

Diagnóstico molecular en pacientes y portadoras de hemofilia A y B

Johanna Mantilla-Capacho,* Claudia Patricia Beltrán-Miranda,* Ana Rebeca Jaloma-Cruz*

Introducción

Las hemofilias A y B son los principales trastornos hemorrágicos hereditarios ligados al cromosoma X que se presentan debido a mutaciones en los genes del factor VIII (hemofilia A, HA) y factor IX (hemofilia B, HB), ocasionando una disminución o deficiencia funcional de estas proteínas en plasma. Sus frecuencias son de 1 en 5,000 y 1 en 30,000 varones recién nacidos vivos, respectivamente. Estos genes se localizan en el cromosoma X (Xq28 HA, Xq27 HB) por lo que su patrón de herencia es recesivo ligado al cromosoma X, afectando casi exclusivamente a varones y siendo las mujeres portadoras, con un riesgo del 50% de heredarlo a sus hijos. Por lo anterior es importante brindar el consejo genético, mediante el diagnóstico molecular para identificar las portadoras, la detección de las mutaciones en afectados y la determinación del origen parental de la mutación en los casos esporádicos. Ambas patologías presentan manifestaciones clínicas ocasionadas por la alteración de la coagulación provocando hemorragias prolongadas de todo tipo, particularmente en articulaciones y músculos. La clasificación de la severidad clínica se basa en los valores de la actividad coagulante de los factores VIII (FVIII:C) y IX (FIX:C) circulantes en plasma considerando hemofilia grave con <1% de actividad, entre 1-5% para hemofilia moderada y > 5% - <40% para hemofilia leve.¹⁻²

Bases moleculares de los genes FVIII y FIX

La identificación y clonación de los genes de los factores VIII y IX a principios de los 80's, sirvió como un aporte invaluable para su caracterización. El gen FVIII es uno de los genes de mamíferos más grandes que existen, consta de 186 kb, distribuidas en 26 exones que se transcriben

como un mRNA de 9 kb cuyo producto proteico es de 2,351 aminoácidos. El gen FIX es más pequeño, consta de 34 kb y está compuesto por 8 exones que se transcriben como un mRNA de 2.0 kb, originando una proteína de 461 aminoácidos.¹⁻² Existen diferentes técnicas para el análisis molecular de los genes del FVIII y FIX, dentro de las cuales tenemos la secuenciación que permite la identificación directa de las mutaciones. Entre las técnicas indirectas, mayormente empleadas en hemofilia A, está el análisis de ligamiento mediante distintos marcadores intragénicos como lo son RFLP's (polimorfismos por la longitud variable de fragmentos de restricción) y microsatélites, los cuales son analizados en geles de poliacrilamida nativa.³ Actualmente se han adecuado protocolos basados en la técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) para la detección de mutaciones más frecuentes como las inversiones de los intrones 1 y 22 del gen del factor VIII en pacientes con hemofilia A severa.¹

Marcadores intragénicos en el diagnóstico de portadoras

Los polimorfismos son variaciones naturales en la secuencia del genoma que se encuentran en la población general y pueden emplearse como marcadores para rastrear los genes mutados dentro de las familias afectadas. El grado de informatividad se define como el porcentaje de heterocigosidad en la población para dicho polimorfismo, el cual tiene un valor máximo de 50% en un sistema bialélico (en el caso de los polimorfismos por la longitud de los fragmentos de restricción, RFLP's), que poseen dos alelos definidos por la presencia o ausencia del sitio de restricción. Cuando se encuentra un valor de heterocigosidad cercano a este valor, se incrementa la probabilidad de encontrar ambos alelos dentro de una familia. En el

* División de Genética, Centro de Investigación Biomédica de Occidente. Centro Médico de Occidente, IMSS. Guadalajara, Jalisco, México. Correspondencia y solicitud de sobretiros: Dra. en C. Ana Rebeca Jaloma Cruz. Centro de Investigación Biomédica de Occidente, IMSS. Sierra Mojada 800 Col. Independencia, C.P. 44340, A.P. 31310. Guadalajara, Jalisco, México. Teléfono: + 52-33-3618-9410 Fax: + 52-33-3618-1756 E-mail: arjaloma@cybercable.net.mx

