

## Estudio familiar de las hemofilias A y B: 5 años de experiencia en la detección de portadoras

### Family study of hemophilia A and B: 5 years of experience in carrier detection

Lic. Yaixa Piloto Roque<sup>I</sup>; DrC. Teresa Collazo Mesa<sup>I</sup>; Téc. Manuel Gómez Martínez<sup>I</sup>; Téc. Yadira Hernández Pérez<sup>I</sup>; Lic. Yulemi González Quesada<sup>I</sup>; Téc. Ilienís Giraldo Rico<sup>I</sup>; Téc. Lídice Reyes Navarro<sup>I</sup>

<sup>I</sup>Centro Nacional de Genética Médica. Centro Colaborador de la OMS para el desarrollo de enfoques genéticos en la promoción de salud.

---

#### RESUMEN

La hemofilia se caracteriza por ser una enfermedad congénita del trastorno de la coagulación y constituye un desorden recesivo ligado al cromosoma X. El estudio molecular se realiza por estudios indirectos por ser causada por mutaciones heterogéneas en los genes del FVIII y FIX. Se realizó el estudio de 40 familias afectadas con hemofilia A (HA) y 10 hemofilia B (HB). La extracción de ADN se realizó por el método de precipitación salina a 293 muestras de sangre y 19 de líquido amniótico, y se hizo el análisis de los polimorfismos St14, Bcl I y Hind III para la HA y Taq I, Xmn I y Dde I para la HB. Se usó la técnica de PCR. En el caso de la HA se obtuvo el 35 % de informatividad para St14 y Hind III y 32,5 para Bcl I. El polimorfismo Dde I fue el más informativo para la HB con el 33 %; mientras que Taq I representó el 10 % de informatividad y XmnI el 0 %. Se comprobó que de las 40 familias analizadas con HA, 23 fueron informativas. Por otra parte, fueron informativas 4 familias de las afectadas con HB. Se realizaron 19 diagnósticos prenatales con previa determinación del sexo fetal, incluidos 3 varones enfermos.

*Palabras clave:* hemofilia, factor VII, factor IX, líquido amniótico, diagnóstico prenatal.

---

#### ABSTRACT

Hemophilia is a congenital disease of coagulation disorder and it is a recessive disorder linked to X-chromosome. The molecular study is conducted by indirect studies due to it is caused by heterogeneous mutations in gen of FVIII and FIX in 40 families with hemophilia A (HA) and 10 with hemophilia B (HB). DNA extraction was carried out by saline precipitation method in 293 blood samples and 19 samples of amniotic fluid, as well as the analysis of St14, Bcl I and Hind III polymorphism for the AH and Taq I, Xmn I and Dde I for BH. The PCR technique was used. In the case of AH it was possible to achieve a 35 % of information for St14 and Hind III and a 32.5 % for Bcl. Dde polymorphism supplied more information for BH for a 33 %; whereas the Taq I represented the 10 % of information and Xmn I the 0 %. We verified that from the families analyzed with HA, in 23 of them there was information. Besides, in 4 families affected by HB there was information. A total of 19 prenatal diagnoses were made with a previous determination of fetus sex, including 3 males ill.

*Key words:* Hemophilia, VII factor, IX factor, amniotic fluid, prenatal diagnosis.

---

## INTRODUCCIÓN

Las hemofilias A (HA) y B (HB) son los principales trastornos hemorrágicos hereditarios ligados al cromosoma X. Se presentan debido a mutaciones heterogéneas en los genes del factor VIII (HA) y factor IX (HB) de la coagulación, que ocasionan una disminución o deficiencia funcional de estas proteínas en el plasma. A causa de su patrón de herencia afectan casi exclusivamente a los varones. Manifiestan gran similitud clínica y su diagnóstico se realiza por pruebas específicas, mediante la determinación de los factores VIII y IX de la coagulación, respectivamente.<sup>1</sup>

Clínicamente presentan un fenotipo variable con hemorragias en las articulaciones, localizadas principalmente en codos y rodillas (hemartrosis). Además, se observan hematomas musculares y sangramientos que pueden ocurrir por traumas, cirugías y en ocasiones de forma espontánea.

