marcadores polimórficos no tienen ninguna relación con la anomalía y pueden estar localizados intra o extragénicamente, siendo más adecuados los primeros, ya que la probabilidad de recombinación entre el *loci* polimórfico y la mutación responsable de la enfermedad es menor. Los marcadores utilizados en hemofilia pueden ser del tipo RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), en los que se determina la presencia-ausencia de una determinada diana de restricción, o bien del tipo STR (*Short Tandem Repeats*) que consisten en repeticiones de pocas bases (por ejemplo GT) un número variable de veces y que se encuentran localizados a lo largo de todo el genoma. Estos últimos marcadores suelen ser más informativos, ya que al ser multialélicos proporcionan una mayor heterocigosidad poblacional (Kochhan L 1994).

1.3.3. Tratamiento y complicaciones

La hemofilia A y B se comenzaron a tratar mediante transfusiones sanguíneas desde mitad del siglo XIX, y sin embargo, se necesitó un siglo para comprender los mecanismos fundamentales de este tratamiento. En la década de los 70s se pudo observar que el precipitado que se obtenía al descongelar a 4°C plasma fresco congelado, conocido como crioprecipitado, era muy rica en FVIII (DiMichele D 1998). Este descubrimiento facilitó la elaboración de grandes cantidades de crioprecipitados en los bancos de sangre y el inicio del fraccionamiento plasmático por parte de la industria para la producción de concentrados comerciales. Los primeros concentrados de FVIII y FIX se obtuvieron, por tanto, en los años 70; cada lote de producto liofilizado se obtenía a partir de 2000 donantes. La administración de estos productos se

tradujo en una disminución significativa de la morbi-mortalidad y, por tanto, en una amplia difusión del uso de estos hemoderivados, haciendo posible el desarrollo de programas de tratamiento domiciliario (Bolton-Maggs PHB 2003). Pero esta percepción optimista de la enfermedad cambió dramáticamente a principio de los años 80, cuando el 60-70% de las personas con hemofilia grave se infectaron con el virus de inmunodeficiencia humano (HIV) y el virus de la hepatitis C (VHC), transmitidos a través de los crioprecipitados. Pronto se introdujeron los procedimientos de inactivación viral para erradicar la transmisión del virus HIV y VHC (Mannucci PM 2002). En los últimos años, la aplicación de técnicas de ingeniería genética, y la secuenciación del gen FVIII en 1984 y del gen FIX en 1982 condujeron al desarrollo de factores recombinantes altamente seguros y eficaces.

Después de al menos 4 décadas del uso de concentrados derivados de plasma o concentrados recombinantes, la situación para los pacientes tratados en países desarrollados ha mejorado significativamente. Mientras en el pasado un hombre con hemofilia probablemente moría en su juventud, hoy gracias a los avances en el diagnóstico y el desarrollo en el cuidado y tratamiento efectivo pueden tener una esperanza de vida normal (Bolton-Maggs PHB 2003).

Por otro lado, la hemofilia es el modelo de enfermedad ideal para la terapia génica ya que una pequeña subida en las concentraciones de factor por encima del 1-2% del nivel normal conseguiría una mejora sustancial en el estilo de vida de los pacientes con hemofilia grave. La idea definitiva de la terapia génica en hemofilia A y B sería corregir el defecto molecular del gen mutado (Bolton-Maggs PHB 2003). Esta posibilidad ha sido demostrada en modelos animales, aunque los resultados son muy preliminares (Kren BT 1998; Kren BT 1999).

1.3.3.1. Inhibidores

La principal complicación en el tratamiento de la hemofilia, en el momento actual, es el desarrollo de inhibidores frente al FVIII o FIX, que ocurre principalmente en hemofilia grave, y es más común en hemofilia A (30-50% de los pacientes) que en hemofilia B (1,5-3% de los pacientes) (Brettler BD 1996).

Los inhibidores son anticuerpos dirigidos contra FVIII y FIX, que neutralizan la función de éstos, 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 (Kasper y cols. 1975), 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 en seguida 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. El resultado debe ser corregido teniendo en cuenta el deterioro espontáneo del FVIII, mediante un control consistente en plasma normal incubado con "buffer". La misma prueba puede emplearse para medir inhibidores de FIX utilizando FIX en lugar de FVIII.

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 unidades Bethesda (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 PHB 2003). Algunos pacientes que no están recibiendo infusiones de factor de forma regular, presentan inhibidores de forma transitoria, estos inhibidores son normalmente de título bajo y desaparecen después de un periodo de tiempo variable (Rothschild C 2000).

Las tempranas observaciones de que el riesgo de formación de inhibidor estaba influenciado por la gravedad de la enfermedad, historia familiar y etnia del individuo, revelaron el importante papel de la genética. Varios estudios sugieren que tanto la predisposición genética como el tipo de mutación y genes implicados en el sistema inmune, además de factores ambientales contribuyen al fenotipo de respondedor (Oldenburg J 2004b).

Aunque está ampliamente aceptado que la formación de un inhibidor se debe a la presentación al sistema inmune del paciente de un antígeno FVIII/FIX nuevo o inmunológicamente alterado, la patogénesis de la formación de inhibidor es comprendida solamente en parte. En hemofilia A existe una

correlación bien establecida entre tipo de mutación y desarrollo de inhibidor (Oldenburg J 2004b; Schwaab R 1995a), y en hemofilia B, a pesar de que la formación de inhibidor es mucho menos frecuente, la correlación entre tipo de mutación e inhibidor parece ser bastante similar a la informada en hemofilia A (Ljung RC 1995a). En hemofilia A y B grave, las mutaciones que dan lugar a una ausencia de proteína o a una proteína truncada están asociadas con un riesgo más elevado a desarrollar inhibidor. En hemofilia A, la mayoría de defectos moleculares graves están asociados con un riesgo de inhibidor del 20-40% (Antonarakis SE 1995b; Schwaab R 1995a; Goodeve AC 2000), llegando por encima del 80% en pacientes con grandes deleciones que abarcan más de un dominio de la proteína (Oldenburg J 2006a).

En estos pacientes el objetivo fundamental es eliminar el inhibidor mediante tratamientos de inmunotolerancia, y asegurarles así una expectativa y calidad de vida similar a la del resto de los pacientes hemofílicos. Existen una variedad de protocolos de inmunotolerancia, la primera, la eliminación de un inhibidor mediante la administración reiterada de concentrados de FVIII, fue comunicada por el grupo de Bonn (Brackmann HH 1984), erradicando el inhibidor en el 75% de los pacientes tratados. Pero el coste del tratamiento era muy elevado, y por ello surgieron iniciativas de otros grupos, intentando conseguir la inmunotolerancia con dosis menores (Aznar JA 1984; Ewing NP 1988). Los resultados obtenidos con las diferentes pautas de tratamiento son similares, a pesar de ser esquemas diferentes en dosis y duración del tratamiento, siendo la tasa de éxito del 60-79% (Haya S 2001).

**PLANTEAMIENTO DE ESTUDIO
Y
OBJETIVOS**

PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO Y OBJETIVOS

2.1. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

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 171 familias de Hemofilia A y 25 familias de Hemofilia B que se han estudiado en el presente trabajo. La creación de un censo de la población hemofílica de Andalucía y la caracterización de las mutaciones genéticas causantes de la enfermedad en esta población ha sido el objetivo central del grupo, que está coordinado por la Unidad de Hemofilia del Servicio de Hematología del Hospital Universitario Virgen del Rocío de Sevilla. El estudio genético se inicia en el año 2001 en el Servicio de Inmunología del Hospital Universitario Virgen del Rocío, en estrecha colaboración con la Unidad de Hemofilia del Servicio de Hematología del mismo hospital.

Las mutaciones identificadas han sido registradas en el censo andaluz, donde se encuentran también recogidos los datos fenotípicos del paciente, así como información acerca de su árbol genealógico. Actualmente, el censo Andaluz se compone de 242 familias de hemofilia A (101 graves, 15 moderadas y 126 leves) y 35 familias de hemofilia B (9 graves, 12 moderadas y 14 leves), y ello supone un número total de 415 pacientes.

Las características fenotípicas de los pacientes que se encuentran registradas en el Registro Andaluz de Hemofilia, al igual que en las bases de datos internacionales de hemofilia A y B, es una información de gran valor para los profesionales ya que, entre otras aplicaciones, podrían permitir la predicción del curso clínico de un paciente con respecto al riesgo de desarrollo de inhibidores que depende, entre otros factores, de la naturaleza de la mutación responsable de la patología (Schwaab R 1995a), y poder así, si es posible, optar a estrategias preventivas.

Otra aplicación práctica de gran repercusión es la identificación de portadoras, ya que, una vez que se identifica 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 los familiares. Por tanto, se puede ofrecer a las mujeres de estas familias la posibilidad de acceder a un consejo genético adecuado y optar libremente por la opción reproductiva que consideren más adecuada.

2.2. OBJETIVOS

Como objetivos de este estudio se fijaron los siguientes:

2.2.1. Objetivos iniciales:

- 1.- Caracterizar las mutaciones en pacientes con hemofilia A y B de Andalucía con la finalidad práctica de poder realizar un estudio de portadora en aquellas mujeres que lo acepten voluntariamente.
- 2.- Comparar las mutaciones encontradas con las descritas en la literatura para establecer si existe prevalencia de una determinada mutación en Andalucía.
- 3.- Estudiar la distribución de las mutaciones encontradas a lo largo del gen FVIII y FIX y ver si existe alguna correlación entre:
 - El tipo de mutación encontrada y su localización
 - El tipo de mutación y el nivel de gravedad de la enfermedad
 - Localización de la mutación y nivel de gravedad de la enfermedad
- 4.- Estudiar la correlación entre el tipo de mutación encontrada y el desarrollo de inhibidor en los pacientes que proceda.

2.2.2. Objetivos "a posteriori"

La información de que dispusimos, una vez caracterizadas las mutaciones en los pacientes estudiados, nos hizo plantearnos una serie de objetivos adicionales:

- 5.- Comprobación de que las mutaciones nuevas de cambio de aminoácido constituyen la base molecular de la enfermedad.

6.- Estudio de portadoras en familias con grandes deleciones.

7.- Datación de las mutaciones causantes de la enfermedad en la población hemofílica estudiada.

2.3. DISEÑO EXPERIMENTAL

Para alcanzar los objetivos propuestos realizamos el siguiente diseño experimental:

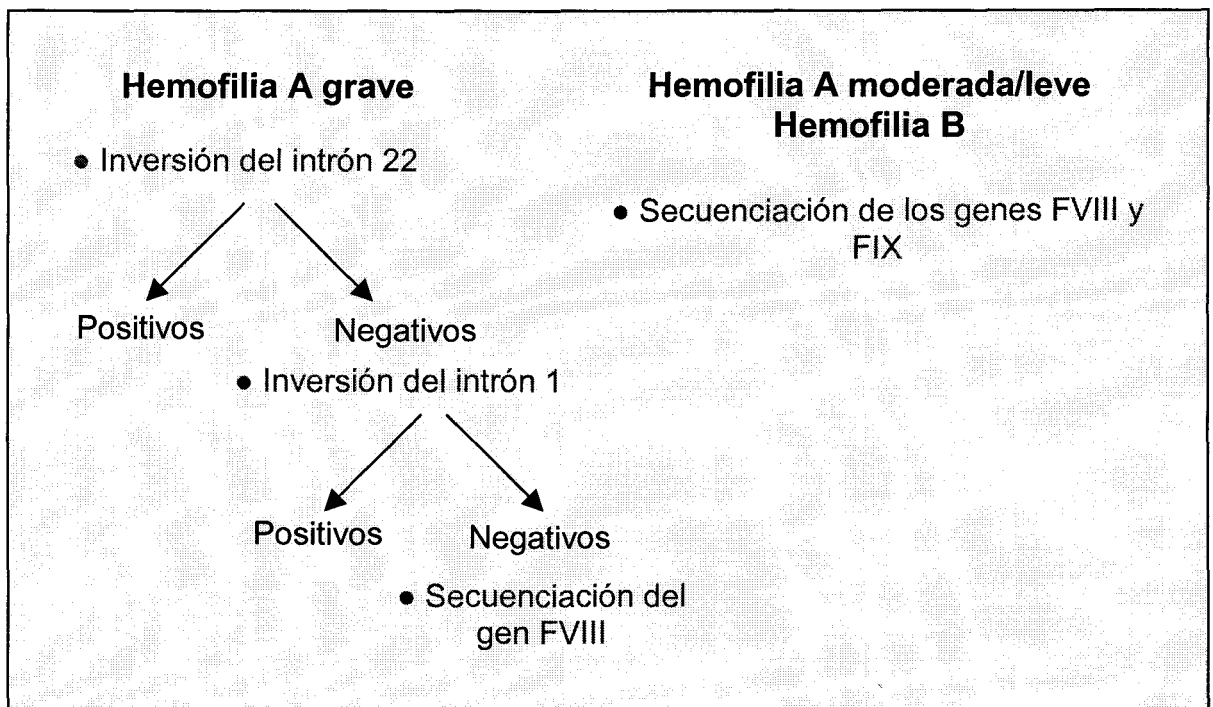
1º Recoger las muestras de sangre de los pacientes con hemofilia A y hemofilia B.

2º Extraer el ADN de las células sanguíneas para realizar el estudio genético.

En los pacientes que presentan hemofilia A grave el primer estudio genético que se realiza es la inversión del intrón 22, estudiada mediante "Long PCR", que es una reacción de amplificación que permite generar un producto, de miles de pares de bases, más extenso que mediante una PCR convencional. A continuación, a los pacientes negativos para esta mutación se les estudia la inversión del intrón 1. En los casos negativos para la inversión del intrón 1 (resto de pacientes con hemofilia A grave), en los pacientes con hemofilia A moderada/leve y en los pacientes con hemofilia B se procede a la secuenciación de todos los exones y regiones intrónicas adyacentes (implicadas en la regulación del procesamiento de ARN) de los genes FVIII y FIX para la identificación de la mutación responsable (figura 17).

Una vez caracterizada las mutaciones en los pacientes estudiados, en el caso de algunos pacientes con hemofilia A que presentan la misma mutación se realiza un estudio de haplotipos para investigar si podrían tener antepasados comunes. Además, en el caso de pacientes con grandes deleciones y con historia familiar previa se identifican los puntos de rotura de las deleciones para poder realizar un estudio de portadora en dichas familias.

Figura 17. Diagrama de flujo.



PACIENTES Y MÉTODOS

PACIENTES Y MÉTODOS

3.1 PACIENTES

3.1.1. Pacientes incluidos en el estudio

Incluimos en el estudio un total de 171 varones no emparentados con hemofilia A y 25 varones no emparentados con hemofilia B, remitidos desde la Unidad de Hemofilia del Hospital Universitario Virgen del Rocío. Todos los pacientes estaban incluidos en el Registro Andaluz de Hemofilia y procedían de distintas áreas geográficas de Andalucía, Ceuta y Melilla. Los pacientes antes de ser incluidos en el Registro Andaluz de Hemofilia deben firmar un consentimiento informado y se les realiza un estudio genealógico comprobando que no están emparentados entre ellos como mínimo en tres generaciones. Los pacientes se clasifican como "familiar" cuando existen otros hemofílicos en generaciones anteriores, y como "esporádico" cuando solo existe un hemofílico en la familia o una sola generación afectada (el paciente hemofílico puede tener hermanos afectados). Seis de los pacientes desconocían si existían otros familiares afectados. Con el fin de completar ciertos estudios de segregación incluidos en este trabajo, algunos familiares de ciertos pacientes fueron también investigados.

Entre los pacientes con hemofilia A (tabla 7), 81 presentaban hemofilia A grave, 13 hemofilia moderada, y los 77 pacientes restantes presentaban hemofilia leve.

Tabla 7. Tipo de herencia en los pacientes con hemofilia A.

	Tipo de herencia	Número de pacientes
Hemofilia A grave	Familiar	27
	Esporádica	50
	Desconocida	4
Hemofilia A moderada	Familiar	8
	Esporádica	5
Hemofilia A leve	Familiar	56
	Esporádica	19
	Desconocida	2

Entre los pacientes con hemofilia B (tabla 8), 6 presentaban hemofilia B grave, 8 hemofilia moderada, y los 11 casos restantes presentaban hemofilia B leve.

Tabla 8. Tipo de herencia en los pacientes con hemofilia A.

	Tipo de herencia	Número de pacientes
Hemofilia B grave	Familiar	5
	Esporádica	1
Hemofilia B moderada	Familiar	2
	Esporádica	6
Hemofilia B leve	Familiar	7
	Esporádica	4

3.1.2. Otros pacientes incluidos en el estudio

Con el fin de completar algunos estudios poblacionales realizados en este trabajo, se incluyeron 8 pacientes con hemofilia A moderada/leve procedentes del Hospital de Sant Pau y la Santa Creu de Barcelona. Cinco de los pacientes eran andaluces y estaban incluidos en el Registro Andaluz de Hemofilia.

3.1.3. Controles

Para comprobar que las mutaciones de cambio de aminoácido identificadas en este estudio no descritas previamente no estaban presentes en nuestra población sana, se utilizaron como controles 50 mujeres andaluzas no emparentadas.

Para determinar la frecuencia de haplotipos del factor VIII en nuestra población se utilizaron como controles 50 hombres sanos. 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.

3.2. EXTRACCIÓN DE ADN

3.2.1. Proteinasa K

Como material de partida se utilizó sangre periférica fresca o conservada a -20°C , obtenida por venopunción en tubos estériles con EDTA como anticoagulante.

Extracción de ADN genómico a partir de sangre total:

- Dispensar $100\mu\text{l}$ de sangre en un tubo Eppendorf de 1.5ml previamente esterilizado en autoclave y añadir 1ml de tampón TE (ver apéndice). Mezclar con vórtex y centrifugar a $13.000 \times g$ 10s .
- Descartar el sobrenadante y resuspender el precipitado celular en 1ml de tampón TE. Centrifugar 10s a 13.000g .
- Repetir esta operación hasta eliminar cualquier resto de hemoglobina, ya que el grupo hemo inhibe la PCR. Normalmente es suficiente con hacerlo dos veces más.
- Resuspender el botón celular en $200\mu\text{l}$ de tampón K (proteínasa K, $100\mu\text{g/ml}$, en $200\mu\text{l}$ de un tampón tris 20mM pH 8 que contiene 0-5% de tween 20) e incubar 45min en un baño termostático a 56°C para digerir las proteínas.
- Incubar 10min a 95°C para inactivar la proteínasa K. Dar un pulso de centrifuga a 13.000g para precipitar los restos celulares no digeridos.

El ADN así obtenido está preparado para su amplificación mediante PCR y puede conservarse a -20°C durante varios años.

3.2.2. ADN purificado

Para la técnica de la inversión del intrón 22 se necesitó ADN purificado ya que se amplifican fragmentos de hasta 12Kb . Para su obtención se utilizó el kit comercial QiAamp (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany).

Para ello, partimos de $200\mu\text{l}$ de sangre y seguimos las instrucciones del fabricante. En el paso final resuspendimos el ADN en tampón AE (suministrado en el kit).

3.3. INVERSIÓN DEL INTRÓN 22

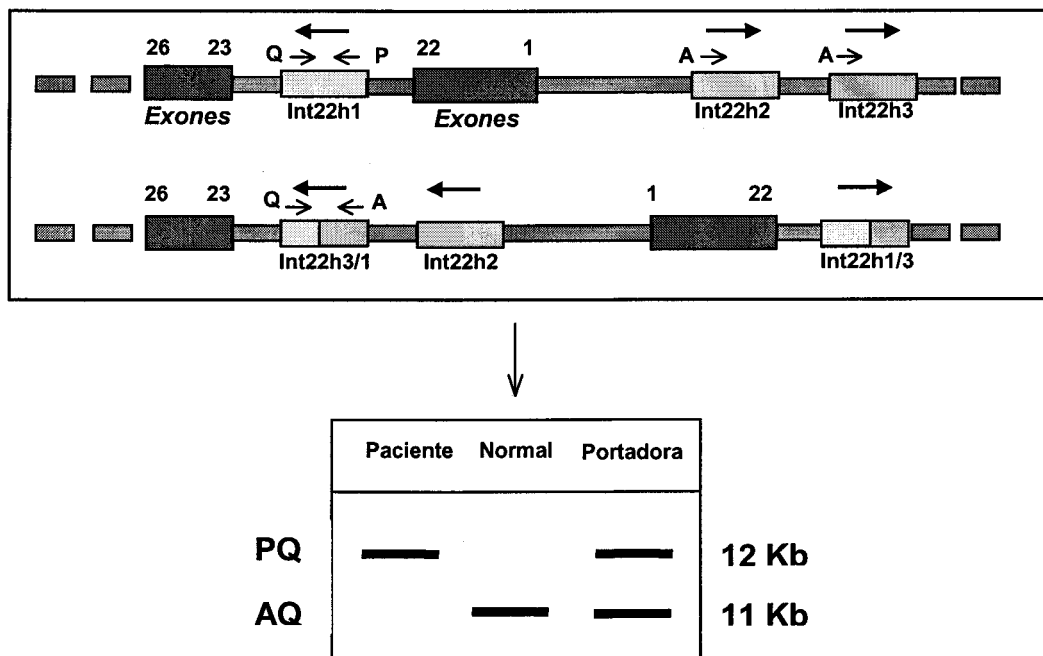
3.3.1. Cebadores

La inversión del intrón 22 la detectamos realizando una PCR con tres cebadores que habían sido previamente descritos por Liu Q y col. (1998a) y fueron sintetizados por Invitrogen (Barcelona, España) (ver tabla 9). Los cebadores se suministraron liofilizados y fueron resuspendidos en el laboratorio en agua destilada, llevando a una concentración de 12µM, 30µM y 20µM a los cebadores A, Q y P, respectivamente. En la figura 19 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.

Tabla 9. Cebadores utilizados en la PCR de la Inversión del intrón 22.

Nombre	Cebadores
A	5'CACAAGGGGGAAGAGTGTGAGGGTGTGGGATAAGA3'
Q	5'GGCCCTACAACCATTCTGCCTTTCACCTTTCAGTGCAATA3'
P	5'GCCCTGCCTGTCCATTACACTGATGACATTATGCTGAC3'

Figura 19. Representación esquemática del ensayo de PCR.



3.3.2. Condiciones de mezcla de PCR

Los reactivos utilizados para la amplificación están descritos en la tabla

10:

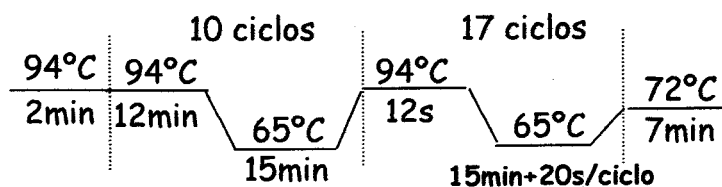
Reactivos	Volumen	Concentración final
ADN	3µl	25ng/µl
Tampón PCR ¹ (Expand Long "casero")	2,5µl	1X
Cebador A (12µM)	1µl	0,5µM
Cebador Q (30µM)	1µl	1,2µM
Cebador P (20µM)	1µl	0,8µM
DMSO 100%	1,4µl	0,06%
DNTPs ²	5µl	500µM
Taq Polimerasa (DyNAzyme EXT™, FINNZYMES)	1µl	0,04U/µl
ddH ₂ O	9,1µl	----
Total	25µl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

¹Ver reactivos, ²62,5µM de dGTP y deaza-dGTP, 125µM del resto de nucleótidos

3.3.3. Parámetros de PCR

Los parámetros utilizados para la amplificación fueron los siguientes:

Parámetros de PCR



3.3.4. Electroforesis

Los fragmentos amplificados se someten a electroforesis en gel de agarosa sumergido en tampón TBE 0.5X (Ver reactivos). La concentración de agarosa para los fragmentos del estudio de la Inversión del intrón 22 fue al 0,4%.

-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 0.5µg/ml (Ver apéndice). Posteriormente se vierte sobre un molde previamente sellado y se deja enfriar hasta que solidifique.

-Se mezclan 4µl del producto de PCR con 1µl de tampón de carga 5X (Ver apéndice) y se dispensa en los pocillos del gel sumergido en TBE 0.5X. Reservar un pocillo para el marcador de peso molecular (Escalera de 1Kb, Amersham Biosciences) (Ver reactivos).

-Someter a electroforesis en tampón TBE 0.5X a 25V durante toda la noche.

-Las bandas se visualizaron con un transiluminador de luz ultravioleta.

3.4. INVERSIÓN DEL INTRÓN 1

3.4.1. Cebadores

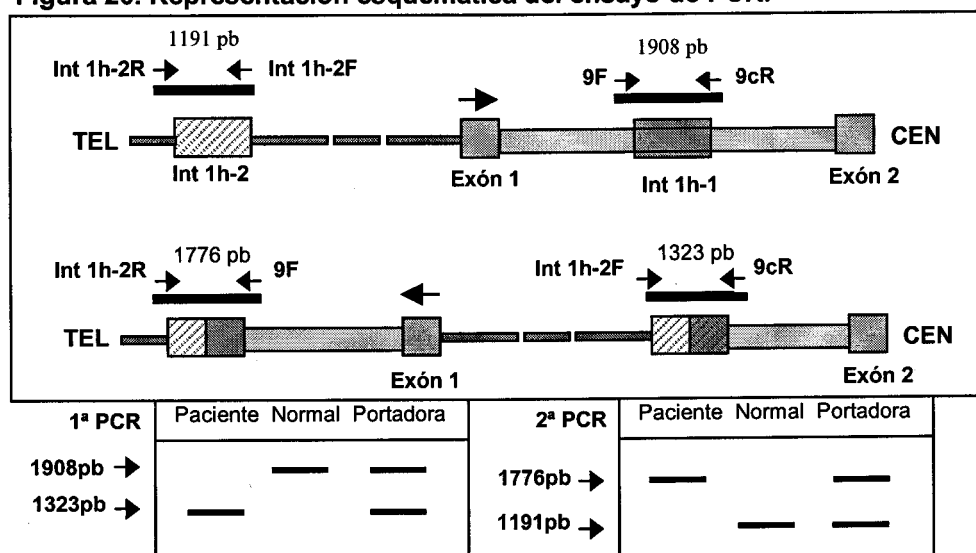
Los cebadores fueron descritos por Richard D. Bagnall y col. (2002) y fueron sintetizados por Invitrogen. Los cebadores se suministraron liofilizados y fueron resuspendidos en el laboratorio en agua destilada, llevándolos a una concentración de 100µM (ver tabla 11).

Tabla 11. Cebadores utilizados en la PCR de la Inversión del intrón 1.

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

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 20 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 20. Representación esquemática del ensayo de PCR.



La primera reacción daría 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 obtendríamos 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, y en caso de portadora obtendríamos las dos bandas.

3.4.2. Condiciones de la mezcla de PCR

Los reactivos utilizados para la amplificación están descritos en la siguiente tabla (tabla 12):

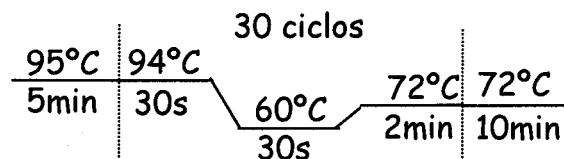
Reactivos	Volumen	Concentración final
ADN	3µl	10ng/µl
Tampón PCR* 10X	3µl	1X
Cebador 1	0,2µl	0,7µM
Cebador 2	0,2µl	0,7µM
Cebador 3	0,2µl	0,7µM
DMSO 100%	1,5µl	0,05%
dNTPs (25mM)	0,4µl	300µM
Taq Polimerasa (Amersham Biosciences)	0,5µl	0,08U/µl
ddH ₂ O	21µl	-----
Total	30µl	-----

* Ver apéndice

3.4.3. Parámetros de PCR

Los parámetros utilizados para la amplificación fueron los siguientes:

Parámetros de PCR



3.4.4. Electroforesis

Para la visualización de los fragmentos amplificados se siguió el mismo procedimiento que en el apartado 3.4., 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 30min.

3.5. SECUENCIACIÓN

3.5.1. Cebadores para la amplificación del gen FVIII y del gen FIX

Los cebadores para la PCR de los exones del factor VIII fueron descritos por David D y col. (1994). Los cebadores del gen FIX se diseñaron en nuestro laboratorio según la secuencia publicada del gen de coagulación humano FIX (nº de acceso en NCBI Sequence Viewer: K02402). Los cebadores fueron sintetizados por Invitrogen y se suministraron liofilizados, resuspendiéndose en el laboratorio en agua destilada hasta una concentración de 100µM. En las tablas 13 y 14 se muestran los cebadores utilizados y el tamaño de los fragmentos amplificados del los genes FVIII y FIX.

Tabla 13. Cebadores utilizados y tamaño de los fragmentos amplificados del gen del factor VIII

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

Exón	Cebadores	Tamaño del fragmento amplificado (pb)
10	E10F 5'CTAGCCTCAAATTAATAATG3' E10R 5'ACTTTAGACTGGAGCTTGAG3'	346
11	E11F 5'TGCGACTTTAGCTTCCACTT3' E11R 5'ACTGACCTATATTGCAAACCA3'	445
12	E12F 5'TGCCATCGCTTTCATCATAG3' E12R 5'CATCATTATCTGGACATCAC3'	319
13	E13F 5'AACAATCTACTTTTTTGGAGA3' E13R 5'AGCATACGAATGGCTAGTGA3'	424
14	E14-1 5'ACAGGCATAGTACAACAGCA3' E14-2 5'CTTGGCTATTCATTAACCTG3'	1007
	E14-3 5'TCCATCAGACAATTTGGCAG3' E14-4 5'CTACATTTGCCTAGTGCTC3'	1042
	E14-5 5'AGTAGGAAAGGGTGAATTTAC3' E14-6 5'AGGTCCTTCTGATAAATGTGA3'	1061
	E14-7 5'AGCAGTCATTTCTTACAAGGA3' E14-8 5'GTTGATAGGTGAGGTTGAC3'	1088
15	E15F 5'AGATGAAGTGGTAACTATGC3' E15R 5'GTGGGAATACATTATAGTCAG	348
16	E16F 5'AGCATCCATCTTCTGTACCA3' E16R 5'TCAGTAGATTCCAGAATGACA3'	524
17	E17F 5'TGTCATTCTGGAATCTACTGA3' E17R 5'CACTCCCACAGATACTCT3'	491
18	E18F 5'AGAGTATATCTGTGGGAGTG3' E18R 5'CTTAAGAGCATGGAGCTTGT3'	412
19	E19F 5'GCAAGCACTTTGCATTTGAG3' E19R 5'AGCAACCATTCCAGAAAGGA3'	341
20	E20F 5'ACGTTGAGTACAGTTCTTGG3' E20R 5'ACTAATAGAAGCATGGAGATG3'	314
21	E21F 5'CAGCTTAGATTAACCTTTCTC3' E21R 5'GAGTGAATGTGATACATTTCC3'	226
22	E22F 5'AAATAGGTTAAAATAAAGTGTTA3' 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 14. Cebadores utilizados y tamaño de los fragmentos amplificados del gen del factor IX

Exón	Cebadores	Tamaño del fragmento (pb)
1	F9 E1F 5'CCATTGAGGGAGATGGACATT3' F9 E1R 5'TGCGTGCTGGCTGTTAGACTCTT3'	325
2/3	F9 E2F 5'CATGCCCTAAAGAGAAATTGGC3' F9 E3R 5'GGACTGATCTTTCTGAGTCCT3'	624
4	F9 E4F 5'CCAGGTCAGTAGTTTTGCTCTG3' F9 E4R 5'CGTTGGAGTTGCGGTTTTCTC3'	549
5	F9 E5F 5'GACCCATACATGAGTCAGTAG3' F9 E5R 5'GGAAGCAGATTCAAGTAGG3'	312
6	F9 E6F 5'TGACAAGGATGGGCCTCAAT3' F9 E6R 5'AAAATAGCCTCAGTCTCCCACC3'	374
7	F9 E7F 5'GCCTATTCCTGTAACCAGCACAA3' F9 E7R 5'CCTTCTGCCTTTAGCCCAATT3'	320
8	F9 E8F 5'CATTGCCAATTAGGTCAGTGGTC3' F9 E8R 5'GATTAGTTAGTGAGAGGCCCT3'	710

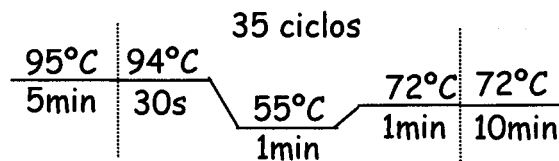
3.5.2. Condiciones de la mezcla para la amplificación del gen FVIII y el FIX

Los reactivos utilizados para la amplificación están descritos en la siguiente tabla (tabla 15):

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

3.5.3. Los parámetros utilizados para la amplificación fueron los siguientes:

Parámetros de PCR



3.5.4. Electroforesis

Para la visualización de los fragmentos amplificados se siguió el mismo procedimiento que en el apartado 3.4., pero se utilizó agarosa al 2% y la electroforesis se realizó a 200V durante 15min.

3.5.5. Purificación

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

3.5.6. Reacción de secuenciación

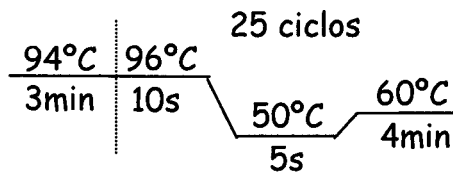
Durante los años que duró el estudio se utilizaron dos secuenciadores automáticos, el secuenciador automático ABI Prism 310 (Applied Biosystems) y el secuenciador automático CEQ 8000 (Beckman-Coulter).

3.5.6.1. Secuenciador automático ABI Prism 310 (Perkin-Elmer):

Los productos de PCR purificados se reamplificaron utilizando el ABI Prism dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, con las siguientes condiciones (tabla 16):

Reactivos	Cantidad
ADN	5 μ l del producto de PCR
"Terminator Ready Reaction Mix"	4 μ l
Cebadores (3 μ M)	1 μ l

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



Los productos se purificaron mediante precipitación con MgCl₂/etanol para retirar el exceso de nucleótidos marcados.

- Añadir 9.5 μ l de MgCl₂ 2mM y 27.5 μ l de etanol por cada 10 μ l de PCR.
- Incubar 10-15 min a T^a amb.
- Centrifugar 20 min a 14000 rpm.
- Lavar con 250 μ l de etanol al 75% (v/v en ddH₂O).
- Centrifugar 10 min a 14000 rpm. Secar 10 min a T^a amb

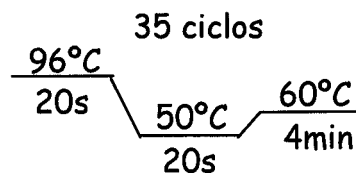
Cada precipitado se resuspende en 12.5 μ l de "Template Supresion Reagent" y se calienta a 95°C durante 3min para la desnaturalización. La electroforesis se llevó a cabo en el secuenciador ABI Prism 310 según las instrucciones del fabricante.

3.5.6.2. Secuenciador automático CEQ 8000 (Beckman-Coulter)

Tras purificar los productos de PCR, se reamplificaron utilizando "CEQ Dye Terminator Cycle Sequencing with Quick Start Kit", con las siguientes condiciones (tabla 17):

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

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



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

- Añadir a cada tubo 10 μ l de ddH₂O y 4 μ l de solución de parada (mezclar en el momento 2 μ l de acetato sódico 3M pH 5.2 y 2 μ l 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 rpm 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.

3.5.7. Alineación de las secuencias

Las secuencias obtenidas fueron alineadas con las secuencias genómicas publicadas para los genes de coagulación humanos FVIII (GenBank Accession nos AY769950) y FIX (GenBank Accession nos K02402). La nomenclatura utilizada para nombrar a nucleótidos y aminoácidos fue la seguida por las bases de datos internacionales de la hemofilia A y B.

3.6. ESTUDIO DE HAPLOTIPOS

Para el estudio de haplotipos se analizaron seis marcadores polimórficos dentro del gen del factor VIII. Se estudiaron tres polimorfismos mediante PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism): sitio polimórfico ALWN I en el intrón 7 (G>A), sitio polimórfico Bcl I en el intron 8 (T>A) y sitio polimórfico Hind III en el intron 19 (C>T). Los tres marcadores restantes son del tipo "STR" (*short tandem repeats*) que se estudiaron mediante PCR+Electroforesis capilar: repeticiones GT en intron 1, repeticiones CA en intrón 13 y repeticiones GT-AG en intrón 22. La figura 21 muestra la localización de los 6 marcadores polimórficos dentro del gen FVIII.

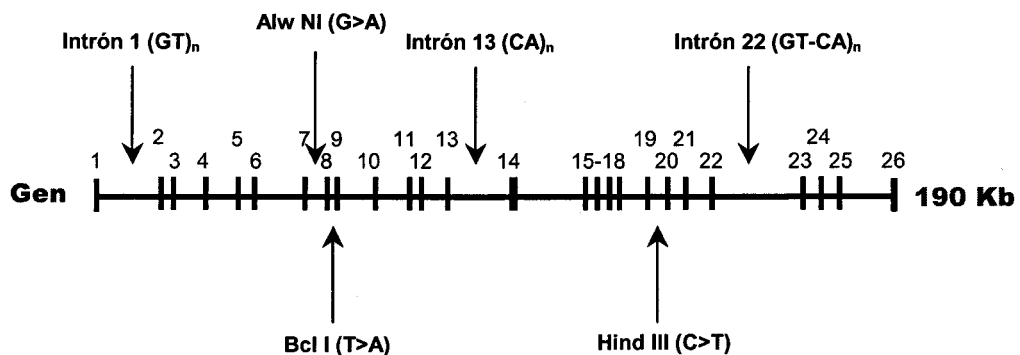


Figura 21. Localización de los 6 marcadores polimórficos en el gen FVIII. Los números del 1 al 26 se refiere a los exones.

3.6.1. PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

El estudio de marcadores mediante PCR-RFLP consiste en la amplificación por PCR y posterior digestión con enzimas de restricción de la zona deseada, donde el patrón de tamaños de los fragmentos de restricción difiere en función de la variante alélica. Todos los cebadores utilizados en el estudio de haplotipos fueron sintetizados por Invitrogen (Barcelona, España) y se suministraron liofilizados, resuspendiéndose en agua destilada hasta 100µM.

3.6.1.1 Cebadores para la amplificación de los sitios polimórficos ALW NI en el intrón 7 (G>A), Bcl I en el intrón 18 (T>A) y Hind III en el intrón 19 (C>T).

- Los cebadores para el sitio polimórfico ALW NI fueron descritos previamente por Kogan y col. (1990). Para cada muestra se realizó una reacción de amplificación obteniéndose un fragmento amplificado de 260 pb, que se sometía a digestión con la enzima de restricción *A/w NI* (New England Biolabs, USA).

- Los cebadores utilizados para el sitio polimórfico Bcl I habían sido descritos previamente por Kogan y col. (1987). Para cada muestra se realizó una reacción de amplificación obteniéndose un fragmento amplificado de 142 pb, que se sometía a digestión con la enzima de restricción *Bcl I* (New England Biolabs, USA).

- Para la amplificación del sitio polimórfico Hind III se usó el cebador directo que se utiliza en la amplificación del exón 19 (E19F) y el inverso utilizado en la amplificación del exón 20 (E20R). Para cada muestra se realizó una reacción de amplificación obteniéndose un fragmento amplificado de 1047 pb, que se sometía a digestión con la enzima de restricción *Hind III* (Boehringer Mannheim). El intron 19 tiene dos sitios *Hind III*, uno constante y otro polimórfico que es el que nos interesa.

En la tabla 18 se muestra la secuencia de los cebadores utilizados en el estudio de los tres marcadores polimórficos y el tamaño de los fragmentos amplificados.

Tabla 18. Cebadores utilizados y tamaño de los fragmentos amplificados

Cebadores	Tamaño del fragmento amplificado (pb)
Alw NI-F 5'TAATGTACCCAAGTTTTAGG3' Alw NI-R 5'TATAGAACAGCCTAATATAGCAACAGACTC3'	260 pb
Bcl I-F 5'TAAAAGCTTTAAATGGTCTAGGC3' BclI-R 5'TTCGAATTCTGAAATTATCTTGTTCC3'	142 pb
E19R 5'AGCAACCATTCCAGAAAGGA3' E20R 5'ACTAATAGAAGCATGGAGATG3'	1047 pb

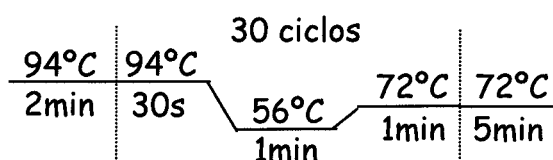
3.6.1.2. Condiciones de la mezcla para la amplificación de los sitios polimórficos ALW NI, Bcl I y Hind III

Los reactivos utilizados para la amplificación están descritos en la siguiente tabla (tabla 19):

Reactivos	Volumen	Concentración final
ADN	3µl	10ng/µl
Tampón PCR 10X	3µl	1X
Cebador 1	0,1µl	0,3µM
Cebador 2	0,1µl	0,3µM
dNTPs (25mM)	0,4µl	300µM
Cl ₂ Mg (25mM)	0,4µl	0,33mM
Taq Polimerasa (Amersham Biosciences)	0,3µl	0,05U/µl
ddH ₂ O	22,7µl	-----
Total	30µl	-----

3.6.1.3. Los parámetros utilizados para la amplificación fueron los siguientes:

Parámetros de PCR



3.6.1.4. Digestión

Se utilizaron 2µl de cada producto de PCR y se digirieron con los enzimas *Alw NI*, *Bcl I* y *Hind III*, respectivamente. Las condiciones de mezcla para la digestión fue en todos los casos la siguiente (tabla 20):

Reactivos	Volumen	Concentración final
ADN	2µl	2µl
Tampón*	3µl	1X
<i>Alw NI</i>		1 U
<i>Bcl I</i>	0,1µl	1,5 U
<i>Hind III</i>		1,5 U
ddH ₂ O	24,9µl	-----
Total	30µl	-----

*NEB4 para *Alw NI* y *Bcl I*, y M para *Hind III* (ver reactivos)

Las reacciones se prepararon, en un volumen final de 10µl. La mezcla se incuba durante 2h a 37°C para los enzimas *Alw NI* y *Hind III* y 2h a 50°C para el enzima *Bcl I*, cada una con su tampón correspondiente. Posteriormente se somete a electroforesis en un gel de agarosa al 2% en TBE 0.5X (Ver apéndice).

