UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN
DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN SEDE BOGOTÁ

Análisis molecular escalonado para la identificación de mutaciones en Hemofilia A y la correlación genotipo-fenotipo en una muestra de pacientes de Bogotá, D.C. Colombia.

LUZ KARIME YUNIS HAZBÚN, MD

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina, Maestría en Genética Humana
Bogotá, D.C, Colombia
2016.

Análisis molecular escalonado para la identificación de mutaciones en Hemofilia A y la correlación genotipo-fenotipo en una muestra de pacientes de Bogotá, D.C. Colombia.

LUZ KARIME YUNIS HAZBÚN, MD.

Tesis investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Genética Humana

Director (a):
Juan José Yunis Londoño, MD, MSc
Profesor Titular
Departamento de Patología
Facultad de Medicina e
Instituto de Genética
Universidad Nacional de Colombia

Línea de Investigación:
Alteraciones moleculares en Trombofilias y Hemofilias.
Grupo de Investigación:
Patología Molecular

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina, Maestría en Genética Humana
Bogotá, D.C, Colombia
2016.

Este trabajo se lo dedico a:

Mis profesores de genética, el Dr. Juan J. Yunis Londoño y el Dr. Emilio Yunis Turbay, mis mentores.

A mi mamá y hermana por la compañía y el apoyo incondicional.

RESUMEN

La Hemofilia A es el segundo trastorno de la hemostasia más común después de la enfermedad de von Willebrand, con incidencia mundial de 1:5000 nacidos vivos varones y de herencia recesiva ligada al cromosoma X. Se estima que hay aproximadamente 178,500 personas con la enfermedad, el 60% presenta la forma severa. La inversión del intrón 22 y del intrón 1 representan las principales alteraciones moleculares en pacientes con hemofilia A severa, con frecuencia del 45-50% y 0.5-5%, respectivamente. Hemos implementado una estrategia para la identificación de la alteración molecular en cada paciente con HA mediante Inverse shifting PCR para la identificación de las inversiones de los intrones 22 y 1, seguido del análisis de los exones del gen F8 en pacientes que no presenten inversión mediante PCR-High Resolution Melting y posteriormente secuenciación Sanger en aquellos exones que presenten alteración en PCR-High Resolution Melting. Se analizaron 37 individuos masculinos con Hemofilia A (30 severos, 5 moderados y dos leves) de dos centros de tratamiento integral de hemofilia de los cuales 33 son **no relacionados** y 8 mujeres (6 madres y dos hermanas de pacientes). Se identificó la inversión 22 en 14 de 33 (42.4%), en 3 de 33 (9.1%) la inversión 1, en 3 de 33 pacientes (9.1%) gran deleción y en 11 de 33 (33.3%) variaciones puntuales o pequeñas deleciones. Dos variantes tipo missense no han sido reportadas previamente, una en un individuo con Hemofilia A severa (c.262A>G; p.M88V) y otra variante en dos hermanos con Hemofilia A leve (c.5666A>G; p.Q1889R) así como una variante nonsense (c.399T>A; p.Y133*) en un paciente con HA severa. No se identificó la variante patogénica causal en 2 de 33 individuos (6%). Con este abordaje molecular escalonado costo-efectivo hemos identificado, por primera vez en Colombia, la variante patogénica responsable de Hemofilia A en 31 de 33 pacientes no relacionados (94%).

Palabras clave:

Hemofilia A, Factor VIII, mutación, Colombia

Abstract

Hemophilia A (HA) is the second most common hemostasis disorder after von Willebrand disease, with a worldwide incidence of 1: 5000 live births with an X-linked recessive inheritance. It is estimated that approximately 178,500 people are affected with the disease; 60 % with the severe form. Intron 22 and intron 1 inversions represent the major molecular alterations found in severe hemophilia A patients, 45-50% and 0.5-5%, respectively. We have implemented a strategy for the identification of the molecular alteration in each patient with HA by Inverse shifting PCR for the identification of the inversions of introns 22 and 1, followed by the analysis of the F8 gene exons by means of PCR -High Resolution Melting and Sanger sequencing in patients who do not present inversion. A total of 37 male HA patients (30 severe, 5 moderate and 2 mild) from two comprehensive hemophilia treatment centers were analyzed, 33 of whom were unrelated and 8 women (6 mothers and 2 sisters). Inversion 22 was identified in 14 of 33 (42.4%), 3 of 33 (9.1%) had inversion 1, 3 of 33 patients (9.1%) presented large deletions and 11 of 33 (33.3%) had point variations or small deletions. Two missense variants have not been previously reported, one in an individual with severe HA (c.262A>G; p.M88V) and another variant in two siblings with mild HA (c.5666A> G; p.Q1889R). In addition, a nonsense variant (c.399T>A; p.Y133*) in a patient with severe HA has not been described before. No pathogenic variant was identified in 2 of 33 individuals (6%). With this cost-effective systematic molecular approach we have identified, for the first time in Colombia, the pathogenic variant responsible for Hemophilia A in 31 of 33 unrelated patients (94%).