En el mundo se reporta que la frecuencia de la HA es aproximadamente entre 1 en 5 000 y 1 en 10 000 varones; mientras que en hembras homocigóticas es de 1 en 25 000 000 a 1 en 100 000 000. En la HB es de 1 en 40 000 varones.<sup>1,2</sup>

El gen del Factor VIII (FVIII) tiene una longitud de 186 kilobases (kb), consta de 26 exones y 25 intrones, el mensajero es de 9 kb y codifica para una proteína madura de 2 332 aminoácidos (a.a). Se encuentra localizado en el brazo largo del cromosoma X, en Xq 28. La proteína de 300 kDa se expresa en células de sangre periférica y en líneas celulares de linfocitos. El gen del factor IX (FIX) es menor: tiene una longitud de 34 kb, está constituido por 7 intrones y 8 exones, el ARN mensajero es de 2,8 kb que codifica para una proteína de 415 a.a. Se encuentra localizado en Xq 26-27.3, aproximadamente a 10 centimorgan (cM) hacia el centrómero del gen del FVIII. La proteína tiene un peso molecular de 56 800 Da.<sup>1-4</sup>

Se ha reportado un número elevado de mutaciones en los genes del FVIII y FIX, por lo tanto, la detección directa es compleja y costosa. Sin embargo, el estudio de esta enfermedad puede realizarse con éxito mediante el estudio indirecto. El análisis de ligamiento es muy simple y módico, se usan marcadores polimórficos

intra o extragénicos que consisten en variaciones en la secuencia del genoma del individuo que permiten un seguimiento del gen defectuoso. Estos marcadores polimórficos no tienen ninguna relación con la anomalía y por lo tanto, no proporcionan información respecto al tipo de mutación causante de la enfermedad.

Los marcadores moleculares empleados fueron los polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP's) en los que hay variaciones en la secuencia de corte de una enzima de restricción determinada. Pueden reconocerse mediante una movilidad alterada de los fragmentos de restricción en la electroforesis. El inconveniente es que solo tienen 2 variantes alélicas, corte o no de la enzima, o sea, alelo 1 ó 2. Por otra parte, las repeticiones en tándem de número variable (RNTV) son muy polimórficas y se deben a la presencia de un número variable de repeticiones en tándem de secuencias cortas de ADN que se heredan de forma mendeliana y codominante.<sup>1,3</sup> El inconveniente de este estudio es la falta, en ocasiones, de informatividad de los marcadores o la ausencia de un familiar imprescindible para el mismo, o ambos.

El estudio de todas las mujeres que tengan un familiar afectado de hemofilia para la detección de portadoras es de gran importancia, pues permite conocer su condición y realizar el asesoramiento genético correspondiente.

En este trabajo se resume la experiencia de un quinquenio en la detección de portadoras y el diagnóstico prenatal de las hemofilias A y B en nuestro país usando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (RCP).

## MÉTODOS

Se estudiaron 50 familias diagnosticadas con hemofilia de todo el país, basados en el diagnóstico clínico e historia familiar. El universo de estudio fue conformado por 40 familias de HA y 10 de HB, para un total de 293 muestras de sangre y 19 de líquido amniótico de 18 gestantes informativas que decidieron realizarse diagnóstico prenatal.

Se realizó la extracción de ADN por el método de precipitación salina<sup>5</sup> a partir de 10 mL de sangre periférica con EDTA 56 mg/mL como anticoagulante y 20 mL de líquido amniótico en las gestantes informativas para la realización de los diagnósticos prenatales.

Para el gen FVIII se estudiaron los polimorfismos RFLP's intragénicos Bcl I, en el intrón 18; Hind III en el intrón 19 y el marcador extragénico RNTV: St14, localizado en el *locus* DXS52. Para el gen FIX se emplearon los marcadores intragénicos Taq I en el intrón 4, Xmn I en el intrón 3 y Dde 1 en el intrón 1.<sup>1,4,6-12</sup>

Se usó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y posterior digestión enzimática en el caso de los RFLP's, tales como Bcl I, Hind III, Taq I y Xmn I, con sus respectivas enzimas de restricción (Bcl I, Hind III, Taq I y Xmn I). Los resultados se visualizaron en gel de agarosa al 3 %. Los productos de amplificación de los polimorfismos St 14 y Dde 1 se estudiaron directamente mediante electroforesis en gel de agarosa al 2 %. Las condiciones de los PCR y las digestiones enzimáticas se realizaron según lo descrito por Suardíaz y otros<sup>4</sup> y Scott y otros,<sup>12</sup> con pequeñas modificaciones.

## RESULTADOS

De las 40 familias estudiadas con HA se encontraron 14 informativas para el polimorfismo St 14, 13 para Bcl 1 y 14 para Hind III. Los 3 marcadores tienen aproximadamente el mismo porcentaje de informatividad: 35 % para St14 y Hind III y 32,5 % para Bcl1. Resultaron informativas 23 gestantes correspondientes a 23 familias, o sea, no todas las familias fueron informativas para algún marcador.