La enzima *Alw NI* solo digirá el fragmento amplificado para el alelo Guanina, la enzima *Bcl I* digirá el fragmento amplificado en presencia del alelo Timina y la enzima *Hind III* digirá el fragmento amplificado en presencia del alelo Citosina (tabla 21).

Tabla 21. Tamaño de los fragmentos de PCR tras la Digestión.

Enzima de restricción	Tamaño de los fragmentos de PCR tras la digestión (pb)*
<i>Alw NI</i>	260 - 232 & 28 +
<i>Bcl I</i>	142 - 99 & 43 +
<i>Hind III</i>	605 & 442 - 605 & 361 & 81 +

* + Indica presencia de sitio de restricción, - indica ausencia.

3.6.2. "STR" (Short Tandem Repeat)

Los polimorfismos del tipo "STR" (short tandem repeat) consisten en un nº variable de repeticiones en tandem, éstas pueden estar en cualquier parte del gen. Nuestros tres marcadores se encuentran dentro del gen del factor VIII: repeticiones GT en el intrón 1, repeticiones GA en el intrón 13, y repeticiones GT-AG en el intrón 22.

Debido a que las diferencias de tamaño entre los diferentes alelos son muy pequeñas, e imposibles de detectar en los geles de agarosa, se deben utilizar sistemas que permitan una mayor resolución como geles de acrilamida o como en nuestro caso sistemas de electroforesis capilar.

En todos los casos, el fragmento de ADN se amplificó utilizando el cebador directo correspondiente marcado en el extremo 5' con el fluorocromo D4. Este marcaje nos permite discriminar el tamaño de los fragmentos en un sistema de electroforesis capilar con un detector láser CEQ™ 8000 Genetic Analysis System (Beckman Coulter).

3.6.2.1. Cebadores para la amplificación de las regiones de repetición en Intrón 1, Intrón 13 e Intrón 22

- Los cebadores para la amplificación de las repeticiones GT en el intrón 1 fueron descritos por Tizzano y col (2005).

- Los cebadores para la amplificación de las repeticiones CA en el intrón 13 y GT-AG en el intrón 22 fueron descritos previamente por Lalloz y col. 1991, 1994, respectivamente.

Todos los cebadores directos se marcaron con el fluorocromo D4 en el extremo 5' y fueron sintetizados por Oligos Online: WellRED™ Oligos. Los cebadores inversos fueron sintetizados por Invitrogen. Los cebadores fueron suministrados liofilizados y se resuspendieron a 100µM. Los productos de PCR fueron sometidos a electroforesis capilar para determinar el tamaño exacto de los fragmentos. En la tabla 22 se muestra la secuencia de los cebadores utilizados.

Tabla 22. Cebadores utilizados en la amplificación de las regiones de repetición en el gen FVIII.

	Nombre	Cebadores (5'-3')
Intrón 1	INT 1F	D4-ATGCAAAGAACTGAAATGGG
	INT 1R	GACCCTGTACTTTTACCATTG
Intrón 13	INT13-F	D4-TTCTAAGAATGTAGTGTGTG
	INT13-R	CCAAATTACATATGAATAAGCC
Intrón 22	INT22-F	D4-TTCTAAGAATGTAGTGTGTG
	INT22-R	TAATGCCACATTATAGA

3.6.2.2. Condiciones de la mezcla para la amplificación de las regiones de repetición

Los reactivos utilizados para la amplificación de las repeticiones GT en el intrón 1 están descritos en la siguiente tabla (tabla 23):

Reactivos	Volumen	Concentración final
ADN	3µl	10ng/µl
Tampón PCR 10X	3µl	1X
Cebador 1	0,1µl	0,3µM
Cebador 2	0,1µl	0,3µM
dNTPs (25mM)	0,4µl	300µM
Cl ₂ Mg (25mM)	0,1µl	0,08mM
Taq Polimerasa (Amersham Biosciences)	0,2µl	0,03U/µl
ddH ₂ O	23,1µl	-----
Total	30µl	-----

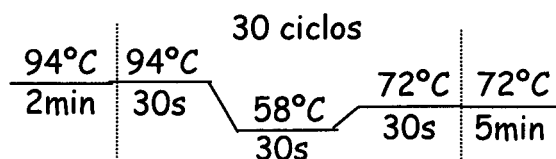
Los reactivos utilizados para la amplificación de las repeticiones CA en el intrón 13 y GT-AG en el intrón 22 están descritos en la siguiente tabla (tabla 24):

Reactivos	Volumen	Concentración final
ADN	3µl	10ng/µl
Tampón PCR 10X	3µl	1X
Cebador 1	0,1µl	0,3µM
Cebador 2	0,1µl	0,3µM
dNTPs (25mM)	0,4µl	300µM
Cl ₂ Mg (25mM)	0,6µl	0,5mM
Taq Polimerasa (Amersham Biosciences)	0,3µl	0,05U/µl
ddH ₂ O	22,5µl	-----
Total	30µl	-----

3.6.2.3. Los parámetros utilizados para la amplificación

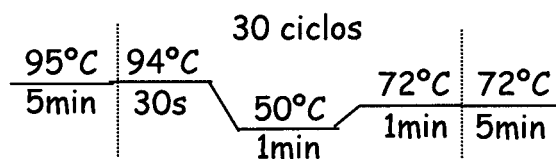
Los parámetros de PCR para las repeticiones en intrón 1 fueron los siguientes:

Parámetros de PCR



Los parámetros de PCR para las repeticiones en el intrón 13 e intrón 22 fueron los siguientes:

Parámetros de PCR



3.6.2.4. Análisis del tamaño de los fragmentos

El tamaño de los fragmentos se determinó utilizando el programa informático "Fragment Análisis Software" (Beckman Coulter). Este *software* asigna el tamaño de los fragmentos interpolando los datos de cada muestra en función del control del peso molecular. Cada muestra es sometida a una electroforesis independiente y debe contener el control de peso molecular, ya que, las condiciones pueden variar ligeramente en cada caso.

3.6.2.4.1. Preparación de las muestras para la electroforesis Capilar

- Diluir las muestras en una proporción 1:10 con ddH₂O autoclavada. Mezclar 1µl de la dilución anterior con 0,5µ de marcador de peso molecular (DNA Size Standard Kit-400, Beckman Coulter) y con 37 µl de formamida desionizada (suministrada en DNA Size Standard Kit-400, Beckman Coulter) en la placa de muestra CEQ.

- Cubrir cada una de las muestras con una gota de aceite mineral ligero (suministrado en el kit)

- Cargar la placa de muestra en el CEQ 8000 y comenzar la electroforesis capilar. Utilizar el polímero Separation Gel-LPA I (Beckman Coulter).

Los parámetros para la electroforesis capilar fueron los siguientes (tabla 25):

Tabla 25. Parámetros de electroforesis capilar

Temperatura Capilar	50°C
Temperatura de desnaturalización	90°C para 120 seg.
Voltaje de Inyección y tiempo	2Kv para 30 seg.
Voltaje de Separación y Tiempo	6Kv para 35 min.

3.7. ESTUDIO DE GRANDES DELECCIONES

3.7.1. Caracterización de del8-9

Los cebadores usados en la caracterización de la delección fueron diseñados en nuestro laboratorio en base a la secuencia genómica publicada en la base de datos (GenBank Accession nos. AY769950) y fueron sintetizados por Invitrogen. Los cebadores se suministraron liofilizados y se resuspendieron a 100µM.

Se realizaron cinco reacciones de amplificación con las siguientes parejas de cebadores: Int7-1F/Int7-1R, Int7-2F/Int7-2R, Int7-3F/Int7-3R, Int7-3F/E10-2, Int7-3F/Int9-4. En la tabla 26 se muestra la secuencia de los cebadores utilizados y su localización genómica.

Tabla 26. Cebadores usados para PCR y su localización

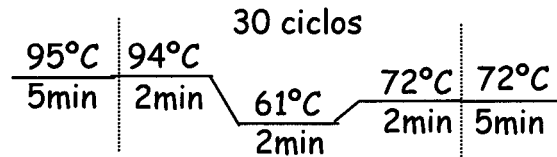
Cebadores	5' – Sequence – 3'	Localización genómica	Gen Bank AL Nucleotides
Int7-1F	TGAAAGGACTATTTGG	Intrón 7	57127 – 57142
Int7-1R	GGTGAAATGATGATGCAATCT	Intrón 7	57257 – 57277
Int7-2F	ATAGCATTCTTTCTTCCTATTACT	Intrón 7	57800 – 57824
Int7-2R	AGGTCTTGTCAAAATTCCAT	Intrón 7	57991 – 58010
Int7-3F	TGATCTTCAAATTTGCCCTG	Intrón 7	58384 – 58403
Int7-3R	CCAAGTTCATAAAACCATGACA	Intrón 7	58555 – 58576
Int9-4	TGATTTGGCTCTCTGTCTG	Intrón 9	62597 – 62615
E10-2	ACTTTAGACTGGAGCTTGAG	Intrón 10	64892 – 64873

Los reactivos utilizados para la amplificación están descritos en la siguiente tabla (tabla 27):

Reactivos	Volumen	Concentración final
ADN	3µl	10ng/µl
Tampón PCR 10X	3µl	1X
Cebador 1	0,1µl	0,3µM
Cebador 2	0,1µl	0,3µM
dNTPs (25mM)	0,4µl	300µM
Taq Polimerasa (Amersham Biosciences)	0,3µl	0,05U/µl
ddH ₂ O	23,1µl	-----
Total	30µl	-----

Los parámetros de PCR fueron los siguientes:

Parámetros de PCR



Las condiciones de PCR para la pareja de cebadores Int7-3F/E10-2 fueron las mismas pero con 35 ciclos.

3.7.2. Caracterización de la delección del exón 15

Los cebadores usados en la caracterización de la delección fueron diseñados en nuestro laboratorio en base a la secuencia genómica publicada en la base de datos (GenBank Accession nos. AY769950) y fueron sintetizados por Invitrogen. Los cebadores se suministraron liofilizados y se resuspendieron a 100µM

Se realizaron siete reacciones de amplificación en el intrón 14 con las siguientes parejas de cebadores: Int14-1F/Int14-1R, Int14-2F/Int14-2R, Int14-3F/Int14-3R, Int14-4F/Int14-4R, Int14-5F/Int14-5R, Int14-6F/Int14-6R, Int14-7F/Int14-7R. Se amplificaron tres regiones del intrón 15 con las siguientes parejas de cebadores: Int15-1/Int15-2, Int15-3/Int15-4, Int15-5/Int15-6. Se realizó una PCR adicional con la pareja de cebadores Int14-2F/Int15-6. En la tabla 28 se muestra la secuencia de los cebadores utilizados y su localización genómica.

Tabla 28. Cebadores utilizados para la amplificación y su localización genómica

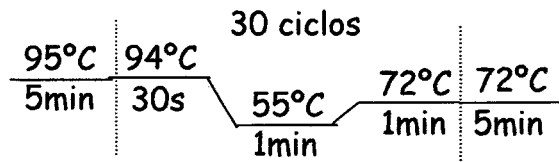
Cebadores	5' – Sequence – 3'	Localización genómica	Gen Bank AL Nucleotides
I 14-1F	TGCTGGCACTTATTCCCCTG	Intron 14	110718 – 110738
I 14-1R	CACAGTTCCAAAGTTGCTTC	Intron 14	110961 – 110980
I 14-2F	TAGTGGAGCTGTGAGAAGAG	Intron 14	111918 – 111937
I 14-2R	CTCCGTGTCTCACATTTAGG	Intron 14	112119 – 112138
I 14-3F	ATTATGCAGTCTCAGGCAG	Intron 14	113097 – 113115
I 14-3R	CTTTATGCCAGTACCATGCT	Intron 14	113249 – 113268
I 14-4F	AACATCGATGAGCCTGGATG	Intron 14	114319 – 114338
I 14-4R	CCACCCCTTCATTTTACACC	Intron 14	114509 – 114528
I 14-5F	CTATGACTAAGAACATGCGG	Intron 14	115481 – 115500
I 14-5R	CATGTGCGGTGTTGAGTCA	Intron 14	115685 – 115703
I 14-6F	ATGTGGGCTTCAGTGTCAAG	Intron 14	116721 – 116740
I 14-6R	CAAACCTGCAAGCAATGTGA	Intron 14	116881 – 116900
I 14-7F	TGGATAGGTGCTCCACA	Intron 14	118139 – 118155
I 14-7R	GTTGGGCGGAATTACTAGG	Intron 14	118363 – 118381
I 15-1	CGCTGTAATCACACAACAG	Intron 15	119790 – 119807
I 15-2	CTCTCATTAATAATGTTTCAGTGGT	Intron 15	119958 – 119980
I 15-3	ATTCCTGCCTATCCAGAG	Intron 15	120114 – 120131
I 15-4	TCTTTGGTTCACACAATGC	Intron 15	120234 – 120252
I 15-5	ATTTTTAATCTGGAAAGTAAGCCT	Intron 15	120414 – 120437
I 15-6	AGGAGAAAATTCCTAAACTCAT	Intron 15	120569 – 120590

Los reactivos utilizados para la amplificación están descritos en la siguiente tabla (tabla 29):

Reactivos	Volumen	Concentración final
ADN	3µl	10ng/µl
Tampón PCR 10X	3µl	1X
Cebador 1	0,1µl	0,3µM
Cebador 2	0,1µl	0,3µM
dNTPs (25mM)	0,4µl	300µM
MgCl ₂ 25mM	0,3µl	0,25mM
Taq Polimerasa (Amersham Biosciences)	0,2µl	0,03U/µl
ddH ₂ O	22,9µl	-----
Total	30µl	-----

Los parámetros de PCR fueron los siguientes:

Parámetros de PCR



La pareja de cebadores Int14-2F/I15-2 fue amplificada bajo las mismas condiciones pero con una temperatura de "annealing" de 58°C.

3.8. REACTIVOS

-Bromuro de etidio 10mg/ml

Disolver 100mg de bromuro de etidio (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, Missouri, USA) en un volumen final de 10ml de ddH₂O. Se almacena a temperatura ambiente protegido de la luz.

-Marcador de peso molecular (Escalera de 100pb)

Preparar a una concentración final de 0.1µg/µl. Mezclar 100µl del marcador, 700µl de TE y 200µl de tampón de carga 5X. Almacenar a 4°C.

-Marcador de peso molecular (Escalera de 1Kb)

Preparar a una concentración final de 0,5µg/µl. Mezclar 100µl de marcador, 100µl de tampón de carga 5X y 200µl de ddH₂O. Almacenar a 4°C.

-MgCl₂ 1M

Disolver 203.3g de MgCl₂ en 1l de ddH₂O. Esterilizar en autoclave. Almacenar a temperatura ambiente.

-Proteinasa K 33µg/µl

Disolver 49.5mg de proteinasa K (Sigma-Aldrich) en 1.5ml de ddH₂O estéril. Almacenar a -20°C.

-Tampón de carga

Solución de blue juice 5X

Azul de bromofenol (Sigma-Aldrich) al 0.25% (p/v), xilencianol (Sigma-Aldrich) al 0.25% (p/v) y glicerol (Merck, KgaA, Darmstadt, Alemania) al 30% (v/v) en ddH₂O. Conservar a 4°C.

-Tampón M 10X

Tris-HCl 10Mm, MgCl₂ 10mM, NaCl 50mM, Dithiothreitol 1mM (pH 7.5). Conservar a -20°C.

-Tampón NEB4

Acetato potásico 50mM, Tris-acetato 20mM, Acetato magnésico 10mM, Dithiothreitol 1mM, (pH 7.9). Conservar a T^a ambiente.

-Tampón casero ("Expand Long") 10X

Tris-HCl 50mM, pH 9.2, (NH₄)₂ SO₄ 16mM, MgCl₂ 2,25mM, DMSO 2%, Tween-20 0,1%. Almacenar a -20°C.

-Tampón para PCR 10X

KCl 50mM, MgCl₂ 1.5mM, Tris-HCl 10mM, pH 8.3. Suministrado junto a la Taq polimerasa. Almacenar a -20°C.

-Tampón Tris-borato-EDTA (TBE) 1X

Trizma base 89mM, ácido bórico 89mM, EDTA 2mM, pH 8.0.

-Tampón TE

Tris-HCl 10mM pH 7.5, EDTA 1mM pH 8.0.

- Kit de extracción de ADN (QUIAGEN)

Se almacena a T^a ambiente

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. HEMOFILIA A

4.1.1. Descripción general de las mutaciones

En este estudio se han incluido un total de 171 pacientes con hemofilia A (81 grave, 13 moderada y 77 leve) del Registro Andaluz de Hemofilia (tabla 28).

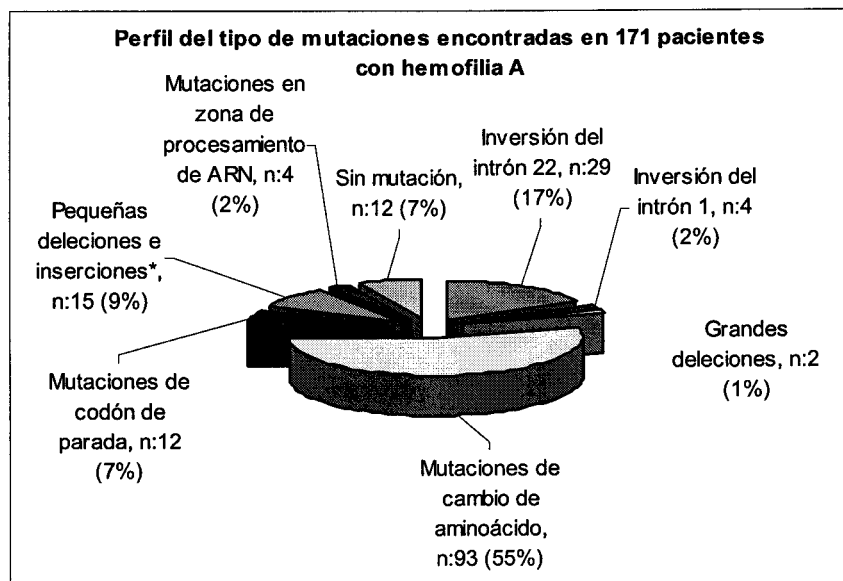
4.1.1.1. Tipo de mutaciones encontradas

La mutación se identificó en 159 pacientes, lo que representa el 93% de los casos (tabla 30). El perfil del tipo de mutaciones encontradas en estos 171 pacientes estudiados se muestra en la figura 22.

Tabla 30. Total de pacientes estudiados

Nivel de gravedad	Pacientes estudiados	Pacientes con mutación identificada, n (%)
Grave	81	74 (91,3)
Moderada	13	13 (100)
Leve	77	72 (93,5)
Total	171	159 (93)

Figura 22



*Pequeñas deleciones e inserciones se refiere a deleciones e inserciones de <50pb

Con respecto a los pacientes con hemofilia A grave, la mutación fue identificada en 74 pacientes de los 81 estudiados (91,3%). Como era de esperar, las dos mutaciones más frecuentes fueron la inversión del intrón 22 (35,8%) y la inversión del intrón 1 (5%). La frecuencia del resto de mutaciones, agrupándolas por tipo de mutación, fue del 18,5% para las pequeñas deleciones e inserciones, 14,8% para las mutaciones de codón de parada y 13,6% para las mutaciones de cambio de aminoácido. Las deleciones grandes y mutaciones en la zona de procesamiento del ARN fueron muy poco frecuentes (tabla 31).

En el grupo de 13 pacientes con hemofilia A moderada (tabla 32), la mutación fue identificada en los 13 pacientes. El tipo de mutación presente en el 92,3% (12/13) de los pacientes fueron las mutaciones de cambio de aminoácido. El otro tipo fue una mutación en la zona de procesamiento del ARN. Con respecto a los 77 pacientes con hemofilia A leve (tabla 33), la mutación fue identificada en 72 (93,5%). Al igual que en el grupo de hemofilia moderada, el tipo de mutación presente en más del 90% (70/72) de los pacientes fueron mutaciones de cambio de aminoácido, el otro tipo de mutación presente fueron mutaciones en la zona de procesamiento de ARN.

Tabla 31. Distribución de los diferentes tipos de mutaciones encontradas en pacientes con hemofilia A grave.

Tipo de mutación	Número de mutaciones observadas	Porcentaje de pacientes (%)
Inversión intrón 22	29	35,8
Inversión intrón 1	4	4,9
Pequeñas deleciones o inserciones	15	18,5
Mutaciones de codón de parada	12	14,8
Mutaciones de cambio de aminoácido	11	13,6
Grandes deleciones	2	2,5
Mutaciones puntuales en zona de procesamiento del ARN	1	1,2
Total	74	91,3

Tabla 32. Distribución de los diferentes tipos de mutaciones encontradas en pacientes con hemofilia A moderada.

Tipo de mutación	Número de mutaciones observadas	Porcentaje de pacientes (%)
Mutaciones de cambio de aminoácido	12	92,3
Mutaciones puntuales en zona de procesamiento del ARN	1	7,7
Total	13	100

Tabla 33. Distribución de los diferentes tipos de mutaciones encontradas en pacientes con hemofilia A leve.

Tipo de mutación	Número de mutaciones observadas	Porcentaje de pacientes (%)
Mutaciones de cambio de aminoácido	70	97,2
Mutaciones puntuales en zona de procesamiento del ARN	2	2,8
Total	72	94,4

4.1.1.2. Mutaciones no descritas previamente

En el grupo de pacientes con hemofilia A grave, excluyendo los pacientes positivos para la inversión del intrón 22 y la inversión del intrón 1, se identificaron 36 mutaciones diferentes. Veintidós de estas mutaciones (61%) no estaban descritas previamente en las bases de datos de hemofilia A (tabla 34). Los dos grupos más frecuentes de mutaciones nuevas lo constituían las pequeñas deleciones e inserciones que representaban más del 36%, y las mutaciones de cambio de aminoácido con un 31,8%. Otras mutaciones nuevas fueron: 4 mutaciones de codón de parada, 2 grandes deleciones y una mutación en la zona de procesamiento del ARN. Algunas de las mutaciones no descritas previamente se diagnosticaron en más de un paciente que pertenecían a familias diferentes.

En cuanto al grupo de pacientes con hemofilia A moderada, se identificaron 9 mutaciones diferentes, 4 de éstas (44,4%) no estaban descritas previamente (tabla 35). Estas incluían 3 mutaciones de cambio de aminoácido y 1 mutación en la zona de procesamiento de ARN.

Con respecto al grupo de hemofilia A leve, 17 (50%) de las 34 mutaciones diferentes encontradas no estaban descritas previamente (tabla

36). Estas incluían 16 mutaciones de cambio de aminoácido y 1 mutación en la zona de procesamiento del ARN. Algunas de las mutaciones nuevas se diagnosticaron en más de un paciente que pertenecían a familias distintas. Una de las mutaciones nuevas aparece también en un paciente del grupo de hemofilia A moderada.

En conjunto, de las 79 mutaciones diferentes encontradas en los pacientes con hemofilia A, 42 mutaciones no estaban descritas previamente, 22 en el grupo de hemofilia grave y 20 en el grupo de hemofilia moderada/leve, lo que representa el 53,2%.

Tabla 34. Número de mutaciones no descritas previamente diagnosticadas en pacientes con hemofilia A grave.

Tipo de mutación	Número de mutaciones nuevas observadas, (n)*	Porcentaje (%)
Pequeñas deleciones o inserciones	8 (12)	36,4
Mutaciones de cambio de aminoácido	7 (9)	31,8
Mutaciones de codón de parada	4 (11)	18,2
Grandes deleciones	2 (2)	9,1
Mutaciones puntuales en zona de procesamiento del ARN	1 (1)	4,5
Total	22 (35)	-

(n)*, número de pacientes.

Tabla 35. Número de mutaciones no descritas previamente diagnosticadas en pacientes con hemofilia moderada.

Tipo de mutación	Número de mutaciones nuevas observadas, (n)	Porcentaje (%)
Mutaciones de cambio de aminoácido	3 (3)	75
Mutaciones puntuales en zona de procesamiento del ARN	1 (1)	25
Total	4 (4)	-

Tabla 36. Número de mutaciones no descritas previamente diagnosticadas en pacientes con hemofilia leve.

Tipo de mutación	Número de mutaciones nuevas observadas, (n)	Porcentaje (%)
Mutaciones de cambio de aminoácido*	16 (35)	94,1
Mutaciones puntuales en zona de procesamiento del ARN	1 (2)	5,9
Total	17 (36)	-

* Una de las mutaciones de cambio de aminoácido aparece en el grupo de hemofilia moderada.

4.1.2. Descripción de las mutaciones identificadas en pacientes con hemofilia A grave

4.1.2.1. Inversión intrón 22/Inversión intrón 1

Se identificaron 29 pacientes con inversión del intrón 22 (Inv22), lo que representa el 35,8% del grupo de pacientes graves y el 17% del total de pacientes estudiados. De los 29 pacientes, 23 (79,3%) eran casos esporádicos y los 6 casos restantes (20,7%) presentaban historia familiar previa.

Con respecto a la inversión del intrón 1 (Inv1), se identificaron 4 pacientes con esta mutación, lo que representa aproximadamente el 5% del grupo de pacientes graves y el 2,3% del total.

4.1.2.2. Pequeñas deleciones e inserciones (<50pb)

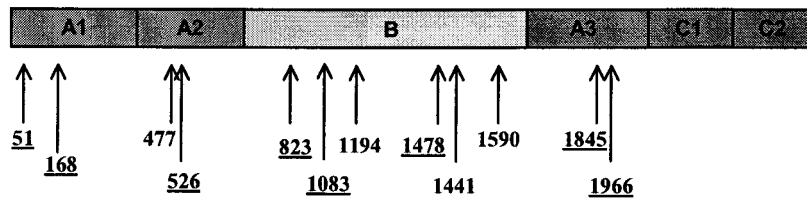
Se identificaron 9 pequeñas deleciones y 3 pequeñas inserciones en un total de 15 pacientes (10 casos esporádicos y 5 casos con historia familiar). Ocho de estos defectos moleculares no estaban descritos previamente en las bases de datos de hemofilia A ([Http://europium.csc.mrc.ac.uk](http://europium.csc.mrc.ac.uk); Stenson PD 2003). Una descripción detallada de las mutaciones se muestra en la tabla 37. En la figura 23 se muestra la localización de las mutaciones identificadas en los dominios de la proteína FVIII, las mutaciones nuevas aparecen subrayadas. A excepción de dos mutaciones, localizadas en el dominio A3, el resto de mutaciones se localizaron en la cadena pesada.

Tabla 37. Pequeñas deleciones o inserciones en el gen FVIII en pacientes con hemofilia A grave.

Código muestra	Exón	Mutación	Cambio de aminoácido	Dominio afectado	CpG	Inhibidor	Historia familiar previa
A-121	6	741G→A	W228X (TGG→TGA)	Todos	No	No	Positiva
A-050	14	2440C→T	R795X (CGA→TGA)	B, A3, C1, C2	Si	No	Negativa
A-011	15	5301C→G	Y1748X (TAC→TAG)	A3, C1, C2	No	Transitorio	Positiva
A-359	16	5508G→A	W1817X (TGG→TGA)	A3, C1, C2	No	No	Negativa
A-149	18	5878C→T	R1941X (CGA→TGA)	A3, C1, C2	No	No	Negativa
A-325	18	5953C→T	R1966X (CGA→TGA)	A3, C1, C2	Si	No	Negativa
A-005	21	6250A→T	K2065X (AAG→TAG)	C1, C2	No	No	Negativa
A-293	21	6266G→A	W2070X (TGG→TAG)	C1, C2	No	No	Negativa
A-028	23	6496C→T	R2147X (CGA→TGA)	C1, C2	Si	Transitorio	Negativa
A-288	23	6496C→T	R2147X (CGA→TGA)	C1, C2	Si	Transitorio	Negativa
A-065	25	6748C→T	Q2231X (CAA→TAA)	C2	No	No	Positiva
A-042	26	6976C→T	R2307X (CGA→TGA)	C2	Si	No	Positiva

(Las mutaciones no descritas previamente aparecen en negrita)

Figura 23. Localización de las pequeñas deleciones e inserciones en los dominios de la proteína FVIII (A1-A2-B-A3-C1-C2).



* Las mutaciones no descritas previamente aparecen subrayadas

Con respecto a las mutaciones no descritas previamente, éstas se localizaron en el dominio A1 (F51fsX y D167_L168delinsV), en el dominio A2 (P526fsX), en el dominio B (G823fsX, G1083fsX, y T1478fsX), y en el dominio A3 (K1845fsX y R1966fsX). Ninguna de las mutaciones se localizó en los dominios C. Todas estas mutaciones, excepto la mutación 557_559delACT (p.D167_L168delinsV), fueron responsables de un cambio en la pauta de lectura de la proteína, dando lugar a una proteína truncada. La mutación 557_559delACT (p.D167_L168delinsV) fue responsable de la sustitución de un residuo de ácido aspártico y un residuo de Leucina (167, 168) por un residuo de valina.

Tres de las mutaciones ya descritas, p.I1194fsX, p.N1441fsX y p.T1590fsX, se localizaron en tramos de 7 a 9 nucleótidos de adenina en el exón 14, estos tramos de adeninas son conocidos por ser zonas donde se producen pequeñas deleciones e inserciones con más frecuencia que en regiones donde no hay series de adeninas (Kunkel TA 1986).

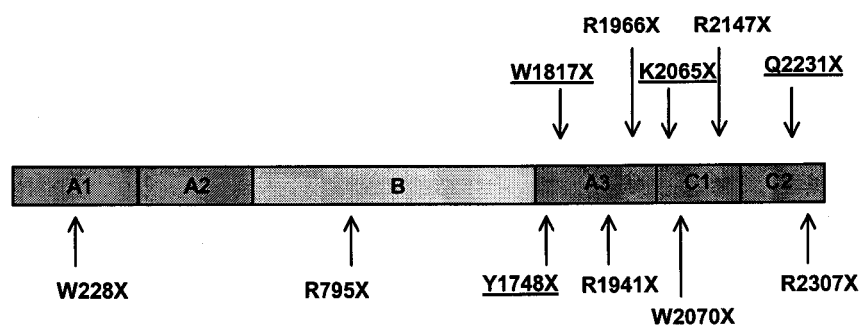
4.1.2.3. Mutaciones de codón de parada

Se identificaron 11 mutaciones puntuales que dieron lugar a un codon de parada en 12 de los pacientes (8 casos esporádicos y 4 con historia familiar) (tabla 38). Cuatro de las mutaciones (p.R795X, p.R1966X, p.R2147X, y p.R2307X) estaban localizadas en sitios CpG. En la figura 24 se muestra la localización de las mutaciones identificadas en los dominios de la proteína FVIII. A diferencia de las pequeñas deleciones e inserciones, la mayoría de las mutaciones se localizaron en los dominios A3, C1 y C2.

Tabla 38. Mutaciones de codón de parada en el gen FVIII en pacientes con hemofilia A grave.

Código muestra	Exón	Mutación	Cambio de aminoácido	Dominio afectado	CpG	Inhibidor	Historia familiar previa
A-121	6	741G→A	W228X (TGG→TGA)	Todos	No	No	Positiva
A-050	14	2440C→T	R795X (CGA→TGA)	B, A3, C1, C2	Si	No	Negativa
A-011	15	5301C→G	Y1748X (TAC→TAG)	A3, C1, C2	No	Transitorio	Positiva
A-359	16	5508G→A	W1817X (TGG→TGA)	A3, C1, C2	No	No	Negativa
A-149	18	5878C→T	R1941X (CGA→TGA)	A3, C1, C2	No	No	Negativa
A-325	18	5953C→T	R1966X (CGA→TGA)	A3, C1, C2	Si	No	Negativa
A-005	21	6250A→T	K2065X (AAG→TAG)	C1, C2	No	No	Negativa
A-293	21	6266G→A	W2070X (TGG→TAG)	C1, C2	No	No	Negativa
A-028	23	6496C→T	R2147X (CGA→TGA)	C1, C2	Si	Transitorio	Negativa
A-288	23	6496C→T	R2147X (CGA→TGA)	C1, C2	Si	Transitorio	Negativa
A-065	25	6748C→T	Q2231X (CAA→TAA)	C2	No	No	Positiva
A-042	26	6976C→T	R2307X (CGA→TGA)	C2	Si	No	Positiva

Figura 24. Localización de las mutaciones de codón de parada en los dominios de la proteína FVIII (A1-A2-B-A3-C1-C2).



De las 11 mutaciones identificadas, 4 no estaban descritas previamente (p.Y1748X, p.W1817X, p.K2065X, y p.Q2231X). Las mutaciones p.Y1748X y p.W1817X se localizaron en el dominio A3 de la cadena ligera, eliminando ésta casi en su totalidad, y p.K2065X, y p.Q2231X en los dominios C1 y C2, respectivamente. Ninguna de estas mutaciones nuevas implicó sitios CpG.

Cuatro de las mutaciones identificadas que ya estaban descritas, p.R795X, p.R1941X, p.R1966X y p.R2307X, aparecen en la base de datos en múltiples ocasiones ([Http://europium.csc.mrc.ac.uk](http://europium.csc.mrc.ac.uk)). Tres de ellas ocurren en zonas CpG.

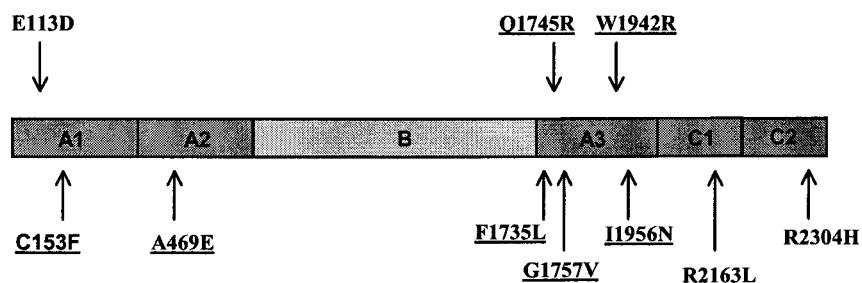
4.1.2.4. Mutaciones de cambio de aminoácido

Se identificaron 10 mutaciones diferentes de cambio de aminoácido, 8 de las cuales no habían sido previamente descritas, en 11 de los pacientes (5 casos esporádicos y 6 con historia familiar de hemofilia) (tabla 39). Sólo dos mutaciones se localizaron en sitios CpG, la mutación p.R2163L, que no había sido descrita previamente, y la mutación p.R2304H. Las mutaciones identificadas estaban localizadas en la cadena pesada y ligera. Todos los dominios estaban afectados salvo el dominio B (figura 25). Este hecho refuerza la idea de que sustituciones de cambio de aminoácido dentro de este dominio son poco importantes (Cutler JA 2002). La mutación nueva p.C153F estaba presente en dos pacientes no emparentados, ambos con historia familiar positiva, el resto eran mutaciones únicas.

Tabla 39. Mutaciones de cambio de aminoácido en pacientes con hemofilia A grave.

Código muestra	Exón	Mutación	Cambio de aminoácido	Dominio afectado	CpG	Inhibidor	Historia familiar previa
A-025	4	396A→C	E113D (GAA→GAC)	A1	No	Si	Negativa
A-304	4	515G→T	C153F (TGC→TTC)	A1	No	No	Positiva
A-21	4	515G→T	C153F (TGC→TTC)	A1	No	No	Positiva
A-433	10	1463C→A	A469E (GCA→GAA)	A2	No	No	Negativa
A-247	15	5260T→C	F1735L (TTC→CTC)	A3	No	No	Negativa
A-019	15	5291A→G	Q1745R (CAG→CGG)	A3	No	No	Positiva
A-092	15	5327G→T	G1757V (GGA→GTA)	A3	No	No	Positiva
A-111	18	5881T→C	W1942R (TGG→CGG)	A3	No	No	Negativa
A-059	18	5924T→A	I1956N (ATT→AAT)	A3	No	No	Positiva
A-397	23	6545G→T	R2163L (CGC→CTC)	C1	Si	No	Negativa
A-337	26	6967G→A	R2304H (CGC→CAC)	C2	Si	No	Positiva

Figura 25. Localización de las mutaciones de cambio de sentido en los dominios de la proteína FVIII (A1, A2, B, A3, C1, C2).



4.1.2.5. Grandes deleciones

Dos de los pacientes presentaron deleciones parciales en el gen FVIII. Las deleciones se identificaron por fallo en la amplificación de los exones 8 y 9 en el paciente A-223 y fallo en la amplificación del exón 15 en paciente A-52. La caracterización de los puntos de rotura de ambas deleciones se describe en el apartado 5. Los dos pacientes presentaban historia familiar de hemofilia.

4.1.2.6. Mutaciones puntuales en la zona de procesamiento del ARN

En un paciente sin historia familiar, se identificó una mutación puntual en la zona de procesamiento del ARN, IVS4-1G→A (tabla 40). Esta mutación no estaba descrita en las bases de datos y consistía en un cambio G→A en el nucleótido 1 del sitio dador del intrón 4.

Tabla 40. Mutación puntual en zona de procesamiento del ARN en un paciente con hemofilia A grave.

Paciente	Intrón	Mutación	Dominio afectado	CpG	Inhibidor	Historia familiar
A-113	Intrón 4	IVS4-1G→A	Todos	No	No	Negativa

4.1.3. Descripción de las mutaciones identificadas en pacientes con hemofilia A moderada

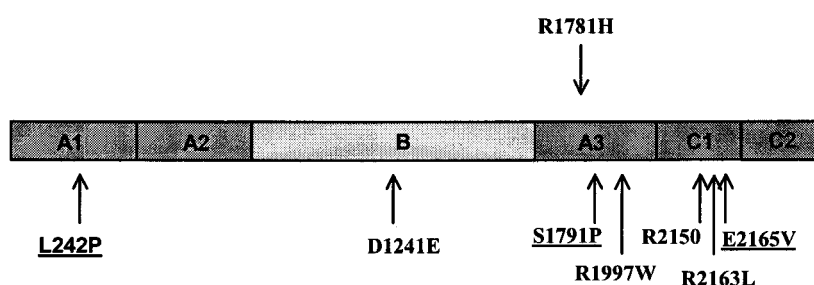
4.1.3.1. Mutaciones de cambio de aminoácido

Se identificaron 8 mutaciones diferentes, 3 de las cuales no habían sido descritas previamente, en 12 de los pacientes (8 casos familiares y 4 casos esporádicos) (tabla 41). Cuatro mutaciones estaban localizadas en sitios CpG. Dos pacientes presentaron el polimorfismo p.D1241E, y no presentaron ningún otro cambio en la secuencia codificante. Esta variación se localiza en el dominio B del FVIII y está asociado con niveles reducidos de FVIII (Machiah DK 2003). En la figura 26 se muestra la localización de las mutaciones identificadas en los dominios de la proteína FVIII. Todas las mutaciones, a excepción de p.L242P y el polimorfismo p.D1242E, se localizaron en la cadena ligera.

Tabla 41. Mutaciones de cambio de aminoácido en pacientes con hemofilia A moderada.

Código muestra	Exón	Mutación	Cambio de aminoácido	Dominio afectado	CpG	Inhibidor	Historia familiar previa
A-578	6	782T→C	L242P (CTG→CCG)	A1	No	No	Negativa
A-358	14	3780C→G	D1241E* (GAC→GAG)	B	No	No	Positiva
A-368	14	3780C→G	D1241E* (GAC→GAG)	B	No	No	Positiva
A-228	16	5399G→A	R1781H (CGT→CAT)	A3	Si	No	Negativa
A-531	16	5428T→C	S1791P (TCT→CCT)	A3	No	No	Positiva
A-064	19	6046C→T	R1997W (CGG→TGG)	A3	Si	No	Positiva
A-323	19	6046C→T	R1997W (CGG→TGG)	A3	Si	No	Positiva
A-014	23	6506G→A	R2150H (CGT→CAT)	C1	Si	Si	Positiva
A-583	23	6506G→A	R2150H (CGT→CAT)	C1	Si	Si	Negativa
A-588	23	6506G→A	R2150H (CGT→CAT)	C1	Si	No	Positiva
A-053	23	6545G→A	R2163H (CGC→CAC)	C1	Si	No	Positiva
A-078	23	6551A→T	E2165V (GAG→GTG)	C1	No	No	Negativa

Figura 26. Localización de las mutaciones de cambio de aminoácido en los dominios de la proteína FVIII (A1, A2, B, A3, C1, C2).