Keywords:

Hemophilia A, Factor VIII, mutation, Colombia

TABLA DE CONTENIDO	Página
Resumen	V
Símbolos y Abreviaturas	11
Planteamiento del problema	12
1 Introducción	14
1.1 Hemofilia A	17
1.1.1 Historia	17
1.1.2 Epidemiología	18
1.1.3 Sistema de Coagulación	19
1.1.4 Manifestaciones clínicas	21
1.1.5 Tratamiento	22
1.1.6 Terapia de Remplazo con Factor VIII	22
1.1.7 Inhibidores del Factor VIII	22
2 Gen del factor VIII (F8)	24
2.1Características	24
2.2 Proteína del factor VIII	27
2.3 Alteraciones Moleculares en el gen F8	27
2.4 Diagnóstico para mutaciones en el gen F8	31
2.5 Southern Blot y Long Distance PCR	31
2.6 Inverse Shifting PCR (IS-PCR)	32
2.7 Tamizaje Mutacional	37
2.8 HRM High Resolution Melting	37
3.Problemática	40
3.1Preguntas de investigación	40
3.2 Objetivo General	41
3.3 Objetivos Específicos	41
4. Metodología	42
4.1.Tipo de Estudio	42
4.2 Muestra	42
4.3 Aislamiento de ADN	45
4.4 Análisis de las inversiones de los intrones 22 y 1	45
4.5 Prueba complementaria int22h	47
4.6 High Resolution Meltinh (HRM)	47
4.7 Amplificación para secuencia	48
4.8 Secuencia con BigDye Terminators	48
4.9 Análisis de Microarreglos	49
4.10 Análisis software de predicción- análisis funcional *in silico*	50
4.11 Análisis Estadístico	50
5. Resultados	51
5.1 Inversión intrón 22 y 1 por IS-PCR	51
5.2 Prueba complementaria int22h	52
5.3 Análisis de HRM	53
5.4 Secuenciación de ADN	55

5.5 Análisis de microarreglos (Microarrays)	61
5.6 Análisis Funcional *in silico*	63
5.7 Correlación genotipo-fenotipo	64
6. Discusión	66
Conclusiones	77
Recomendaciones	79
Productos académicos	79
Agradecimientos	80
Bibliografía	82
Anexos	91

LISTA DE FIGURAS	Página
Figura 1. Representación esquemática del modelo celular de la hemostasia	21
Figura 2. Características del gen del Factor VIII, RNA mensajero y Proteína	26
Figura 3. Propiedades e interacción de la proteína del Factor VIII	28
Figura 4. Inversiones patológicas del Factor VIII de la coagulación Intrón 1	29
Figura 5. Inversiones patológicas del Factor VIII de la coagulación Intrón 22	30
Figura 6. Frecuencia de mutaciones en el gen F8 en la base de datos CHAMP-CDC	31
Figura 7. Esquematización de Inverse Shifting PCR y resultado de alelo normal	33
Figura 8. Esquematización de Inverse Shifting PCR y resultado de inversión del intron 22 tipo I	34
Figura 9. Esquematización del gen F8 y regiones normales (A, B) variantes de recombinación relacionadas a *int22h* (C-G)	35
Figura 10. Curva de disociación (melt) a alta temperatura en ADN de doble cadena	39
Figura 11. Inverse shifting-PCR	52
Figura 12. Prueba complementaria Int22h	53
Figura 13. Análisis de HRM (High Resolution Melting Analysis)	54
Figura 14. Secuenciación Sanger en individuos colombianos con HA	57
Figura 15. Distribución de variantes patogénicas dentro de la proteína FVIII en pacientes colombianos	60
Figura 16. Análisis de microarreglos CytoScan 750 (Affymetrix)	61
Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa para exón 26 en muestras de pacientes con HA	63
Figura 18. Análisis de HRM muestras HA-33, HA-37 y HA-39	69
Figura 19. Secuencia del exón 4 con secuencias intrónicas adyacentes	70
Figura 20. Electroferograma y análisis de HRM muestras HA-35 y HA-36	72