caso del gen FVIII, se han reportado dos marcadores multialélicos generados por la presencia de microsatélites de repetición variable en los intrones 13 y 22, los cuales son los más informativos al poseer entre cuatro y ocho alelos. En nuestra población se ha reportado una heterocigosidad de 41.3% y 52.6% respectivamente.⁴ Para el gen FVIII los RFLP's intragénicos más comúnmente empleados son *AluNI* en intrón 7 y *BclI* en intrón 18, éste último con una informatividad cercana al 50% en diversas poblaciones. Los microsatélites, por sus características como sistemas multialélicos y su identificación directa por PCR, son sin duda la primera elección a utilizar por su elevado grado de informatividad. La mayoría de familias (75%) son informativas para al menos uno o dos polimorfismos y el diagnóstico tiene un porcentaje de error <1%, porque al ser marcadores intragénicos, es mínima la posibilidad de recombinación con el sitio de la mutación, con el que se asume un desequilibrio de ligamiento. También se han empleado otros microsatélites extragénicos muy informativos como el St14 localizado en el locus DXS52, encontrándose una heterocigosidad de 83% y siendo uno de los marcadores con mayor informatividad descritos en nuestra población.⁴ Sin embargo, el riesgo de error es mayor (2-6%) por la posibilidad de recombinación, lo cual depende del número de meiosis por la localización del marcador en cuestión con el sitio de la mutación. Con respecto al gen FIX, se emplean distintos polimorfismos intragénicos, siendo los más informativos: en región promotora *NruI*, *SalI* y *BamHI*; en regiones intrónicas, un polimorfismo tetralélico por la Inserción/Delección de 50 pb en intrón I, *TaqI* en intrón IV y *HhaI* en región 3' terminal. Sus frecuencias se conocen principalmente en poblaciones asiáticas y europeas, con una informatividad entre el 30-80%, dependiendo el marcador y al ser todos intragénicos, su riesgo de error es menor del 1%.³

Inversión de los intrones 1 y 22 en el gen del factor VIII

Desde 1994 se identificó en pacientes con hemofilia A severa, un mecanismo de mutación debido a una inversión en el intrón 22 del gen FVIII, que es considerado como el único sitio o punto caliente de mutaciones. Se realizaron estudios para la identificación de mutaciones a lo largo de la región codificadora en el mRNA del FVIII y se encontró una interrupción entre los exones 22 y 23, en el 50% de los pacientes con hemofilia A severa, ocasionada por la recombinación homóloga entre el F8A, uno de los dos genes anidados en el intrón 22 del gen FVIII y una de las dos copias del mismo gen F8A que se encuentran en la región telomérica, a unos 500kb del gen FVIII, lo cual lleva a una interrupción de la secuencia, originando la ausencia completa del producto proteico. Recientemente se detectó

un rearrreglo semejante que provoca la ruptura del gen FVIII en el intrón 1, originando el 5% de los casos de hemofilia A severa en poblaciones caucásicas. El rearrreglo, es también ocasionado por la recombinación homóloga entre una región del intrón 1 dentro del gen FVIII y otra región repetida en telómero, provocando asimismo una orientación invertida de ese segmento en el gen original y la imposibilidad de traducción para la generación del producto proteico. La alta frecuencia de las inversiones en intrón 22 y en menor grado en intrón 1, así como su factibilidad técnica de detección por PCR, las sitúa como las primeras estrategias de elección en la detección de mutaciones en casos severos de hemofilia A y de aplicación directa en el diagnóstico de portadoras, con un gran valor sobre todo en casos esporádicos que constituyen el 30%, un alto porcentaje donde no es posible el empleo de un diagnóstico indirecto para la identificación de portadoras.^{1,3}