4.1.3.2. Mutación en la zona de procesamiento de ARN

Un nuevo cambio en la zona de procesamiento de ARN en el gen FVIII fue identificado en el grupo de pacientes con hemofilia A moderada (tabla 42). El cambio IVS7+3A→G fue encontrado en un paciente sin historia familiar previa, y consistía en un cambio A→G en el tercer nucleótido del sitio aceptor del intrón 7.

Tabla 42. Mutación puntual en la zona de procesamiento de ARN en un paciente con hemofilia moderada.

Paciente	Intrón	Mutación	Dominio afectado	CpG	Inhibidor	Historia familiar
A-016	Intrón 7	IVS7+3A→G	Todos	No	No	Negativa

4.1.4. Descripción de las mutaciones identificadas en pacientes con hemofilia A leve

4.1.4.1. Mutaciones de cambio de aminoácido

Se identificaron 34 mutaciones diferentes, 10 de las cuales estaban localizadas en sitios CpG (tabla 43). Nueve de estas 10 mutaciones se encontraron en más de un paciente, resultando ser mutaciones recurrentes ampliamente representadas en la base de datos de hemofilia A. Las mutaciones más frecuentes encontradas fueron p.R593C (12 pacientes), p.R1966Q (7 pacientes), y p.R2150H (6 pacientes). Las mutaciones p.R1781H, p.R1997W, y p.R2150H, y el polimorfismo p.D1241E, se encontraron también en pacientes con hemofilia moderada. En la figura 27 se muestra la localización de las mutaciones identificadas en los dominios de la proteína FVIII. Las mutaciones identificadas estaban localizadas en todos los dominios de la proteína.

Dieciseis de las mutaciones encontradas no estaban descritas previamente, y sólo una de ellas, p.R1696Q, se localizó en un sitio CpG. Las mutaciones p.V266A, p.S1791P, y p.H2082D aparecieron en más de un paciente. La mutación p.V266A se detectó en dos pacientes, A-128 y A-510, ambos con historia familiar previa. La mutación p.S1791P se identificó en 3 pacientes, A-096, A-215, y A-286, y todos tenían historia familiar previa. Además, esta mutación también aparecía en un paciente con hemofilia moderada, A-531, con historia familiar previa. La mutación p.H2082D se detectó en dos pacientes, A-476 con historia familiar previa y A-594 que resultó ser un caso esporádico.

Tabla 43. Mutaciones de cambio de aminoácido en pacientes con hemofilia A leve.

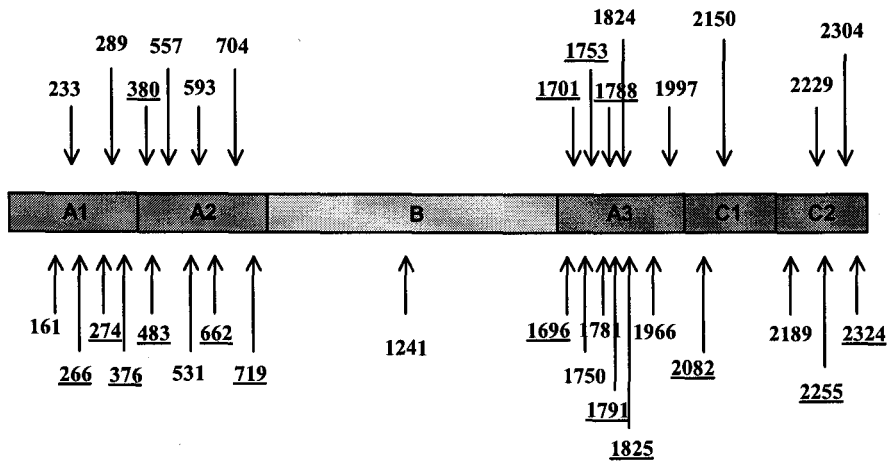
Código muestra	Exón	Mutación	Cambio de amino ácido	Dominio Afectado	CpG	Inhibidor	Historia Familiar Previa
A-151	4	538C→T	H161Y (CAT→TAT)	A1	No	No	Positiva
A-514	4	538C→T	H161Y (CAT→TAT)	A1	No	No	Positiva
A-084	6	755C→T	T233I (ACA→ATA)	A1	No	No	Positiva
A-561	6	755C→T	T233I (ACA→ATA)	A1	No	No	Positiva
A-128	7	854T→C	V266A (GTG→GCG)	A1	No	No	Positiva
A-510	7	854T→C	V266A (GTG→GCG)	A1	No	No	Positiva
A-089	7	878A→T	H274L (CAC→CTC)	A1	No	No	Positiva
A-266	7	923C→T	S289L (TCG→TTG)	A1	Si	No	Positiva
A-544	7	923C→T	S289L (TCG→TTG)	A1	Si	No	Negativa
A-454	8	1185G→C	K376N (AAG→AAC)	A2	No	No	Negativa
A-342	8	1195A→G	K380E (AAA→GAA)	A2	No	No	Positiva

Resultados

A-221	10	1505T→A	V483D (GTC→GAC)	A2	No	No	Positiva
A-003	11	1726G→A	E557K (GAA→AAA)	A2	No	No	Negativa
A-452	11	1648G→T	R531C (CGC→TGC)	A2	Si	No	Negativa
A-482	11	1648G→T	R531C (CGC→TGC)	A2	Si	No	Negativa
A-009	12	1834C→T	R593C (CGC→TGC)	A2	Si	No	Positiva
A-039	12	1834C→T	R593C (CGC→TGC)	A2	Si	No	Positiva
A-040	12	1834C→T	R593C (CGC→TGC)	A2	Si	No	Positiva
A-061	12	1834C→T	R593C (CGC→TGC)	A2	Si	No	Positiva
A-260	12	1834C→T	R593C (CGC→TGC)	A2	Si	No	Positiva
A-298	12	1834C→T	R593C (CGC→TGC)	A2	Si	No	Positiva
A-365	12	1834C→T	R593C (CGC→TGC)	A2	Si	No	Positiva
A-189	12	1834C→T	R593C (CGC→TGC)	A2	Si	No	Positiva
A-173	12	1834C→T	R593C (CGC→TGC)	A2	Si	No	Positiva
A-425	12	1834C→T	R593C (CGC→TGC)	A2	Si	No	Negativa
A-475	12	1834C→T	R593C (CGC→TGC)	A2	Si	No	Positiva
A-524	12	1834C→T	R593C (CGC→TGC)	A2	Si	No	Positiva
A-035	13	2043G→A	M662I (ATG→ATA)	A2	No	No	Negativa
A-392	14	2167G→A	A704T (GCC→ACC)	A2	Si	No	Positiva
A-118	14	2167G→A	A704T (GCC→ACC)	A2	Si	No	Positiva
A-183	14	2213A→G	Y719C (TAC→TGC)	A2	No	No	Negativa
A-573	14	3780C→G	D1241E (GAC→GAG)	B	No	No	Negativa
A-136	14	5144G→A	R1696Q (CGA→CAA)	A3	Si	No	Positiva
A-012	14	5159C→T	A1701V (GCT→GTT)	A3	No	No	Positiva
A-387	15	5305G→A	G1750R (GGA→AGA)	A3	No	No	Positiva
A-521	15	5305G→A	G1750R (GGA→AGA)	A3	No	No	Negativa
A-599	15	5316T→A	N1753K (AAT→AAA)	A3	No	No	Positiva
A-336	16	5399G→A	R1781H (CGT→CAT)	A3	Si	No	Positiva
A-281	16	5420G→C	S1788T (AGC→ACC)	A3	No	No	Negativa
A-096	16	5428T→C	S1791P (TCT→CCT)	A3	No	No	Positiva
A-215	16	5428T→C	S1791P (TCT→CCT)	A3	No	No	Positiva
A-286	16	5428T→C	S1791P (TCT→CCT)	A3	No	No	Positiva
A-390	16	5527G→A	A1824T (GCA→ACA)	A3	No	No	Positiva
A-037	16	5531C→T	P1825L (CCC→CTC)	A3	No	No	Positiva
A-027	18	5954G→A	R1966Q (CGA→CAA)	A3	Si	No	Positiva
A-030	18	5954G→A	R1966Q (CGA→CAA)	A3	Si	No	Positiva
A-417	18	5954G→A	R1966Q (CGA→CAA)	A3	Si	No	Positiva
A-155	18	5954G→A	R1966Q (CGA→CAA)	A3	Si	No	Positiva
A-472	18	5954G→A	R1966Q (CGA→CAA)	A3	Si	No	Positiva
A-446	18	5954G→A	R1966Q (CGA→CAA)	A3	Si	No	Positiva
A-515	18	5954G→A	R1966Q (CGA→CAA)	A3	Si	No	Positiva
A-134	19	6046C→T	R1997W (CGG→TGG)	A3	Si	No	Positiva
A-574	19	6046C→T	R1997W (CGG→TGG)	A3	Si	No	Negativa
A-476	22	6301C→G	H2082D (CAC→GAC)	C1	No	No	Positiva
A-594	22	6301C→G	H2082D (CAC→GAC)	C1	No	No	Negativa
A-046	23	6506G→A	R2150H (CGT→CAT)	C1	Si	No	Positiva
A-194	23	6506G→A	R2150H (CGT→CAT)	C1	Si	Transitorio	Positiva
A-209	23	6506G→A	R2150H (CGT→CAT)	C1	Si	No	Positiva
A-245	23	6506G→A	R2150H (CGT→CAT)	C1	Si	No	Positiva
A-559	23	6506G→A	R2150H (CGT→CAT)	C1	Si	No	Positiva
A-584	23	6506G→A	R2150H (CGT→CAT)	C1	Si	Si	Positiva
A-129	24	6623A→G	Q2189R (CAG→CGG)	C2	No	No	Negativa
A-592	24	6623A→G	Q2189R (CAG→CGG)	C2	No	No	Positiva
A-068	24	6622C→G	Q2189E (CAG→GAG)	C2	No	No	Positiva
A-493	24	6622C→G	Q2189E (CAG→GAG)	C2	No	No	Desconocida
A-505	24	6622C→G	Q2189E (CAG→GAG)	C2	No	No	Positiva
A-024	25	6744G→T	W2229C (TGG→TGT)	C2	No	Transitorio	Negativa
A-120	25	6821T→A	M2255K (ATG→AAG)	C2	No	No	Positiva
A-373	26	6967G→A	R2304H (CGC→CAC)	C2	Si	No	Negativa
A-081	26	7028T→C	L2324P (CTG→CCG)	C2	No	No	Positiva

(Las mutaciones no descritas previamente aparecen en negrita)

Figura 27. Localización de las mutaciones de cambio de aminoácido en los dominios de la proteína FVIII (A1, A2, B, A3, C1, C2).



4.1.4.2. Mutaciones puntuales en zona de procesamiento del ARN

Una nueva mutación en la zona de procesamiento del ARN en el gen FVIII fue identificada en 2 pacientes (1 caso familiar y 1 caso esporádico) con hemofilia A leve (tabla 44). La mutación IVS11+5G→T consistía en un cambio G→T en el quinto nucleótido del sitio aceptor del intrón 11.

Tabla 44. Mutaciones puntuales en la zona de procesamiento del ARN en pacientes con hemofilia A leve.

Paciente	Intrón	Mutación	Dominio afectado	CpG	Inhibidor	Historia familiar
A-536	Intrón 11	IVS11+5G→T	Todos	No	No	Positiva
A-563	Intrón 11	IVS11+5G→T	Todos	No	No	Negativa

4.1.5. MUTACIONES "DE NOVO"

Este aspecto es muy importante porque estos casos requieren de un estudio causa-efecto. Es decir, al no existir antecedentes familiares se precisa demostrar que la mutación encontrada es la responsable de la alteración funcional.

En hemofilia grave, el 61,7% (50/81) de los pacientes fueron casos esporádicos y en hemofilia moderada/leve fueron el 26,7% (24/90). De los 171 pacientes con hemofilia A estudiados, 74 fueron casos esporádicos, es decir,

los pacientes no tenían antecedentes familiares de hemofilia, lo que supone que un 43,3% (74/171) de los casos de hemofilia A se han originado en la generación del paciente.

Analizando los datos en conjunto, la mutación se identificó en 70 de los 74 casos esporádicos, 47 con hemofilia grave y los 23 restantes con hemofilia moderada/leve. En 45 de los 70 casos esporádicos, se dispuso del ADN de la madre del paciente para el estudio de portadora. En 5 casos, la madre resultó ser no portadora de la mutación. De los 40 casos restantes sólo dispusimos de ADN de 9 abuelas maternas, siendo 1 portadora de la mutación y las 8 restantes negativas para la mutación.

4.1.6. INHIBIDORES DEL FACTOR FVIII

De los 171 pacientes con hemofilia A estudiados catorce desarrollaron inhibidores, 9 de los 81 pacientes graves (11%) y 5 de los 90 pacientes con hemofilia moderada/leve (5,6%). La tabla 45 muestra los datos clínicos de estos 14 pacientes con inhibidor permanente e inhibidor transitorio incluyendo tipo de mutación, fenotipo, título de inhibidor y días de exposición al tratamiento en el momento de la detección del inhibidor.

Tabla 45. Características de pacientes con inhibidor permanente (A) e inhibidor transitorio (B)

	Paciente	Mutación	Fenotipo	Título de inhibidor más elevado (UB)	Número de días de exposición*
A	A-223	Del E8-E9	Grave	40	< 50
	A-284	N1441fsX	Grave	1,4	> 50
	A-25	E113D	Grave	30	< 50
	A-14	R2150H	Moderado	32	< 50
	A-583	R2150H	Moderado	1	> 50
B	A-48	INV22	Grave	19	< 50
	A-52	Del E15	Grave	6	> 50
	A-11	Y1748X	Grave	4	> 50
	A-28	R2147X	Grave	1,5	> 50
	A-288	R2147X	Grave	NC	Desconocido
	A-45	P477fsX	Grave	2	> 50
	A-194	R2150H	Leve	NC	Desconocido
	A-559	R2150H	Moderado	NC	Desconocido
	A-24	W2229C	Moderado	1,2	> 50

Todos los pacientes de la tabla 2A han sido sometidos al protocolo de erradicación. Los pacientes de la tabla 2B no han recibido el protocolo de erradicación, ya que estos inhibidores desaparecen sin tratamiento especial.

UB: Unidades Bethesda

*Número de días de exposición en el momento de detección del inhibidor

Los pacientes con inhibidor permanente fueron sometidos al protocolo de erradicación y únicamente en el paciente A-223 el inhibidor fue erradicado. Los pacientes con inhibidor transitorio no fueron tratados especialmente ya que estos inhibidores desaparecen espontáneamente.

Entre las mutaciones identificadas en este estudio, que estaban descritas previamente, 15 estaban asociadas con el desarrollo de inhibidores según el registro de mutaciones HAMSTeRS. En nuestro grupo de pacientes, sólo 5 de estos 15 genotipos se asociaron con desarrollo de inhibidor (INV22, R2150H, W2229C, E113D y R2147X). La mutación N1441fsX, que no estaba asociada con el desarrollo de inhibidor según HAMSTeRS, se identificó en un paciente (A284) con inhibidor permanente.

Sólo fueron detectados inhibidores de título alto (> 10 UB) en los pacientes A-14 y A-25 con mutaciones de cambio de sentido, en el paciente A-223 con una delección parcial y en el paciente A-48 con inversión del intrón 22.

4.2. HEMOFILIA B

4.2.1. DESCRIPCIÓN GENERAL DE LAS MUTACIONES

En este estudio se han incluido un total de 25 pacientes con hemofilia B (6 grave, 8 moderada y 11 leve) del Registro Andaluz de Hemofilia (tabla 44).

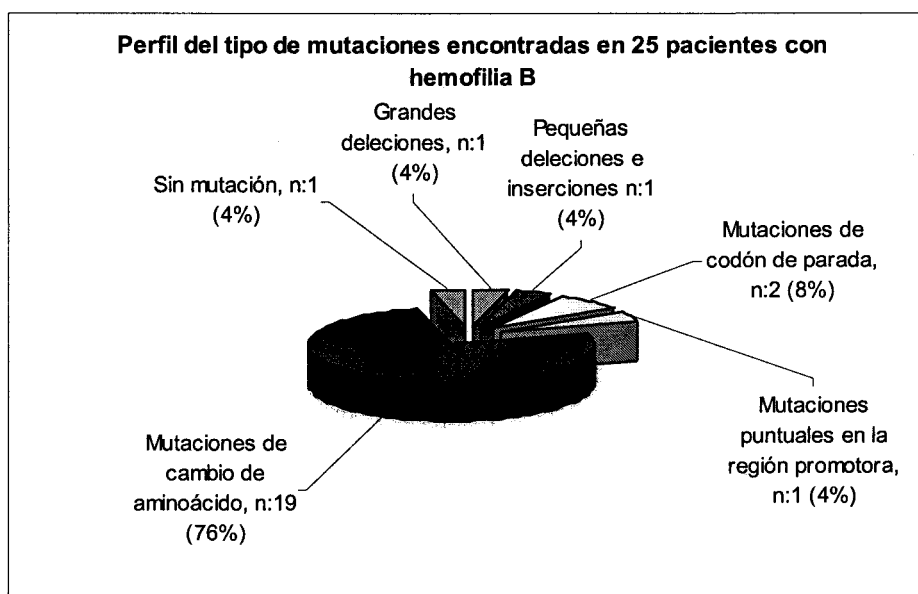
4.2.1.1. Tipo de mutaciones encontradas

La mutación se identificó en 24 pacientes, lo que representa el 96% del total (tabla 46). En la figura 28 se muestra el perfil del tipo de mutaciones encontradas en los 25 pacientes estudiados.

Tabla 46. Total de pacientes estudiados

Nivel de gravedad	Pacientes estudiados	Pacientes con mutación identificada, n (%)
Grave	6	5 (83,3)
Moderada	8	8 (100)
Leve	11	11 (100)
Total	25	24 (96)

Figura 28



En el grupo de 6 pacientes con hemofilia B grave, la mutación fue identificada en 5 (83,3%). El tipo de mutaciones encontradas fue: 2 mutaciones de codón de parada, 1 gran deleción, 1 pequeña inserción, y 1 mutación de cambio de aminoácido (tabla 47). En el grupo de 8 pacientes con hemofilia B moderada, la mutación se identificó en todos ellos. El único tipo de mutación que se identificó en estos pacientes fue la mutación de cambio de aminoácido (tabla 45). Con respecto a los 11 pacientes con hemofilia leve, se identificó la mutación en todos ellos y todas las mutaciones identificadas fueron de cambio de aminoácido a excepción de una mutación puntual en la zona promotora.

En conjunto, el tipo de mutación más frecuente encontrada en el grupo de pacientes con hemofilia B fueron las mutaciones de cambio de aminoácido con una frecuencia del 76% (19/25), donde 18 de las mutaciones ocurrieron en pacientes con hemofilia moderada/leve.

Tabla 47. Distribución de los diferentes tipos de mutaciones encontradas en pacientes con hemofilia B.

Tipo de mutación	Pacientes con hemofilia grave	Pacientes con hemofilia moderada	Pacientes con hemofilia leve
Grandes deleciones	1	--	--
Pequeñas deleciones o inserciones	1	--	--
Mutaciones de codón de parada	2	--	--
Mutaciones puntuales en región promotora	--	--	1
Mutaciones de cambio de aminoácido	1	8	10
Total	5	8	11

4.2.1.2. Mutaciones no descritas previamente

En el grupo de pacientes con hemofilia B grave se identificaron 5 mutaciones diferentes, 2 de las cuales no estaban descritas previamente en la base de datos de hemofilia B (www.kcl.ac.uk/ip/petergreen/haemBdatabase.html). Las mutaciones consistían en 1 mutación de codón de parada y 1 pequeña inserción.

En el grupo de pacientes con hemofilia moderada se identificaron 8 mutaciones diferentes, ninguna de ellas era nueva, y con respecto al grupo de pacientes con hemofilia leve, se identificaron 14 mutaciones diferentes, 1 de las

cuales no estaba descrita previamente en la base de datos de la hemofilia B. La mutación consistía en una mutación de cambio de aminoácido.

En total se han identificado 19 mutaciones diferentes, 3 de las cuales (16%) eran nuevas.

4.2.2. Descripción de las mutaciones identificadas en pacientes con hemofilia B grave

En la tabla 48 se describen las 5 mutaciones diferentes identificadas en los cinco pacientes con hemofilia B grave (1 caso esporádico y 4 con historia familiar). Solo la mutación p.R248X afectó a una zona CpG.

Las dos mutaciones nuevas eran una delección parcial del gen que abarcaba los exones 4-8 y una inserción de 5 pares de bases (31198_3199insGAGAT; 359fs), que introducía un cambio en la pauta de lectura.

Tabla 48. Mutaciones en el gen FIX en pacientes con hemofilia B grave.

Código muestra	Exón	Mutación	Cambio de aminoácido	Dominio afectado	CpG	Inhibidor	Historia familiar previa
B-011	4-8	EX4_EX8del	Frameshift		--	Si	Negativa
B-047	8	30863C→T	R248X (CGA→TGA)	Domino Catalítico	Si	No	Positiva
B-010	8	31051G→A	W310X (TGG→TGA)	Domino Catalítico	No	No	Positiva
B-023	8	31278G→T	G386V (GGT→GTT)	Domino Catalítico	No	No	Positiva
B-022	8	31198_3199insGAGAT	359fs	Domino Catalítico	No	No	Positiva

(Las mutaciones no descritas previamente aparecen en negrita).

4.2.3. Descripción de las mutaciones identificadas en pacientes con hemofilia B moderada

Se identificaron 8 mutaciones diferentes en 8 pacientes con hemofilia B moderada (6 casos esporádicos y 2 con historia familiar) (tabla 49). Todas las mutaciones identificadas fueron mutaciones de cambio de aminoácido, 3 de las cuales se localizaron en sitios CpG (37,5%). Cinco de las mutaciones se localizaron en el dominio catalítico. Todas las mutaciones habían sido descritas previamente.

Tabla 49. Mutaciones en el gen FIX en pacientes con hemofilia B moderada.

Código muestra	Exón	Mutación	Cambio de aminoácido	Dominio afectado	CpG	Inhibidor	Historia familiar previa
B-082	2	6364C→T	R-4W (CGG→TGG)	Propéptido	Si	No	Negativa
B-050	2	6401T→C	F9S (TTT→TCT)	Dominio Gla	No	No	Negativa
B-005	6	20540C→A	A187D (GCC→GAC)	Péptido de Activación	No	No	Negativa
B-025	8	30933C→A	A271D (GCC→GAC)	Domino Catalítico	No	No	Negativa
B-018	8	31008C→A	T296K (ACG→AAG)	Domino Catalítico	Si	No	Negativa
B-003	8	31119G→A	R333Q (CGA→CAA)	Domino Catalítico	Si	No	Positiva
B-034	8	31169T→C	C350R (TGT→CGT)	Domino Catalítico	No	No	Positiva
B-052	8	31170G→A	C350Y (TGT→TAT)	Domino Catalítico	No	No	Negativa

4.2.4. Descripción de las mutaciones identificadas en pacientes con hemofilia B leve

Se identificaron 6 mutaciones diferentes en 11 de los pacientes (4 casos esporádicos y 7 con historia familiar de hemofilia) (tabla 50). Cinco de las mutaciones eran cambios de aminoácido, todas localizadas en el dominio catalítico, la mutación restante era una mutación puntual en la zona promotora. Sólo 1 de las mutaciones de cambio de aminoácido y la mutación en la región promotora se localizaron en un sitio CpG. Sólo la mutación p.H268Q no había sido descrita previamente y no estaba localizada en un sitio CpG.

La mutación p.S308N se observó en 5 pacientes (2 casos esporádicos y 3 con historia familiar) y la mutación p.T296M apareció en 2 pacientes (1 caso esporádico y 1 caso con historia familiar).

Tabla 50. Mutaciones en el gen FIX en pacientes con hemofilia B leve.

Código muestra	Exón	Mutación	Cambio de aminoácido	Dominio afectado	CpG	Inhibidor	Historia familiar previa
B-008	Promotor	-6G→A	----	----	Si	No	Positiva
B-044	7	30150G→A	A233T (GCA→ACA)	Domino Catalítico	No	No	Negativa
B-065	8	30925T→A	H268Q (CAT→CAA)	Domino Catalítico	No	No	Negativa
B-072	8	31008C→T	T296M (ACG→ATG)	Domino Catalítico	Si	No	Negativa
B-074	8	31008C→T	T296M (ACG→ATG)	Domino Catalítico	Si	No	Positiva
B-029	8	31044G→A	S308N (AGT→AAT)	Domino Catalítico	No	No	Positiva
B-055	8	31044G→A	S308N (AGT→AAT)	Domino Catalítico	No	No	Positiva
B-060	8	31044G→A	S308N (AGT→AAT)	Domino Catalítico	No	No	Positiva
B-079	8	31044G→A	S308N (AGT→AAT)	Domino Catalítico	No	No	Positiva
B-081	8	31044G→A	S308N (AGT→AAT)	Domino Catalítico	No	No	Negativa
B-048	8	31080C→T	A320V (GCT→GTT)	Domino Catalítico	No	No	Positiva

(Las mutaciones no descritas previamente aparecen en negrita)

4.2.5. Mutaciones “de novo”

De los 25 pacientes con hemofilia B estudiados, 12 fueron casos esporádicos, lo que supone que un 48% de los casos de hemofilia B se han originado en la generación actual. En el grupo de hemofilia grave, sólo 2 pacientes fueron casos esporádicos, mientras que en hemofilia moderada/leve, el 50% (10/20) de los pacientes fueron casos esporádicos.

La mutación se identificó en 11 de los 12 casos esporádicos, 1 con hemofilia grave y 10 con hemofilia moderada/leve. En 5 de los 11 casos esporádicos, se dispuso del ADN de la madre del paciente para el estudio de portadora. En los 5 casos la madre era portadora de la mutación. En uno de estos casos se dispuso del ADN de una abuela materna y resultó no portadora.

4.2.6. Inhibidores del FIX

De los 25 pacientes con hemofilia B estudiados, solo 1 paciente con hemofilia B grave desarrolló inhibidor (4% del total). El paciente tenía una delección parcial del gen FIX que abarcaba los exones 4-8. El paciente había desarrollado una reacción alérgica tras la administración de los concentrados de factor.

4.3. CORRELACIÓN ENTRE CAMBIO DE AMINOÁCIDO NO DESCRITO PREVIAMENTE EN EL GEN FVIII Y HEMOFILIA

4.3.1. Rastreo en la población general de los cambios de aminoácido no descritos previamente

Uno de los problemas al que nos enfrentamos es la necesidad de comprobar si las mutaciones de cambio de aminoácido no descritas previamente que habíamos identificado tenían consecuencias clínicas para los pacientes o por el contrario eran irrelevantes clínicamente.

Para comprobar que estas mutaciones eran las responsables de la hemofilia o se trataban por el contrario de polimorfismos neutros del gen FVIII, se secuenció el gen del factor VIII en 50 mujeres de familias no hemofílicas (100 cromosomas X). El resultado fue que ninguna de estas mutaciones estaba

presente en el grupo control, lo que sugirió que las mutaciones descritas constituían la base molecular de la hemofilia en estas familias.

4.3.2. Cambio de aminoácido en casos con antecedentes familiares

En hemofílicos con historia familiar de hemofilia se realizó un análisis de segregación familiar de la mutación con la enfermedad para comprobar que la mutación aparecía en los individuos enfermos y era la responsable.

En el grupo de hemofilia grave, las mutaciones nuevas p.C153F, p.Q1745R, p.G1757V y p.I1956N, fueron identificadas en pacientes con historia familiar previa pero no pudimos realizar el análisis de segregación de la mutación con la enfermedad ya que no dispusimos de muestras de ADN de otros miembros familiares afectados. Lo mismo sucedió con la mutación nueva p.S1791P, que se identificó en un paciente del grupo de hemofilia moderada y en tres pacientes del grupo de hemofilia leve, todos con historia familiar previa.

Con respecto al grupo de hemofilia leve, el análisis de segregación de la mutación con la enfermedad se pudo realizar en el caso de las mutaciones p.H274L, p.A1701V, p.N1753K y p.P1825L. En el resto de mutaciones que aparecían en pacientes con historia familiar previa no se pudo realizar el análisis de segregación con la enfermedad.

La asociación de la mutación p.H274L con la enfermedad fue confirmada en 4 individuos afectados con hemofilia A leve, III-6, III-8, III-10, y III-13 (figura 29). La mutación estaba presente en 7 mujeres de la familia, II-6, II-8, II-13, II-14, II-15, III-7, y III-9. Dispusimos de los niveles de FVIII de dos de las portadoras, II-6 y III-7, que presentaban unos niveles reducidos de 65 y 56U/dl, respectivamente.

La mutación p.A1701V fue identificada en el caso índice A-12 (III-12), afectado con hemofilia A leve. La segregación de la mutación con la enfermedad fue confirmada en su hermano, III-13 (figura 30). La hermana portaba la mutación y tenía un nivel de factor de 76U/dl.

Para la mutación p.N1753K, la asociación de la mutación con la enfermedad fue confirmada en el caso índice (III-1) y en su abuelo materno (I-2) (figura 31). La madre del caso índice y su hermana eran portadoras de la mutación.

Con respecto a la mutación p.P1825L, la asociación de la mutación con la enfermedad fue confirmada en 4 individuos afectados (III-2, III-5, III-14, y IV-9) (figura 32). Cuatro mujeres de la familia, III-10, IV-2, IV-8, y IV-10, portaban la mutación, y presentaban los siguientes niveles de factor VIII: 100U/dl, 50U/dl, 67U//dl, y 79U/dl, respectivamente.

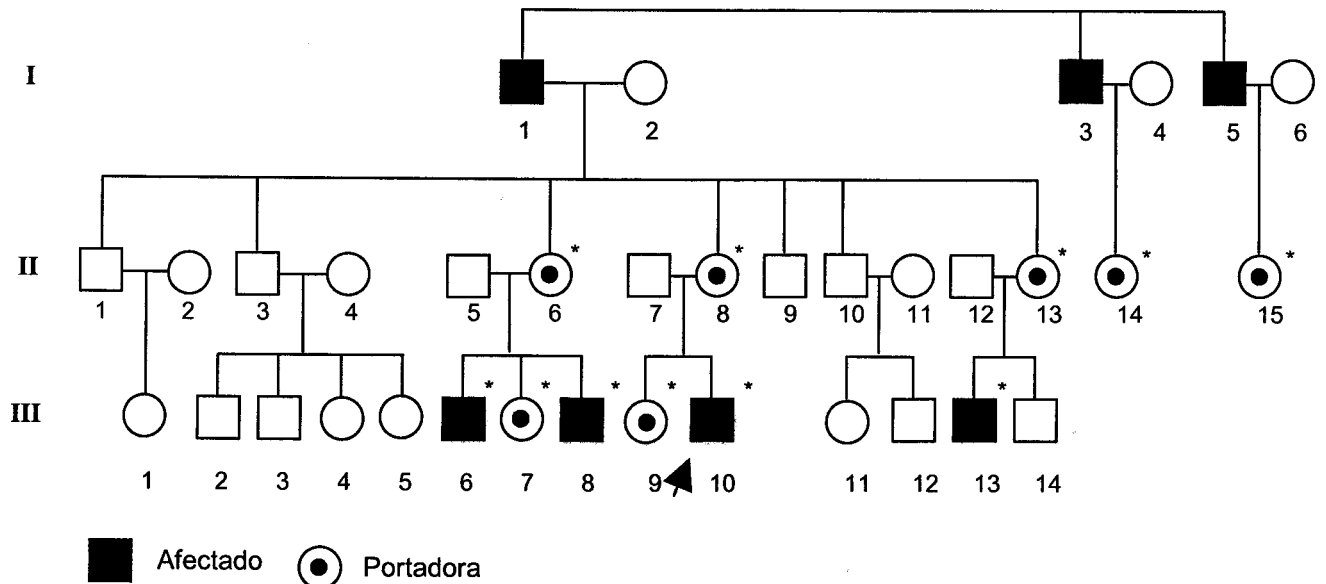


Figura 29. Árbol familiar del paciente A-089. Análisis de segregación de la mutación p.H274L. El paciente índice está indicado con una flecha. * Individuos estudiados.

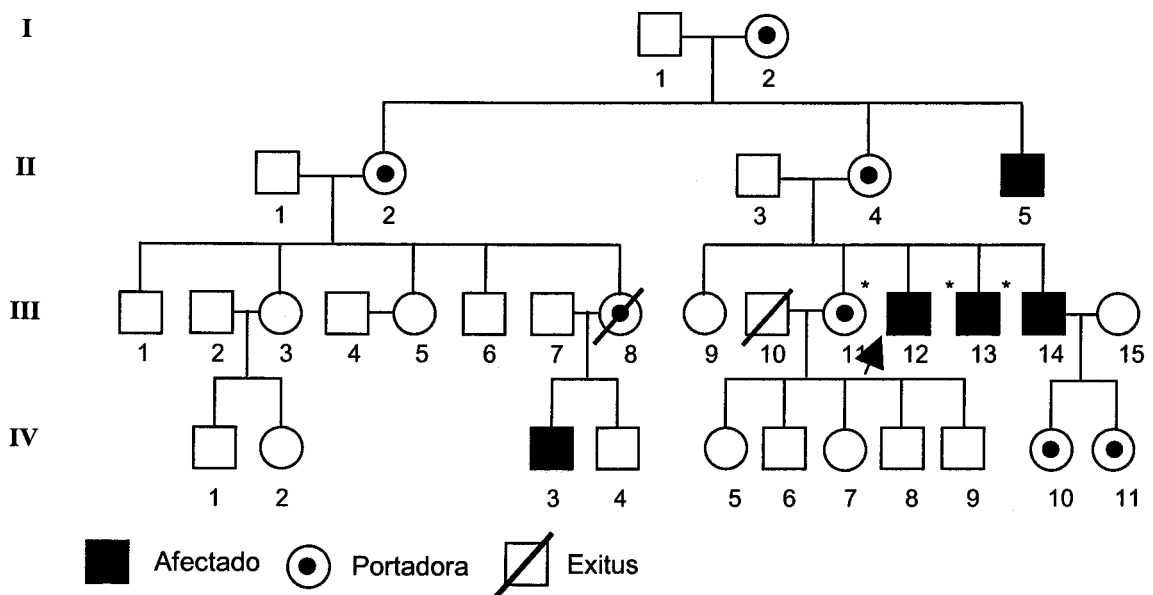


Figura 30. Árbol familiar del paciente A-012. Análisis de segregación de la mutación p.A1701V. * Individuos estudiados.

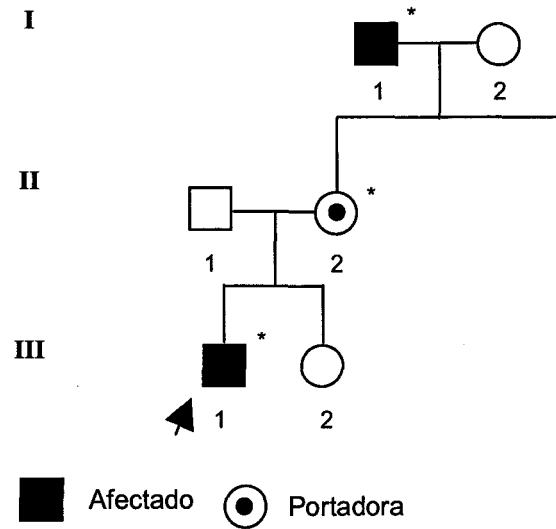


Figura 31. Árbol familiar del paciente A-599. Análisis de segregación de la mutación p.N1753K.

* Individuos estudiados.

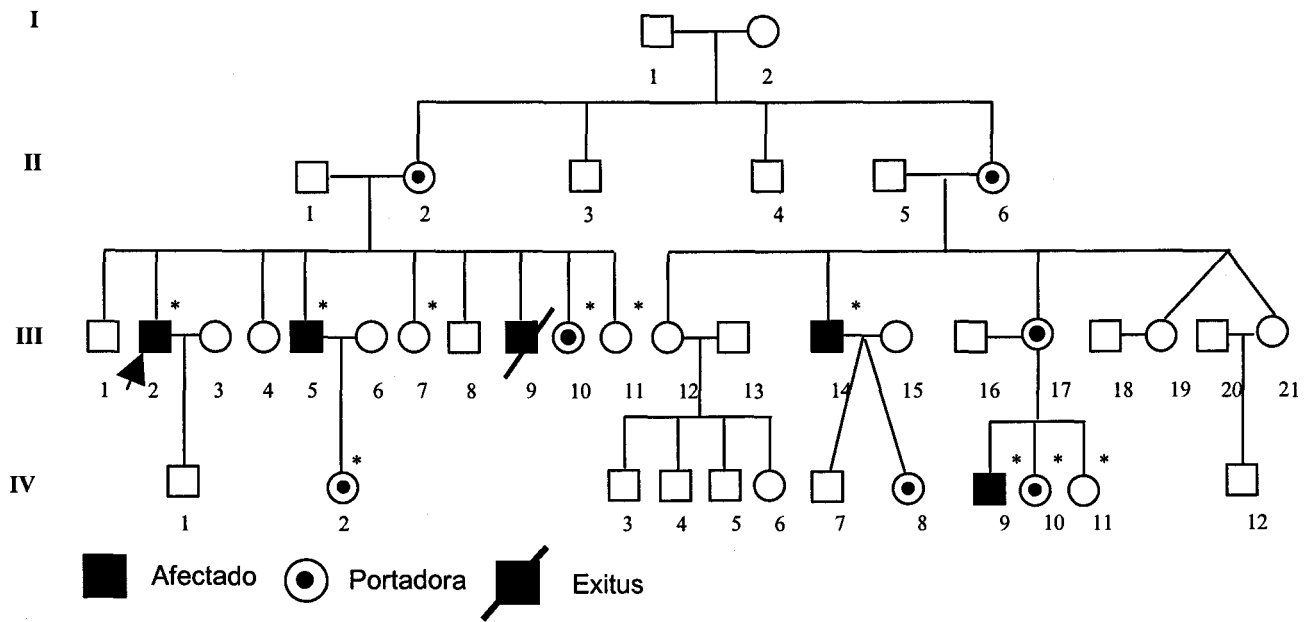


Figura 33. Árbol familiar del paciente A-037. Análisis de segregación de la mutación p.P1825L.

El paciente índice está indicado con una flecha. * Individuos estudiados.

4.5. CARACTERIZACIÓN DE LOS PUNTOS DE ROTURA DE LAS DOS GRANDES DELECIONES IDENTIFICADAS EN ESTE ESTUDIO: IDENTIFICACIÓN DE PORTADORAS

4.5.1. Delección de los exones 8 y 9

En el paciente A-223, todos los exones fueron amplificados excepto el 8 y el 9 lo que sugería la existencia de una delección que los implicaba. Para determinar los puntos de rotura de la delección, en primer lugar se mapeó el intrón 7 con tres parejas de cebadores (figura 33). Se obtuvieron productos de PCR del tamaño esperado para las tres parejas de cebadores, lo que indicaba que el intrón 7 no estaba implicado en la delección. Posteriormente se probó a amplificar con los cebadores Int-3F y E10-2 (cebador utilizado en la secuenciación del exón 10) (figura 34), y se obtuvo un producto de PCR de unas 3,200 pares de bases (pb). Esta pareja de cebadores debe amplificar en un gen normal un fragmento de 6.500-pb, anunciando, por lo tanto, una delección de aproximadamente 3.300-pb.

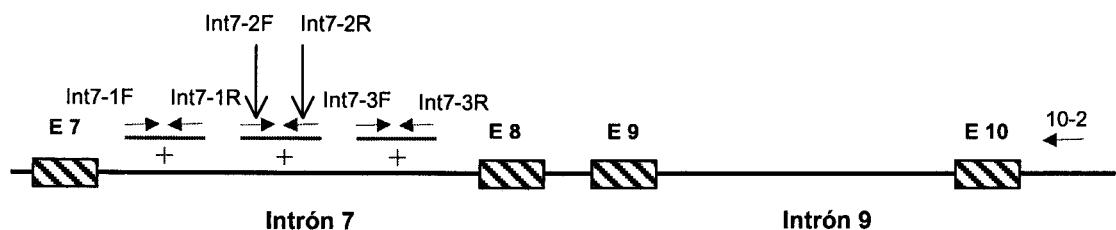


Figura 33. Representación esquemática de la localización de las parejas de cebadores utilizadas en la caracterización de la delección.

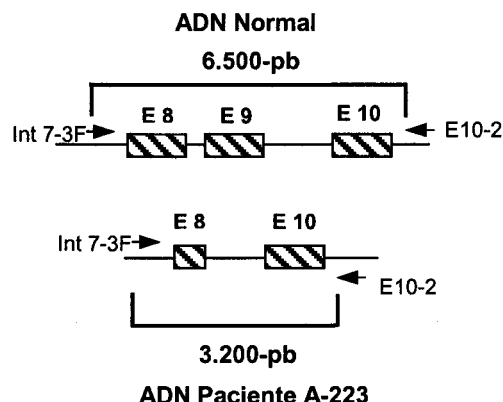


Figura 34. El diagrama representa la localización de los cebadores, Int7-3F y E10-2, en el gen FVIII en control sano y paciente.