LISTA DE TABLAS	Página
Tabla 1. Datos clínicos y demográficos individuos con HA	43
Tabla 2. Variantes genéticas identificadas en individuos con HA de Colombia	56
Tabla 3. Análisis de predicción para variantes nuevas identificadas en individuos con HA de Colombia	64

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

Símbolos con letras griegas

µl	microlitro
µM	Micromolar

Superíndice	Término
o	Grado de temperatura

Abreviatura	Término
aa	aminoácido
ADN	ácido desoxiribonucléico.
ARNm	ARN mensajero
BSA	Albúmina sérica bovina
CSGE	Conformational strand gel electrophoresis
DGGE	Denaturing gradient gel electrophoresis.
DHPLC	Denaturinh High Precision Liquid Chromatography.
dl	decilitro
dNTP	Deoxinucleótidos
DTT	ditiotreitol
FOSYGA	Fondo de Solidaridad y garantía
FVIII	Factor VIII de la coagulación
HA	Hemofilia A
HCl	Ácido Clorhídrico
HLA	Human leukocyte Antigen
HRM	High Resolution melting
IAC	cloroformo: alcohol isoamílico
IL2	Interleuquina 2
InDel	Polimorfismo de inserción/deleción.
kb	kilobase o 1000 pares de bases de ADN
INV	Inversión
Int	intrón
IS-PCR	Inverse shifting PCR
NaCl	Cloruro de Sodio
MgCl2	Cloruro de magnesio.
min	minuto
ml	Mililitro
mg	miligramo
mM	Milimolar
Mb	Megabase, un millón de pares de bases de ADN.
pb	par de bases de ADN
PCR	Polymerase Chain Reaction
Seg	Segundo
SSCP	Single strand conformational polymorphism.
TNFa	Factor de necrosis tumoral alfa.
TF	Factor tisular
U	Unidades
US$	Dólar americano
UI	Unidad internacional

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La Hemofilia A es causada por mutaciones en el gen del Factor VIII de la coagulación, con una incidencia mundial estimada de 1 en 5000 nacidos vivos varones, siendo esta la alteración de la hemostasia más común(Rossetti, Radic, Abelleyro, Larripa, & De Brasi, 2011; Rossetti, Radic, Larripa, & De Brasi, 2008b). Esta enfermedad, es de herencia recesiva ligada al cromosoma X. Se clasifica como severa, moderada o leve, dependiendo del nivel de actividad plasmática del Factor VIII (Savage, 2014). Cerca del 45-50 % de los pacientes con Hemofilia A (HA) severa, presentan la Inversión en el intrón 22 del gen (INV22) y entre el 0.5-5% de los pacientes tienen una Inversión en el intrón 1 (INV1)(Graw et al., 2005). En el 50% restante de los pacientes con HA severa, la mutación se encuentra en uno de los 26 exones que conforman el gen, ya sea por deleción, inserción o mutación puntual. La mayoría de estudios moleculares para esta enfermedad se centran en analizar las Inversiones del intrón 22 e intrón 1 (INV22 e INV1)(Abou-Elew et al., 2011; Rossetti et al., 2011; Rossetti et al., 2008b). Por consiguiente, no se logra identificar la mutación responsable de la enfermedad en casos distintos de la presencia de la INV22 e INV1, es decir, alrededor de la mitad de los casos. Establecer la alteración molecular en cada individuo con HA permite hacer la correlación entre la presentación de la enfermedad (leve, moderada o severa), establecer el posible riesgo de la generación de anticuerpos neutralizantes-inhibidores para el FVIII de la terapia de reemplazo, la identificación de mujeres portadoras y llevar a cabo una adecuada asesoría genética.