De las 6 familias estudiadas con HB se encontró una informativa para el polimorfismo Taq 1, 3, para Dde 1 y ninguna para Xmn 1, o sea, todas las muestras resultaron ser homocigóticas. Habría que aumentar el tamaño de la muestra para decidir si valdría la pena seguir su estudio, pues hasta ahora su informatividad es nula en nuestra población. El polimorfismo Dde 1 fue el más informativo, con el 33 %.

De aquellas familias que resultaron informativas y desearon realizarse diagnóstico prenatal, se logró diagnosticar 19 de ellos. Previamente se realizó diagnóstico de sexo y a continuación se realizó el estudio; después de conocer la condición del feto y la consulta de asesoramiento genético, las familias determinaron interrumpir el embarazo o continuarlo. Se diagnosticaron 3 fetos varones enfermos y 5 sanos, 11 hembras sanas o portadoras.

Cuando se hizo un análisis de los enfermos por provincias no hubo prevalencia de ninguna, pero al analizarlo por regiones, se encontró que hubo una mayor incidencia en la región occidental con el 52 %, lo que puede explicarse por las migraciones hacia la capital, que está incluida en esta región.

## DISCUSIÓN

Cuando se compararon los resultados obtenidos en HA con estudios realizados en otras poblaciones, se encontró que la informatividad del marcador Bcl I es inferior a la informada por la población de la India, donde hay comunicaciones de 44 y 46,3 %, <sup>13,14</sup> y por México, que es aproximadamente 50 %. <sup>15</sup> Como se puede apreciar, la informatividad de nuestra población es algo menor que lo informado por otros países, pues de manera general, no es mayor del 50 %, lo que puede deberse a que se trata de un RFLP que se caracteriza por ser pobremente polimórfico.

El polimorfismo Hind III tiene 35 % de informatividad, similar a lo descrito en un estudio en la población de la India, con el 30 %, <sup>13</sup> pero inferior a lo comunicado por *Chowdhury* y otros, <sup>14</sup> con el 51,2 %.

Para el caso del marcador extragénico St14, la informatividad fue similar a lo descrito por *Chowdhury* <sup>14</sup> en la India, pero inferior a la comunicada en la población mexicana, con el 83 %. <sup>15</sup> En la población cubana, la informatividad de este marcador fue baja, menor del 50 %, lo que no está en correspondencia con lo que se refiere en la literatura, pues se trata de un VNTR.

Como se aprecia, cada población tiene un comportamiento único, incluida la nuestra, y aún en diferentes regiones de la población de la India, <sup>13,14</sup> hubo diferencias, lo cual puede explicarse por la diversidad étnica de esa población.

En nuestro estudio se analizaron 3 marcadores: 2 intragénicos (Bcl1 y Hind III) y uno extragénico (St14) y la informatividad total ha sido del 57 %; por lo tanto, es

necesaria la introducción de otros marcadores para mejorar la calidad del diagnóstico. Por ejemplo, las pequeñas repeticiones en tandem (STR): intrón 13 e intrón 22 STR, son muy buenos candidatos, según lo descrito por Chowdhury.<sup>14</sup> Estos marcadores, junto con los analizados actualmente en la población cubana, brindaron una magnífica informatividad (88 %) en la población de la India. Además, la detección de la inversión del intrón 22 en familias con HA, puede resolver aproximadamente el 50 % de los casos con HA severa, según reporta la literatura.<sup>16,17</sup>

En poblaciones asiáticas y europeas, los marcadores más informativos en HB son: en región promotora NruI, Sa/I, y BamHI; en regiones intrónicas, un polimorfismo tetralélico por la inserción/delección de 50 pb en intrón I, TaqI y HhaI; en región 3'terminal, su informatividad oscila entre el 30-80 %, en dependencia del marcador, y al ser todos intragénicos, su riesgo de error es menor que el 1 %.<sup>18</sup> La informatividad de los marcadores del gen del FIX es muy baja, menor del 40 %; comportamiento similar presenta la población de la India y de China. Muchos autores plantean que hay un desequilibrio de ligamiento entre los polimorfismos del FIX que difiere entre los diferentes grupos étnicos. En la mayoría de los casos, el análisis de un gran número de polimorfismos no incrementa significativamente la informatividad, aunque el riesgo de recombinación y el desequilibrio de ligamiento pueden ser reducidos analizando un panel de polimorfismos localizado en diferentes regiones del gen.<sup>18</sup>