Se secuenció el producto específico de la deleción para determinar los puntos de rotura. El punto de rotura 5' fue localizado dentro del exón 8 en el nucleótido 59.318, mientras que el punto de rotura 3' se encontraba en el intrón 9 en el nucleótido 62.505. Por tanto, la deleción de 3.185-pb incluye una porción del exón 8 y la totalidad del exón 9 (figura 35).

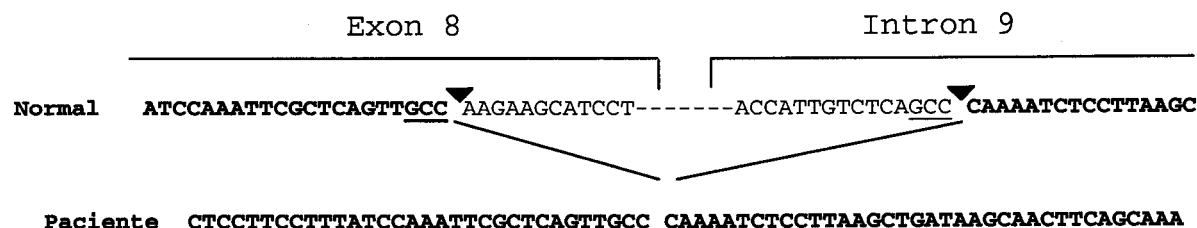


Figura 35. Puntos de rotura de la deleción en el paciente A-223. La secuencia superior es ADN normal y la inferior ADN del paciente (GenBank Accession nos. AY769950).

4.5.1.1. Estudio de portadoras

Debido al hecho de que los cebadores Int7-3F y E10-2 amplificaban un producto de PCR de 3.326-pb, diseñamos un nuevo cebador (Int9-4) hacia el extremo 5' más próximo a la deleción para obtener un producto de PCR de 1.046-pb en individuos con deleción. En individuos sin deleción, la pareja de cebadores amplificaría una banda de 4.234-pb, sin embargo, esta banda no amplificó bajo las condiciones de PCR usadas, por lo que se utilizaron los cebadores del exón 1 como control de la amplificación. Analizamos el ADN de la abuela, la madre y la hermana del paciente, y dos controles sanos. Sólo la abuela y la madre resultaron portadoras del gen mutado (figura 36).

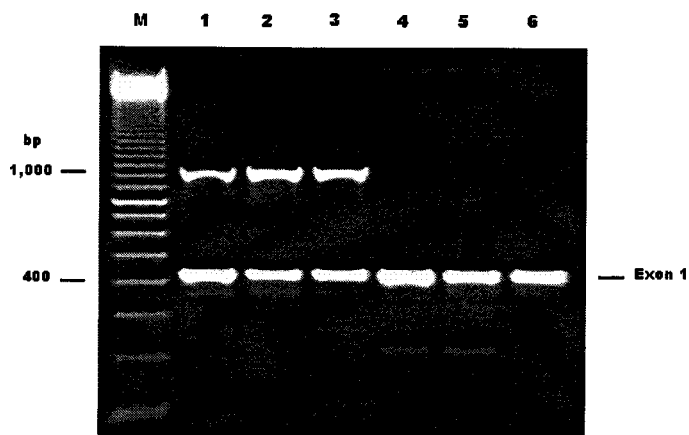


Figura 36. Amplificación del fragmento específico de la deleción. Un fragmento de 1046-pb fue amplificado mediante los cebadores Int 7-3 y Int 9-4 en el paciente 1, su abuela (2) y su madre (3). No fue observado producto en la hermana (4) ni en los dos controles (5, 6). Se usó un marcador de 100-pb (M). El exón 1 del gen FVIII fue amplificado mediante los cebadores Ex-1F y Ex-1R como control positivo de PCR.

4.5.2. Deleción del exón 15

En el paciente A-52, todos los exones fueron amplificados excepto el 15, lo que sugirió la presencia de una deleción que afectaba únicamente a este exón. Para caracterizar las regiones de los puntos de rotura, en primer lugar se mapeó el intrón 14 con siete parejas de cebadores (figura 37). Se obtuvieron productos de PCR del tamaño esperado mediante las parejas Int14-1F/Int14-1R, Int14-2F/Int14-2R, pero no se generó producto alguno para el resto de parejas de cebadores. En segundo lugar, se mapeó el intrón 15 con tres parejas de cebadores y se generaron productos de PCR del tamaño esperado en todas las parejas (figura 38). Para obtener un fragmento de PCR que contuviera la zona de empalme de la deleción, combinamos el cebador Int14-2F con Int15-1R y se obtuvo un producto de aproximadamente 600-pb. Esta pareja de cebadores debía amplificar un fragmento silvestre de 8.000-pb prediciendo una deleción de aproximadamente 7.400 pb (figura 36).

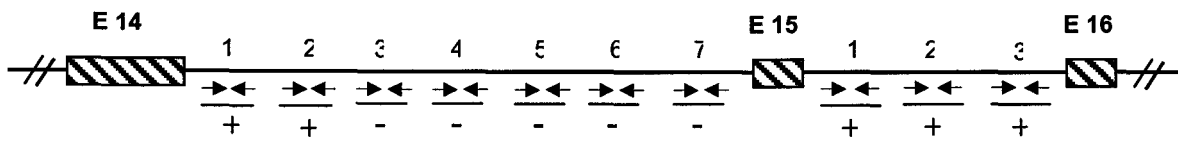


Figura 37. Representación esquemática de la localización de las parejas de cebadores utilizadas en la caracterización de la deleción.

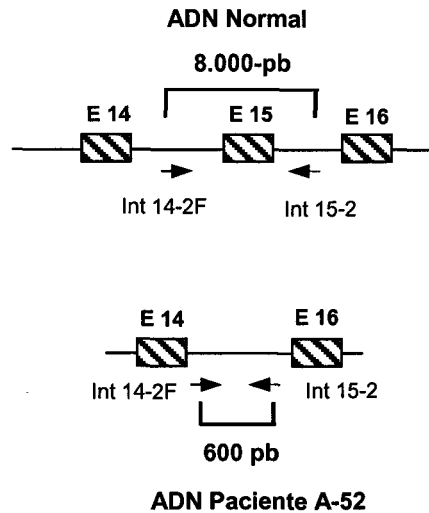


Figura 38. El diagrama representa la localización de los cebadores, Int14-2F y Int15-2, en el gen FVIII en control sano y paciente.

Se secuenció el fragmento de 600-pb para localizar los puntos de rotura. El punto de rotura 5' se localizó en el intrón 14 en el nucleótido 111.980, y el 3' en el intrón 15 en el nucleótido 119.463 (figura 39). El tamaño de la deleción resultó de 7.481-pb, y se localizó en el punto de rotura y empalme de la deleción una inserción de 56-pb de origen desconocido.

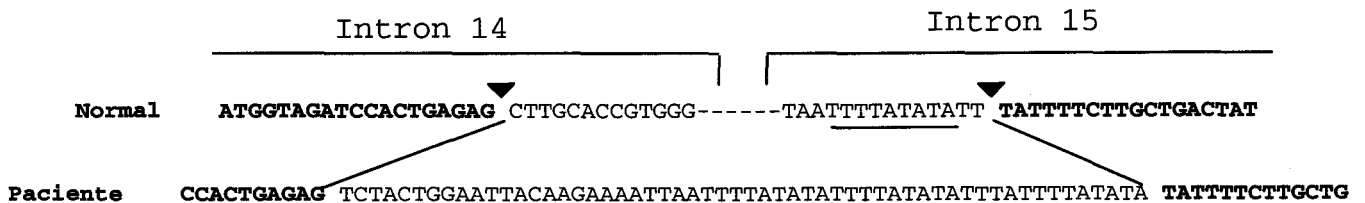


Figura 39. Puntos de rotura de la deleción en el paciente A-52. La secuencia superior es de ADN normal y la inferior ADN del paciente. Se localizó una inserción de 56-pb de origen desconocido en el punto de rotura y empalme en el gen factor VIII del paciente A-52 (GenBank Accession nos. AY769950).

4.5.2.1. Estudio de portadoras

Se utilizó la pareja de cebadores Int14-2F y Int15-1R para el estudio de portadoras, obteniendo un producto específico de 637pb. Como en el caso anterior, los cebadores amplificarían una banda de 8.062-pb, que no fue observada con las condiciones de PCR usadas, por lo que se utilizaron los cebadores del exón 1 como control de la amplificación. Analizamos el ADN de dos sobrinas y dos controles sano. Las dos sobrinas fueron portadoras del gen mutado (figura 40).

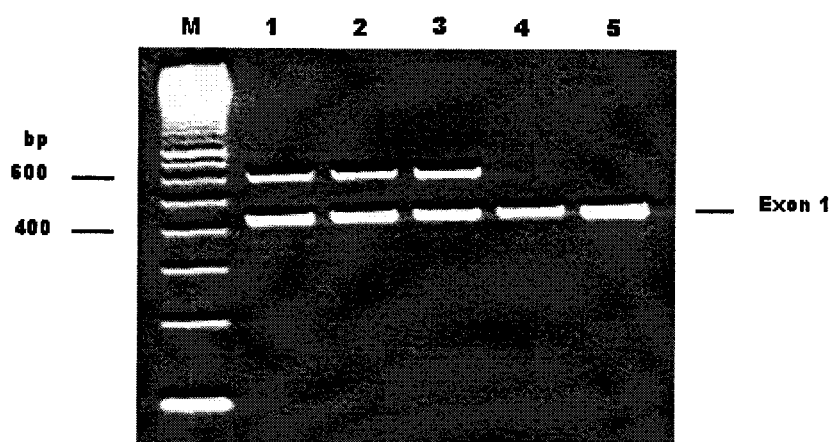


Figura 40. Amplificación del fragmento específico de la deleción. Un fragmento de 600-pb fue amplificado mediante los cebadores Int 14-2F y Int 15-2 en el paciente 2 (1) y sus dos sobrinas (2,3). Este producto no fue observado en los dos controles (4 y 5). Se usó un marcador de 100-pb (M). El exón 1 del gen FVIII fue amplificado mediante los cebadores Ex-1F y Ex-1R como control positivo de PCR.

4.6. ANÁLISIS DE HAPLOTIPOS

En algunos pacientes pertenecientes a familias diferentes que presentaban la misma mutación, se realizó un estudio de haplotipos para investigar si podrían tener antepasados comunes.

4.6.1. Población general de Andalucía

Para determinar los haplotipos y sus frecuencias en la población general del sur de Andalucía se estudiaron 50 varones no hemofílicos. El análisis reveló un haplotipo común (h1): Int1 (GT)₁₇ – ALWN I (+) – Int13 (CA)₂₄ – Bcl I (+) – Hind III (-) – Int22 (CA + TC)₂₆ con una frecuencia del 38%. Se observaron

otros 19 haplotipos en menor representación con un rango de frecuencia que iba del 2% al 8% (tabla 51).

Tabla 51. Haplotipos en el gen FVIII encontrados en la población normal andaluza.

Haplotipo	Polimorfismos						Nº de alelos	Frecuencia de Haplotipo (%)
	Int 1 (GT) _n	ALWN1	Int 13 (CA) _n	Bcl I	Hind III	Int 22 (CA) _n		
h1	17	+	24	+	-	26	19	38
h2	17	+	24	+	-	25	4	8
h3	17	+	25	+	-	25	4	8
h4	17	-	24	+	-	25	3	6
h5	17	+	25	+	-	26	3	6
h6	18	+	24	+	-	26	2	4
h7	18	+	25	-	+	25	2	4
h8	14	+	24	+	-	26	1	2
h9	15	+	25	+	+	25	1	2
h10	16	+	24	+	-	26	1	2
h11	17	+	24	+	-	27	1	2
h12	17	+	24	+	-	28	1	2
h13	17	+	23	+	-	26	1	2
h14	17	+	25	+	-	27	1	2
h15	18	+	23	-	+	24	1	2
h16	18	+	24	-	+	24	1	2
h17	18	+	25	+	-	25	1	2
h18	18	-	28	-	+	25	1	2
h19	19	+	23	+	+	24	1	2
h20	20	-	27	+	+	25	1	2
Total							50	

En cada caso '+' indica la presencia y '-' la ausencia de un sitio de restricción.

4.6.2. Pacientes con inversión del intrón 22

Se realizó el análisis de haplotipos en 22 pacientes con la mutación Inv22 para estudiar el origen de esta mutación en nuestra población hemofílica. El análisis reveló un haplotipo común: Int1 (GT)₁₇ – ALWN I (+) – Int13 (CA)₂₄ – Bcl I (+) – Hind III (-) – Int22 (CA + TC)₂₆ con una frecuencia del 27,3%, que resultó ser el haplotipo más común en la población general (tabla 52). Se observaron otros 12 haplotipos con menor representación con un rango de frecuencia que iba del 4,5% al 9%, 7 de los cuales no estaban representados en la población general.

Tabla 52. Haplotipos en el gen FVIII encontrados en pacientes con la mutación Inv22.

Haplotipo	Polimorfismos						Nº de alelos	Frecuencia de Haplotipo (%)
	Int 1 (GT) _n	ALWN1	Int 13 (CA) _n	Bcl I	Hind III	Int 22 (CA) _n		
h1	17	+	24	+	-	26	6	27,3
h2	17	+	24	+	-	25	2	9
h3	17	+	25	+	-	25	2	9
h5	17	+	25	+	-	26	2	9
h7	18	+	25	-	+	25	2	9
h15	18	+	23	-	+	24	1	4,5
h	17	-	25	+	-	29	1	4,5
h	18	+	26	-	+	25	1	4,5
h	18	-	26	-	+	25	1	4,5
h	18	-	27	-	+	ND	1	4,5
h	19	-	27	-	+	25	1	4,5
h	20	+	28	-	+	25	1	4,5
h	20	-	27	-	+	25	1	4,5
Total							22	4,5

4.6.3. Análisis de haplotipos en pacientes con las mutaciones recurrentes p.R593C, p.R1966Q y p.R2150H

4.6.3.1 Estudio de haplotipos en pacientes con la mutación p.R593C

Se incluyeron los 15 pacientes andaluces, 12 incluidos en este estudio y 3 remitidos desde el hospital de Sant Pau (Barcelona). Además se incluyeron 3 pacientes de origen no andaluz, también remitidos desde el hospital de Sant Pau. Los 15 pacientes andaluces compartían el haplotipo h1, el más común en la población general de Andalucía. Los tres pacientes procedentes de fuera de Andalucía presentaban haplotipos diferentes (tabla 53), dos de los cuales no estaban representados en nuestra población.

Se realizó un estudio detallado de los árboles familiares de los pacientes, pudiendo documentar 4 generaciones afectadas en la mayoría de familias (figura 41). El estudio reveló que un grupo de 8 pacientes con tal anomalía procedían de dos pequeños municipios de la provincia de Sevilla, Martín de la Jara y Pedrera, muy cercanos entre si (9 Km), y otro grupo de 5 pacientes contaban con familiares afectados que procedían de la provincia de

Cádiz. Los dos pacientes restantes, A-425 y 01-1284, no tenían historia familiar previa y procedían de la provincia de Huelva.

Tabla 53. Haplotipos en pacientes con la mutación p.R593C: Datos del paciente

Paciente	Haplotipo	Polimorfismos						Procedencia familiar
		Int 1	ALWN 1	Int 13	Bcl I	Hind III	Int 22	
A-9	h1	17	+	24	+	-	26	Martín de la Jara-Pedreira
A-39	h1	17	+	24	+	-	26	Martín de la Jara-Pedreira
A-40	h1	17	+	24	+	-	26	Martín de la Jara-Pedreira
A-61	h1	17	+	24	+	-	26	Martín de la Jara-Pedreira
A-189	h1	17	+	24	+	-	26	Martín de la Jara-Pedreira
A-173	h1	17	+	24	+	-	26	Martín de la Jara-Pedreira
A-298	h1	17	+	24	+	-	26	Martín de la Jara-Pedreira
A-260	h1	17	+	24	+	-	26	Martín de la Jara-Pedreira
A-524	h1	17	+	24	+	-	26	Cádiz
A-365	h1	17	+	24	+	-	26	Cádiz
99-1900*	h1	17	+	24	+	-	26	Cádiz
00-1946*	h1	17	+	24	+	-	26	Cádiz
A-475	h1	17	+	24	+	-	26	Cádiz
A-425	h1	17	+	24	+	-	26	Huelva
01-1284*	h1	17	+	24	+	-	26	Huelva
95-476*	h11	17	+	24	+	-	27	Origen no andaluz
00-1016*	hx1	16	+	24	+	-	27	Origen no andaluz
00-2022*	hx2	19	+	24	-	+	ND	Origen no andaluz

* El estudio genético de estos pacientes se realizó en el hospital Sant Pau.

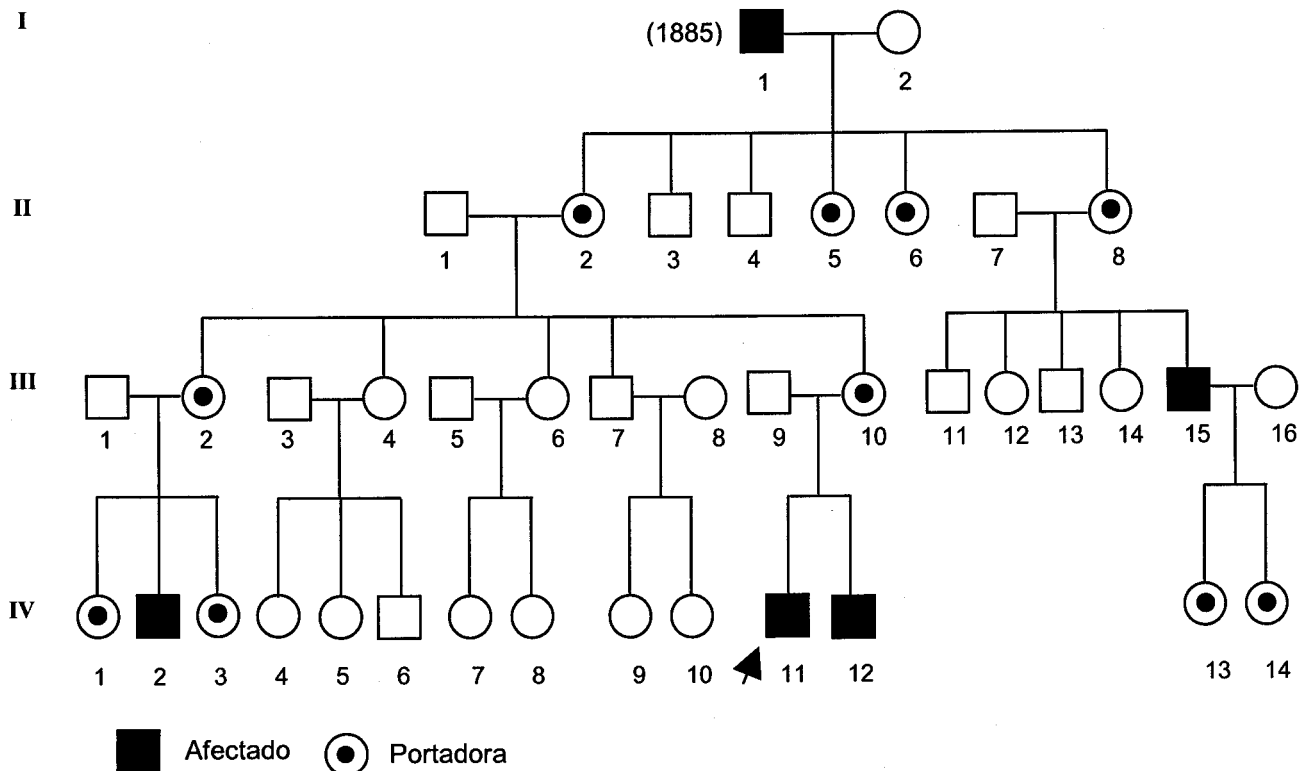


Figura 41. Árbol familiar del paciente A-9. * El paciente índice está indicado con una flecha. El número entre paréntesis indica la fecha de nacimiento del bisabuelo del paciente IV-11.

4.6.3.2. Estudio de haplotipos en pacientes con la mutación p.R2150H

Se incluyeron 11 pacientes andaluces con la mutación p.R2150H, 9 pertenecían a este estudio y 2 fueron remitidos desde el hospital de Sant Pau. El análisis de haplotipo reveló que los 11 pacientes compartían el haplotipo h1 (tabla 54). El estudio familiar también documentó la hemofilia hasta cuatro generaciones atrás (figura 42).

Tabla 54. Haplotipos en pacientes con la mutación p.R2150H: Datos del paciente

Paciente	Haplotipo	Polimorfismos						Procedencia familiar
		Int 1	ALWN 1	Int 13	Bcl I	Hind III	Int 22	
A-14	h1	17	+	24	+	-	26	Málaga/Granada
A-46	h1	17	+	24	+	-	26	Málaga/Granada
A-245	h1	17	+	24	+	-	26	Málaga/Granada
A-559	h1	17	+	24	+	-	26	Málaga/Granada
A-583	h1	17	+	24	+	-	26	Málaga/Granada
A-584	h1	17	+	24	+	-	26	Málaga/Granada
A-588	h1	17	+	24	+	-	26	Málaga/Granada
97-1094*	h1	17	+	24	+	-	26	Málaga/Granada
A-209	h1	17	+	24	+	-	26	Cádiz
A-194	h1	17	+	24	+	-	26	Cádiz
00-2019*	h1	17	+	24	+	-	26	Cádiz

* El estudio genético de estos pacientes se realizó en el hospital de Sant Pau.

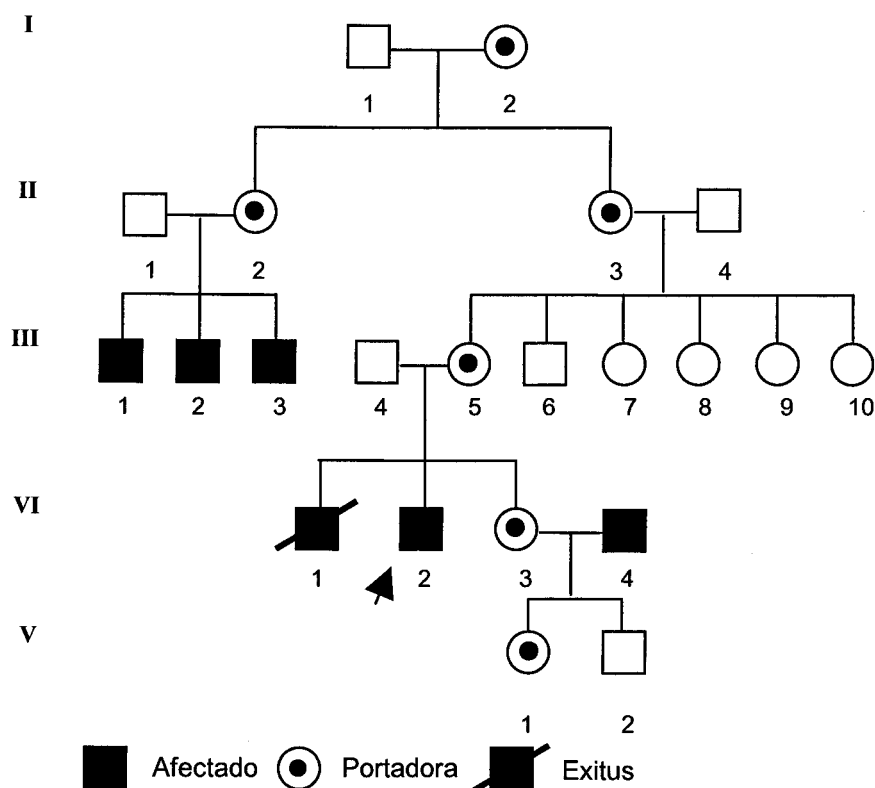


Figura 42. Árbol familiar del paciente A-245.

* El paciente índice está indicado con una flecha.

Ocho pacientes tenían ancestros que procedían de tres poblaciones de la costa oriental Andaluza (Vélez-Málaga, Nerja y Motril) muy cercanas entre sí, situadas en un radio de aproximadamente 35 Km. Del paciente A-583 aunque también procedía de esta zona no se conocía historia familiar previa. Los 3 pacientes restantes tenían familiares afectados que procedían de la provincia de Cádiz.

4.6.3.3. Estudio de haplotipos en pacientes con la mutación p.R1966Q

Se incluyeron en el estudio 7 pacientes andaluces con la mutación p.R1966Q. El análisis de haplotipos reveló que todos, a excepción del paciente A-446, compartían el haplotipo h1 (tabla 55). El paciente A-446 presentaba el haplotipo h6, que tenía una frecuencia en la población general del 4%.

Haciendo un estudio de la rama afecta del grupo de pacientes con el haplotipo h1, se vio que dos de los pacientes (A-417 y A-515) tenían antepasados familiares que procedían de la provincia de Cádiz. Por otro lado los antepasados familiares de A-27, A-30 y A-472 procedían de Écija, Almería y Granada, respectivamente, y por tanto sin relación aparente entre ellos. Por último, los antepasados familiares del paciente A-155 procedían de Zaragoza.

Tabla 55. Haplotipos en pacientes con la mutación p.R1966Q: Datos del paciente

Paciente	Haplotipo	Polimorfismos						Procedencia familiar
		Int 1	ALWN 1	Int 13	Bcl I	Hind III	Int 22	
A-27	h1	17	+	24	+	-	26	Écija
A-30	h1	17	+	24	+	-	26	Almería
A-155	h1	17	+	24	+	-	26	Zaragoza
A-417	h1	17	+	24	+	-	26	Cádiz (Algeciras)
A-515	h1	17	+	24	+	-	26	Cádiz (Barbate)
A-472	h1	17	+	24	+	-	26	Granada
A-446	h6	18	+	24	+	-	26	Cádiz (Algeciras)

4.6.4. Análisis de haplotipos en pacientes con mutaciones nuevas de cambio de aminoácido

La mutación p.V266A se identificó en los pacientes A-128 y A-510 que presentaban hemofilia A leve. La mutación p.S1791P se identificó en un paciente con hemofilia moderada (A-531) y en tres pacientes con hemofilia leve (A-096, A-215, y A-286). Con respecto a la mutación p.C153F, ésta se

identificó en dos pacientes con hemofilia grave. Ninguna de estas mutaciones se encontraba en sitios CpG. En la tabla 56 se muestran los resultados del análisis de haplotipo realizado en estos pacientes.

Tabla 56. Haplotipos en pacientes no relacionados que comparten mutaciones nuevas.

Mutación	Paciente	Haplotipos	Polimorfismo					
			Int 1	ALWN I	Int 13	Bcl I	Hind III	Int 22
V266A	A-128	h5	17	+	25	+	-	26
	A-510	h5	17	+	25	+	-	26
S1791P	A-096	hx3	18	-	29	-	+	26
	A-215	hx3	18	-	29	-	+	26
	A-286	hx3	18	-	29	-	+	26
	A-531	hx3	18	-	29	-	+	26
C153F	A-021	h1	17	+	24	+	-	26
	A-304	h1	17	+	24	+	-	26

El análisis de haplotipo en los dos pacientes con la mutación p.V266A reveló que compartían el haplotipo h5, que se encuentra representado en la población general con una frecuencia del 6%. El estudio de la historia familiar de ambos pacientes reveló que tenían familiares afectados de generaciones anteriores que procedían de Sevilla.

En el caso de la mutación S1791P, el análisis de haplotipos reveló que los cuatro pacientes compartían el mismo haplotipo, el cual no estaba representado en población control andaluza. Cuando se realizó un estudio familiar para ver la procedencia de los cuatro individuos se vio que las cuatro familias eran de etnia gitana. Se pudo determinar la procedencia familiar de los pacientes A-94 y A-215, localizándose en la provincia de Cádiz, aunque no quedo clara la procedencia familiar de los pacientes A-286 y A-531, debido a que son familias muy extensas y con una gran movilidad geográfica.

Por último, los pacientes A-304 y A-021, con la mutación C153F, compartían el haplotipo h1 y además ambos tenían generaciones anteriores de familiares afectados que procedían de Cabra, un pueblo de la provincia de Córdoba. La familia del paciente A-021 describe que el abuelo materno de éste

era hemofílico, aunque no está documentado el diagnóstico de hemofilia, y que murió muy joven por una hemorragia interna.

DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

El estudio de 196 pacientes con hemofilia pertenecientes a 196 familias andaluzas, nos ha permitido caracterizar el defecto genético causante de la enfermedad en el 93,4% de casos. De estos defectos, el 46,9% eran inéditos y el resto había sido descrito previamente. El porcentaje de detección de la mutación en el grupo de pacientes con hemofilia A fue del 93%, mientras que el porcentaje de detección en pacientes con hemofilia B fue del 96%.

En hemofilia A, diversos trabajos consultados, realizados en los últimos años en población alemana, francesa, india, y estadounidense, obtuvieron porcentajes de detección de la mutación muy similares a los nuestros (Bogdanova 2006, Guillet B 2006, Bogdanova 2005, Jayandharan G 2005, Citron M 2002). Con respecto a la hemofilia B, en un trabajo multicéntrico realizado en el 2005 en pacientes Italianos (Belvini D 2005), la detección falló en 2 de 238 pacientes estudiados. Por tanto, confirmamos que el porcentaje de detección de mutaciones en hemofilia B es más elevado que en hemofilia A, existiendo numerosos trabajos donde el porcentaje alcanza el 100% (Mahajan A 2004; Onay UV 2003; Vidal F 2000; Costa JM 2000; Jaloma-Cruz AR 2000; Attali O 1999).

A la vista de los resultados obtenidos y de los trabajos anteriormente citados, es evidente que mediante la secuenciación de los exones de los genes FVIII y FIX, la mutación no puede ser detectada en un 5-10% de pacientes con hemofilia A y entre el 1-5% de pacientes con hemofilia B. Esto puede ser debido a que los cebadores utilizados no permiten la identificación de cambios en secuencias intrónicas que puedan afectar a la transcripción (Citron M 2002). Por otro lado, pueden ocurrir inversiones en el gen (aparte del intrón 22 e intrón 1) que tampoco son detectadas mediante PCR del ADN genómico, así como duplicaciones de cierto exones (Acquila M 2004). Este tipo de mutaciones sólo pueden ser estudiadas mediante el ARN, aunque esto no se realizó en este trabajo. Sin embargo, un reciente trabajo realizado en ARN de pacientes a los que no se les detectó mutación a nivel genómico, no reveló defectos adicionales que afectaran al gen FVIII (El-Maarri O 2005). Es posible que

defectos en otras proteínas implicadas en plegamiento, secreción, tráfico o estabilidad sobre los factores de coagulación FVIII y FIX puedan ser responsables del nivel reducido de FVIII/FIX en algunos de estos casos (Bogdanova N 2006).

En el grupo de pacientes con hemofilia A se identificaron un total de 79 mutaciones diferentes, 42 de las cuales no habían sido descritas previamente, y fueron identificadas en un total de 49 pacientes. Tomando todos estos datos en conjunto, aproximadamente una tercera parte (49/171) de los 171 pacientes con hemofilia A incluidos este trabajo presentaron una mutación nueva, coincidiendo con los resultados publicados en trabajos previos en otras poblaciones (sueca, checa, y francesa), donde también la tercera parte de los pacientes presentaron mutaciones que no habían sido descritas previamente (Ljung RC 1999, Habart D 2003, Guillet B 2006).

Con respecto a la hemofilia B, se han identificado un total de 19 mutaciones diferentes, 3 (15,8%) de las cuales no habían sido descritas previamente. Entre los diversos trabajos consultados realizados en diversas poblaciones, el porcentaje de pacientes que presentaban mutaciones nuevas osciló entre el 10 y el 27% (Ljung R 2001; Mahajan A 2004; Onay UV 2003; Belvini D 2005; Espinós C 2003).

El defecto genético más común en hemofilia A grave es la inversión del intrón 22 del gen FVIII, la cual fue descrita en 1993 por Lakich D y col. En nuestra población, la incidencia de la inversión del intrón 22 fue del 35,8% (29/81). En un estudio multicéntrico realizado en 1995 (Antonarakis SE 1995a), la frecuencia de la inversión del intrón 22 en pacientes con hemofilia A grave osciló, entre los diferentes grupos, del 28% al 53%, siendo la frecuencia en el grupo de pacientes españoles (grupo 21 del estudio) del 42%. Esta diferencia en la frecuencia entre las diferentes poblaciones pudo ser debida, al menos en parte, al tamaño de la muestra de cada grupo y a la metodología empleada, si bien la variación étnica no pudo ser excluida.

Cuando analizamos la correlación entre historia familiar y frecuencia de esta mutación, se vio que un porcentaje muy elevado, 79,3%, se debía a casos esporádicos y sólo el 20,7% a casos con historia familiar previa. Estos

resultados están en concordancia con los encontrados previamente en población sueca por Ljung & Sjörin (1995b), donde la inversión del intrón 22 era también más frecuente en familias con hemofilia esporádica (63,6%) que en familias con historia familiar conocida (36,4%). Similares resultados fueron obtenidos en un trabajo del 2004 realizado en población iraní, donde el 73% de los pacientes con inversión del intrón 22 eran casos esporádicos (Rastegar LG 2004). De acuerdo a los datos de la literatura, más del 90% de las madres de los casos esporádicos causados por esta mutación, son portadoras de la misma y casi exclusivamente los gametos afectados son transmitidos por los abuelos maternos (Rossiter JP 1994). En nuestro estudio, de los 23 casos esporádicos con Inv22, solo se pudo estudiar a 12 de las madres de estos pacientes y todas resultaron portadoras de la mutación, además se estudiaron 3 abuelas maternas siendo dos de ellas no portadoras. El mecanismo postulado para la inversión del intrón 22 es que en varones, la ausencia de un segundo cromosoma X para el alineamiento homólogo durante la meiosis favorecería el alineamiento intracromosómico entre las regiones homólogas (entre región int22h1 y región int22h2 o int22h3).

En relación a la inversión del intrón 1 del gen FVIII, la incidencia de esta mutación en nuestra población fue del 5%. Esta frecuencia se corresponde con la ya descrita (2-5%) por otros estudios, realizados en población mejicana, indú y del Reino Unido (Mantilla-Capacho JM 2007, Jayandharan G 2005, Bagnall RD 2002).

Con respecto a las pequeñas deleciones e inserciones, aproximadamente la tercera parte (15/47) de los pacientes con hemofilia A grave, negativos para Inv22 e Inv1, portaban pequeñas deleciones e inserciones. Este porcentaje está en concordancia con los resultados que aparecen en un estudio previo realizado por Bogdanova y col. (2002) en población alemana, donde se informa que existe una prevalencia del 30% de este tipo de mutaciones en pacientes con hemofilia A grave.

En este trabajo, hemos identificado 12 pequeñas deleciones/inserciones diferentes, 11 de las cuales provocaron un cambio de la pauta de lectura. La mitad de éstas (6/12) se localizaron en el exón 14, el cual es considerado un

punto caliente para este tipo de mutaciones, debido principalmente, a la presencia de varios tramos de nucleótidos de adenina (poli-A) (Nakaya S 2001). De hecho, tres de estas mutaciones implicaban la inserción o delección de una adenina dentro de un tramo poli-A, 3637delA, 4379_4380insA y 4825_4826insA. Los tramos de adeninas en los exones del gen FVIII son mucho más comunes que otra secuencia de ADN formada por la repetición de cualquier otro nucleótido. Por ejemplo, hay doce secuencias de A₆ en los exones del gen FVIII, comparado con 3 secuencias de T₆, 1 de G₆, y ninguna de C₆ (Goodeve AC 2003).

Ocho de las doce mutaciones identificadas no habían sido descritas previamente, y a excepción de la mutación 557_559delACT (p.D167_L168delinsV), todas producían un cambio de la pauta de lectura. La mutación 557_559delACT (p.D167_L168delinsV) fue responsable de la sustitución de un residuo de ácido aspártico y un residuo de leucina (167, 168) por un residuo de valina. La mutación se localizó en el dominio A1, el cual interacciona con FX, aunque ninguna región específica ha sido identificada. Una mutación de cambio de aminoácido en el residuo 167, Asp>Tyr (GAC>TAC), ha sido descrita por Liu ML y col. (2002) asociada con hemofilia grave. Además, los residuos 167 y 168 tienen un porcentaje de accesibilidad del 0,1% y 7,3%, respectivamente, lo que indica que se encuentran en el núcleo del dominio A1. Todo esto apoyaría el fenotipo grave del paciente con la mutación p.D167_L168delinsV.

Las mutaciones de codón de parada estaban presentes en una cuarta parte de nuestros pacientes con hemofilia A grave, negativos para Inv22 e Inv1. Este resultado coincide con el de otros trabajos publicados, donde aproximadamente el 24% de los pacientes con hemofilia grave presentaban un codón de parada (Ivaskevicius V 2001; Bogdanova N 2005; Vinciguerra C 2006; Guillet B 2006).

En este estudio, hemos identificado 11 mutaciones de codón de parada, 4 de ellas no estaban descritas previamente, y ninguna de éstas se localizó en sitios CpG. Estos resultados son similares a los obtenidos por Citron y col. en el 2002 que identificaron 7 mutaciones nuevas de codón parada y ninguna de

ellas estaba localizadas en sitios CpG. Estas observaciones son diferentes a las de un estudio multicéntrico realizado en 1996 en 147 pacientes hemofílicos sin historia familiar previa, donde la mayoría de las mutaciones nuevas se localizaban en zonas CpG (Becker J 1996). Esta diferencia de resultados podría ser debida a que la identificación de mutaciones en hemofilia A cuando se realizó el trabajo de Becker y col. era relativamente reciente, y por lo tanto, la frecuencia de aparición de mutaciones nuevas, incluidas las localizadas en sitios CpG, era muy elevada.

Por otro lado, las mutaciones identificadas en nuestro estudio localizadas en sitios CpG (p.R795X, p.R1941X, p.R1966X y p.R2307X) aparecen en la base de datos en múltiples ocasiones asociadas con hemofilia grave.

El mecanismo deletéreo de este tipo de mutaciones es obvio, ya que un codón de parada prematuro conduce a un ARNm y/o proteína truncada (Antonarakis SE 1995b). Como consecuencia, todas las mutaciones de codón de parada identificadas en este estudio dieron lugar a un fenotipo grave.

En el caso de las mutaciones de cambio de aminoácido, un 55% del total de pacientes con hemofilia A estudiados presentaron este tipo de mutación. Entre los diversos trabajos consultados, el porcentaje de pacientes con este tipo de mutación osciló entre el 22 y el 60% (Ahmed RPH 2005, Ivaskevicius V 2001, Citron M 2002, Guillet B 2006, Hill M 2005). En nuestros pacientes con hemofilia A grave, negativos para Inv22 e Inv1, la prevalencia de este tipo de mutación fue del 24,4%. Este resultado es similar al que se obtuvo en un estudio multicéntrico realizado por Vinciguerra y col. en pacientes graves donde la prevalencia para las mutaciones de cambio de aminoácido fue aproximadamente del 29% (Vinciguerra C 2006). Sin embargo, en un estudio multicéntrico realizado en el 2005 (Bogdanova N 2005) el porcentaje fue del 38,4%. Con respecto a nuestros pacientes con hemofilia A moderada/leve, la incidencia fue aproximadamente del 84,7%, coincidiendo con resultados previos obtenidos en otros trabajos (Citron M 2002, Hill M 2005, Guillet B 2006, Bogdanova N 2006).

Se identificaron 48 mutaciones diferentes de cambio de aminoácido, aproximadamente el 21% (10/48) en hemofilia A grave y el 79% restante en hemofilia A moderada/leve. De estas mutaciones, 26 eran no habían sido descritas previamente, 8 se identificaron en pacientes con hemofilia grave y 18 en pacientes con hemofilia moderada/leve.

Las mutaciones de cambio de aminoácido encontradas en pacientes con hemofilia A grave se observaron a lo largo de todo el gen FVIII, aunque cinco de las 10 mutaciones de cambio de aminoácido identificadas en estos pacientes se localizaron en el dominio A3, ninguna de las cuales había sido descrita previamente. En hemofilia moderada/leve, las mutaciones se observaron a lo largo de todo el gen FVIII, principalmente en el dominio A3. Las mutaciones inéditas se localizaron en su mayoría en el dominio A2 (5/18) y en el dominio A3 (6/18).

En los dominios C se identificaron 24 mutaciones de cambio de aminoácido y sólo el 8,3% (2/24) estaban asociadas con hemofilia grave. En un estudio realizado por Liu ML y col. (2000), se identificaron 57 pacientes con mutaciones de cambio de aminoácido localizadas en los dominios C, en los que el 20% de las mutaciones estaban asociadas a hemofilia A grave. La frecuencia más baja obtenida en nuestro estudio quizás fue debido al tamaño de la muestra, aunque estos datos nos indican, que las mutaciones de cambio de aminoácido en los dominios C tienden a asociarse con hemofilia moderada/leve.

El carácter "hotspots" de los dinucleótidos CG ha sido ya confirmado en numerosas publicaciones (Cooper DN 1988; Youssoufian H 1988; Cooper DN 1990; Pattinson JK 1990). En el caso de la hemofilia A, entre un 30-40% de las mutaciones puntuales ocurren en uno de los 70 sitios CpG del FVIII, aunque éstos sólo representan el 2% de la secuencia codificante (Cooper DN 1988, Youssoufian H 1988, Pattinson JK 1990).