Se estima que hay alrededor de 178,500 personas a nivel mundial con Hemofilia, del cual el 80% corresponde a HA (Savage, 2014). En el reporte de la Federación Mundial de Hemofilia, Annual Global Survey 2014, donde se incluyeron 106 países, se reportaron 143,523 pacientes con HA, (Hemophilia, 2014). Para el caso de Colombia, el informe de la Cuenta de Alto Costo sobre Hemofilia en Colombia, reporta un total de 1525 individuos con diagnóstico de HA. En el año 2013, en el censo de enfermedades huérfanas, se identificó que la hemofilia A y B eran las enfermedades huérfanas más prevalentes; adicionalmente, estaba considerada como la enfermedad de más alto costo en Colombia. (Situación de la hemofilia en Colombia 2015. Cuenta de Alto

Costo, Fondo Colombiano de Enfermedades de Alto Costo Disponible en https://cuentadealtocosto.org/site/images/Situación_de_la_hemofilia_en_Colombia_2015.pdf). La hemofilia A, es la enfermedad “huérfana” de mayor impacto económico en el sistema de salud colombiano. Según datos del FOSYGA (Fondo de Solidaridad y Garantía), para el primer semestre de 2014, la Hemofilia A generó recobros por 37 mil millones de pesos en dicho semestre. Esto se debe al alto costo de la terapia de remplazo con concentrados de Factor VIII recombinante o derivados plasmáticos y al desarrollo de inhibidores (anticuerpos neutralizantes) secundario a la terapia de remplazo junto a las complicaciones derivadas de la enfermedad y su tratamiento.

En la actualidad, existen métodos que permiten la identificación de todas las mutaciones en el gen del Factor VIII de la coagulación, tales como las técnicas de secuenciación masiva. Sin embargo, dichas metodologías son costosas (alrededor de US$1500-2500 por muestra) y no están disponibles aún en el país. Por otro lado, diversas metodologías para tamizaje genético han sido desarrolladas. Entre ellas, la resolución de disociación de ADN a alta temperatura (en inglés High Resolution Melting-HRM) (Hill et al., 2010; Montgomery, Wittwer, Palais, & Zhou, 2007; Ririe, Rasmussen, & Wittwer, 1997) que permite, en tiempo real, identificar los posibles polimorfismos y mutaciones presentes en fragmentos de ADN amplificados por PCR. Este método, permite detectar variaciones en las secuencias de la cadena de ADN en presencia de una sustancia fluorescente, para discriminar las regiones genéticas que presenten un comportamiento anormal en HRM para ser secuenciadas posteriormente (Montgomery et al., 2007; Ririe et al., 1997). A través de esta metodología, se puede aproximar a la identificación de las mutaciones presentes en las regiones codificantes del gen, complementando el análisis de las Inversiones en los intrones 22 y 1 (INV22 e INV1).

Hasta la fecha, en Colombia no existe diagnóstico molecular para esta condición y en algunos casos, las muestras son remitidas fuera del país para su análisis. Hemos desarrollado una estrategia para la identificación de la alteración molecular en cada paciente con hemofilia A, un abordaje molecular en HA costo-efectivo para nuestro medio. El abordaje consta de la identificación de las Inversiones de los intrones 22 y 1

(INV22 e INV1) mediante IS-PCR (Inverse shifting PCR), seguida del análisis de los exones del gen del FVIII en pacientes que no presenten Inversión mediante PCR-HRM (High Resolution Melting) y posterior secuenciación mediante Big Dye terminators (Secuenciación Sanger) en aquellos exones que presenten alteración en HRM.

El alto costo que implica el análisis de cada paciente y el hecho de que no existe un centro de referencia nacional para el diagnóstico molecular de esta enfermedad, generan la necesidad de desarrollar métodos diagnósticos de menor costo, que permitan identificar las mutaciones presentes en cada paciente. Esto con el fin de poder establecer una correlación genotipo-fenotipo, evaluar el posible riesgo de desarrollo de anticuerpos neutralizantes-inhibidores y brindar un adecuado asesoramiento genético en los casos que se requiera. Además, se pretende iniciar la creación de una base de datos sobre las mutaciones y polimorfismos hallados en el gen, de manera que permita comprender y analizar el comportamiento molecular del gen del Factor VIII en población colombiana y que sirva como referente para futuros estudios en Colombia y Latinoamérica.

INTRODUCCIÓN

La Hemofilia A (HA), es una condición genética de herencia recesiva ligada al cromosoma X(Hoyer, 1994). Es una condición que se da principalmente en hombres y, en casos especiales, en mujeres. En esta enfermedad, las personas afectadas presentan una predisposición a sangrar (Antonarakis, Kazazian, & Tuddenham, 1995; Bagnall, Waseem, Green, & Giannelli, 2002; Bowen, 2002; Brinkhous, 1981; Castaldo et al., 2007; Djulbegovic & Goldsmith, 1995; Hoyer, 1994) debido a la deficiencia del Factor VIII de la coagulación(Jayandharan & Srivastava, 2012). Se estima una incidencia de 1 en 5000 nacidos vivos varones, dato que no varía entre poblaciones(Graw et al., 2005), por lo que la HA es el trastorno de la coagulación más frecuente después de la enfermedad de von Willebrand (Hoyer, 1994). Adicionalmente, la severidad de la enfermedad está determinada por la actividad

residual del FVIII de la coagulación(Graw et al., 2005); en la HA leve, existen niveles plasmáticos del Factor VIII del 5 al 40% , en la HA moderada de 1 a 5% y en HA severa valores inferiores al 1%, representando el 25%, 15% y 60% de los casos de HA, respectivamente (Savage, 2014).