Secuenciación de los genes de los factores VIII Y IX

La secuenciación es la estrategia de elección para la caracterización de las mutaciones en los genes de los factores VIII y IX, que nos permite visualizar en forma directa su localización y el tipo de rearrreglo genético involucrado. Es el método diagnóstico de mayor precisión para la detección de portadoras, con una confiabilidad mayor del 99% y es la herramienta básica para el conocimiento de la etiología molecular de la enfermedad. El gen FIX muestra una gran heterogeneidad mutacional, siendo las más comunes las mutaciones de tipo puntual, ocupando el primer lugar las transiciones seguidas de las transversiones. En el caso del gen FIX la secuenciación es un método de diagnóstico molecular accesible por el tamaño de sus regiones codificadora y promotora (2.2 kb), donde se localizan más del 96% del total de las mutaciones causantes de hemofilia B, por lo cual se plantea como una estrategia de elección factible en el diagnóstico de portadoras, sobre todo en casos esporádicos.⁵ En un grupo de 10 pacientes mexicanos se detectaron las mutaciones causantes de hemofilia B y con ello se logró el diagnóstico de portadoras en 100% de las familias. Además la caracterización de estas mutaciones permitió la identificación de un patrón mutacional en población mexicana, el cual parece ser propio de poblaciones latinoamericanas y no había sido descrito anteriormente.⁵ En el caso del FVIII su patrón mutacional es diferente, porque aunque también predominan las mutaciones puntuales, se ha identificado como sitio "hotspot" de mutaciones el intrón 22 y la mayoría de mutaciones puntuales se localiza en el exón 14 que tiene un gran tamaño respecto al resto de las regiones codificadoras. Una desventaja para la secuenciación del gen del FVIII es su gran tamaño, debido a que aunque se

dirija el análisis a la región codificadora (9kb) es considerablemente grande y se requieren al menos 50 reacciones de PCR y secuenciación para cubrir su rastreo.

Conclusiones y perspectivas

Los avances en la ciencia y la tecnología permiten situar actualmente las perspectivas más amplias con que ha contado la hemofilia hasta el momento. Por un lado, se cuenta con un mejor manejo del paciente, porque el conocimiento de la naturaleza del defecto genético permite reducir considerablemente los riesgos de complicaciones clínicas como el desarrollo de inhibidores, principalmente asociado a las inversiones en intrón 22 en hemofilia A severa. Por otra parte, nos brinda la posibilidad preventiva al contar con estrategias diagnósticas de detección de portadoras, lo cual ha permitido establecer estrategias de diagnóstico precoz, como el diagnóstico prenatal o preimplantación. Actualmente, la aportación de la medicina genómica aplicada a la hemofilia, permitirá definir la interacción del defecto genético primario con otros genes que parecen modificar el comportamiento clínico de los pacientes. La adecuada caracterización molecular y subcelular, además será la base de la implementación de estrategias terapéuticas de vanguardia como la terapia

génica, que está actualmente en etapa de experimentación clínica.

Sin duda, la implementación de todas estas estrategias debe realizarse en conjunto con los esfuerzos de un manejo integral de la hemofilia, así como la organización de las asociaciones civiles para promover la educación en hemofilia y la identificación completa de pacientes y familias para la integración de un censo nacional, que permitirá definir las estrategias de diagnóstico, manejo y tratamiento de la mejor calidad en la población con hemofilia de México.

Referencias

1. **Haig H, Kazazian Jr.** Hemophilia A: Deficiency of Coagulation Factor VIII. En: *The metabolic basis of inherited disease*. Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. (Eds). Mc Graw Hill. Inc. 8th. Edition, New York, 2001. p. 4367-4392.
2. **Pollak ES and High KA.** Hemophilia B: Factor IX Deficiency. En: *The metabolic basis of inherited disease*. Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. (Eds). Mc Graw Hill. Inc. 8th. Edition New York, 2001, p. 4393-4413.
3. **Peake IR, Lillicrap DP, Boulyjenkov V, Briet E, Chan V, Ginter EK, Kraus EM, Ljung R, Mannucci PM, Nicoladies K and Tuddenham EGD.** Hemophilia: strategies for carrier detection and prenatal diagnosis. *Bulletin of the World Health Organization*, 1993; 71: 429-458.
4. **Martínez-Gallegos R, Benítez-Arana H, Navarrete C, Peñaloza-Espinoza R, Salamanca-Gómez F, Arenas-Aranda D.** Polymorphism distribution of Int13, Int22, and St14 VNTRs in a Mexican population and their application in carrier diagnosis of hemophilia A. *Am J Hematol*. 2004; 77: 1-6.
5. **Jaloma-Cruz AR, Scaringe WA, Roberts S, Li S, Barros-Núñez P, Figueroa LE, Rivas F, Cantú JM and Sommer SS.** Nine independent F9 mutations in the Mexican hemophilia B population: Non-random recurrences of point mutation events in the human germline. *Hum Mut*. 2000; 15: 116-117.