En nuestro estudio, en hemofilia A, hemos identificado 59 mutaciones puntuales, entre mutaciones de codón de parada y mutaciones de cambio de sentido, y 17 (28,8%) se localizaron en sitios CpG. En un estudio anterior realizado por V. Ivaskevicius y col. (2001) en 63 pacientes con hemofilia A de

Lituania, se encontró que el porcentaje de mutaciones localizadas en sitios CpG era del 29,2%. Estos resultados corroboran que aproximadamente el 30% de las mutaciones puntuales ocurren en sitios CpG.

De las 59 mutaciones puntuales identificadas, 30 no habían sido descritas previamente y solo 2 (6,6%) de ellas se localizaron en sitios CpG. Este porcentaje es significativamente menor que el 32% informado por Cooper (1990), pero igual al 6,1% obtenido por Cutler y col (2002). En otro trabajo realizado en el año 2002 por Citron y col., encontraron 17 mutaciones puntuales que no habían sido descritas previamente pero ninguna de ellas se localizó en zonas CpG. La diferencia significativa en los resultados obtenidos por Cooper y col. en el 1990 y los obtenidos en el resto de trabajos mencionados, incluido el nuestro, podría ser debida, como ya se ha comentado antes para un trabajo de Becker en 1996, a que la frecuencia de aparición de mutaciones puntuales nuevas, incluidas las localizadas en sitios CpG, era mayor en el momento del estudio, ya que la identificación de mutaciones en hemofilia era reciente.

Por otro lado, 4 de los 6 codones que codifican para el aminoácido arginina contienen sitios CpG, de hecho, de las 17 mutaciones puntuales localizadas en sitios CpG en este estudio, 14 se localizaban en codones de arginina. Como consecuencia de ello, la arginina es el aminoácido más mutado, estando afectado en aproximadamente 1/3 de todas las mutaciones puntuales (Oldenburg J 2004a). En este trabajo se han obtenido datos similares, ya que el 27% (16/59) de las mutaciones puntuales se localizaron en codones de arginina.

En hemofilia existe una alta frecuencia de mutaciones puntuales recurrentes y éstas se encuentran principalmente en sitios CpG (Oldenburg J 2006b, base de datos HAMSTeRS). En nuestro caso, en hemofilia A, y a excepción de las dos mutaciones nuevas (p.R1696Q y p.R2163L) y la mutación R2304H, que solo aparece en HAMSTeRS en dos ocasiones, las 14 mutaciones restantes localizadas en sitios CpG se consideran mutaciones recurrentes ya que aparecen en la base de datos en numerosas ocasiones.

Por tanto, nuestros resultados confirman que la tercera parte de las mutaciones puntuales ocurren en sitios CpG, y que el amino ácido arginina es el más mutado. Por otro lado, la gran mayoría (82%) de las mutaciones puntuales localizadas en sitios CpG son mutaciones recurrentes, y solo un mínimo porcentaje de las mutaciones puntuales nuevas se localizan en sitios CpG.

Dos grandes deleciones se identificaron en dos pacientes con hemofilia A grave (4%), negativos para Inv22 e Inv1, ambas deleciones no habían sido descritas previamente. En un estudio multicéntrico realizado en 846 pacientes de origen alemán la frecuencia de este tipo de mutación fue del 3% (Oldenburg J 2004a). En otros trabajos recientes realizados en población indú y francesa, las frecuencias fueron del 4% y 6%, respectivamente (Jayandharan 2005; Vinciguerra C 2006). En general, lo que nos indican estos resultados es que la frecuencia de ese tipo de mutación es baja.

El último tipo de mutación identificada en nuestros pacientes con hemofilia A fueron las mutaciones en la zona de procesamiento del ARN. Un 2% del total de pacientes con hemofilia A estudiados presentaron este tipo de mutación, coincidiendo con los resultados obtenidos en trabajos previos consultados (Ivaskevicius V 2001, Cutler JA 2002, Citron M 2002, Jayandharan G 2005, Vinciguerra C 2006). Se identificaron 3 mutaciones puntuales en la zona de procesamiento de ARN, ninguna de las cuales había sido descrita previamente. La mutación IVS4-1G>A se detectó en un paciente con hemofilia A grave y afectaba al dinucleótido invariante AG (sitio aceptor). Esta secuencia está totalmente conservada en todos los sitios aceptores de procesamiento de ARN, por lo que la mutación interferirá en el procesamiento de intrones (Krawczak M 1992), provocando hemofilia grave. Esta hipótesis está apoyada por un caso descrito en HAMSTeRS donde una mutación en el sitio aceptor AG del intrón 4 (IVS4-2A>G) está asociada con la forma grave de la enfermedad. Las dos mutaciones restantes, IVS7+3A>G y IVS11+5G>T, se localizaron en la secuencia consenso del sitio dador de los intrones, dando lugar a hemofilia leve. Se podría postular, que al estar ambas mutaciones en la secuencia consenso, pero no en una de las posiciones invariantes, podría darse algún

procesamiento correcto lo que explicaría la levedad de la afección clínica (Bowen DJ 2001).

Con respecto al estudio que hemos realizado en pacientes con hemofilia B, se han identificado 19 mutaciones diferentes dentro del grupo de pacientes, 17 de las cuales fueron mutaciones puntuales. Las mutaciones de cambio de aminoácido fueron el defecto genético más frecuente, con un 73,7% (14/19), seguido de las mutaciones de codón de parada con un 10,5% (2/19). Estas frecuencias son similares a las informadas en dos estudios multicéntricos realizados en población española (Montejo JM 1999) e italiana (Belvini D 2005), y en la base de datos internacional de hemofilia B, donde las frecuencias de las mutaciones de cambio de aminoácido fueron 72,5%, 65%, y 68%, respectivamente; y las mutaciones de codón de parada fueron de 9,7% y 15%, y 14%, respectivamente.

El 35,5% (6/17) de las mutaciones puntuales identificadas en nuestro pacientes con hemofilia B estaban localizadas en sitios CpG, coincidiendo con el 40% informado en la base de datos internacional de hemofilia B (Mukherjee S 2003), y con el 35% obtenido en el estudio realizado por Belvini D y col (Belvini D 2005). En otro estudio realizado en 18 pacientes con hemofilia B, que procedían del Norte de la India, el porcentaje que obtuvieron fue de aproximadamente un 29% (Mahajan A 2004). Como sucede en el gen del FVIII, nuestros resultados vuelven a confirmar que los dinucleótidos CpG son un "hotspot" en el gen FIX (Green PM 1990)

En el grupo de pacientes con hemofilia B grave se identificaron dos mutaciones que no habían sido descritas previamente, una gran delección que abarcaba los exones 4 y 8, y una pequeña inserción (31198_31199insGAGAT) que provocaba un cambio en la pauta de lectura y como consecuencia, un codón de parada prematuro en el exón 8. La frecuencia de ambas mutaciones fue inferior al 10%, lo cual estaba en concordancia con las frecuencias informadas por estudios previos (Ljung R 2001, Enayat MS 2004, Mahajan A 2004).

En hemofilia B moderada/leve se identificaron 13 mutaciones de cambio de aminoácido y una mutación en la región promotora. Sólo la mutación de cambio de aminoácido p.H268Q no había sido descrita previamente.

La mutación en la zona promotora, -6G→A, estaba asociada con fenotipo B Leyden en un paciente con hemofilia leve. Esta variante de la enfermedad se caracteriza por tener una deficiencia grave de factor IX en el nacimiento y la infancia, aumento de los niveles desde la pubertad a la adolescencia, y valores de FIX casi normales en la edad adulta (Crossley M 1992). Se sabe que la hormona esteroide juega un papel importante en el aumento de los niveles de FIX en la pubertad (Briet E 1985). La región promotora de FIX tiene un sitio de unión para el factor nuclear de hepatocitos 4 (HNF-4), que es un factor de transcripción en la superfamilia de receptores de hormonas esteroides. En la hemofilia B Leyden, la unión del factor de transcripción HNF-4 a esta región promotora está afectada, y por lo tanto también lo está la transactivación del FIX (Reijnen MJ 1992). El fenotipo Leyden se supera parcialmente durante la pubertad, con el incremento en la concentración de testosterona. De entre las mutaciones en la zona promotora que dan lugar a este fenotipo, la mutación -6G→A, la cual se encuentra localizada en un sitio CpG y para la que ha sido documentado un efecto fundador (Morgan GE 1995), es la que da un fenotipo más leve y una recuperación parcial más temprana de los niveles de FIX (Morgan GE 1995; Vidaud D 1993).

Todas las mutaciones identificadas en este estudio, tanto si eran inéditas como si ya habían sido previamente descritas por otros autores, han sido enviadas a las bases de datos correspondientes ([Http://europium.csc.mrc.ac.uk](http://europium.csc.mrc.ac.uk); Stenson PD 2003, www.kcl.ac.uk/ip/petergreen/haemBdatabase.html) con objeto de que puedan ser consultadas por la comunidad científica internacional.

En ausencia de estudios funcionales, la relación entre causa y efecto no siempre es clara, y sólo en una minoría de mutaciones, podemos comprender perfectamente como el defecto genético presente en el gen es el causante de la hemofilia. Esto queda limitado en su mayor parte a mutaciones cuyo efecto

es evidente, lo que sucede en grandes deleciones, mutaciones de codón de parada, mutaciones que cambian la pauta de lectura y mutaciones en la zona de procesamiento del ARN, ya que el gen queda interrumpido, la traducción de la proteína es terminada de forma prematura, o el procesamiento del ARNm es incorrecto, etc; estando relacionadas este tipo de mutaciones con la forma grave de la enfermedad. Sin embargo, para la mayoría de mutaciones de cambio de aminoácido no hay una explicación obvia para el efecto que producen, en cuyo caso se intentan buscar posibles explicaciones como desestabilización de la proteína, plegamiento incorrecto, o perturbación de regiones estructural y funcionalmente importantes. Aunque a menudo las posibilidades para probar estas explicaciones son pocas, la cristalografía de rayos X y avances en software de modelos moleculares y predicción de estructura de proteína han permitido la explicación para algunas mutaciones (Pemberton S 1997; Brandstetter H 1995; Mertens K 1999; Bajaj SP 1999).

En nuestro estudio, hemos identificado 26 mutaciones de cambio de aminoácido, en pacientes con hemofilia A, que no habían sido descritas previamente. Siguiendo una serie de pasos hemos intentado demostrar que estos cambios son los responsables de las anomalías clínicas en estos pacientes.

Se descartó la existencia de un segundo cambio en la secuencia codificante de estos pacientes que pudiera ser causante de la enfermedad, ya que se secuenció la región codificante del gen del FVIII y las zonas adyacentes exón/intrón y no se encontró ningún otro cambio. También pudimos descartar la presencia de estas mutaciones en la población general, porque al secuenciar el gen FVIII en 100 cromosomas no hemofílicos no encontramos ninguno de estos cambios entre ellos, sugiriéndonos que no se trataban de cambios polimórficos neutros.

Estudiamos el grado de conservación de los residuos afectados en cuatro genomas de mamíferos que han divergido en la evolución: humano, ratón, cerdo y perro ([Http://europium.csc.mrc.ac.uk](http://europium.csc.mrc.ac.uk)). Todos los residuos afectados, a excepción de uno, estaban altamente conservados en el FVIII de humano, ratón, cerdo y canino, lo que sugirió un importante papel para la

función de la proteína (Matthews BW 1996) (tabla 57). La única excepción fue valina en el codon 266, sustituido por isoleucina en el genoma de canino.

Tabla 57. Conservación de los residuos afectados en 4 genomas de mamíferos.

Tipo de Hemofilia	Mutación encontrada	FVIII Humano	FVIII Cerdo	FVIII Ratón	FVIII Canino
Grave	C153F	C	C	C	C
	A469E	A	A	A	A
	F1735L	F	F	F	F
	Q1745R	Q	Q	Q	Q
	G1757V	G	G	G	G
	W1942R	W	W	W	W
	I1956N	I	I	I	I
	R2163L	R	R	R	R
Moderada	L242P	L	L	L	L
	S1791P	S	S	S	S
	E2165V	E	E	E	E
Leve	V266A	V	V	V	I
	H274L	H	H	H	H
	K376N	K	K	K	K
	K380E	K	K	K	K
	V483D	V	V	V	V
	M662I	M	M	M	M
	Y719C	Y	Y	Y	Y
	R1696Q	R	R	R	R
	A1701V	A	A	A	A
	N1753K	N	N	N	N
	S1788T	S	S	S	S
	P1825L	P	P	P	P
	H2082D	H	H	H	H
	M2255K	M	M	M	M
L2324P	L	L	L	L	

Los pacientes con las mutaciones p.H274L, p.A1701V, p.N1753K, y p.P1825L, presentaban historia familiar, y pudimos realizar un análisis de segregación de las mutaciones con la enfermedad, demostrando que la mutación aparecía solamente en individuos enfermos.

Por último, en el caso de las mutaciones identificadas en pacientes esporádicos y, en pacientes a los que no se les pudo realizar el análisis de

segregación de la mutación con la enfermedad al no disponer del ADN de otros miembros afectados, la hipotética correlación del cambio con la función de la proteína fue analizada siguiendo los modelos moleculares descritos para el FVIII (Pemberton S 1997; Stoilova-McPhie S 2002; Pratt KP 1999), y basándonos en la diferente naturaleza entre el amino ácido silvestre y el sustituido, apoyándonos a su vez en referencias de cambios de aminoácidos similares.

- Mutación p.C153F

La mutación se identificó en dos pacientes no emparentados que presentaban hemofilia grave. Una mutación en el mismo codón, p.C153W, ha sido descrita asociada con hemofilia grave (Waseem NH 1999), aunque la mutación se produjo en el tercer nucleótido (TGC>TGG). La sustitución de cisteína por fenilalanina da lugar a la sustitución de un aminoácido polar por un aminoácido apolar con anillo aromático, igual que la sustitución antes mencionada. Además, la cisteína en el codón 153 está implicada en puentes disulfuro en el dominio A1 (McMullen 1995). El factor VIII tiene 23 residuos de cisteína y se han identificado 7 puentes disulfuro, de los cuales 2 están en el dominio A1, entre los residuos 153 y 179, y entre los residuos 248 y 329. Por tanto, la sustitución de cisteína en la posición 153 podría cambiar la geometría del dominio A1 y causar la enfermedad.

- Mutación p.A469E

El residuo A469 se encuentra en el dominio A2 y de acuerdo con el modelo molecular tiene un porcentaje de accesibilidad del 9%. Un valor del 0% indica que un residuo es inaccesible, mientras que un valor del 100% indica que es totalmente accesible. Dos mutaciones en el residuo A469, p.A469G y p.A469V, han sido descritas previamente por Schwaab y col. (1995b) y Ljung y col. (base de datos HAMSTeRS), respectivamente (ambas asociadas con hemofilia moderada). En nuestro caso, la mutación p.A469E, da lugar a la sustitución de un residuo hidrofóbico de alanina por un residuo de ácido glutámico de mayor tamaño y con una carga negativa.

- Mutación p.F1735L

De acuerdo con el modelo molecular del dominio A3, el residuo F1735 es completamente inaccesible, lo cual nos indica que se encuentra en el núcleo de la proteína. Con la mutación p.F1735L se produce la sustitución del aminoácido fenilalanina, un residuo hidrofóbico aromático, por un residuo de leucina, también hidrofóbico aunque de menor tamaño y sin anillo aromático.

- Mutación p.Q1745R

El residuo Q1745 se encuentra en el dominio A3, en la superficie de la proteína, con un porcentaje de exposición del 61%. La mutación da lugar a la sustitución de glutamina, residuo polar, por arginina, residuo con carga positiva y de mayor tamaño.

- Mutación p.Q1757V

Según el modelo molecular del dominio A3, el residuo Q1757 tiene un porcentaje de exposición del 3%, por lo que se encuentra en el núcleo de la proteína. La mutación da lugar a la sustitución del aminoácido glutamina, residuo polar, por valina, residuo polar y de menor tamaño.

- Mutación p.W1942R

Una mutación de codón de parada en el residuo W1942 fue previamente descrita por Lin y col. (1993), en nuestro caso ha sido un mutación de cambio de aminoácido, p.W1942R (TGG>CGG). Esta mutación provoca el cambio de triptófano, un residuo hidrofóbico que se encuentra en el interior de la molécula (accesibilidad 0,9%), por un residuo de arginina, aminoácido más pequeño y que además está cargado positivamente, lo que podría provocar un cambio en la estructura tridimensional de la proteína (Eriksson AE 1993; Xu J 1998).

- Mutación p.I1956N

El residuo I1956 se localiza en el dominio A3 y es totalmente inaccesible. Una mutación en el mismo residuo, p.I1956T ha sido descrita previamente asociada con hemofilia leve (Cutler JA 2002). Ambas sustituciones son no conservativas y dan lugar a la sustitución de un aminoácido apolar por un aminoácido polar; sin embargo, mientras nuestro paciente presenta hemofilia grave, el paciente con la mutación p.I1956T presentaba una hemofilia leve.

- Mutación p.R2163L

En HAMSTeRS aparecen descritas previamente dos sustituciones en el residuo R2163, p.R2163H y p.R2163C. El residuo R2163 se localiza en el dominio C1 y tiene un porcentaje de exposición menor al 10%, por lo que según el modelo molecular se le sitúa en el núcleo de la proteína (Liu ML 2000). En la mutación p.R2163L, la arginina, residuo cargado positivamente, se sustituye por un residuo sin carga y de menor tamaño. Según Liu ML y col. (2000), la mayoría de mutaciones de cambio de aminoácido localizadas en el dominio C1 y asociadas a hemofilia grave, a menudo parecen desestabilizar el plegamiento de la proteína y/o alterar el tráfico y secreción de FVIII mediante la modificación de la estructura del núcleo de la proteína.

- Mutación p.L242P

Según el modelo molecular, el residuo L242 tiene un porcentaje de exposición del 8,6% por lo que se encuentra en el interior de la molécula. En la mutación p.L242P, se produce un cambio de leucina, amino ácido hidrofóbico, por prolina, amino ácido también hidrofóbico. Se sabe que un residuo de prolina puede influir en la conformación de la proteína, por tanto, una mutación que implique un residuo de prolina podría modificar la estructura tridimensional de la proteína en función de la localización de éste en la molécula (Boekhorst J 2005; Jayandharan G 2005).

- Mutación p.V266A

El residuo V266 está localizado en el dominio A1 y tiene un porcentaje de exposición del 0,8%, lo que nos indica que se encuentra en el núcleo de la proteína. Una mutación en este residuo, p.V266G, ya había sido descrita previamente (Higuchi M 1991b) asociada también con hemofilia leve. La mutación da lugar a la sustitución de valina, residuo hidrofóbico, por alanina, algo más pequeño pero también hidrofóbico.

- Mutación p.V483D

El residuo V483 se localiza en el dominio A2 y tiene un porcentaje de accesibilidad del 40%, por lo que se encuentra en la superficie de la molécula. La sustitución da lugar a un cambio de valina, aminoácido apolar, por ácido aspártico, aminoácido cargado negativamente. Se ha sugerido que la

secuencia 483-493 es un sitio de reconocimiento del FIXa (Fray and Scandella 1999, Koszelak ME 2000), por lo que la mutación podría alterar este sitio de reconocimiento.

- Mutación p.S1791P

Según el modelo molecular de A3, el residuo S1791 tiene un porcentaje de exposición del 3,8%, por lo que se encuentra en el interior de la proteína. La mutación provoca la sustitución de un residuo de serina, residuo polar, por un residuo de prolina, amino ácido hidrofóbico que por su morfología, al igual que en la mutación p.L242P, puede influir en la conformación de la proteína (Boekhorts J 2005; Jayandharan G 2005).

- Mutación p.M662I

Con respecto a la mutación p.M662I, la sustitución de metionina por isoleucina en el residuo 662 ha sido descrito previamente por Cutler JA y col 2002, asociado con hemofilia leve al igual que nuestro paciente, y producida por el cambio ATG>ATC. En nuestro caso, se produce un cambio de ATG>ATA. Ambos aminoácidos tienen la misma carga y polaridad, por lo que inducen cambios estructurales leves en la proteína.

- Mutación p.K376N

De acuerdo con el modelo molecular de A2, el residuo K376 tiene un porcentaje de accesibilidad de 27% y se encuentra en la zona de interfase A1-A2 (337-372). La sustitución de un residuo de lisina por un residuo de asparagina (p.K376N) resulta en una pérdida de carga positiva, lo cual podría desestabilizar la zona de interfase ya que el dímero A1/A3-C1-C2 está débilmente asociado con A2 por medio de interacciones electrostáticas (Saenko EL 2002). Recientes estudios han identificado segmentos ricos en residuos básicos en la subunidad A2 (373-385, 418-428) que pueden ser interactivos con el dímero A1/A3-C1-C2 (Koszelak ME 2000).

- Mutación p.K380E

El residuo K380 se localiza en el dominio A2, cercano a la zona de interfase A1-A2, y tiene un porcentaje de exposición del 58%. La sustitución de lisina a ácido glutámico da lugar a un cambio de carga (positiva→negativa), y al

igual que en el caso de la mutación p.K376N, ello podría desestabilizar la zona de interfase (Koszelak ME 2000, Saenko EL 2002).

- Mutación p.Y719C

En el residuo Y719 fue descrito previamente un codon de parada por Liu y col. (1997). Este residuo está localizado en la región ácida a2, interfase de los dominios A2-A3, y tiene un porcentaje de accesibilidad del 79%, por tanto se encuentra en la superficie de la proteína (Pemberton S 1997). La mutación p.Y719C se encontró en un paciente con hemofilia leve y consistió en la sustitución de tirosina, un residuo aromático de gran tamaño, por cisteína, un residuo sin anillo aromático y más pequeño. Los residuos de tirosina, Y718 y Y719, los cuales son sulfatados como modificación posttranslacional (Pittman DD 1992), pueden intervenir en varios procesos, incluyendo interacciones proteína-proteína (Huttner WB 1988). Estos residuos pueden jugar un papel en la estimulación de la actividad enzimática del FIXa, por lo que un mutante para estos residuos podría reducir esta capacidad (Michnick DA 1994). Por otra parte, es posible que un residuo de cisteína libre pueda unirse a otro residuo de cisteína dentro de la molécula o a un residuo de cisteína libre de otra molécula formando puentes disulfuro, lo cual podría afectar la vida media y también la secreción del FVIII (Boekhorst J 2005).

- Mutación p.R1696Q

El residuo R1696 se localiza en el dominio A3 y tiene un porcentaje de exposición del 14%, por lo que no se encuentra en el núcleo de la proteína. Se han informado previamente dos mutaciones en este codón, una mutación de codón de parada, p.R1696X, asociada con hemofilia grave (Pattison 1990a), y la mutación de cambio de sentido p.R1696G asociada con hemofilia leve (Liu Q 1998b). La sustitución de arginina por glutamina provoca la pérdida de una carga positiva.

- Mutación p.S1788T

De acuerdo con el modelo molecular de A3, el residuo S1788 tiene un porcentaje de accesibilidad de 0,2%, y por tanto se encuentra en el núcleo de la proteína. La mutación p.S1788T da lugar a la sustitución de serina por treonina, ambos aminoácidos son hidrofílicos y de tamaño similar. La

interacción de alta afinidad entre FVIIIa y FIXa es proporcionada principalmente por la cadena ligera del FVIII, la cual contiene un importante sitio de unión al FIXa formado por residuos localizados en el dominio A3, E1811-K1818. Varias mutaciones asociadas con hemofilia A han sido identificadas en la región Q1778-D1840, apoyando el papel esencial de esta interacción de alta afinidad que contribuye a su función de cofactor (Fay PJ 2005). Sin embargo, todavía no se han publicado estudios sobre los efectos de estas mutaciones y ninguna mutación deletérea ha sido identificada dentro del segmento 1803-1818.

- Mutación p.H2082D

La mutación p.H2082D se identificó en dos pacientes no relacionados, uno de los pacientes presentaba historia familiar y el otro era un caso esporádico. El residuo H2082 se localiza en el dominio C1 y la sustitución de histidina por ácido glutámico dio lugar a un cambio de carga (positiva→negativa). Se sabe que un aminoácido cargado juega un papel importante en la estabilidad de la estructura tridimensional y la interacción con otras moléculas. Según Jacquemin M, mutaciones en el dominio C1 del FVIII dan lugar a una unión reducida FVIII-FvW, ya que estas mutaciones podrían afectar de forma indirecta esa unión mediante la alteración de otras regiones del FVIII que intervienen en el contacto con el FvW (dominios A3 o C2) (Jacquemin M 2000).

- Mutación p.E2165V

El residuo E2165 se localiza en dominio C1, cercano a la zona de interfase C1-C2, y tiene un porcentaje de exposición menor al 10%. La mutación p.E2165V da lugar a la sustitución de ácido glutámico, aminoácido con carga negativa, por valina, aminoácido apolar de menor tamaño. Al igual que la mutación p.H2082D, la mutación p.E2165V podría afectar de forma indirecta la unión FVIII-FvW (Jacquemin M 2000).

- Mutación p.M2255K

El residuo M2255 se localiza en el dominio C2, y la mutación dio lugar a la sustitución de un residuo de metionina, aminoácido polar, por un residuo de lisina, aminoácido cargado positivamente. Ha sido informado que el dominio C2

interacciona con FXa y trombina a través de la secuencia 2253-2270 (la cual incluye el residuo M2255) (Foster PA 1990).

- Mutación p.L2324P

El residuo se localiza en el dominio C2, y la mutación p.L2324P dio lugar a la sustitución de un residuo de leucina, apolar, por un residuo de prolina, también apolar pero que por su estructura puede influir en la conformación de la proteína. Se ha sugerido que la secuencia C terminal 2303-2332 forma un sitio interactivo para el factor von Willebrand (Foster 1990 PA), por lo que la sustitución podría alterar este sitio de interacción.

En hemofilia B se identificó una sola mutación de cambio de aminoácido que no había sido descrito previamente, la mutación p.H268Q. Este cambio de aminoácido fue descrito previamente en la base Internacional de mutaciones de hemofilia B (Tartary M 1993) debida a la mutación CAT→CAG, mientras que el paciente de nuestro estudio presentaba el cambio CAT→CAA. En ambos casos la mutación estaba asociada con hemofilia B leve y daba lugar al mismo aminoácido. No consideramos necesario realizar un estudio similar al realizado en hemofilia A porque el cambio de aminoácido ya estaba descrito y dicho cambio se ha correlacionado con el defecto de la hemostasia.

El diagnóstico de portadora es vital en mujeres pertenecientes a familias con historial familiar de hemofilia, ya que de esta información va a depender la posibilidad de que transmitan o no la enfermedad a su progenie. En el estudio de portadoras se nos han presentado limitaciones como el caso de familias con grandes deleciones, ya que en el análisis de portadora de una deleción en el gen FVIII no se puede realizar mediante la amplificación individual de los exones, ya que éstos quedan enmascarados por la presencia del alelo normal. Por ello es necesario el uso de técnicas más laboriosas como el southern-blot y técnicas de clonaje genómico. La caracterización de los puntos de rotura permite desarrollar un simple test específico de PCR con cebadores que flanquean la deleción, y de esta manera se pueda realizar el estudio de portadoras en estas familias, esencial para el consejo genético.

En este trabajo hemos caracterizado los puntos de rotura de dos deleciones parciales en el gen FVIII. En el paciente A-223, la deleción tenía un

tamaño de 3,185 pb y eliminaba parte del exón 8 y el exón 9 completo, mientras que en el paciente A-52 el tamaño de la deleción era de 7,289 pb y eliminaba el exón 15. Sin embargo, la caracterización de los puntos de rotura es laboriosa y no resulta factible aplicarla al estudio de portadoras de forma rutinaria, por lo cual no se identificaron los puntos de rotura de la deleción parcial encontrada en un paciente con hemofilia B, ya que éste se trataba de un caso esporádico y por tanto no existía la necesidad de realizar un estudio de portadora en la familia.

En hemofilia, sólo algunas publicaciones han caracterizado los puntos de rotura de grandes deleciones (Van de Water N 1998, Vidal F 2002). No se han descrito puntos calientes en el gen FVIII para este tipo de mutaciones, y por lo tanto es probable que la mayoría de las deleciones tengan puntos de rotura distintos (Salviato R 2002).

El estudio genético de las mutaciones nos ha permitido detectar los casos esporádicos, identificando mutaciones “de novo” y descartando, por lo tanto, la existencia de portadoras en estas familias. Sin embargo, existen casos de pacientes con madres no portadoras donde no se puede descartar la posibilidad de que algunas de estas madres tengan mosaicismo genético, y porten la mutación en algunas de sus células germinales o incluso podrían ser mosaicos somáticos. Por tanto, sería necesario investigar la frecuencia de mosaicismo en familias con hemofilia esporádica a la hora de ofrecer un consejo genético, ya que se necesita conocer el riesgo de una madre de un caso esporádico de tener otro hijo hemofílico o hija portadora, si bien ninguna mutación puede ser identificada mediante el análisis convencional de la mutación usando ADN de células sanguíneas (Ljung RCR 1999).

Una de las cuestiones más importantes en hemofilia es conocer las bases estructurales de cada tipo de hemofilia, es decir, la correlación entre los defectos estructurales en los genes FVIII o FIX y la forma clínica de la enfermedad a la que dan lugar: grave o moderada/leve. Esta correlación, que como ya se ha comentado anteriormente, sólo está clara en los casos en que las mutaciones dan lugar a una proteína truncada, resultando una forma grave de la enfermedad. De la observación realizada a partir de los datos obtenidos

en nuestro estudio junto con los datos de la base de datos de mutaciones para la hemofilia A (HAMSTeRS), hemos encontrado que, con frecuencia, una misma mutación de cambio de aminoácido puede estar asociada a distinto nivel de gravedad de la enfermedad.

En nuestro estudio, entre las mutaciones de cambio de aminoácido en pacientes A graves, la mutación p.E113D aparece en la base de datos en 2 pacientes con fenotipo moderado/leve (Freson K 1998) y en 2 pacientes con fenotipo grave (Theophilus BD 2001), 1 de ellos con inhibidor como también es el caso de nuestro paciente. Por otro lado, la mutación p.R2304H que aparece en dos pacientes de nuestro estudio, 1 con hemofilia grave y otro con hemofilia leve, aparece en la base de datos en 2 pacientes, uno de ellos con hemofilia leve (Schwaab R 1995b) y en el otro paciente no aparecen datos del fenotipo.

Con respecto a las mutaciones identificadas en hemofilia A moderada/leve, la mutación p.R2150H se detectó en 3 pacientes del grupo de hemofilia moderada y en 6 pacientes del grupo de hemofilia leve. Esta mutación es frecuente de acuerdo a la información suministrada por las bases de datos de hemofilia A, y se asocia básicamente con hemofilia moderada/leve y únicamente, en dos casos, con hemofilia grave (Goodeve AC 2000).

La mutación p.R2163H la observamos en un paciente del grupo de hemofilia moderada y aparece en la base de datos en asociación con hemofilia moderada y grave (Theophilus BD 1998, Hay et al 1998a; 1998b)

En el caso de la mutación p.R1997W, se identificó en dos pacientes, uno con hemofilia moderada y el otro con hemofilia leve. En la base de datos, los casos que aparecen se asocian con hemofilia moderada/leve (Higuchi M 1991a, Pieneman WC 1995, Timur AA 2001, Hill M 2005) y con fenotipo grave (Waseem NH 1999, Liu Q 1998b, Theophilus 2001, Vidal F 2001,). Theophilus y col. (2001), encontraron esta mutación como único cambio genómico de un paciente que tenía el exón 19 delecionado del ARNm y sugirió que el cambio podría afectar al procesamiento de intrones en el precursor de ARNm, aunque no está claro el mecanismo por el que esta mutación afectaría al procesamiento de intrones. Si este fuera el caso, la variación en la gravedad de hemofilia debida a esta mutación podría ser debida a la producción de

pequeñas cantidades de ANRm completo, causado por la acción incompleta de esta mutación sobre el procesamiento (Hill M 2005).

La mutación p.R1996Q ha sido informada previamente 30 veces, todas en asociación con fenotipo leve a excepción de 1 caso grave (HAMSTeRS). En nuestro estudio se identificó la mutación en 7 pacientes, todos con fenotipo leve.

La mutación p.R1781H fue observada en 2 pacientes, uno con hemofilia moderada y el otro con hemofilia leve. La mutación ha sido informada en 14 ocasiones asociada con hemofilia grave, moderada y leve (Laprise SL 1998; Ivaskevicius V 2001; Jonsdottir S 1992).

La mutación p.S1791P, que no estaba descrita previamente, la identificamos en 4 pacientes, 1 con hemofilia moderada y los otros tres con hemofilia leve.

Por último, las mutaciones p.A704T y p.W2229C, asociadas en la base de datos con hemofilia grave, moderada, y leve, se identificaron en 2 y 1 pacientes, respectivamente, con hemofilia leve. El resto de mutaciones ya descritas se identificaron en pacientes con fenotipo moderado/leve, lo que estaba en concordancia con el fenotipo que aparecía en la base de datos para estas mutaciones.

Por tanto, es importante tener en cuenta que el genotipo del factor VIII no es suficiente para definir el fenotipo en un paciente. Estas variaciones en la gravedad de la enfermedad en pacientes con la misma mutación, podrían ser explicadas por diferencias en la evaluación clínica o cuantificación de los niveles de FVIII. El fenotipo puede estar también influenciado por un cambio adicional dentro del FVIII que no se haya identificado, aunque en nuestro caso la presencia de una segunda mutación en la región codificante del FVIII fue excluida ya que ésta se secuenció en todos los pacientes. Sin embargo, en este estudio no se dispuso de muestras de ARN de los pacientes para estudiar posibles variaciones intrónicas que pudiesen afectar la eficiencia en el procesamiento de intrones. No obstante, como ya se ha comentado antes, en un estudio publicado recientemente (El-Maarri O 2005), se examinó el ARN de pacientes sin mutación en la región codificante para buscar posibles defectos

de procesamiento de intrones y reordenamientos, y los resultados no revelaron defectos en el gen FVIII.

Otra posible causa de las discordancias entre fenotipo y genotipo sería la existencia de variaciones en otros factores hemostáticos que podrían modificar la gravedad clínica de la hemofilia. Varios estudios han informado acerca de una reducción de la gravedad de hemofilia con respecto a la esperada en un paciente con una mutación coheredada en el FV Leiden (FV p.R509Q) (Nichols WC 1996, Ghosh K 2001). Por otro lado, se vio que una mutación en el gen de la protrombina, PT20210A, estaba relacionada con niveles elevados de protrombina en el plasma y con un mayor riesgo a un tromboembolismo venoso (Soria JM 2000). En base a esto, Tizzano y col (2002a) estudiaron un grupo de pacientes con hemofilia A grave con inversión del intrón 22 que portaban la variante PT20210A y observaron, que los episodios hemorrágicos, la utilización de factor VIII recombinante y el número de artropatías fueron significativamente mas bajos que en un grupo de pacientes de iguales características sin PT20210A. Por tanto, dado que los mecanismos de coagulación y fibrinolisis son muy complejos e implican un gran número de genes, hay múltiples variantes genéticas que pueden influir en el fenotipo final de un individuo (Tizzano EF 2002b).

Además de las mutaciones de cambio de aminoácido, en hemofilia A existe otro tipo de mutaciones, como son las pequeñas deleciones e inserciones en tramos poli-A que, estando en principio relacionadas con hemofilia grave, debido a que se produce un cambio en la pauta de lectura, se pueden asociar con hemofilia moderada (Young M 1997, Oldenburg J 1998). Se ha demostrado, que errores en la replicación del ADN o en la transcripción/traducción dan lugar a una restauración parcial del marco de lectura, que resulta en la producción de pequeñas cantidades de proteína FVIII normal responsable de un fenotipo menos grave del esperado (Young M 1997; Oldenburg J 1998). Existe una mayor probabilidad de que se produzca este fenómeno en tramos de >8 adeninas (Young M 1997, Oldenburg J 1998). En nuestro estudio todos los pacientes con pequeñas deleciones o inserciones en tramos de poliadenina presentaban hemofilia grave.

Con respecto a la correlación fenotipo/genotipo en la hemofilia B, en la forma grave encontramos única mutación de cambio de sentido, p.G386V, que aparecía también en la base de datos asociada con hemofilia grave (Montejo JM 1999).

Con respecto a las mutaciones identificadas en pacientes con hemofilia moderada/leve, la mutación p.R-4W se identificó en un paciente con hemofilia moderada. Esta mutación ha sido informada en la base de datos un número elevado de veces, e incluye asociación con hemofilia grave, moderada, y leve.

La mutación p.F9S la observamos en un paciente del grupo de hemofilia moderada y aparece en la base de datos en una sola ocasión asociada con hemofilia grave (Ketterling RP 1999). También la mutación p.A187D que la identificamos en un paciente con hemofilia moderada, aparece en la base de datos en tres ocasiones asociada en todos los casos con hemofilia grave. La mutación p.A271D tiene una sola entrada en la base de datos asociada con hemofilia grave, mientras que nosotros la hemos identificado en un paciente con hemofilia moderada. La mutación p.R333Q se identificó en un paciente con hemofilia moderada. La mutación se considera recurrente y aparece en la base de datos asociada principalmente con hemofilia moderada, aunque también se asocia con hemofilia grave y leve.

Las mutaciones p.C350R y p.C350Y se identificaron en dos pacientes con hemofilia moderada, mientras que todos los casos que aparecen en la base de datos para estas dos mutaciones están asociados con hemofilia grave.

La mutación p.A233T se identificó en un paciente con hemofilia leve. Esta mutación tiene un elevado número de entradas en la base de datos y aparece asociada con hemofilia leve principalmente, aunque también con hemofilia moderada y en un caso con hemofilia grave (Ljung R 2001).

Por último las mutaciones p.T296M y p.A320V, aparecían en la base de datos asociadas con hemofilia grave, moderada y leve. Ambas mutaciones la identificamos en dos pacientes con hemofilia leve.

Como ya comentamos en el caso de la hemofilia A, la explicación de estas discordancias puede ser que las variaciones intrónicas podrían afectar a

la eficiencia en el procesamiento de intrones, y además, múltiples variantes genéticas podrían influir en el fenotipo final de un individuo (Tizzano EF 2002b). Por otro lado, en la base de datos de hemofilia B también existen ejemplos de mutaciones de codón de parada asociadas con fenotipo moderado e incluso leve. Una de las mutaciones de codón de parada, p.R248X, que se identificó en un paciente de nuestro estudio con hemofilia B grave, aunque aparece en la base de datos en múltiples ocasiones asociada con fenotipo grave, también existen 5 casos descritos donde aparece asociada con fenotipo moderado. Como ya se comentó en hemofilia A, el mecanismo deletéreo de las mutaciones de codón de parada resulta obvio; sin embargo, en hemofilia B, se han descrito algunas de estas mutaciones asociadas con fenotipo moderado (desde <1 a 6%) (www.kcl.ac.uk/ip/petergreen/haemBdatabase.html) e incluso leve (Belvini D 2005). Taylor (Taylor SA 1991) y Cutler (Cutler JA 2004) propusieron una explicación para la atenuación del fenotipo en dos casos de hemofilia B con presencia de mosaicismo somático para el alelo mutante. El mosaicismo en las mutaciones del FIX no ha sido estudiado de forma sistemática, por lo que su incidencia es desconocida. El mosaicismo puede dar lugar a una modificación del fenotipo de la enfermedad a una forma clínica más leve, sin embargo dará lugar a una forma más grave de la enfermedad en la siguiente generación (Taylor SA 1991).

El desarrollo de inhibidores es, actualmente, la complicación más seria y que condiciona en mayor medida el tratamiento de los hemofílicos. En nuestro estudio, 14 pacientes con hemofilia A desarrollaron inhibidores, lo que supone un 8,2% del total de pacientes, de los cuales 9 tenían hemofilia A grave y el 5 tenían hemofilia A moderada/leve. Dado que el porcentaje de pacientes con hemofilia A que desarrolla inhibidor se encuentra en torno a un 10-15% (Wight J 2003), podemos decir que en nuestro grupo de pacientes con hemofilia A la frecuencia es algo menor. Con respecto a la hemofilia B, sólo 1 paciente desarrolló inhibidor, lo que supone una incidencia del 4% (1/25), porcentaje similar al 3% publicado previamente (Scharrer I 1993; Oldenburg J 2006a).

De acuerdo a los datos de la literatura, en pacientes con hemofilia A grave, el riesgo de inhibidor es aproximadamente del 25-30%, mientras que en

hemofilia A moderada/leve es solamente del 5% (Schwaab R 1995a; Oldenburg J 2002). Dado que el riesgo de inhibidores en pacientes con hemofilia B es únicamente del 3%, la formación de inhibidor se convierte, principalmente, en una complicación de la hemofilia A grave (Scharrer I 1993). Los factores genéticos, como el tipo de mutación y genes implicados en el sistema inmune, los factores ambientales como la edad de inicio del tratamiento, tipo de tratamiento y modo de administración, así como las interacciones entre ambos tipos de factores (genéticos y ambientales), deben ser considerados como determinantes en la formación de inhibidor (Oldenburg J 2004b).