La secuenciación sería un método accesible por el tamaño de su región codificadora y promotora (2,2 kb), donde se localiza más del 96 % del total de las mutaciones causantes de HB, por lo que se plantea en la literatura como una estrategia de elección factible en el diagnóstico de portadoras, sobre todo en casos esporádicos. Sin embargo, para el gen del FVIII, la secuenciación no es un método factible por su gran tamaño, pues aunque se dirija el análisis a la región codificadora (9 kb), es considerablemente grande y se requieren al menos 50 reacciones de PCR y secuenciación para cubrir su rastreo. Por eso es ideal la detección de la inversión del intrón 22 en el gen del FVIII.<sup>15-17</sup>

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Haig HK, Tuddenham EGD, Stylianos EA. Hemophilia A and hemophilia B. Deficiencies of coagulation Factors VIII and IX. En: Scriver CR, Baudette AL, Sly WS, Valle D, eds. The metabolic and molecular bases of inherited disease. Vol. III. 7 ed. New York: Mc Graw-Hill; 1995.
2. Ginsburg D. Hemophilias and other disorders of hemostasis. Cap. 70. En: Rimoin DL, Connor M, Pyeritz RE, Korf BR. Emery and Rimon's. Principles and practice of medical genetics. 4 ed. Vol. 2. London: Churchill Livingstone; 2002. pp. 1929-37.
3. Mueller RF, Young ID. Emery's. Genética Médica. Cap. 18. Trastornos monogénicos. 10 ed. Madrid: Marbán; 2001. pp. 279-81.
4. Suardíaz Martínez AB, Hernández Pérez Y, Collazo Mesa T, Reyes Navarro L, Gómez Martínez M. Diagnóstico molecular de Hemofilia A y B empleando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa. Rev Cub Gen Hum 2001;3(2).
5. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res 1988;16:1215.

6. Richards B, Heilig R, Oberle I, Storjohann L, Horn GT. Rapid PCR analysis of the St 14 (DXS52) VNTR. *Nucl Acids Res* 1991;91:1944.
7. Graham JB, Kunkel GR, Fowlkes DN, Lord ST. The utility of a Hind III polymorphism of factor VIII examined by rapid DNA analysis. *Br J Haematol* 1990;76:75-9.
8. Kogan SC, Doherty N, Gitschier J. An improved method for prenatal diagnosis genetics diseases by analysis of amplified DNA sequences: Application to hemophilia A. *N Engl J Med* 1987;317:895-90.
9. Bowen DJ, Thomas P, Webb CE, Bignell P, Peake IR, et al. Facile and rapid analysis of three DNA polymorphisms within the human factor IX gene using the polymerase chain reaction. *Br J Haematol* 1991;77:559-60.
10. Liu Q, Sommer SS. Subcycling PCR for multiplex long-distance amplification of regions with high and low GC content: Application to the inversion hotstop in the factor VIII gene. *Biot* 1998;25:1022-28.
11. Xuefeng W, Yuanfang L, Zhiguang L, Haiyan C, Xiaujie S, et al. Carrier detection and prenatal diagnosis of hemophilia A. *Clin Chem Lab Med* 2001;39:1204-8.
12. Scott C, Kogan J, Gitschier J. Genetic prediction of Hemophilia A. En: Innis MA, Gelfand HD, Sninsky JJ, White TJ, eds. *PCR Protocols. A guide to methods and applications*. California: Academic Press Ltd; 1990.
13. Shetty S, Ghosh K, Vides A, Mohanty D. Carrier detection and prenatal diagnosis in families with hemophilia. *Nat Med J Ind* 2001;107:182-6.
14. Chowdhury MR, Twari M, Kabra M. Prenatal diagnosis in Hemophilia A using factor VIII gene polymorphism Indian experience. *Ann Hematol* 2003;82:427-30.
15. Mantilla Capacho J, Beltrán Miranda CP, Jaloma Cruz ARJ. Diagnóstico molecular en pacientes y portadoras de hemofilia A y B. *Gac Med Mex* 2005;141(1):69-71.
16. Liu Y, Wang X, Chu H. Carrier detection and prenatal diagnosis of hemophilia alpha. *Chin Med J* 2002;115: 991-4.
17. Poláková H, Zmetáková I, Kádasi L. Long distance PCR in detection of inversion mutations of F8C gene in Hemophilia A patients. *Gen Physiol Biophys* 2003;22:243-53.
18. Castaldo G, Nardiello P, Bellitti F, Santamaria R, Rocino A, et al. Haemophilia B: From molecular diagnosis to gene therapy. *Clin Chem Lab Med* 2003;41(4):445-51.

Recibido: 2 de febrero de 2010.

Aprobado: 18 de febrero de 2010.

Dra. *Yaixa Piloto Roque*. Centro Nacional de Genética Médica. Calle 146 No. 3102 esquina a Ave. 31, Marianao, CP 11600. Ciudad de La Habana, Cuba.