Con respecto a los factores genéticos, estudios recientes de hermanos hemofílicos y gemelos hemofílicos en hemofilia A grave, mostraron principalmente un alto grado de concordancia (78,3%, 195/249) entre miembros familiares (todos los miembros en una familia eran positivos o negativos para inhibidores) (Astermark J 2001). Esta concordancia fue aún más elevada cuando solo se consideraron gemelos (88,2%, 15/17). Un estudio más reciente de los mismos autores (Astermark J 2005) sugirió que los genes implicados en la respuesta inmune debían tener una gran influencia en el desarrollo de inhibidores. Estos genes serían receptores de células T (TCR), moléculas MHC de clase I y II y genes que codifican para citoquinas y moléculas reguladoras del sistema inmune (Astermark J 2006a). Existen otros trabajos que apoyan que varias de estas moléculas como IL-10, TNF α y moléculas MHC clase I y II, tienen influencia en el desarrollo de inhibidores (Lalani I 1997; Astermark J 2006b; Oldenburg J 1997; Hay CR 1997). En dos de estos trabajos (Oldenburg J 1997; Hay CR 1997) realizados en pacientes con hemofilia A que presentaban la inversión del intrón 22, se encontró que algunos alelos HLA de clase II están asociados con un riesgo alto para la formación de inhibidor, mientras que otros podrían ser protectores.

A pesar de todos estos estudios, el parámetro principal que influye en el riesgo de desarrollo de inhibidor es el tipo de mutación en los genes FVIII y FIX. En hemofilia A, los defectos genéticos moleculares graves, tales como grandes deleciones, inversión del intrón 22, y mutaciones de codón de parada, que causan una ausencia completa de la proteína FVIII, presentan una

prevalencia en el desarrollo de inhibidor de entre 21-88%. Sin embargo, las mutaciones de cambio de sentido, pequeñas deleciones/inserciones y mutaciones en la zona de procesamiento de ARN, que provocan pérdida de función pero no ausencia completa de proteína, se consideran mutaciones de bajo riesgo con una frecuencia de inhibidores menor al 10% (Schwaab R 1995a; Oldenburg J 2004b). Este menor riesgo a desarrollar inhibidor es lógico, ya que la presencia de cierta cantidad de proteína es suficiente para inducir una tolerancia central, mecanismo mediante el cual el Sistema Inmunológico “aprende” a no responder frente a un antígeno propio, eliminando o anulando funcionalmente los clones de linfocitos específicos para ese antígeno (Alfonso O 2000). En hemofilia B, la correlación entre el tipo de mutación y el desarrollo de inhibidor parece ser similar a la informada en hemofilia A (Ljung RC 1995a)

Con respecto a nuestros pacientes con hemofilia A grave, 9 de un total de 81 (11%) desarrollaron inhibidor. De estos pacientes, 6 presentaban mutaciones que daban lugar a una proteína truncada: 1 inversión del intrón 22, 2 grandes deleciones y 3 mutaciones de codón de parada. Los tres restantes presentaban mutaciones de bajo riesgo: 1 pequeña deleción, 1 pequeña inserción y 1 mutación de cambio de sentido. Como se ha comentado anteriormente, el riesgo de desarrollo de inhibidor en hemofilia grave es del 25-30% (Schwaab R 1995a; Oldenburg J 2002), y por tanto mayor que la frecuencia obtenida en nuestro estudio.

Con respecto a la inversión del intrón 22, sólo 1 paciente de 29 (3,4%) que presentaban esta mutación desarrolló inhibidor. Según diversos trabajos la inversión del intrón 22 está asociada con un riesgo de desarrollo de inhibidor del 20-30% (Schwaab R 1995a; Goodeve AC 2000; Oldenburg J 2002), lo cual no concuerda con nuestros resultados. La explicación para esta frecuencia tan baja debería encontrarse en la influencia de otros factores genéticos y en factores ambientales (Astermark J 2006a). Aunque estas variables no se han podido comprobar en los pacientes de nuestro estudio, podrían ser algunos de los motivos que expliquen la diferencia encontrada en cuanto a la incidencia de esta mutación en el desarrollo de inhibidor.

Los dos pacientes que presentaron grandes deleciones desarrollaron inhibidor, las dos deleciones identificadas afectaban únicamente a uno o dos exones. Las grandes deleciones son el tipo de mutación que presentan mayor frecuencia de inhibidores, aproximadamente un 40% para todos los tipos de grandes deleciones, llegando incluso hasta el 88% para deleciones que implican mas de un dominio (Schwaab R 1995a; Oldenburg J 2002).

En cuanto a las mutaciones de codón de parada, 3 de los pacientes con este tipo de mutación desarrolló inhibidor (25%). Se identificaron dos mutaciones de codón de parada asociadas con el desarrollo de inhibidor, p.R2147X, que estaba presente en dos pacientes, y p.Y1748X, ambas localizadas en la cadena ligera. La mutación p.R2147X se localizó en el dominio C1 y aparece descrita en la base de datos en 19 ocasiones, estando asociada con inhibidores en 5 de los casos. La mutación p.Y1748X se localizó en el domino A3 y no había sido descrita previamente. Según la literatura, la prevalencia estimada para el desarrollo de inhibidor es de aproximadamente un 30%, llegando incluso al 40% en pacientes que tienen la mutación localizada en la cadena ligera (A3-C1-C2) del FVIII (Schwaab R 1995a; Goodeve AC 2000; Oldenburg J 2002; HAMSTeRS). La razón para esto es desconocida. La incidencia en el desarrollo de inhibidor en nuestros pacientes con mutación de codón de parada es similar a la informada previamente, y además, sólo pacientes con la mutación en la cadena ligera desarrollaron inhibidor.

En la cohorte de pacientes estudiada, 15 pacientes presentaron pequeñas deleciones/inserciones y solo 2 de ellos (13%) desarrollaron inhibidores. Según HAMSTeRS, las mutaciones que portaban estos pacientes (p.N1441fsX y p.P477fsX) no estaban asociadas con desarrollo de inhibidores. Nuestros resultados concuerdan con trabajos previos anteriormente citados (Schwaab R 1995a; Oldenburg J 2004b) que sugieren que la incidencia de inhibidor en pacientes con pequeñas deleciones/inserciones es del 7,4-16%. Para este tipo de mutaciones, esta frecuencia incluso disminuye si estas mutaciones se localizan en un tramo de adeninas. Young y col investigaron la baja incidencia de inhibidor en pacientes con este tipo de mutación en tramos de adeninas y llegaron a la conclusión de que una incorporación errónea de

residuos de adenina durante la transcripción del ARNm daba lugar a una corrección parcial del marco de lectura (Young M 1996). Como consecuencia de ello, se produce una cantidad muy pequeña de FVIII que parece ser suficiente para que no se produzca inhibidor después de la terapia sustitutiva de FVIII.

Con respecto a las mutaciones de cambio de aminoácido, sólo 1 paciente con mutación de cambio de aminoácido desarrolló inhibidor. La mutación p.E113D estaba localizada en la cadena pesada (dominio A1) de la proteína y aparecía en la base de datos asociada a inhibidores en un paciente con fenotipo grave. La frecuencia de pacientes con mutaciones de cambio de sentido que desarrollaron inhibidores fue aproximadamente un 9%, lo cual está conforme con trabajos previos (Schwaab R 1995a; Goodeve AC 2000). Parece que los pacientes con este tipo de mutación sintetizan proteína endógena que, aunque funcionalmente alterada, es suficiente, como ya se ha comentado antes, para inducir tolerancia central (Oldenburg J 2006a).

En cuanto a los pacientes con hemofilia A moderada/leve, sólo 5 de un total de 90 (5,5%) desarrollaron inhibidores. En un estudio publicado por Hay CR y col. (1998a) en pacientes del Reino Unido, se encontró que la incidencia de inhibidor en hemofilia moderada/leve era del 28%. Sin embargo en un estudio más reciente realizado por Sharathkumar A y col. (2003) en población canadiense, la incidencia fue del 7,4%, lo cual está más en concordancia con nuestros resultados.

Aunque las mutaciones que causan hemofilia moderada/leve están distribuidas por todo el gen, las mutaciones descritas que están asociadas con inhibidores tienden a localizarse cerca o en los residuos 482-501 en el dominio A2 y en torno a la zona de interfase C1-C2 (residuos 2009-2229) (Peerlinck K 2006). Entre los 5 pacientes con hemofilia moderada/leve que desarrollaron inhibidor, 4 presentaban la mutación p.R2150H, localizada en el dominio C1, y el quinto paciente la mutación p.W2229C, localizada en el dominio C2, ambas mutaciones localizadas en una de las regiones asociadas con el desarrollo de inhibidores. En la cohorte de pacientes estudiada, 9 pacientes presentaron la mutación R2150H y 4 de ellos (45%) desarrollaron inhibidores, lo cual apoya

que algunas mutaciones de cambio de sentido localizadas en ciertas zonas de la molécula (A2 y C1-C2) tengan un riesgo muy elevado en el desarrollo de inhibidores, similar a ciertas mutaciones nulas en pacientes con hemofilia grave. Las mutaciones p.R2150H y p.W2229C están ampliamente representadas en la base de datos de mutaciones HAMSTeRS y asociadas con el desarrollo de inhibidores. La asociación de la mutación p.R2150H con el desarrollo de inhibidores es mencionada en el 34% (18/53) de los pacientes que aparecen en HAMSTeRS, mientras que la asociación de la mutación p.W2229C con inhibidor se produce en el 39% (7/18) de los pacientes representados en la base de datos.

Los dominios A2 y C1-C2, son cruciales para la función de FVIII (interacción con FIX activado y FvW), por lo que es comprensible que anticuerpos contra estas regiones puedan reducir la actividad del FVIII (Jacquemin M 2000). Se ha sugerido que mutaciones en estas regiones podrían provocar cambios en la conformación de la molécula FVIII del paciente, lo cual la conduciría a pérdida de función y la haría antigénicamente distinta a la molécula silvestre (Oldenburg J 2006a). Por otro lado, en un estudio realizado en 26 pacientes con hemofilia moderada/leve y mutaciones de cambio de sentido localizadas en la regiones antes mencionadas (p.R593C, p.Y2105C, p.R2150H, p.P2300L y p.W2229C), se encontró una prevalencia de inhibidores muy elevada, por encima del 40%, similar a la observada en pacientes con defectos genéticos graves (Hay CR 1998b).

Cuando se intentó realizar una correlación entre el tipo de mutación y el tipo de inhibidor (permanente o transitorio) no se encontraron diferencias significativas. Grandes deleciones, mutaciones de cambio de sentido y pequeñas deleciones/inserciones se encontraron en ambos grupos. Las mutaciones de codón de parada solo se detectaron en el grupo de inhibidores transitorios, aunque esto puede ser debido al que el número de pacientes con inhibidor es reducido. En un estudio multicéntrico realizado por Schwaab y col. en 364 pacientes con hemofilia A grave con inhibidor, tampoco encontraron diferencias significativas, aunque comentan que ello podría deberse a que el número de pacientes con inhibidor transitorio era bajo (Schwaab R 1995a).

Tampoco pudimos correlacionar el inhibidor de alta (>10 UB) o baja respuesta (<10 UB) con el tipo de mutación. Según nuestros resultados, los dos pacientes con deleciones grandes tenían título alto, pero no se pudieron obtener conclusiones porque el grupo de pacientes con inhibidor de título alto era muy pequeño y además no dispusimos de los datos del título de inhibidor en dos pacientes con mutaciones de cambio de sentido. En un estudio multicéntrico realizado en 201 pacientes con hemofilia A grave e inhibidor, Oldenburg y col. (2006a) llegaron a la conclusión de que la proporción de inhibidores de título alto podría ser más bajo en pacientes con mutaciones de cambio de sentido y más elevado en pacientes con grandes deleciones.

En resumen, en hemofilia A grave, aunque el grupo que desarrolló inhibidor en este estudio es bastante pequeño, se puede ver que la incidencia en el desarrollo de inhibidor con respecto a las mutaciones encontradas sigue una tendencia similar a lo publicado hasta ahora, a excepción de la inversión del intrón 22, responsable de la baja incidencia de inhibidor en pacientes con hemofilia grave. Por otro lado, las mutaciones encontradas en los pacientes con hemofilia A moderada/leve se caracterizaron por tener una incidencia muy alta en el desarrollo de inhibidores en función de la zona de la molécula en la que se localizaron las mutaciones.

Con respecto a la hemofilia B, el paciente que desarrolló inhibidor presentaba hemofilia B grave y la mutación consistía en una gran deleción que abarcaba los exones 4-8. El paciente sufrió una reacción alérgica grave al inicio del desarrollo de inhibidor, característica que hay que resaltar ya que esta se produce especialmente en pacientes con grandes deleciones. Warrior y col. informaron acerca de un grupo de 18 pacientes con inhibidores y reacciones anafilácticas graves, 10 de los cuales presentaban grandes deleciones, 7 tenían otros defectos genéticos graves y en el paciente restante, el defecto genético era desconocido (Warrior I 1997).

Existen enfermedades genéticas en las que la clínica se manifiesta en la edad adulta, no afectando a la capacidad reproductiva de la especie y haciendo que las mutaciones se transmitan de generación en generación durante siglos. Sin embargo, hay otras enfermedades genéticas que se manifiestan desde el

nacimiento, como es el caso de las hemofilias, donde muchos de los individuos enfermos pueden morir antes de llegar a la edad de reproducción. En el caso de las hemofilias, antes de la introducción de la terapia sustitutiva moderna, se estimaba que la vida media de las mutaciones era de dos a cuatro generaciones (Francis RB 1983). Esto indicaría que la mayoría de las mutaciones responsables de las hemofilias en la actualidad habrían surgido a lo largo del siglo XX.

Hace unos 40 años, Biggs y Macfarlane (1966), estimaron que la prevalencia de la hemofilia esporádica suponía un tercio del total de los casos de hemofilia. En un estudio más reciente en población estadounidense, Kasper CK y col (2007) sugirieron que en hemofilia A grave el 55% de los casos son esporádicos, mientras que en hemofilia A moderado/leve los casos esporádicos representaban el 30%. En nuestro estudio se identificaron 74 casos esporádicos de un total de 171 casos de hemofilia estudiados, lo cual supone aproximadamente un 43,3%. En hemofilia grave el 61,7% de los casos fueron esporádicos y en hemofilia moderada/leve el 26,7%. Por tanto, nuestros resultados están en concordancia con los datos anteriormente citados.

De los 74 casos esporádicos, se identificó la mutación en 70 de ellos y se ha confirmado que 13 de las mutaciones son “de novo”, 5 pacientes con madre no portadora y 8 pacientes con abuela materna no portadora. El resto de mutaciones suponemos que son “de novo”, aunque no podemos excluir que se hayan transmitido a través de varias generaciones. Es probable que la mayoría de las mutaciones en los casos esporádicos hayan ocurrido en las dos últimas generaciones (Ljung RCR 1999) y que solo un pequeño número de abuelas maternas de los casos esporádicos tengan la mutación (Ljung RCR 1999, Kasper CK 2007). En nuestro estudio se estudió el ADN de 9 abuelas maternas y sólo una de ellas portaba la mutación.

En hemofilia B, se identificaron 11 casos esporádicos de un total de 25 casos estudiados, lo que supone un 44%. En hemofilia B grave el 20% de los casos fueron esporádicos, y en hemofilia B moderada/leve el 50%. En el estudio realizado por Kasper CK, se estimó que en hemofilia B grave el 43% de los casos eran esporádicos, mientras que en hemofilia B moderado/leve los

casos esporádicos representaban el 30% (Kasper CK 2007). Sin embargo, en nuestro grupo de hemofilia B la frecuencia de casos esporádicos en hemofilia moderada/leve es mucho mayor en que en hemofilia grave, esto podría ser debido a que nuestro grupo de pacientes con hemofilia B grave es muy pequeño.

De los 12 casos esporádicos de hemofilia B, se identificó la mutación en 11 de ellos y se ha confirmado que 1 de las mutaciones es “de novo” (1 paciente con abuela materna no portadora), para el resto de casos no dispusimos de más información y suponemos que son “de novo” aunque no podemos confirmarlo. Al igual que en hemofilia A, es probable que la mayoría de las mutaciones en los casos esporádicos hayan ocurrido en las dos últimas generaciones (Ljung R 1999).

Para comprobar en nuestra población la hipótesis de que la mayoría de las mutaciones han surgido en las últimas generaciones y no tienen un origen común, hemos realizado un estudio de haplotipos en pacientes con la mutación más frecuente, la Inv22. Se realizó el estudio de haplotipos en 22 pacientes con esta mutación, y se obtuvieron 13 haplotipos diferentes, con una distribución de haplotipos similar a la de la población general. Estos resultados corroboran el origen independiente propuesto para esta mutación (Lakich D 1993).

Por otro lado, existen ciertas mutaciones puntuales que aparecen de forma repetida en diferentes poblaciones y que están localizadas en sitios CpG. En algunos casos, la frecuencia de una mutación es muy elevada para ser explicada únicamente por localizarse en una región “hotspot” (Ketterling EC 1991), y habría que buscar otras causas, como podría ser el efecto fundador.

El efecto fundador ha estado asociado con mutaciones recurrentes en muchas enfermedades genéticas, en el que las mutaciones pueden ser transmitidas a lo largo de varias generaciones persistiendo así en la población (Xie YG 2002; Lucotte G 1995; Zabetian CP 2006). En hemofilia B, se sabe que muchas de las mutaciones que ocurren en sitios CpG, especialmente las que causan hemofilia B leve (por ejemplo en el nucleótido 31.008), son debidas, al menos en parte, a un efecto fundador (Thompson AR 1990; Morgan GE 1995). Varias publicaciones indican que una proporción significativa de hemofilia B

leve (20-30%) es debida a un pequeño número de mutaciones fundadoras (Sommer SS 1996; Thompson AR 1990), entre estas mutaciones predominan 4 mutaciones de cambio de sentido, Gly60Ser, Arg248Gln, Thr296Met y Ile397Thr, que son responsables de aproximadamente un tercio de toda la hemofilia B leve en pacientes Caucásico-Americanos (Lillicrap D 1998).

En este estudio, nos planteamos estudiar si las mutaciones más frecuentes identificadas en nuestra población con hemofilia A moderada/leve, p.R593C, p.R1966Q y p.R2150H, podían ser debidas a un efecto fundador o por el contrario se debían al hecho de que estas mutaciones se localizan en sitios CpG, que como ya se ha comentado antes es un conocido "hotspot" para mutaciones (Casula L 1990; Pattinson JK 1990). Actualmente, la base de datos HAMSTeRS contiene un número elevado de entradas para estas tres mutaciones, pero no hay estudios respecto a un efecto fundador.

Entre los pacientes del Registro Andaluz de Hemofilia incluidos en este estudio, hay 15 pacientes no relacionados que presentaban la mutación p.R593C. El análisis de haplotipos mostró que todos tenían el mismo haplotipo, h1, lo que estaba a favor de un posible efecto fundador para esta mutación en nuestra área. Para confirmar que la mutación no estaba en desequilibrio de ligamiento con este haplotipo, se estudiaron tres pacientes con esta mutación que procedían de otras Comunidades y se vio que la mutación estaba asociada con otros haplotipos, dos de los cuales no estaban representados en nuestra población general.

Cuando se hizo un estudio genealógico de antepasados afectos, se vio que una importante proporción de los pacientes con la mutación p.R593C (8/15) tenían antepasados procedentes de dos áreas geográficas cercanas, Martín de la Jara y Pedrera, en el Noreste de la provincia de Sevilla, localidades muy cercanas entre si, con aproximadamente 2,800 y 5,000 habitantes, respectivamente. En esta región el número de hemofílicos es muy alto, y considerando el número total de hemofílicos en estas familias, existe 1 hemofílico por cada 300 varones nacidos. Por otro lado, durante años esta área geográfica estuvo mal comunicada. Todos estos hechos refuerzan la idea de un efecto fundador en esta región. Según el estudio de pedigrí, los primeros

familiares hemofílicos documentados nacieron a comienzos del siglo XX (árbol). No se encontraron ancestros comunes entre las familias, un hecho que indica que el efecto fundador pudo haberse originado en siglos previos.

De los pacientes restantes, 5 tenían antepasados familiares que procedían de la provincia de Cádiz, que se encuentra a 200 Km del área geográfica Martín de la Jara-Pedreira. El análisis de pedigrí en este grupo también indicó que si la mutación fue debida a un efecto fundador, se originó en siglos previos. No podemos asegurar que estos dos grupos procedan de un ancestro común, ya que no hemos encontrado ninguna relación entre sus predecesores y, además, comparten el haplotipo más frecuente en la población general. Por tanto, no se puede descartar que en estos dos focos de población haya podido surgir un efecto fundador de origen independiente.

Los dos pacientes de Huelva eran casos aislados. La madre de uno de los pacientes era portadora de la mutación, mientras que la madre del otro paciente no pudo ser estudiada. Con la información disponible, no fue posible excluir un efecto fundador en estos casos ya que podría haberse dado una transmisión de la mutación mediante mujeres asintomáticas en varias generaciones sin hemofílicos. Sin embargo, esta alternativa debería ser considerada como una posibilidad poco probable.

Con respecto a la mutación R2150H, se incluyeron en este estudio 11 pacientes no relacionados inscritos en el Registro Andaluz de Hemofilia. El análisis de haplotipos mostró que todos tenían el mismo haplotipo, h1. La investigación del árbol genealógico de los pacientes, mostró que 8 de ellos tenían antepasados familiares hemofílicos que procedían de la costa Este de Andalucía (Vélez-Málaga/Nerja/Granada/Motril). Según el estudio de pedigrí, los primeros familiares hemofílicos documentados nacieron a comienzos del siglo XX (árbol). No se encontraron ancestros comunes entre las familias, un hecho que indica que el efecto fundador, al igual que en el caso de la mutación p.R593C, pudo haberse originado en siglos previos. Uno de los pacientes de este grupo (A-583) no tenía historia familiar previa, y a pesar de que no tenemos datos de la madre, no podemos excluir el efecto fundador ya que la transmisión de la mutación en la familia, como ya hemos mencionado

anteriormente, se ha podido producir mediante mujeres asintomáticas en varias generaciones.

El resto de pacientes con esta mutación tenía familiares que procedían de la provincia de Cádiz, en la costa Oeste de Andalucía, y al igual que en el caso de la mutación p.R593C, no hemos encontrado datos que muestren una relación entre los antepasados de estos dos grupos, por lo que en este caso es también probable que las mutaciones surgieran independientemente en ambas poblaciones y se haya perpetuado en estas áreas geográficas. Por lo tanto, la elevada prevalencia de ambas mutaciones en nuestra población podría ser debida a la combinación de dos factores: un efecto fundador de estas mutaciones en algunos focos de la población y la alta naturaleza mutagénica del dinucleótido CpG, aunque nuestros resultados sugieren estar más a favor de que ambas mutaciones sean debidas a un efecto fundador y procedan de un ancestro común.

Con respecto a la mutación p.R1966Q, se incluyeron en el estudio 7 pacientes no relacionados, todos inscritos en Registro Andaluz de Hemofilia, 6 compartían el haplotipo h1 y uno tenía un haplotipo distinto al resto, indicando que la mutación había surgido de forma independiente. Al estudiar el árbol genealógico de los pacientes con haplotipo común, se vio que salvo dos pacientes que procedían del mismo lugar (Cádiz), los 4 restantes procedían de áreas geográficas distintas y por tanto sin relación aparente entre ellos. Por tanto, no hay datos que indiquen que un efecto fundador haya podido influir en la elevada prevalencia de la mutación p.R1966Q en nuestra población, sino más bien que el dinucleótido CpG ha propiciado que esta mutación surja en Andalucía de forma independiente en distintas áreas geográficas.

Por otro lado, en nuestro estudio se identificaron tres mutaciones nuevas, p.V266A, p.S1791P y p.C153F, que aparecían en más de un paciente, todos con historia familiar previa. Ninguna de las mutaciones se localizó en un sitio CpG

La mutación p.V266A se identificó en dos pacientes no relacionados que compartían el haplotipo h5, presente en nuestra población general con una frecuencia del 6%. Cuando se estudió el árbol genealógico de los pacientes, se

vio que tenían antepasados familiares afectados que procedían de la provincia de Sevilla. El hecho de que se trate de una mutación nueva, que compartan un haplotipo poco frecuente y que procedan de la misma área geográfica hace probable que procedan de un ancestro común.

La mutación p. S1791P se presentó en 4 pacientes de etnia gitana que compartían el mismo haplotipo (18, -, 29, -, +, 26), y que no estaba representado en nuestra población general. Estos datos apoyan la posibilidad de que la mutación se deba a un ancestro común, sin embargo, no hemos realizado un análisis de haplotipos en etnia gitana y por tanto desconocemos la frecuencia de este haplotipo. Cuando se hizo un estudio genealógico de los antepasados familiares afectados, se vio que dos de los pacientes (A-094 y A-215) procedían de la provincia de Cádiz, pero no se pudo determinar la procedencia de los familiares hemofílicos de los otros dos pacientes debido a la constante movilidad geográfica de estas familias.

La mutación p.C153F se presentó en dos pacientes con hemofilia grave que compartían el haplotipo h1, el más común en nuestra población. Al hacer un estudio del árbol genealógico de los pacientes se vio que ambos pacientes tenían antepasados familiares afectados que procedían de Cabra, un pueblo de la provincia de Córdoba. 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, sin embargo, en nuestro caso, la mutación ha podido persistir a pesar de su forma clínica, debido probablemente a que los hemofílicos tuvieran descendientes a edad temprana, y al hecho de que tratándose de familias numerosas se haya podido dar la transmisión de la mutación a través de mujeres asintomáticas.

En resumen, si bien la mayoría de las mutaciones responsables de la hemofilia en pacientes andaluces han debido surgir durante el siglo XX, hay ciertas mutaciones generalmente asociadas a hemofilia moderada/leve que se han originado en siglos anteriores y se han perpetuado hasta nuestros días.

CONCLUSIONES

1.- Las mutaciones encontradas en la población hemofílica de Andalucía muestran una heterogeneidad similar a la informada en otras poblaciones. En concreto, en hemofilia A, hemos hallado 79 mutaciones diferentes en un total de 171 familias, y en hemofilia B, 19 mutaciones diferentes en un total de 25 familias.

2.- El 44% de los pacientes con hemofilia A y el 12% de los pacientes con hemofilia B presentaban mutaciones inéditas, no descritas en otras poblaciones, lo que demuestra la alta mutabilidad de los genes FVIII y FIX.

3.- A falta de pruebas funcionales, no podemos asegurar que algunas de las mutaciones nuevas de cambio de aminoácido que hemos identificado, constituyan la base molecular del déficit funcional. No obstante, su asociación con la enfermedad las convierte en marcadores genéticos para el estudio de portadoras.

4.- En relación con las mutaciones de cambio de aminoácido, no existe una correlación exacta entre la mutación y la gravedad de la enfermedad, ya que una misma mutación puede dar lugar a hemofilia grave, moderada o leve, indicando la posible influencia de otros factores, probablemente genéticos, implicados en el curso clínico de la enfermedad.

5.- La frecuencia de pacientes que desarrolló inhibidor del factor VIII fue del 11%, porcentaje inferior a los datos publicados en la literatura. La representación del tipo de mutación en estos pacientes fue similar a la de otros estudios, a excepción de la inversión del intrón 22. En efecto, los pacientes andaluces con esta mutación desarrollaron el inhibidor con una frecuencia inferior a la descrita.

6.- La mayoría de las mutaciones halladas han surgido de forma espontánea a lo largo del siglo XX y se han mantenido durante 2-4 generaciones, aunque un

pequeño número de mutaciones se ha originado en épocas anteriores y se han mantenido hasta nuestros días.

7.- Existe una alta prevalencia de las mutaciones p.R593C y p.R2150H en nuestra población. La mutación p.R593C aparece distribuida principalmente en dos áreas geográficas, Martín de la Jara-Pedreira y la provincia de Cádiz. Por su parte, la mutación p.R2150H se ha localizado en algunos puntos de la costa oriental de Andalucía y en una zona de la provincia de Cádiz. Con los datos disponibles en ambas mutaciones no podemos asegurar que estos focos procedan de uno o de un limitado número de ancestros comunes.

BIBLIOGRAFÍA

-
- Acquila M, Pasino M, Lanza T, Bottini F, Molinari AC, Bicocchi MP. Duplication of exon 13 causes one third of the cases of mild hemophilia A in northern Italy. *Haematologica*. 2004; 89: 758-9.
 - Aggeler PM, White SG, Glendening MB, Page EW, Leake TB, Bates G. Plasma thromboplastin component (PTC) deficiency; a new disease resembling hemophilia. *Proc Soc Exp Biol Med* 1952; 79: 692-4.
 - Aguilar C, Alberca I, Altisen C, Arranz P, Aznar JA, Aznar-Salatti J, Batlle J, Brito D, etc. Guia práctica de coagulopatías congénitas
 - Ahmed RPH, Ivaskevicius V, Kannan M, Seifried E, Oldenburg J, Saxena R. Identification of 32 novel mutations in the factor VIII gene in Indian patients with hemophilia A. *Haematologica* 2005; 90(2):283-284.
 - Alfonso O, Alfonso RB, Lisando B, Ángeles GP, Lourdes M, Carmina G, Miguel LB, Luisa Maria V, y col. Introducción a la inmunología humana. Editorial Síntesis 2000.
 - Antonarakis SE, Rossiter JP, Young M, Horst J, de Moerloose P, Sommer SS, et al. Factor VIII gene inversions in severe haemophilia A: results of an international consortium study. *Blood* 1995a; 86: 2206-12.
 - Antonarakis SE, Kazazian HH, Tuddenham EG. Molecular etiology of the factor VIII deficiency in hemophilia A. *Human Mutation* 1995b; 5: 1-22.
 - Astermark J, Berntorp E, White CG, Corner BL, and the MIBS Study Group. The Malmö International Brother Study (MIBS): further support for genetic predisposition to inhibitor development in hemophilia patients. *Haemophilia* 2001; 7: 267-272.
 - Astermark J, Oldenburg J, Escobar M, White GC 2nd, Berntorp E; Malmo International Brother Study study group. The Malmö International Brother Study (MIBS). Genetic defects and inhibitor development in siblings with severe hemophilia A. *Haematologica* 2005; 90: 924-930.
 - Astermark J. Why do inhibitors develop? Principles of and factors influencing the risk for inhibitor development in hemophilia. *Haemophilia* 2006a; 12, (Suppl. 3): 52-60.
 - Astermark J, Oldenburg J, Pavlova A, Berntorp E, Lefvert AK. A bi-allelic polymorphism at -308 in the promoter region of the TNF α gene

- influences the risk of inhibitor development in patients with hemophilia. *WHF Congress, Vancouver, 2006b*, abstract.
- Attali O, Vinciguerra C, Trzeciak MC, Durin A, Perrod G, Gay V, et al. Factor IX gene análisis in 70 unrelated patients with hemophilia B: description of 13 new mutations. *Thrombosis and Haemostasis* 1999; 82: 1437-42.
 - Aznar JA, Jorquera JI, Peiro A, García I. The importance of corticoids added to continued treatment with Factor VIII concentrates in the suppression of inhibitors in haemophilia A. *Thrombosis and Haemostasis* 1984; 51: 217-21.
 - Baglia FA, Jameson BA, Walsh PN. Identification and characterization of a binding site for factor XIIa in the apple 4 domain of coagulation of factor XI. *J Biol Chem* 1993; 268: 3838-44.
 - Baglia FA, Seaman FS, Walsh PN. The apple 1 and apple 4 domains of factor XI act synergistically to promote the surface-mediated activation of factor XI by factor XIIa. *Blood* 1995a; 85: 2078-83.
 - Baglia FA, Jameson BA, Walsh PN. Identification and characterization of a binding site for platelets in the Apple 3 domain of coagulation factor XI. *J Biol Chem* 1995b; 270: 6734-40.
 - Baglia FA, Walsh PN. A binding site for thrombin in the apple 1 domain of factor XI. *J Biol Chem* 1996; 271: 3652-8.
 - Bagnall RD, Waseem N, Green PM, Geannelli F. Recurrent inversion breaking intron 1 of the factor VIII gene is a frequent cause of severe hemophilia A. *Blood* 2002. 99:168-174.
 - Bajaj SP. Region of factor IXa protease domain that interacts with factor VIIIa: analysis of select hemophilia B mutants. *Trombosis and Haemostasis* 1999; 82: 218-25.
 - Becker J, Schwaab R, Moller-Taube A, Schwaab U, Schmidt W, Brackmann HH, Grimm T, Olek K, Oldenburg J. Characterization of the factor VIII defect in 147 patients with sporadic hemophilia A: families studies indicate a mutation type-dependent sex ratio of mutation frequencies. *American Journal of Human Genetic* 1996; 58:657-670.

-
- Belvini D, Salviato R, Radossi P, Pierobon F, Mori P, Castaldo G, Tagiarello G. Molecular genotyping of the Italian cohort of patients with hemophilia B. *Haematologica* 2005; 90: 635-42.
 - Biggs R, Douglas AS, Macfarlane RG, Dacie JV, Pitney WR, Merskey. Christmas disease: a condition previously mistaken for haemophilia. *Br Med Journal* 1952; 2: 1378-82.
 - Biggs R, Macfarlane RG. Treatment of haemophilia and other coagulation disorders. Philadelphia: F.A. Davis Company, 1966; 22.
 - Boekhorst J, Verbruggen B, Lavergne JM, Costa J-M, Schoormans SCM, Brons PPT, van Kraaij MGJ, Nováková IRO, van Heerde WL. Thirteen novel mutations in the factor VIII gene in the Nijmegen haemophilia A patient population. *British Journal of Haematology* 2005; 131: 109-117.
 - Bogdanova N, Markoff A, Pollmann H, Nowak-Göttl U, Eisert R, Dworniczak B, Eigel A, Horst J. Prevalence of small rearrangements in the factor VIII gene F8C among patients with severe hemophilia A. *Human Mutation*, Mutation in brief #533 (2002) Online.
 - Bogdanova N, Markoff A, Pollmann H, Nowak-Göttl U, Eisert R, Wermes C, Todorova A, Eigel A, Dworniczak B, Horst J. Spectrum of molecular defects and mutation detection rate in patients with severe hemophilia A. *Human Mutation* 2005; 26: 249-54.
 - Bogdanova N, Markoff A, Eisert R, Wermes C, Pollmann H, Todorova, A, Chlystun M, Nowak-Göttl U, Horst J. Spectrum of molecular defects and mutation detection rate in patients with mild and moderate haemophilia A. *Human Mutation* 2006; 0: 1-7.
 - Bolton-Maggs PH, Wensley RT, Kernoff PB, Kasper CK, Winkelman L, Lane RS, Smith JK. Production and therapeutic use of a factor XI concentrate from plasma. *Thrombosis and Hemostasis* 1992; 67: 314-9.
 - Bolton-Maggs PHB, Pasi KJ. Haemophilias A and B. *Lancet* 2003; 361: 1801-1809.
 - Bottema CD, Ketterling RP, Vielhaber E, Yoon HS, Gostout B, Jacobson DP, Shapiro A. The pattern of spontaneous germ-line mutation: relative

- rates of mutation at or near CpG dinucleotides in the factor IX gene. *Hum Genet* 1993; 91: 496-503.
- Bowen DJ. Haemophilia A and B: molecular insights. *Journal Clinical Pathology: Molecular Pathology* 2001; 55:1-18.
 - Brackmann HH. Induced immunotolerance in factor VIII inhibitor patients. *Prog Clin Biol Res* 1984; 150: 181-195.
 - Brandstetter H, Bauer M, Huber R, Lollar P, Bode W. X-ray structure of clotting factor IXa: active site and module structure related to Xase activity and hemophilia B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 9796-800.
 - Brettler BD. Inhibitors in congenital haemophilia. *Baillieres Clin Haematol* 1996; 9: 319-9.
 - Briet E, Wijnands MC, Veltkamp JJ. The prophylactic treatment of hemophilia B Leyden with anabolic steroids. *Ann Intern Med* 1985; 103: 225-6.
 - Broze GJ Jr, Warren LA, Novotny WF, Higuchi DA, Girard JJ, Mileteich JP. The lipoprotein-associated coagulation inhibitor that inhibits the factor VII-tissue factor complex also inhibits the factor Xa: insight into its possible mechanism of action. *Blood* 1988; 71: 335-43.
 - Camerino G, Grzeschik K, Jaye M, De La Salle H, Tolstoshev P, Lecocq JP, Heiling R, Mandel JL. Regional localization on the human X chromosome and polymorphism of the coagulation factor IX gene (hemophilia B locus). *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 498-502.
 - Carrell RV, Chirstey PB, Boswell DR. Serpins: antithrombin and other inhibitors of coagulation and fibrinolysis in Vers. Taete M, Vermylen J, Linjnem HR, et al. (eds). *Thrombosis and Haemostasis, Brussels. Leuven University Press* 1987: 1-15.
 - Casula L, Murru S, Pecorara M, Ristaldi MS, Restagno G, Mancuso G, Morfini M, De Biasi R, Baudo F, Carbonara A, et al. Recurrent mutations and three novel rearrangements in the factor VIII gene of haemophilia A patients of Italian descent. *Blood* 1990;175:662-670.
 - Church WR, Jeringan RL, Toole J, Hewick RM, Knopf J, Knutson GJ, Nesheim ME, Mann KG, Fass DN: Coagulation factors V and VIII and

- ceruloplasmin constitute a family structurally related proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 6934-7.
- Citron M, Godmilow L, Ganguly T, Ganguly A. High throughput mutation screening of the factor VIII gene (F8C) in hemophilia A: 37 novel mutations and genotype-phenotype correlation. *Human Mutation* 2002; 20: 267-74.
 - Clemetson KJ, Clemetson JM. Platelet collagen receptors. *Thrombosis and Haemostasis* 2001; 86: 189-97.
 - Cooper DN, Youssoufian H: The CpG dinucleotide and human genetic disease. *Human genetic* 1988; 78:151-5.
 - Cooper DN, Krawczak M: The mutational spectrum of single base-pair substitutions causing human genetic disease: Patterns and predictions. *Human Genetic* 1990; 85:55-74.
 - Cooper DN, Krawczak M, Antonarakis SE. The nature and mechanisms of human gene mutation. In: Volgestein B, Kinzler KW, eds. The genetic basis of human cancer. New York: McGraw Hill; 1998.
 - Costa JM, Hernault P, Vidaud M, Meyer D, Lavergne JM. Fast and efficient mutation detection method using multiplex PCR and cycle sequencing—application to hemophilia B. *Thrombosis and Haemostasis* 2000; 83: 244-7.
 - Crossley M, Ludwig M, Stowell KM, De Vos P, Olek K, Brownlee GG. Recovery from hemophilia B Leyden: an androgen-responsive element in the factor IX promoter. *Science* 1992; 257: 377-9.
 - Cutler JA, Mitchell MJ, Smith MP, Savidge GF. The identification and classification of 41 novel mutations in the factor VIII gene (F8C). *Human Mutation* 2002; 19: 274-278.
 - Cutler JA, Mitchell MJ, Smith MP, Savidge GF. Germline mosaicism resulting in the transmission of severe hemophilia B from a grandfather with a mild deficiency. *Am J Med Genet A* 2004; 129:13-5.
 - Dahlbäck B. Blood coagulation. *Lancet* 2000; 335: 1627-32.
 - Dahlbäck B. Progress in the understanding of the protein C anticoagulant pathway. *Internal Journal of Hematology* 2004; 79: 109-16.

- Dahlbäck B. Blood coagulation and its regulation by anticoagulant pathways: genetic pathogenesis of bleeding and thrombotic diseases. *Journal of Internal Medicine* 2005; 257: 209-223.
- David D, Moreira I, Lalloz MR, Rosa HA, Schwaab R, Morais S, Kiniz MJ, de Deus G, Campos M, Lavinha J, Tuddenham EGD. Analysis of the essential sequences of the factor VIII gene in twelve haemophilia A patients by single-stranded conformation polymorphism. *Blood Coagulation and Fibrinolysis* 1994; 5: 257-264.
- Davie EW. Biochemical and molecular aspects of the coagulation cascade. *Thrombosis and Haemostasis* 1995; 74: 1-16.
- DiMichele D, Neufeld EJ. Hemophilia A: A new approach to an old disease. *Hematolo/Oncol Clinics of North America* 1998; 12: 1315-44.
- Di Scipio RG, Kurachi K, Davie EW. Activation of human factor IX (Christmas factor). *J Clin Invest* 1978; 61: 1528-38.
- Doolittle R, Cottrell B, Strong D, Watt K: The amino acid sequence of the α -chain of human fibrinogen. *Nature* 1979; 280: 464-8.
- Eaton D, Rodríguez H, Vehar GA. Proteolytic processing of human factor VIII. Correlation of specific cleavages by thrombin, factor Xa, and activated protein C with activation and inactivation of factor VIII coagulant activity. *Biochemistry* 1986; 25: 505-12.
- El-Maarri O, Singer H, Klein C, Watzka M, Herbiniaux U, Brackman W, Schroder J, Graw J, Muller CR, Schramm W, Schwaab R, Haaf T, Hanfland P, Oldenburg J. Lack of F8 mRNA: a novel mechanism leading to haemophilia A. *Blood* 2005; 107: 2759-65.
- Enayat MS, Karimi M, Chana G, Farjadian S, Theophilus BDM, Hill FGH. Mutation Analysis in F9 gene of 17 families with Haemophilia B from Iran. *Haemophilia* 2004; 10: 751-755.
- Eriksson AE, Baase WA, Matthews BW. Similar hydrophobic replacements of Leu99 and Phe153 within the core of T4 lysozyme have different structural and thermodynamic consequences. *Journal Molecular Biology* 1993; 229:747-769.

-
- Esmon CT. The roles of protein C and thrombomodulin in the regulation of blood coagulation. *J Biol Chem* 1989; 264: 4743-6.
 - Espinos C, Casana P, Haya S, Cid AR, Aznar JA. Molecular analyses in hemophilia B families: identification of six new mutations in the factor IX gene. *Haematologica* 2003; 88: 235-6.
 - Ewing NP, Sanders NL, Dietrich SL, Kasper CK. Induction of immune tolerance to factor VIII in hemophiliacs with inhibitor. *JAMA* 1988; 259:65.
 - Fay PJ, Jenkins PV. Mutating factor VIII: lessons from structure to function. *Blood Rev* 2005; 19: 15-27.
 - Foster PA, Fulcher CA, Houghten RA, Zimmerman TS. 1990. Synthetic factor VIII peptides with amino acid sequences contained within the C2 domain of FVIII inhibit FVIII binding to phosphatidyl serine. *Blood* 75:1999-2004.
 - Francis RB, Kasper ck. Reproduction in hemophilia. *JAMA* 1983; 250:3192-5.10. Green PM, Naylor JA, Gianelli F. The hemophilias. *Adv Genet* 1995; 32:99-139.
 - Fray PJ, Scandella D. 1999. Human inhibitor antibodies for the factor VIII A2 domain disrupt the interaction between the subunit and factor IXa. *J Biol Chem* 274:29826-29830.
 - Freson K, Peerlinck K, Aguirre T, Arnout J, Vermylen J, Cassiman JJ, Matthijs G. Fluorescent chemical cleavage of mismatches for efficient screening of the factor VIII gene. *Human Mutation* 1998; 11: 470-9.
 - Fribourg C, Meijei AB, Mertens K. The interface between the EGF2 domain and the protease domain in blood coagulation factor IX contributes to factor VIII binding and factor X activation. *Biochemistry* 2006; 45(35):1977-85.
 - Fujikawa K, Chung DW. Factor XI, in *Molecular basis of thrombosis and Hemostasis*, edited by K High, H Roberts, p 257. Marcel Dekker, New York, 1995.
 - Galeffi P, Brownlee GG. The propeptide region of clotting Factor IX is a signal for vitamin K dependent carboxylase: evidence from protein engineering of amino acid -4. *Nucleic Acids Res* 1987; 15: 9505-13.

- Gardlund B, Hessel B, Marguerie G, Murano G, Blomback B. Primary structure of human fibrinogen. Characterization of disulfide-containing cyanogen-bromide fragments. *Eur J Biochem* 1977; 77: 595-610.
- George JN. Platelets. *Lancet* 2000; 335: 1531-9.
- Ghosh K, Shetty S, Mohanty D. Milder clinical presentation of hemophilia A with severe deficiency of factor VIII. *Haemophilia*; 7:9-12, 2001.
- Gitschier J, Word WI, Goralka TM, Wion KL, Chen EY, Eaton DH, Vehar GA, Capon DJ, Lawn RM: Characterization of the human factor VIII gene. *Nature* 1984; 312: 326-30.
- Goodeve AC. Laboratory methods for the genetic diagnosis of bleeding disorder. *Clin Lab Haematol* 1998; 20(1): 3.
- Goodeve AC, Williams I, Bray GL et al. Relationship between factor VIII mutation type and inhibitor development in a cohort of previously untreated patients treated with recombinant factor VIII (Recombinate). Recombinate PUP Study Group. *Thrombosis and Haemostasis* 2000; 83: 844-8.
- Goodeve AC, Peake IR. The molecular basis of hemophilia A: Genotype-Phenotype relationships and inhibitor development. *Seminars in Thrombosis and hemostasis* 2003; 29: 23-30.
- Graw J, Brackmann HH, Oldenburg J, Schneppenheim R, Spannag M, Schwaab R. Haemophilia A: from mutation analysis to new therapies. *Nature Reviews* 2005; vol 6: 488-501.
- Green PM, Montandon AJ, Bentley DR, Ljung R, Nilsson IM, Giannelli F. The incidence and distribution of CpG----TpG transitions in the coagulation factor IX gene. A fresh look at CpG mutational hotspots. *Nucleic Acids Res* 1990; 18: 3227-31. Erratum in: *Nucleic Acids Res* 1990; 18: 4051.
- Griffith MJ. Measurement of the heparin enhanced-antithrombin III/thrombin reaction rate in the presence of synthetic substrate. *Thrombosis Research* 1982; 25: 245-53.
- Guillet B, Lambert T, D'Oiron R, Proulle V, Plantier J-L, Rafowicz A, et al. Detection of 95 novel mutations in coagulation of Factor VIII gene

- F8* responsible for hemophilia A: results from a single institution. *Human Mutation* 2006; 27: 676-685.
- Habart D, Kalabova D, Novotny M, Vorlova Z. Thirty-four novel mutations detected in factor VIII gene by complex CSGE: modelling of 13 novel amino acid substitutions. *Journal Thrombosis and Haemostasis* 2003; 1: 773-781.
 - Hamer RJ, Kodam JA, Beeser-Viser NH, Sixma JJ. The effect of thrombin on the complex between factor VIII and von Willebrand factor. *Eur J Biochem* 1987; 167: 253-9.
 - Hay CR, Ollier W, Pepper L, Cumming A, Keeney S, Goodeve AC, Colvin BT, Hill FG, Preston FE, Peake IR. HLA class II profile: a weak determinant of factor VIII inhibitor development in severe hemophilia A. UKHCDO Inhibitor Working Party. *Thrombosis and Hemostasis* 1997; 77: 234-7.
 - Hay CR, Ludlam CA, Colvin BT, Hill FG, Preston FE, Wasseem N, Bagnall R et al. Factor VIII inhibitors in mild and moderate-severity haemophilia A. UK Haemophilia Centre Directors Organisation. *Thrombosis and Hemostasis* 1998a; 79: 762-6.
 - Hay CR. Factor VIII inhibitors in mild and moderate-severity haemophilia A. *Haemophilia* 1998b; 4: 558-63.
 - Haya S, Aznar JA. Guía práctica de coagulopatías congénitas. Capítulo 10: Tratamiento del paciente hemofílico con inhibidores. *Acción Médica* 20001.
 - Higuchi M, Antonarakis SE, Kasch L, Oldenburg J, Economou-Petersen E, Olek K, Arai M, Inaba H, Kazazian HH Jr. Molecular characterization of mild-to-moderate hemophilia A: detection of the mutation in 25 of 29 patients by denaturing gradient gel electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991a; 88: 8307-11.
 - Higuchi M, Kazazian HH Jr, Krash L, Warren TC, McGinniss MJ, Phillips JA 3rd, Kasper C, Janco R, Antonarakis SE. Molecular characterization of severe hemophilia A suggests that about half the mutations are not

- within the coding regions and splice junctions of the factor VIII gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991b; 88: 7405-9.
- Hill M, Deam S, Gordon B, Dolan G. Mutation analysis in 51 patients with haemophilia A: report of 10 novel mutations and correlations between genotype and clinical phenotype. *Haemophilia* 2005; 11: 133-41.
 - Hoffman M, Monroe DM, Oliver JA, Roberts HR. Factors IXa y Xa play distinct roles in tissue dependent initiation of coagulation. *Blood* 1995; 86: 1794-1801.
 - Hoffman, R; Benz, J; Shattil, S; Furie, B; Cohen, H; Silberstein, L; McGlave P. Hematology: Basic Principles and Practice. 3rd edition (2000) Ed. Churchill Livingston.
 - Hoffman M. Remodeling the blood coagulation cascade. *Journal Thrombosis Thrombolysis* 2003a; 16: 17-20.
 - Hoffman M. A cell-based model of coagulation and the role of factor VIIa. *Blood Rev* 2003b; 17(Suppl. 1):S1-5.
 - Hopff F. Ubre die haemophilie order die erbliche Anlage zu tödliche blutungen. Thesis, Univ. Zurich, 1928.
 - Huttner WB. Tyrosine sulfation and the secretory pathway. *Annu Rev Physiol* 1988; 50: 363-76.
 - Ingram GIC. The history of haemophilia. *J Clin Path* 1976; 29: 469-479.
 - Ivaskevicius V, Jurgutis R, Rost S, Muller A, Schmitt C, Wulff K, Hermann FH, Muller CR, Schwaab R, Oldenburg J. Lithuanian haemophilia A and B registry comprising phenotypic and genotypic data. *British Journal and Haematology* 2001; 112: 1062-1070.
 - Jacquemin M, Lavend'homme R, Benhida A, Vanzielegem B, d'Oiron R, Lavergne JM, Brackmann HH, Schwaab R, et al. A novel cause of mild/moderate haemophilia A: mutations scattered in the factor VIII C1 domain reduce factor VIII binding to von Willebrand factor. *Blood* 2000; 96: 958-6.
 - Jaloma-Cruz AR, Scaringe WA, Drost JB, Roberts S, Li X, Barros-Nuñez P, Figuera LE, Rivas F, Cantu JM, Sommer SS. Nine independent F9 mutations in the Mexican hemophilia B population: nonrandom

- recurrences of point mutation events in the human germline. *Human Mutation* 2000; 15: 116-7.
- Jayandharan G, Shaji RV, Baidya S, Fair SC, Chandy M, Srivastava A. Identification of factor VIII gene mutations in 101 patients with haemophilia A: mutation analysis by inversion screening and multiplex PCR and CSGE and molecular modelling of 10 novel missense substitutions. *Haemophilia* 2005; 11: 481-491.
 - Jesty J, Morrison SA. The activation of factor IX by tissue factor.factor VII in a bovine plasma system lacking factor X. *Thrombosis Research* 1983; 32: 171-81.
 - Jonsdottir S, Diamond C, Levinson B, Magnusson S, Jensson O, Gitschier J. Missense mutations causing mild hemophilia A in Iceland detected by denaturing gradient gel electrophoresis. *Human Mutation* 1992; 1: 506-508.
 - Kant JA, Fornace AJ, Saxe D, Simon MI, McBride OW, Crabtree GR. Evolution and organization of the fibrinogen locus on chromosome 4: gene duplication accompanied by transposition and inversion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 2344-8.
 - Kasper CK, Lin JC. Prevalence of sporadic and familial haemophilia. *Haemophilia*; 13, 90-92, 2007.
 - Kazazian HH, Wong C, Youssoufian H, Scott AF, Phillips DG, Antonarakis SE. Haemophilia A resulting from de novo insertion of L1 sequences represents a novel mechanism for mutation in man. *Nature* 1988; 332: 164-166.
 - Ketterling RP, Bottema CD, Koeberl DD, Li S, Sommer SS. T296M, a common mutation causing mild hemophilia B in Amish and others: founder effect, variability in factor IX activity assays, and rapid carrier detection. *Human Genetic* 1991; 87: 333-37.
 - Ketterling RP, Vielhaber E, Li X, Drost J, Schaid DJ, Kasper CK, Phillips JA 3rd, Koerper MA, Kim H, Sexauer C, Gruppo R, Ambriz R, Paredes R, Sommer SS. Germline origins in the human F9 gene: frequent G:C--

- >A:T mosaicism and increased mutations with advanced maternal age. *Human Genetic* 1999; 105: 629-40.
- Kogan SC, Doherty M, Gitschier J. An improved method for prenatal diagnosis of genetic diseases by analysis of amplified DNA sequences. Application to hemophilia A. *N Engl J Med* 1987; 317: 985-90.
 - Kogan S, Gitschier J. Mutations and polymorphism in the factor VIII gene discovered by denaturing gradient gel electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 2092-6.
 - Koszelak ME, Huggins CF, Fay PJ. Sites in A2 subunits involved in the interfactor VIIIa interaction. *J Biol Chem* 2000; 275: 27137-44.
 - Krawczak M, Reiss J, Cooper DN. The mutational spectrum of single base-pair substitutions in mRNA splice junctions of human genes: causes and consequences. *Human Genetic* 1992; 90: 1-54.
 - Kren BT, Bandyopadhyay P, Steer CJ. In vivo site-directed mutagenesis of the factor IX gene by chimeric RNA/DNA oligonucleotides. *Nature Medicine* 1998; 4: 285-90.
 - Kren BT, Parashar B, Bandyopadhyay P, Chowdhury NR, Chowdhury JR, Steer CJ. Correction of the UDP-glucuronosyltransferase gene defect in the Gunn rat model of Crigler-Najjar syndrome type I with a chimeric oligonucleotide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 10349-54.
 - Kunkel TA, Alexander PS. The base substitution fidelity of eukaryotic DNA polymerase. Mispairing frequencies, site preferences, insertions preferences, and base substitution by dislocation. *J Bio Chem* 1986; 261:160-6.
 - Kurachi K, Davie EW. Isolation and characterization of a cDNA coding for human factor IX. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79:6461-64.
 - Lai T-S, Achyuthan KE, Santiago MA, Greenberg GS. Carboxyl-terminal truncation of recombinant factor XIII A-chains expressed in *E. Coli*. *Protein Expr Purif* 1994; 5: 125-32.
 - Lakich DH, Kazazian HH, Antonarakis SE, Gitschier J. Inversions disrupting the factor VIII gene are a common cause of severe haemophilia A. *Nat Genet* 1993; 5: 236-41.

-
- Lalani I, Bhol K, Ahmed AR. Interleukin-10: biology, role in inflammation and autoimmunity. *Ann Allergy Asthma Immunology* 1997; 79: 469-83.
 - Lalloz MR, McVey JH, Pattinson JK, Tuddenham EG. Hemophilia A diagnosis by analysis of a hypervariable dinucleotide tandem repeats within the factor VIII gene. *Lancet* 1991; 338: 207-11.
 - Lalloz MR, Schwaab R, McVey JH, Michaelides K, Tuddenham EG. Hemophilia A diagnosis by simultaneous analysis of two variable dinucleotide tandem repeats within the factor VIII gene. *Br J Haematology* 1994; 86: 804-9.
 - Lane DA, Mannucci PM, Bauer KA, Bertina RM et al. Inherited Thrombophilia: Part 1. *Thrombosis and Haemostasis* 1996; 76:651-62.
 - Laprise SL, Mak EK, Killoran KA, Layman LC, Gray MR. Use of denaturing gradient gel blots to screen for point mutations in the factor VIII gene. *Human Mutation* 1998; 12: 393-402.
 - Levinson B, Kenwick S, Lackich D, Hammonds G Jr, Gitschier J. A transcribed gene in an intron of the human factor VIII gene. *Genomics* 1990; 7: 1-11.
 - Levinson B, Kenwick S, Gamel P, Fisher K, Gitschier J. Evidence for a third transcript from human factor VIII gene. *Genomics* 1992; 14: 585-9.
 - Lenting PJ, van Mourik JA, Mertens Koen. The life cycle of coagulation of factor VIII in view of its structure and function. *Blood* 1998; 92: 3983-3996.
 - Lewin B. *Genes V*. Oxford: Oxford University Press; 1994.
 - Lillicrap D. The molecular basis of haemophilia B. *Haemophilia* 1998; 4, 350-357.
 - Lin SW, Lin SR, Shen MC. Characterization of genetic defects of hemophilia A in patients of Chinese origin. *Genomics* 1993; 18: 496-504.
 - Liu Q, Norazi G, Sommer SS. Single-tube Polymerase chain reaction for rapid diagnosis of the inversion hotspot of mutation in hemophilia A. *Blood* 1998a; 92: 1458-9.

- Liu Q, Weinshenker BG, Wingerchuk DM, Sommer SS. Denaturation fingerprinting: two related mutation detection methods especially advantageous for high G + C regions. *Biotechniques* 1998b; 24:140-7.
- Liu ML, Shen BW, Nakaya S, Pratt KP, Fujikawa K, Davie EW, Stoddard BL, Thompson AR. Hemophilic factor VIII C1- and C2-domain missense mutations and their modelling to the 1.5-angstrom human C2-domain crystal structure. *Blood* 2000; 96: 979-87.
- Liu ML, Nakaya S, Thompson AR. Non-Inversion factor VIII mutations in 80 hemophilia A families including 24 with alloimmune responses. *Thrombosis and haemostasis*; 87:273-276, 2002.
- Ljung RC. Gene mutations and inhibitor formation in patient with hemophilia B. *Acta Haematol* 1995a; 94(suppl. 1): 49-52.
- Ljung RC, Sjörin E. Inversions of the factor VIII gene in Swedish patients with severe haemophilia A. *European Journal Haematology* 1995b; 54: 310-3.
- Ljung RC, Sjörin E. Origin of mutation in sporadic cases of haemophilia A. *British Journal of Haematology* 1999; 106: 870-874.
- Ljung R, Petrini P, Tengborn L, Sjorin E. Haemophilia B mutations in Sweden: a population-based study of mutational heterogeneity. *Br J Haematol* 2001; 113: 81-6.
- London FS, Walsh PN. Activation dependent appearance of a platelet protein that recognizes coagulation factor IXa. *Circulation* 1992; 86: 1465.
- Lucotte G, Hazout S. Geographic and ethnic distributions of the more frequent cystic fibrosis mutations in Europe show that a founder effect is apparent for several mutant alleles. *Hum Bio* 1995; 67: 562-576.
- Machiah DK, Viel K, Almasy L, et al. A common SNP in the factor VIII (FVIII) gene encodes a conservative aspartate to glutamate substitution (Asp1241Glu) in the B-domain that influences FVIII activity levels. *Blood* 2003; 102(11), Abstract #181.
- Mahajan A, Chavali S, Kabra M, Chowdhury MR, Bharadwaj D. Molecular characterization of hemophilia B in North Indian families:

- identification of novel and recurrent molecular events in the factor IX gene. *Haematologica* 2004; 89: 1498-503.
- Majerus PW. Platelets. In: Stamatoyannopoulos G, Majerus PW, Perlmutter RM, Varmus H, eds. *The molecular Basis of Blood disease*, 3rd edn. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 2001; 764-90.
 - Mann KG, Nesheim ME, Church WR, Haley P, Krishnaswamy S. Surface-dependent reactions of the vitamin k-dependent enzyme complexes. *Blood* 1990; 76: 1-16.
 - Mann KG. Biochemistry and physiology of blood coagulation. *Thrombosis and Haemostasis* 1999; 82: 165-74.
 - Mann KG, Brummel K, Butenas S. What is all that thrombin for? *J Thrombosis and Haemostasis* 2003; 1: 1504-14.
 - Mannucci PM. Hemophilia and related bleeding disorders: a story of dismay and success. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2002: 1-9.
 - Mannucci PM, Duga S, Peyvandi F. Recessively inherited coagulation disorders. *Blood* 2004; 104: 1243-52.
 - Mantilla-Capacho JM, Beltran-Miranda CP, Luna Zaizar H, Aguilar-Lopez L, Esparza-Flores MA, Lopez-Guido E, Troyo-Sanroman R, Jaloma-Cruz AR. Frequency of intron 1 and 22 inversions of Factor VIII gene in Mexican patients with severe hemophilia A. *American Journal Hematology* 2007; 82: 283-7.
 - Mathur A, Bajaj SP. Protease and EGF1 domains of factor IXa play distinct roles in binding to factor VIIIa. Importance of helix 330 (helix 162 in chymotrypsin) of protease domain of factor IXa in its interaction with factor VIIIa. *J Biol Chem* 1999; 274(26):18477-86.
 - Matthews BW. Structural and genetic analysis of the folding and function of T4 lysozyme. *FASEB J* 1996; 10: 35-41.
 - McMullen BA, Fujikawa K, Davie EW, Hedner U, Ezban M. 1995. Locations of disulfide bridges and free cysteines in the heavy and light chains of recombinant human factor VIII (antihemophilic factor A). *Protein Sci* 4:740-...

- Mertens K, Celie PH, Kolkman JA, Lenting PJ. Factor VIII-factor IX interactions: molecular sites involved in enzyme-cofactor complex assembly. *Thrombosis and Haemostasis* 1999; 82: 209-17.
- Michnick DA, Pittmann DD, Wise RJ, Kaufman RJ. Identification of individual tyrosine sulfation sites within factor VII required for optimal activity and efficient thrombin cleavage. *J Biol Chem* 1994; 269: 20095-102.
- Montejo JM, Magallon M, Tizzano E, Solera J. Identification of twenty-one new mutations in the factor IX gene by SSCP analysis. *Human Mutation* 1999;13: 160-5.
- Monroe DM, Hoffman M, Roberts HR. Transmission of a procoagulant signal from tissue factor bearing cells to platelets. *Blood Coagul Fibrin* 1996; 7: 459-65.
- Monroe DM, Hoffman M, Roberts HR. Platelets and thrombin generation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 1381-9.
- Morgan GE, Figueiredo MS, Winship PR, Baker R, Bolton-Maggs PH, Brownlee GG. The high frequency of the -6G→A factor IX promoter mutation in the result both of a founder effect and recurrent mutations at a CpG dinucleotide. *Br J Haematol* 1995; 89: 672-4.
- MRC Haemostasis and Thrombosis Database Resource Sites. [Http://europium.csc.mrc.ac.uk](http://europium.csc.mrc.ac.uk).
- Mukherjee S, Mukhopadhyay A, Chaudhuri K, Ray K. Analysis of haemophilia B database and strategies for identification of common point mutations in the factor IX gene. *Haemophilia* 2003; 9: 187-92.
- Nakaya S, Liu M-L, Arthur R. Some factor VIII exon 14 frameshift mutations cause moderately severe haemophilia A. *British Journal of Haematology* 2001; 115: 977-982.
- Nakaya SM, Hsu TC, Geraghty SJ, Manco-Johnson MJ, Thompson AR. Severe hemophilia A due to a 1,3 Kb factor VIII gene deletion including exon 24: homologous recombination between 41bp within an Alu repeat sequence in introns 23 and 24. *Journal Thrombosis and Haemostasis* 2004; 2: 1941-1945.

-
- Naylor JA, et al. Investigation of the factor VIII intrón 22 repeated region (int22h) and the associated inversion junctions. *Hum Mol Genet* 1995; 4: 1217-1224.
 - Nichols WC, Amano K, Cacheris PM, Figueiredo MS, Michaelides K, Schwaab R, Hoyer L, Kaufman RJ, Ginsburg D. Moderation of Haemophilia A phenotype by the factor V R506Q mutations. *Blood* 1996; 88: 1183-1187.
 - Oldenburg J, Picard JK, Schwaab R, Brackmann HH, Tuddenham EG, Simpsom E. HLA genotype of patients with severe hemophilia A due to intron 22 inversion with and without inhibitors of factor VIII. *Thrombosis and Haemostasis* 1997; 77: 238-42.
 - Oldenburg J, Schoroder J, Schmidt C, Brackmann HH, Schwaab R. Small deletion/insertion mutations within poly-A runs of the factor VIII gene mitigate the severe haemophilia A phenotype. *Thrombosis and haemostasis* 1998; 79, 452-453.
 - Oldenburg J. Mutation profiling in haemophilia A. *Trombosis and haemostasis* 2001; 85: 577-9.
 - Oldenburg J, El-Maarri O, Schwaab R. Inhibitor development in correlation of factor VIII genotypes. *Haemophilia* 2002; 8(Suppl. 2): 23-9.
 - Oldenburg J, Ananyeva NM, Saenko EL. Molecular basis of haemophilia A. *Haemophilia* 2004a; 10(Suppl. 4): 133-139.
 - Oldenburg J, Schroder J, Brackmann HH, Muller-Reible C, Schwaab R, Tuddenham E. Environmental and genetic factors influencing inhibitor development. *Semin Hematol* 2004b; 41(Suppl. 1): 82-8.
 - Oldenburg J and Pavlova A. Genetic risk factors for inhibitors to factors VIII and FIX. *Haemophilia* 2006a; 12(Suppl. 6): 15-22.
 - Oldenburg J, El-Maarri O. New insight into the molecular basis of hemophilia A. *International Journal of Hematology* 2006b; 83: 96-102.
 - Oliver J, Monroe D, Roberts H, Hoffman M. Thrombin activates factor XI on activates plateletes in the absence of factor XII. *Arterioscler Thromb Vase Biol* 1990; 19: 170-7.

- Onay UV, Kavakli K, Kilimc Y, Gurgey A, Aktuglu G, Kemahlis S, Ozbek U, Caglayan SH. Molecular pathology of haemophilia B in Turkish patients: identification of a large deletion and 33 independent point mutations. *British Journal Haematology* 2003; 120: 656-9.
- Osterud B, Rappaport SI. Activation of factor IX by the reaction product of coagulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74: 5260-4.
- Otto JC. An account of a haemorrhagic disposition existing in certain families. *Med. Respos* 1803; 6: 1-4.
- Pattinson JK, Millar DS, McVey JH, Grundy CB, Wieland K, Mibashan RS, Martinowitz U, Tan-Un K, Vidau M, Goossens M et al. The molecular genetic analysis of hemophilia A: a directed search strategy for the detection of point mutations in the human factor VIII gene. *Blood* 1990; 76: 2242-8.
- Pratt KP, Shen BW, Takeshima K, Davie EW, Fujikawa K, Stoddard BL. Structure of the C2 domain of human factor VIII at 1.5 Å resolution, A molecular model for the triplicated A domains of human factor VIII based on the crystal structure of human ceruloplasmin. *Nature* 1999; 402: 439-442.
- Pechet L, Tiaras CY, Stevens J, Sudhindra RR, Lipworth L. Relationship of factor IX antigen and coagulant in haemophilia B patients and carriers. *Thrombosis and Haemostasis* 1978; 40:465-77.
- Peerlinck K, Jacquemin M. Characteristics of inhibitors in mild/moderate haemophilia A. *Haemophilia* 2006; 12(Suppl. 6): 43-47.
- Pemberton S, Lindley P, Zaitsev V, Card G, Tuddenham D, Kembell-Cook G. A molecular model for the triplicated A domains of human factor VIII based on the crystal structure of human ceruloplasmin. *Blood* 1997; 89: 2413-2421.
- Peyvandi F, Mannucci PM. Rare coagulation disorders. *Thrombosis and Haemostasis* 1999; 82: 1207-14.
- Peyvandi F, Duga S, Akhavan S, Mannucci PM. Rare coagulations deficiencies. *Haemophilia* 2002; 8: 308-321.

- Peyvandi F, Jayandharan G, Chandy M, Srivastava A, Nakaya SM, Johnson MJ, Thompson AR, Goodeve A, et al. Genetic diagnosis of haemophilia and other inherited bleeding disorders. *Haemophilia* 2006 ; 12 (Suppl. 3): 82-89.
- Pieneman WC, Deutz-Terlouw PP, Reitsma PH, Briet E. Screening for mutations in haemophilia A patients by multiplex PCR-SSCP, Southern blotting and RNA analysis: the detection of a genetic abnormality in the factor VIII gene in 30 out of 35 patients. *Br J Haematol* 1995; 90: 442-9.
- Pittman DD, Wang JH, Kaufman RJ: Identification and functional importance of tyrosine sulfate residues within recombinant factor VIII. *Biochemistry* 1992; 31: 3315-25.
- Pollmann H, Richter H, Jurgens H. When are children diagnosed as having severe haemophilia and when do they start to bleed? A 10-year single-centre PUP study. *Eur J Pediatr* 1999; 158(suppl 3): S166-70.
- Rao Z, Handford PA, Maythew M, Knott V, Brownlee GG, Stuart D. The structure of a Ca(2+)-binding epidermal growth factor-like domain: its role in protein-protein interactions. *Cell* 1995; 82(11):131-141.
- Rapaport SI. Inhibitory of factor VIIIa-tissue factor induced blood coagulation with particular emphasis on a factor Xa-dependent inhibitory mechanism. *Blood* 1989; 73: 359-64.
- Rapaport SI, Rao LV, The tissue factor pathway: how it has become a "prima ballerina". *Thrombosis and Haemostasis* 1995; 74: 7-17.
- Rastegar LG, Enayat MS, Arjang Z, Lavergne JM, Ala F. Identification of intrón 1 and intrón 22 inversion mutations in the factor VIII gene of the 124 Iranian families with severe haemophilia A. *Haemophilia* 2004; 10: 410-411.
- Reijnen MJ, Sladek FM, Bertina RM, Reitsma PH. Disruption of a binding site for hepatocyte nuclear factor 4 results in hemophilia B Leyden. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 6300-3.
- Rodeghiero F, Castaman G. Congenital von Willebrand disease type I: definition, phenotypes, clinical and laboratory assessment. *Best Pract Res Clin Haematol* 2001; 14: 321-35

- Rodeghiero F. von Willebrand disease: still an intriguing disorder in the era of molecular medicine. *Haemophilia* 2002; 8: 292-300.
- Rossetti LC, Goodeve A, Larripa IB, De Brasi CD. Homeologous recombination between AluX-sequences as a cause of hemophilia. *Human Mutation* 2004; 24: 440.
- Rossiter JP, Young M, Kimberland ML, Hutter P, Ketterling PR, Gitschier J, Morris MA, Schaid DJ, de Moreloose P, Sommer SS, Kazazian HH, Antonarakis SE. Factor VIII gene inversions causing severe hemophilia A originate almost exclusively in male germ cells. *Human Mol Genet* 1994; 3: 1035-39.
- Rothschild C, Gil J, Sharrer I, Bray G. Transient inhibitors in the Recombinate PuP study. *Thrombosis and Haemostasis* 2000; 84: 145-6.
- Ruf W, Edginton TS. Structural biology of tissue factor, the initiator of thrombogenesis in vivo. *Faseb J* 1994; 8: 385-90.
- Ruggeri ZM. Von Willebrand factor, platelets and endothelial cell interactions. *J Thrombosis and Haemostasis* 2003; 1: 1335-42.
- Saenko EL, Shima M, Sarafanov AG. Role of activation of the coagulation of factor VIII in interaction with vWf, phospholipid, and functioning within the factor Xase complex. *Trends Cardiovasc Med* 1999; 9: 185-92.
- Saenko EL, Ananyeva NM, Tuddenham EGD, Kembell-Cook G. Factor VIII: Novel insights into form and function. *British Journal of Haematology* 2002; 119: 323-331.
- Saito H, Kojima T: Factor XII, prekallikrein and high-molecular-weight kininogen, in *Molecular Basis of Thrombosis and Haemostasis*, edited by K High, H Roberts, p 269. Marcel Dekker, New York, 1995.
- Salviato R, Belvini D, Are A, Radossi P, Tagariello G. Large FVIII gene deletion confers very high risk of inhibitor development in three related severe haemophiliacs. *Haemophilia* 2002; 8: 17-21.
- Sandler JE. Biochemistry and genetics of von Willebrand factor. *Annu Rev Biochem* 1998; 67: 395-424.

-
- Sandset PM, Abildgaard U, Larsen ML. Heparin induces release of extrinsic coagulation pathway inhibitor (EPA). *Thromb Res* 1988; 50: 803-13.
 - Scharrer I, Neutzling O. Incidence of inhibitors in haemophiliacs. A review of the literature. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1993; 4: 753-8.
 - Schwaab R, Brackmann H, Meyer C, Seehafer J, Kirchgesser M, Haack A, Olek K, Tuddenham E. G. D., Oldenburg J. Hemophilia A: Mutations type determines risk of inhibitor formation. *Thrombosis and Haemostasis* 1995a; 76: 1402-6.
 - Schwaab R, Oldenburg J, Schwaab U, Johnson DJ, Schmidt W, Olek K, Brackman HH, Tuddenham EG. Characterization of mutations within the factor VIII gene of 73 unrelated mild and moderate haemophiliacs. *British Journal of Haematology* 1995b; 91: 458-64.
 - Sharathkumar A, Lillicrap D, Blanchette VS et al. Intensive exposure to factor VIII is a risk factor for inhibitor development in mild hemophilia A. *J Thrombosis and Haemostasis* 2003; 1: 1228-36.
 - Sheffield W, Wu Y, Blajchman M. Antithrombin: Structure and function, in *Molecular Basis of Thrombosis*, edited by K High, H Roberts, p 355, Marcel Dekker, New York, 1995.
 - Sinha D, Seaman FS, Kosshy A, et al. Blood coagulation factor FXIa binds specifically to a site on activated human platelets distinct from that for factor FXI. *J Clin Invest* 1984; 73: 1550-6.
 - Sommer SS, Bowie EJ, Ketterling RP, Bottema CD. Missense mutations and the magnitude of functional deficit: the example of factor IX. *Human Genetics* 1992; 98: 295-7.
 - Sommer SS, Ketterling RP. The factor IX gene as a model for análisis of human germline mutations: an update. *Hum Mol Genet* 1996; 5: 1505-14.
 - Soria JM, Almasy L, Souto JC, Tirado I, Borell M, Mateo J, Sliter S, Stone W, Blangero J, Fontcuberta J. Linkage analysis demonstrated that the prothrombin G20210A mutation jointly influences plasma prothrombin levels and risk of thrombosis. *Blood* 2000; 95: 2780-5.

- Soulier JP, Larrieu MJ. Nouvelle method de diagnostic de l'hemophilie. Dosage des facteurs antihemohémophiliques A et B. *Sang*, 1953, 24, 205.
- Stenflo J, Suttie JW. Vitamin K-dependent formation of gamma-carboxyglutamic acid. *Annu Rev Biochem* 1977; 46:157-72.
- Stenson PD, Ball EV, Mort M, Phillips AD, Shiel JA, Thomas NS, Abeysinghe S, Krawczak M, Cooper DN. Human gene mutation database (HGMD): 2003 update. *Human Mutation* 2003; 21: 577-581.
- Stoilova-McPhie S, Villoutreix BO, Mertens K, Kemball-Cook G, Hoizenburg. 3-Dimensional structure of membrana-bound coagulation factor VIII: modeling of the factor VIII heterodimer within a 3-dimensional density map derived by electron crystallography. *Blood* 2002; 99:1215-1223.
- Sukarova E, Dimovski AJ, Tchacarova P, Petkov GH, Efremov GD. An Alu insert as the cause of a severe form of hemophilia A. *Acta Haematol* 2001; 106: 126-129.
- Scharrer I, Neutzling O. Incidence of inhibitors in haemophiliacs. A review of the literature. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1993; 4: 753-8.
- Tartary M, Vidaud D, Piao Y, Costa JM, Bahnak BR, Fressinaud E, Congard B, Laurian Y, Meyer D, Lavergne JM, et al. Detection of a molecular defect in 40 of 44 patients with haemophilia B by PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *Br J Haematol* 1993; 84: 662-9.
- Taylor SA, Deugau KV, Lillicrap DP. Somatic mosaicism and female-to-female transmission in a kindred with hemophilia B (factor IX deficiency). *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 39-42.
- Theophilus BD, Enayat MS, Higuchi M, Kazazian HH, Antonarakis SE, Hill FG. Independent occurrence of the novel Arg2163 to His mutation in the factor VIII gene in three unrelated families with haemophila A with different phenotypes. *Human Mutation* 1998; 11: 334.
- Theophilus BD, Enayat MS, Williams MD, Hill FG. Site and type of mutations in the factor VIII gene in patients and carriers of haemophilia A. *Haemophilia*. 2001; 7: 381-91.

-
- Thompson RE, Mandle R Jr, Kaplan AP. Association of factor XI and high molecular weight Kininogen in human plasma. *J Clin Invest* 1977; 60: 1376-80.
 - Thompson AR, Bajaj SP, Chen S-H, MacGillivray RTA. "Founder" effect in different families with haemophilia B mutation. *Lancet* 1990; 335: 418.
 - Thorland EC, Weinschenker BG, Liu JZ, Ketterling RP, Vielhaber EL, Kasper CK, Ambriz R, Paredes R, Sommer SS. Molecular epidemiology of factor IX germline mutations in Mexican Hispanics: Pattern of mutation and potential founder effects. *Thrombosis and Haemostasis* 1995; 74: 1416-1422.
 - Timur AA, Gurgey A, Aktuglu G, Kavakli K, Canatan D, Olek K, Caglayan SH. Molecular pathology of haemophilia A in Turkish patients: identification of 36 independent mutations. *Haemophilia* 2001; 7: 475-81.
 - Tizzano EF, Soria JM, Coll I, Guzman B, Cornet M, Altisent C, Martorell M et al. The prothrombin 20210A allele influences clinical manifestations of hemophilia A in patients with intron 22 inversion and without inhibitors. *Haematologica* 2002a; 87: 279-85.
 - Tizzano EF, Cornet M, Domenech M, Baiget M. Modifier genes in haemophilia: their expansion in the human genome. *Haemophilia* 2002b; 8: 250-4.
 - Tizzano E, Venceslá A, Cornet M, Baena M Baiget M. Utility of a (GT)_n dinucleotide repeat in intron 1 of the factor 8 gene for haemophilia A carrier diagnosis. *Haemophilia* 2005; 11: 142-4.
 - Toole JJ, Knopf JL, Wozney JM, Sultzman LA, Bueker JL, Pittman DD, et al. Molecular cloning of a cDNA encoding human antihaemophilic factor. *Nature* 1984; 312: 342-7.
 - Tuddenham EG, Lane RS, Rotblat F, et al. Response to infusions of polyelectrolyte fractionated human factor VIII concentrate in human haemophilia A and von Willebrand's disease. *Br Journal Haematol* 1982; 52: 259-67.

- Tuddenham EG, Cooper DN. The molecular genetics of haemostasis and its inherited disorders. Oxford Monographs in Medical Genetics No 25. Oxford: Oxford University press; 1994
- Tuley EA, Gaucher C, Jorieux S, Worrall NK, Sadler JE, Mazurier C. Expresión of von Willebrand factor "Normando": an autosomal mutation that mimics hemophilia A. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 6377-81.
- Van de Water N, Williams R, Ockelford P, Browett P. A 20.7 Kb deletion within the factor VIII gene associated with LINE-1 element insertion. *Thrombosis and Haemostasis* 1998; 79: 938-42.
- Vehar GA, Keyt B, Eaton D, Rodriguez H, O'Brien DP, Rotblat F, Oppermann H, et al. Structure of human factor VIII. *Nature* 1984; 312: 337-342.
- Vidal F, Farssac E, Altisent C, Puig L, Gallardo D. Factor IX gene sequencing by a simple and sensitive 15-hour procedure for hemophilia B diagnosis: identification of two novel mutations. *Br Journal Haematol* 2000; 111: 549-551.
- Vidal F Elisenda Farssac, Joan Tusell, Lluís Puig, Dominique Gallardo. First molecular characterization of an unequal homologous Alu-mediated recombination event responsible for haemophilia. *Thrombosis and Haemostasis* 2002; 88: 12-6.
- Vidaud D, Tartary M, Costa JM, Bahnak BR, Gispert-Sanchez S, Fressinaud E, Gazengel C, Meyer D, Goossens M, Lavergne JM, et al. Nucleotide substitutions at the -6 position in the promoter region of the factor IX gene result in different severity of hemophilia B Leyden: consequences for genetic counselling. *Human Genetics* 1993; 91: 241-4.
- Vinciguerra C, Zawadzki C, Dargaud Y, Pernod G, Berger C, Nougier C, Negrier C. Characterisation of 96 mutations in 128 unrelated severe haemophilia A patients from France. Description of 62 novel mutations. *Thrombosis and Haemostasis* 2006; 95: 593-9.
- Vogel F. A probable sex difference in some mutation rates. *Am J Hum Genet* 1977; 29: 312-9.

-
- Von dem Borne, Meijers JC, Bouma BN. Feedback activation of factor XI by thrombin in plasma results in additional formation of thrombin that protects fibrin clots from fibrinolysis. *Blood* 1995; 86: 125-32.
 - Walsh PN, Bradford H, Sinha M, et al. Kinetics of the factor XIa catalyzed activation of human blood coagulation factor XI. *J Clin Invest* 1984; 73: 1392-9.
 - Walsh PN. Roles of platelets and factor IX in the initiation of blood coagulation by thrombin. *Thrombosis and Haemostasis* 2001; 86: 75-82
 - Warrier I, Ewenstein BM, Koerper MA et al. Factor IX inhibitors and anaphylaxis in hemophilia B. *J Pediatr Hematol Oncol* 1997; 19: 23-7.
 - Waseem NH, Bagnall R, Green PM, Gianelli F. Start of UK confidential haemophilia A database: analysis of 142 patients by solid phase fluorescent chemical cleavage of mismatch. Haemophilia Centres. *Thrombosis and Haemostasis* 1999; 81: 900-5.
 - Weiss HJ, Sussman II, Hoyer LW. Stabilization of factor VIII in plasma by the von Willebrand factor. Studies on posttransfusion and dissociated factor VIII and in patient with von Willebrand's disease. *J Clin Invest* 1977; 60: 390-404.
 - Wight J, Paisley S. The epidemiology of inhibitor in haemophilia A: a systematic review. *Haemophilia* 2003; 9: 418-35.
 - Wilkinson FH, Ahmad SS, Walsh PN. The factor IXa second epidermal growth factor (EGF2) domain mediates platelet binding and assembly of the factor X activating complex. *J Biol Chem* 2002; 277(88):5734-41.
 - Wood WI, Capon DJ, Simmonson CC, Eaton DL, Gitschier J, Keyt B, et al. Expression of activated human factor VIII from recombinant DNA clones. *Nature* 1984; 312: 330-7.
 - Woodside DG, Liu S, Ginsberg MH. Integrin activation. *Thrombosis and Haemostasis* 2001; 86: 316-23.
 - Wun TC, Kretzmer KK, Girard TJ, Miletich JP, Broze GJ Jr. Cloning and characterization of cDNA coding for the lipoprotein associated coagulation inhibitor shows that it consists of three tandem Kunitz-type inhibitor domains. *J Biol Chem* 1988; 263: 6001-4.

- Xie YG, Zheng H, Leggo J, Scully MF, Lillicrap D. A founder factor VIII mutation, valine 2016 to alanine, in a population with an extraordinarily high prevalence of mild hemophilia A. *Thrombosis and Haemostasis* 2002; 87: 178-179.
- Xu J, Baase WA, Baldwin E, Matthews BW. The response of T4 lysozyme to large-to-small substitutions within the core and its relations to the hydrophobic effect. *Protein Sci* 1998; 7: 158-177.
- Yoshitake S, Schach BG, Foster DC, et al. Nucleotide sequence of the gene for human factor IX (antihemophilic factor B). *Biochemistry* 1985; 24: 3736-50.
- Young M, Inaba H, Hoyer LW, Higuchi M, Kazazian HH, Antonarakis SE. Partial correction of a severe molecular defect in hemophilia A because of errors during expression of the factor VIII gene. *American Journal of Human Genetics* 1997; 60: 565-573.
- Youssoufian H, Antonarakis SE, Bell W, Griffin AM, Kazazian HH Jr. Nonsense and missense mutations in hemophilia A: Estimate of the relative Mutation Rate at CG dinucleotides. *Am J Genetic* 1998; 42: 718-725.
- Zabetian CP, Hutter CM, Yearout D, Lopez AN, Factor SA, Griffith A, Leis BC, Bird TD, Nutt JG, Higgins DS, Roberts JW, Kay DM, Edwards KL, Samii A, Payami H. LRRK2 G2019S in families with Parkinson disease who originated from Europe and the Middle East: evidence of two distinct founding events beginning two millennia ago. *Am J Hum Genet* 2006; 79: 752-758.
- Zur M, Nmerson Y. Kinetics of factor IC activation via the extrinsic pathway dependence of km on tissue factor. *J Biol Chem* 1980; 255: 5703-7.

APÉNDICE

I. ABREVIATURAS

aa	Aminoácido
ADP	Difosfato de adenosina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
amb	Ambiente
ddH ₂ O	Agua bidestilada
del	Delección
DNTP	Desoxinucleótido trifosfato
DMSO	Dimetil sulfóxido
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATIII	Antitrombina III
EDTA	Ácido etilendiamino
EVW	Enfermedad de von Willebrand
FCE	Factor de crecimiento epidérmico
FL	Fosfolípido
FI a FXIII	Factor I a Factor XIII
FIa a FXIIIa	Factor I activado a Factor XIII activado
fs	frameshift (cambio del marco de lectura)
FT	Factor tisular
FvW	Factor von Willebrand
Gla	γ-carboxiglutámico
GP	Glicoproteína
HAMSTeRS	The Hemophilia A Mutation, Structure, Test and Resource Site
HIV	Virus de inmunodeficiencia humano
HLA	Antígenos leucocitarios humanos
HGMD	Human Gene Mutation Database
IL	Interleuquina
ins	Inserción
Inv 1	Inversión del intrón 1

Inv 22	Inversión del intrón 22
IVFT	Inhibidor de vía del factor tisular
Kb	Kilobase
KDa	Kilodaltons
ml	Mililitros
MHC	Major Histocompatibility Complex (Complejo Mayor de Histocompatibilidad)
min	Minutos
μl	Microlitro
μM	Micromolar
PA	Péptido de activación
pb	Par de bases
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)
PC	Proteína C
PCa	Proteína C activada
QAPM	Qininógeno de alto peso molecular
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
rpm	Revoluciones por minuto
STR	Short Tandem Repeats (Repeticiones cortas)
TBE	Tampón tris-borato
TE	Tampón tris-EDTA
TNFα	Tumor necrosis factor (Factor de necrosis tumoral)
TXA ₂	Tromboxano A ₂
UB	Unidad Bethesda

II. BASES DE DATOS DE MUTACIONES CONSULTADAS EN ESTE TRABAJO

- The Hemophilia A Mutation, Structure, Test and Resource Site (HAMSTeRS):

<http://www.europium.csc.mrc.ac.uk>

- Haemophilia B Mutation Database:

<http://www.klc.ac.uk/ip/petergreen/haemBdatabase.html>

- Human Gene Mutation Database (HGMD):

<http://archive.uwcm.ac.uk/uwcm/mg/search/119124.html>

III. CÓDIGO GENÉTICO

	T	C	A	G
T	TTT Phe (F) TTC " TTA Leu (L) TTG "	TCT Ser (S) TCC " TCA " TCG "	TAT Tyr (Y) TAC TAA Ter TAG Ter	TGT Cys (C) TGC TGA Ter TGG Trp (W)
C	CTT Leu (L) CTC " CTA " CTG "	CCT Pro (P) CCC " CCA " CCG "	CAT His (H) CAC " CAA Gln (Q) CAG "	CGT Arg (R) CGC " CGA " CGG "
A	ATT Ile (I) ATC " ATA " ATG Met (M)	ACT Thr (T) ACC " ACA " ACG "	AAT Asn (N) AAC " AAA Lys (K) AAG "	AGT Ser (S) AGC " AGA Arg (R) AGG "
G	GTT Val (V) GTC " GTA " GTG "	GCT Ala (A) GCC " GCA " GCG "	GAT Asp (D) GAC " GAA Glu (E) GAG "	GGT Gly (G) GGC " GGA " GGG "

uation of 35 patients.¹¹ Results obtained from extra-medullary sites and HMCL, of which more than 85% of cases express CD221, always at high levels, suggest that CD221 expression could be upregulated during disease progression and associated with a more aggressive disease, and facilitates cell growth *in vitro*, in agreement with the biology of IGF-1 in mouse models.^{4,5}

We found that CD221 expression was not random but correlated with t(4,14) and t(14,16) translocations, translocations generally associated with poorer prognosis in patients.¹⁰ It also seemed that CD221 expression was related to disease severity, although given the small number of patients and their non-uniform treatment management, survival data should be interpreted cautiously. To conclude, the CD221 phenotype should be systematically evaluated in myeloma patients, and this receptor could be an ideal therapeutic target in patients, as recently shown.¹¹

Régis Bataille,* Nelly Robillard,* Hervé Avet-Loiseau,*
Jean-Luc Harousseau,° Philippe Moreau°

*Central Laboratory of Hematology and INSERM UMR 601,
Institute of Biology; °Department of Clinical Hematology,
Hôtel Dieu, Nantes, France

Key words: CD221, IGF-1R, 14q32, myeloma.

Funding: supported by the Ligue Nationale Contre Le Cancer (équipe labélisée 2004).

Correspondence: Régis Bataille, Laboratory of Hematology, 9 quai Moncoussu, 44093 Nantes cedex 01, France/Philippe Moreau, Department of Clinical Hematology, University Hospital, place Alexis Ricordeau 44093 Nantes cedex 01, France. Phone: international +33.2.40084768. Fax: international +33.2.40084778. E-mail: r-bataille@nantes.fnclcc.fr/philippe.moreau98@wanadoo.fr

References

- Freund GG, Kulas DT, Mooney RA. Insulin and IGF-1 increase mitogenesis and glucose metabolism in the multiple myeloma cell line, RPM18226. *J Immunology* 1993;151:1811-20.
- Georgii-Hemming P, Jernberg Wiklund H, Ljunggren O, Nilsson K. Insulin-like growth factor I is a growth and survival factor in human multiple myeloma cell lines. *Blood* 1996;88:2250-58.
- Ferlin M, Noraz N, Hertogh C, Brochier J, Taylor N, Klein B. Insulin-like growth factor induces the survival of proliferation of myeloma cells through an interleukin-6-independent transduction pathway. *Br J Haematol* 2000;111:626-34.
- Vanderkerken K, Asosingh K, Braet F, Van Riet I, Van Camp B. Insulin-like growth factor-1 act as a chemoattractant factor for 5T2 multiple myeloma cells. *Blood* 1999;93:235-41.
- Ge NL, Rudikoff S. Insulin-like growth factor I is a dual effector of multiple myeloma cell growth. *Blood* 2000;96:2856-61.
- Mitsiades CS, Mitsiades N, Poulaki V, Schollossman R, Akiyama M, Chauhan D, et al. Activation of NF- κ B and upregulation of intracellular anti-apoptotic proteins via the IGF-1/Akt signaling in human multiple myeloma cells: therapeutic implications. *Oncogene* 2002;21:5673-83.
- Harousseau JL, Shaughnessy J Jr, Richardson P. Multiple myeloma. *Hematology* 2004:237-56.
- Jego G, Bataille R, Pellat-Deceunynck C. Interleukin-6 is a growth factor for non malignant human plasmablasts. *Blood* 2001;97:1817-22.
- Robillard N, Avet-Loiseau H, Garand R, Moreau P, Pineau D, Rapp MJ, et al. The expression of CD20 is aberrant, significantly associated with a small mature plasma-cell morphology, t(11;14) and good survival in multiple myeloma. *Blood* 2003;102:1070-1.
- Moreau P, Facon T, Leleu X, Morineau N, Huyghe P, Harousseau JL, et al. Recurrent 14q32 translocations determine the prognosis of multiple myeloma, especially in patients receiving intensive therapy. *Blood* 2002;100:1579-83.
- Mitsiades CS, Mitsiades NS, McMullan CJ, Poulaki V, Shringarpure Akiyama M, Hideshima T, et al. Inhibition of the insulin-like growth factor receptor-1 tyrosine kinase activity as a therapeutic strategy for multiple myeloma, other hematologic malignancies, and solid tumors. *Cancer Cell* 2004;5:221-30.

Disorders of Hemostasis

The spectrum of mutations in Southern Spanish patients with hemophilia A and identification of 28 novel mutations

The aim of this study was to analyze the mutation pattern causing hemophilia A in a population from Southern Spain. Mutation analysis identified the mutation in 99 of the 109 unrelated patients enrolled in the Hemophilia Registry from Andalusia. About 54% of non-inversion mutations identified were previously unreported.

haematologica 2005; 90:707-710

(<http://www.haematologica.org/journal/2005/5/707.html>)

Hemophilia A (HA) is an X-linked bleeding disorder caused by a wide spectrum of mutations in the coagulation factor VIII (F8) gene (MIM # 306700). In the severe phenotype, the most prevalent mutations are the intron 22 (IVS22) and intron 1 (IVS1) inversion accounting for 40-50% and 5% of the mutations, respectively.^{1,2} Apart from these inversions, no mutation hotspots have been identified. Approximately 30% of all distinct point mutations in HA occur at CpG sites.³

The aim of this study was to analyze the mutation pattern causing HA in a population from Southern Spain. The study included a consecutive series of 109 unrelated males with HA (55 severe, 8 moderate and 46 mild phenotypes) enrolled in the Hemophilia Registry from Andalusia (Southern Spain). Forty were sporadic cases with no previous family history and 69 had a positive family history. Genealogical investigations conducted for each patient's family did not disclose any common ancestor in three generations.

Among the 55 patients with severe HA, of which 27 were sporadic cases (49%) and 28 had a positive family history (51%), the prevalence of IVS22⁴ and IVS1² inversion was 36% (20 patients) and 5% (3 patients), respectively. The IVS22 frequency was relatively low in comparison with the prevalence reported in other studies in the Spanish population.¹ Nevertheless, the number of patients in the group is too small to determine whether the frequency is statistically lower. When the correlation between familial or sporadic inheritance of the disease was analyzed, no significant differences were observed (11 and 9, respectively).

In patients with inversion-negative, severe or moderate-mild HA, we sequenced the F8 gene (exons and intron/exon splice junctions) following standard protocols using previously described primers.⁵ Among 32 patients with severe HA, the mutation was identified in 26 and 23 different mutations were found, 15 (65%) of which had not been previously reported;^{6,7} none of these mutations affected the CpG sites. The novel mutations comprised 5 frameshift mutations, 4 nonsense mutations, 5 missense mutations and 1 mutation affecting the splicing sites (Table 1). Among 54 patients with moderate-mild HA, 12 sporadic cases (22%) and 42 with positive family history (78%), the mutation was identified in 50 patients and 29 different mutations were found (Table 2), all of them missense mutations. Thirteen (45%) of the 29 mutations identified were novel^{6,7} and only one affected the CpG site. All the detected mutations were confirmed through two independent polymerase chain reaction

Table 1. Summary of F8 mutations in severe hemophilic males. Novel mutations in boldface type. Transient: antibody that disappears over a period of 6 months.

ID number	Exon	Mutation	Amino acid substitution	Affected domain	CpG	Inhibitor	Family history
A-304	4	515G→T	C153F (TGC→TTC)	A1	No	No	Positive
A-021	4	515G→T	C153F (TGC→TTC)	A1	No	No	Positive
A-195	4	557_559delACT	D167fs	All	No	No	Positive
A-113	Intron 4	IVS4-1G→A	Splicing	All	No	No	Sporadic
A-121	6	741G→A	W228X (TGG→TGA)	All	No	No	Positive
A-045	10	1487delC	P477fs	A2, B, A3, C1, C2	No	Transient	Sporadic
A50	14	2440C→T	R795X (CGA→TGA)	B, A3, C1, C2	Yes	No	Sporadic
A-232	14	2526_2527delAG	G823fs	B, A3, C1, C2	No	No	Positive
A-017	14	3305_3306insAAAGAGGG	G1083fs	B, A3, C1, C2	No	No	Sporadic
A-060	14	3637delA	I1194fs	B, A3, C1, C2	No	No	Sporadic
A-041	14	3637delA	I1194fs	B, A3, C1, C2	No	No	Positive
A-43	14	4491_4492delTG	T1478fs	B, A3, C1, C2	No	No	Sporadic
A-247	15	5260T→C	F1735L (TTC→CTC)	A3	No	No	Sporadic
A-019	15	5291A→G	Q1745R (CAG→CGG)	A3	No	No	Positive
A-011	15	5301C→G	Y1748X (TAC→TAG)	A3, C1, C2	No	Transient	Positive
A-359	16	5508G→A	W1817X (TGG→TGA)	A3, C1, C2	No	No	Sporadic
A-125	17	5592delA	K1845fs	A3, C1, C2	No	No	Sporadic
A-149	18	5878C→T	R1941X (CGA→TGA)	A3, C1, C2	No	No	Sporadic
A-111	18	5881T→C	W1942R (TGG→CGG)	A3	No	No	Sporadic
A-059	18	5924T→A	I1956N (ATT→AAT)	A3	No	No	Positive
A-005	21	6250A→T	K2065X (AAG→TAG)	C1, C2	No	No	Sporadic
A-293	21	6266G→A	W2070X (TGG→TAG)	C1, C2	No	No	Sporadic
A-028	23	6496C→T	R2147X (CGA→TGA)	C1, C2	Yes	Transient	Sporadic
A-288	23	6496C→T	R2147X (CGA→TGA)	C1, C2	Yes	Transient	Sporadic
A-065	25	6748C→T	Q2231X (CAA→TAA)	C2	No	No	Positive
A-042	26	6976C→T	R2307X (CGA→TGA)	C2	Yes	No	Positive

assays from different blood samples. R593C was the mutation most frequently found. The prevalence of this mutation in our population is unusually high and, although this may well be in part due to a founder effect, this hypothesis has not been studied.

About 30% of hemophilic patients develop polyclonal IgG inhibitory antibodies directed against the exogenic factor VIII. In our patients, 5 of 55 patients with severe HA (9%) and 3 of 54 (5.5%) with moderate-mild disease developed inhibitors. Only one patient with IVS22 developed factor VIII inhibitors; therefore, the presence of IVS22 is not a major predisposing factor to inhibitor development in our population. Three patients with the R2150H mutation developed inhibitor antibodies. R2150H mutation may affect the tertiary structure of the molecule and alter the immunogenicity of the FVIII protein. R593C has also been reported in association with inhibitor; however, neither of our patients developed inhibitors.

We described 19 novel missense mutations and only one affecting the CpG sites. These mutations were identified in both the heavy and light chains, and in all but the B domain.⁸ This fact reinforces the idea that single nucleotide substitutions within this domain are largely unimportant. In the present study the relationship between the novel missense mutations and the disease was indicated by several investigations: (i) mutations were not detected in 50 female controls; (ii) in hemophilics with a family history, we performed a segregation analysis of the mutation; (iii) in hemophilics with no

previous family history, all missense mutations were at positions preserved in murine, pig, canine and human genomes.⁶ In conclusion, we report here the results of an analysis of the F8 gene mutations in Southern Spanish patients with HA. Mutation analysis identified the mutation in 99 of the 109 hemophilic males (91%). This frequency is similar to those previously described by other authors.^{9,10} About 54% of non-inversion mutations identified were previously unreported. We failed to identify the mutation in ten patients. Rearrangements in introns other than 22 or 1, or mutations affecting the promoter or intronic regions could be responsible for the disease in these cases. Such mutations are not currently part of routine screening of F8 gene.

Olga Fernández-López,* José-Raúl García-Lozano,*
Ramiro Núñez-Vázquez,^o Rosario Pérez-Garrido,^o
Antonio Núñez-Roldán*

*Servicio de Inmunología and ^oUnidad de Hemofilia del Servicio de Hematología, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Avda Manuel Siurot s/n, 41013 Sevilla, Spain

Funding: this study was partly funded with grants from the Junta de Andalucía (34/01) and the Plan Andaluz de Investigación (CTS-197). Olga Fernández-López is the recipient of a fellowship from Novo Nordisk.

Acknowledgments: we are grateful to the hemophilia centers from Andalusia for their collaboration in the development of the Hemophilia Registry of Andalusia. We also thank Dr. Guillermo Antúñolo and Dr. Irene Marcos for the use of the MegaBASE.

Key words: hemophilia A, factor VIII mutation, F8C.

Table 2. Summary of F8 mutations in moderate-mild hemophilic males. Novel mutations in boldface type.

ID number	Exon	Mutation	Amino acid Substitution	Affected Domain	CpG	Inhibitor	Family history
A-025	4	396A→C	E113D (GAA→GAC)	A1	No	Yes	Sporadic
A-151	4	538C→T	H161Y (CAT→TAT)	A1	No	No	Positive
A-084	6	755C→T	T233I (ACA→ATA)	A1	No	No	Positive
A-128	7	854T→C	V266A (GTG→GCG)	A1	No	No	Positive
A-089	7	878A→T	H274L (CAC→CTC)	A1	No	No	Positive
A-266	7	923C→T	S289L (TCG→TTG)	A1	Yes	No	Positive
A-342	8	1195A→G	F380V (AAA→GAA)	A2	No	No	Positive
A-221	10	1505T→A	V483D (GTC→GAC)	A2	No	No	Positive
A-009	12	1834C→T	R593C (CGC→TGC)	A2	Yes	No	Positive
A-039	12	1834C→T	R593C (CGC→TGC)	A2	Yes	No	Positive
A-040	12	1834C→T	R593C (CGC→TGC)	A2	Yes	No	Sporadic
A-061	12	1834C→T	R593C (CGC→TGC)	A2	Yes	No	Positive
A-260	12	1834C→T	R593C (CGC→TGC)	A2	Yes	No	Positive
A-298	12	1834C→T	R593C (CGC→TGC)	A2	Yes	No	Positive
A-365	12	1834C→T	R593C (CGC→TGC)	A2	Yes	No	Positive
A-189	12	1834C→T	R593C (CGC→TGC)	A2	Yes	No	Positive
A-173	12	1834C→T	R593C (CGC→TGC)	A2	Yes	No	Sporadic
A-035	13	2043G→A	M662I (ATG→ATA)	A2	No	No	Sporadic
A-392	14	2167G→A	A704T (GCC→ACC)	A2	Yes	No	Positive
A-183	14	2213A→G	Y719C (TAC→TGC)	A2	No	No	Sporadic
A-358	14	3780C→G	D1241E (GAC→GAG)	B	No	No	Positive
A-368	14	3780C→G	D1241E (GAC→GAG)	B	No	No	Positive
A-136	14	5144G→A	R1696Q (CGA→CAA)	A3	Yes	No	Positive
A-387	15	5305G→A	G1750R (GGA→AGA)	A3	No	No	Positive
A-336	16	5399G→A	R1781H (CGT→CAT)	A3	Yes	No	Positive
A-281	16	5420G→C	S1788T (AGC→ACC)	A3	No	No	Sporadic
A-096	16	5428T→C	S1791P (TCT→CCT)	A3	No	No	Positive
A-215	16	5428T→C	S1791P (TCT→CCT)	A3	No	No	Positive
A-390	16	5527G→A	A1824T (GCA→ACA)	A3	No	No	Positive
A-037	16	5531C→T	P1825L (CCC→CTC)	A3	No	No	Positive
A-309	16	5531C→T	P1825L (CCC→CTC)	A3	No	No	Positive
A-027	18	5954G→A	R1966Q (CGA→CAA)	A3	Yes	No	Positive
A-030	18	5954G→A	R1966Q (CGA→CAA)	A3	Yes	No	Positive
A-417	18	5954G→A	R1966Q (CGA→CAA)	A3	Yes	No	Positive
A-155	18	5954G→A	R1966Q (CGA→CAA)	A3	Yes	No	Positive
A-323	19	6046C→T	R1997H (CGG→TGG)	A3	Yes	No	Positive
A-064	19	6046C→T	R1997H (CGG→TGG)	A3	Yes	No	Positive
A-134	19	6046C→T	R1997H (CGG→TGG)	A3	Yes	No	Positive
A-046	23	6506G→A	R2150H (CGT→CAT)	C1	Yes	No	Positive
A-194	23	6506G→A	R2150H (CGT→CAT)	C1	Yes	Yes	Positive
A-209	23	6506G→A	R2150H (CGT→CAT)	C1	Yes	No	Positive
A-410	23	6506G→A	R2150H (CGT→CAT)	C1	Yes	Yes	Positive
A-245	23	6506G→A	R2150H (CGT→CAT)	C1	Yes	No	Positive
A-014	23	6506G→A	R2150H (CGT→CAT)	C1	Yes	Yes	Positive
A-078	23	6551A→T	E2165V (GAG→GTG)	C1	No	No	Sporadic
A-129	24	6623A→G	Q2189R (CAG→CGG)	C2	No	No	Sporadic
A-068	24	6622C→G	Q2189E (CAG→GAG)	C2	No	No	Positive
A-024	25	6744G→T	W2229C (TGG→TGT)	C2	No	No	Sporadic
A-120	25	6821T→A	M2255K (ATG→AAG)	C2	No	No	Positive
A-081	26	7028T→C	L2324P (CTG→CCG)	C2	No	No	Positive

Correspondence: José-Raúl García-Lozano, Servicio de Inmunología, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Avda Manuel Siurot s/n, 41013 Sevilla, Spain.
Phone: international +34.955013223. Fax: international +34.955013224. E-mail: jraul.garcia.sspa@juntadeandalucia.es

References

- Antonarakis SE, Rossiter JP, Young M, Horst J, de Moerloose P, Sommer SS, et al. Factor VIII gene inversions in severe hemophilia A: results of an international consortium study. *Blood* 1995;86:2206-12.
- Bagnall RD, Waseem N, Green PM, Giannelli F. Recurrent inversion breaking intron 1 of the factor VIII gene is a frequent cause of severe hemophilia A. *Blood* 2002;99:168-74.
- Youssoufian H, Kazazian HH, Phillips DG, Aronis S, Tsiftis G, Brown VA, et al. Recurrent mutations in haemophilia A give evidence for CpG mutation hotspots. *Nature* 1986;324:380-2.
- Liu Q, Nozari G, Sommer SS. Single-tube polymerase chain reaction for rapid diagnosis of the inversion hotspot of mutation in hemophilia A. *Blood* 1998;92:1458-9.
- David D, Moreira I, Lalloz MR, Rosa HA, Schwaab R, Morais S, et al. Analysis of the essential sequences of the factor VIII gene in twelve haemophilia A patients by single-stranded conformation polymorphism. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1994; 5:257-64.

6. MRC Haemostasis and Thrombosis Database Resource Sites. [Http://europium.csc.mrc.ac.uk](http://europium.csc.mrc.ac.uk)
7. Stenson PD, Ball EV, Mort M, Phillips AD, Shiel JA, Thomas NS, Abeyasinghe S, Krawczak M, Cooper DN. Human Gene Mutation Database (HGMD): 2003 update. *Hum Mutat* 2003; 21:577-81.
8. Lenting PJ, van Mourik JA, Mertens K. The life cycle of coagulation factor VIII in view of its structure and function. *Blood* 1998;92:3983-96.
9. Cutler JA, Mitchell MJ, Smith MP, Savidge GF. The identification and classification of 41 novel mutations in the factor VIII gene (F8C). *Hum Mut* 2002;19:274-8.
10. Citron M, Godmilow L, Ganguly T, Ganguly A. High throughput mutation screening of the factor VIII gene (F8C) in hemophilia A: 37 novel mutation and genotype-phenotype correlation. *Hum Mut* 2002;20:267-74.

Platelets

Increased glycofalin index and normal thrombopoietin levels in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura with a decreased rate of platelet production

Platelet kinetic studies in idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP) have shown that in a subgroup of patients a shortened mean platelet life (MPL) is associated with a decreased platelet production rate (PPR).¹ Other methods of studying certain aspects of thrombopoiesis are the plasma concentrations of thrombopoietin and glycofalin.

haematologica 2005; 90:710-711
<http://www.haematologica.org/journal/2005/5/710.html>

Clinical studies have shown elevated plasma levels of thrombopoietin in conditions with diminished megakaryocyte production.² Glycofalin is the soluble, external part of membrane glycoprotein Ib α (GPIb α). The glycofalin-index, normalized for individual platelet count, has been introduced as a parameter of platelet turnover.³ We investigated thrombopoietin and glycofalin levels in ITP patients and correlated them to the platelet kinetic parameters MPL and PPR. *Platelet kinetic studies.* In order to study platelet kinetics, autologous platelets were labeled with Indium-111 tropolonate according to the recommendations of the International Committee for Standardization in Hematology.⁴ The platelet production rate (PPR) is defined as the number of platelets entering the circulation to maintain the platelet count. The normal values of PPR is 223 $\times 10^9$ /day (158-268) and the normal mean platelet life (MPL) is 9.2 \pm 1.4 days (8.9-9.4).⁵

Plasma thrombopoietin concentrations were determined with an enzyme-linked immunosorbent assay (Quantikine, R&D systems, Minneapolis, USA). The normal value in this assay is 114 pg/mL (93-146). Plasma glycofalin concentrations were measured by enzymatic immunoassay (Takara Shuzo Co, Ltd). The glycofalin index is derived from the glycofalin value (mg³/mL) $\times 250 \times 10^9$ /L divided by the individual platelet count. The normal value is 0.7 (0.6-0.9).

Data are presented as the median with 25th and 75th percentiles. Statistical analysis was performed using Kruskal-Wallis non-parametric analysis of variances and the Wilcoxon two-sample test. Correlations were assessed with Spearman's rank correlation procedure. A *p*-value of <0.05 was considered statistically significant,

Table 1. Characteristics of patients.

	Production decreased	Production normal or increased	<i>p</i>
Patients, n	9	26	
Female	4	16	
Age, years	62 (30-68)	44 (32-67)	0.9
Platelet count at diagnosis, $\times 10^9$ /L	22 (13-46)	63 (43-89)	0.02
Mean platelet life, days	2.6 (1.4-3.7)	1.9 (1.1-3)	0.5
Platelet production rate, 10^9 /d	100 (88-145)	255 (188-325)	0.004
Thrombopoietin, pg/mL	109 (71-172)	111 (64-171)	0.8
Glycofalin-index	12 (7-25)	5 (3-10)	0.03

Results are expressed as median (25th/75th percentile).

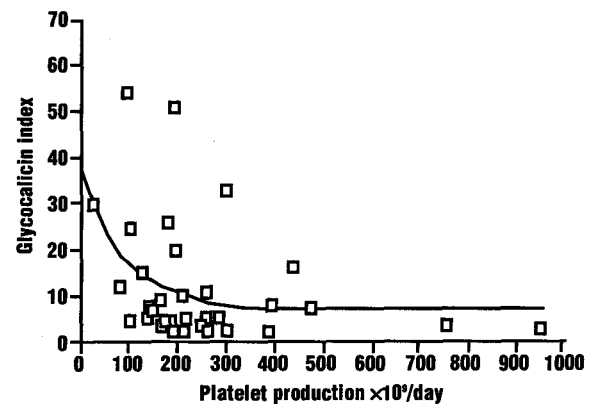


Figure 1.

and all tests were two-sided. After informed consent, 35 patients (20 women) with ITP were studied. Their mean age was 45 years (32-66) and platelet count at diagnosis was 58 $\times 10^9$ /L (22-85). MPL was 2 days (1.1-3) and PPR was 195 $\times 10^9$ /day (150-300). PPR was reduced in 9 patients whereas in 26 patients it was normal (n=17) or increased (n=9; median 395, min: 300, max: 950 $\times 10^9$ /day). The PPR were not correlated to changes in MPL. Thrombopoietin plasma levels (110 pg/mL, 68-171) were measured in all the studied patients and compared to those in controls (114 pg/mL, 93-146). No statistical difference was observed (*p*=0.7). In addition, there was no significant difference in thrombopoietin plasma levels in patients with a normal or increased PPR, (111 [64-171]) vs a reduced PPR (median 109 [71-172], *p*=0.8).

The glycofalin index was 5 (4-13). A significant correlation was observed between this index and PPR (Figure 1; *p*=0.03). In patients with a normal or increased PPR, the glycofalin index was 5 (3-10), whereas it was 12 (7-25) in patients with a decreased PPR (*p*=0.03). No significant correlation was observed between the glycofalin index and MPL (*p*=0.08). Patients with a MPL ≤ 2 days demonstrated a glycofalin index of 7 (3-26) compared to 5 (4-

LETTER TO THE EDITOR

Characterization of sequence breakpoints in two haemophiliac patients with large FVIII gene deletions

O. FERNÁNDEZ-LÓPEZ,*¹ J. R. GARCÍA-LOZANO,*¹ R. NÚÑEZ-VÁZQUEZ,†
R. PÉREZ-GARRIDO† and A. NÚÑEZ-ROLDÁN*

*Servicio de Inmunología, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla; and †Unidad de Hemofilia del Servicio de Hematología, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla, Spain

Haemophilia A is an X-linked bleeding disorder caused by a wide spectrum of mutations in the coagulation factor VIII gene (MIM #306700). The first recurrent FVIII mutation to be recognized was intron 22 inversion (Inv22), which accounts for approximately 45% of severe haemophilia A cases [1]. Bagnall *et al.* [2] described another recurrent FVIII inversion affecting intron 1 (Inv1) that is responsible for up to 5% of severe haemophilia A cases and results from homologous recombination between inversely oriented sequences of 1.2 kb (int1h). Other large deletions account for 1–5% of the mutations causing severe haemophilia A [3]; however, the molecular mechanisms of excision and rejoining still remain quite unexplored. In the present study, we have mapped two different partial deletions within the FVIII gene in two patients with severe haemophilia A. Neither of the patients had Inv22 or Inv1.

Our subjects were two unrelated patients with severe haemophilia A (FVIII:C < 1%) enrolled in the Haemophilia Registry of Andalucía (Southern Spain) [4]. In Patient 1, all exons were amplified except for the amplicon involving exons 8–9. Exons 8 and 9 were not amplified separately, suggesting a deletion affecting these exons. To delineate the deletion breakpoint regions, we mapped intron 7 with three primer pairs. Polymerase chain reaction (PCR; Table 1) products of the expected size were obtained by all three primer pairs, suggesting that this region was not involved in the deletion. However, the

combination of primer Int7-3F with E10-2 yielded a deletion-specific product of 3300 bp (data not shown). This primer pair amplifies a wild-type fragment of 6500 bp, predicting a deletion of about 3200 bp. We sequenced the deletion-specific product to localize the breakpoints. The 5'-breakpoint was localized inside exon 8 at nucleotide 59 318 while the 3'-breakpoint occurred in intron 9 at nucleotide 62 505. Therefore, the 3185-bp deletion includes a portion of exon 8 and all of exon 9. Sequence analysis revealed a 3-bp region of homology (GCC) at the junction site (Figure 1).

In Patient 2, all exons were amplified except for exon 15. This exon consistently failed to amplify, suggesting the presence of a deletion affecting only exon 15. To delineate the breakpoint regions, we first mapped intron 14 with seven primer pairs (Table 1). PCR products of the expected size were obtained by primer pairs Int14-1F/Int14-1R, Int14-2F/Int14-2R, but no amplicons were generated by the remaining primer pairs. Secondly, we mapped intron 15 with three primer pairs (Table 1) and obtained PCR products of the expected size in all the pairs. In order to amplify a junction fragment, we combined primer Int14-2F with Int15-1R. A PCR product of 600 bp was obtained. The primer pair amplified a wild-type fragment of 7900 bp, predicting a deletion of about 7300. We sequenced the junction fragment of 600 bp to localize the breakpoints. The 5'-breakpoint was identified in intron 14 at nucleotide 111 980, and the other in intron 15 at nucleotide 119 463. We found that 7289 bp were deleted and replaced with a 56-bp sequence. This DNA region is extremely A + T rich and contains two 9-bp tandem copies (TTTTATATA; Figure 2).

In addition to the breakpoint analysis, we designed a specific PCR test for each of the families to detect carrier female members. In carrier analysis of families with large deletions in the FVIII gene, the

¹Both authors contributed equally to this study.

Correspondence: J. Raúl García-Lozano, Servicio de Inmunología, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Avda Manuel Siurot s/n, 41013 Sevilla, Spain.
Tel.: + (34) 955013223; fax: + (34) 955013221;
e-mail: jraul.garcia.sspa@juntadeandalucia.es

Accepted after revision 14 May 2007

Table 1. Primers used for characterizing the FVIII deletions were designed based on the genomic sequence deposited in the GenBank database (AY769950).

Primers	Sequence 5' to 3'	Genomic location	GenBank nucleotides
Int 7-1F	TGAAAGGACTATTTGG	Intron 7	57 127-57 142
Int7-1R	GGTGAAATGATGATGCAATCT	Intron 7	57 257-57 277
Int 7-2F	ATAGCATTTCCTTCTCCTATTACT	Intron 7	57 800-57 824
Int 7-2R	AGGTCTTGTCAAAATTCAT	Intron 7	57 991-58 010
Int 7-3F	TGATCTTCAAAATTGCCCTG	Intron 7	58 384-58 403
Int 7-3R	CCAAGTTCATAAAACCATGACA	Intron 7	58 555-58 576
Int 9-4	TGATTTGGCTCTCTGTCTG	Intron 9	62 597-62 615
E 10-2	ACTTTAGACTGGAGCTTGAG	Intron 10	64 892-64 873
I 14-1F	TGCTGGCACTTATTCCCACTG	Intron 14	110 718-110 738
I 14-1R	CACAGTTCAAAAGTTGCTTC	Intron 14	110 961-110 980
I 14-2F	TAGTGGAGCTGTGAGAAGAG	Intron 14	111 918-111 937
I 14-2R	CTCCGTGTCTCACATTTAGG	Intron 14	112 119-112 138
I 14-3F	ATTATGCAGTCTCAGGCAG	Intron 14	113 097-113 115
I 14-3R	CTTTATGCCAGTACCATGCT	Intron 14	113 249-113 268
I 14-4F	AACATCGATGAGCCTGGATG	Intron 14	114 319-114 338
I 14-4R	CCACCCCTTCATTTTACACC	Intron 14	114 509-114 528
I 14-5F	CTATGACTAAGAACATGCGG	Intron 14	115 481-115 500
I 14-5R	CATGTGCGGTGTTGAGTCA	Intron 14	115 685-115 703
I 14-6F	ATGTGGGCTTCAGTGTCAAG	Intron 14	116 721-116 740
I 14-6R	CAAACCTGCAAGCAATGTGA	Intron 14	116 881-116 900
I 14-7F	TGGATAGGTGCTCCACA	Intron 14	118 139-118 155
I 14-7R	GTTGGGCGGAATTACTAGG	Intron 14	118 363-118 381
I 15-1F	CGTGTAATCACACAACAG	Intron 15	119 790-119 807
I 15-1R	CTCTCATAAAATGTTTCAGTGGT	Intron 15	119 958-119 980
I 15-2F	ATTCTGCCTATCCAGAG	Intron 15	120 114-120 131
I 15-2R	TCTTTGGTTCACACAATGC	Intron 15	120 234-120 252
I 15-3F	ATTTTAAATCTGAAAAGTAAGCCT	Intron 15	120 414-120 437
I 15-3R	AGGAGAAAATTCCTAAACTCAT	Intron 15	120 569-120 590

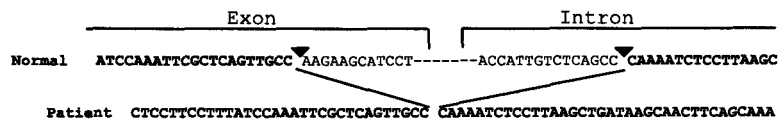


Fig. 1. Gene deletion breakpoints in Patient 1. Breakpoints were characterized by sequencing. The upper sequence is from normal DNA and the lower sequence is from patient's DNA. The 5'-breakpoint was located at base 59 318 in exon 8, and the 3'-breakpoint at base 62 505 in intron 9.

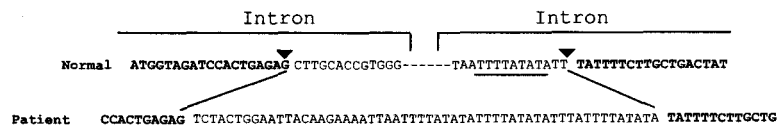


Fig. 2. Gene deletion breakpoints in Patient 2. Breakpoints were characterized by sequencing. The upper sequence is from normal DNA, and the lower sequence is from patient's DNA. The 5'-breakpoint was located at nucleotide 111 980, in intron 14, and the 3'-breakpoint was located at nucleotide 119 463 from the 5'-terminal intron 15. We also detected 56-bp intervening bases at the deletion junction in the patient's FVIII gene.

detection of deletions by screening techniques based on PCR amplification of individual exons is hampered by the presence of a masking normal allele. However, delineation of the breakpoint regions and amplification of rearrangement-specific junction

fragments by PCR can be a useful tool for carrier detection and provides important information for counselling the patient's families.

In Family 1, due to the fact that the Int7-3F and Ex10-2 primers amplified a 3326-bp PCR product,

we designed a new primer (Int9-4) at the 5' closest to the deletion to obtain a 1046-bp PCR product in individuals with the deletion. In individuals without the deletion, the primer pair should amplify a 4234-bp band. However, this band did not amplify under the PCR conditions used; hence, it was necessary to introduce the exon 1 primers as an amplification control. We analysed the DNA of the patient's grandmother, mother and sister, and two healthy controls. The grandmother and mother were carriers of the mutant gene, but the sister was not.

In Family 2, primers Int14-2F and Int15-1R were used for carrier testing, obtaining a 600-bp specific product. As in the other case, these primers should amplify a 7900-bp band, which was not observed with the PCR conditions used; thus, the exon 1 primers were again used as a control. We analysed the DNA of two nieces and two healthy controls. The two nieces were carriers of the mutant gene.

In conclusion, herein we describe two large deletions in two families with haemophilia A. Breakpoint sequences were determined by PCR protocols and sequencing. Thus, we have developed simple, specific PCR tests for the detection of carriers of mutations in

these two families, without the need for other more laborious processes, which provide important information for genetic counselling.

References

- 1 Antonarakis SE, Rossiter JP, Young M *et al.* Factor VIII gene inversions in severe haemophilia A: results of an international consortium study. *Blood* 1995; **86**: 2206–12.
- 2 Bagnall RD, Wassem N, Green PM, Giannelli F. Recurrent inversion breaking intron 1 of the factor VIII gene is a frequent cause of severe haemophilia A. *Blood* 2002; **99**: 168–74.
- 3 Kemball-Cook G, Tuddenham EG, Wacey AI. The factor VIII structure and mutation resource site: HAMSTeRS version 4. *Nucleic Acids Res* 1998; **26**: 216–9. Available at: <http://europium.csc.mrc.ac.uk> (accessed on 2005).
- 4 Fernandez-Lopez O, Garcia-Lozano JR, Nuñez-Vazquez R, Perez-Garrido R, Nuñez-Roldan A. The spectrum of mutations in Southern Spanish patients with hemophilia A and identification of 28 novel mutations. *Haematologica* 2005; **90**: 707–9.



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Reunido el tribunal en el día de la fecha, integrado por los abajo firmantes, para evaluar la tesis doctoral de D. *Olga Fernández López* titulada "*Caracterización de las palmerías griegas en la población de* *Sanlúcar de Barrameda*" acordó otorgarle la calificación de *insuficiente*.

Sevilla, a 13 de *marzo* de 2008.

[Signature]
Vocal,

[Signature]
Vocal,

[Signature]
Vocal,

[Signature]
Presidente,

[Signature]
Secretario

[Signature]
Doctorando,