Las personas con HA presentan una predisposición a sangrar de manera recurrente que puede resultar de difícil manejo. Los pacientes con el fenotipo severo tienen sangrado espontáneo que puede ser grave. Entre las manifestaciones clínicas de esta entidad están las hemorragias en órganos internos, músculos y articulaciones; usualmente posterior a procedimientos o traumas menores(Hill et al., 2010; Rossetti et al., 2011). Entre las causas de mortalidad en estos pacientes, en países en vía de desarrollo, se encuentra el sangrado del sistema nervioso central y la mayor causa de morbilidad es la sinovitis crónica, dado por sangrados recurrentes a nivel articular generando un estado de inflamación crónica, que con el tiempo lleva a discapacidad (Graw et al., 2005). Por estas razones, desde hace unos años se ha implementado el manejo de estos pacientes con terapia de reemplazo del FVIII de la coagulación. Con la introducción de infusión de FVIII en 1981 y posteriormente la infusión del concentrado de FVIII recombinante en 1992, se ha logrado disminuir el impacto de la enfermedad en los pacientes y sus familias(Schramm, 2014).

La complicación más severa en el manejo de la HA es la generación de anticuerpos neutralizantes- inhibidores secundarios a la administración de concentrados de FVIII, los cuales neutralizan la función pro coagulante de este e impiden una adecuada respuesta al tratamiento(Kreuz & Ettingshausen, 2014). Se han descrito múltiples factores de riesgo asociados a la aparición de anticuerpos neutralizantes -inhibidores en pacientes con HA severa, siendo el tipo de mutaciones en el gen F8 uno de los posibles factores de mayor impacto (Bowen, 2002; Gouw et al., 2012; Lewis, Soulier, & Taylor, 1946; Claudia Pamela Radic, 2010; Srivastava et al., 2013; Vine, 2009). De aquí la importancia de determinar con exactitud la alteración molecular de pacientes con HA para determinar la predisposición a generar inhibidores con el tratamiento.

Se han identificado distintos tipos de mutación en el gen F8 (mutaciones puntuales, deleciones, inserciones, rearreglos/Inversiones). De las mutaciones puntuales, las

variantes missense corresponden al 90% de los casos de HA. Las Inversiones representan el 5 al 10% de los casos de HA, pero se concentran principalmente en casos de HA severa(Bowen, 2002); siendo la Inversión del intrón 22 la responsable del 50% de los casos del fenotipo severo de la enfermedad(Graw et al., 2005).

La estrategia de diagnóstico molecular plantea un análisis escalonado para la detección de la alteración molecular en cada paciente con Hemofilia A, mediante la reacción de IS-PCR (Inverse Shifting PCR) para la identificación de las Inversiones de los intrones 22 y 1 (INV22 e INV1), como una variante de la PCR Inversa utilizada por Rossetti en el 2005(Rossetti, Radic, Larripa, & De Brasi, 2008a); seguido del análisis por HRM (Montgomery et al., 2007) de los exones del gen F8, en quienes no se detecte Inversión por IS-PCR, seguido de secuenciación mediante Big Dye terminators (Sanger, Nicklen, & Coulson, 1977) en aquellos fragmentos que presenten alteración en HRM. Con esta aproximación diagnóstica escalonada y altamente costo-efectiva se pueden identificar las mutaciones presentes en los intrones 22 y 1, además de variantes en regiones codificantes en pacientes con Hemofilia A. Un diagnóstico preciso permite una asesoría genética eficaz, así como establecer correlaciones entre las mutaciones halladas con la severidad de la enfermedad y la posible aparición de anticuerpos neutralizantes - inhibidores ante el tratamiento de reemplazo con Factor VIII.

HEMOFILIA A

HISTORIA

Los primeros reportes de esta enfermedad datan en el Siglo II en el Talmud, donde se indicaba que una mujer que perdiera a dos de sus hijos posteriores a la circuncisión, no se debía realizar ésta práctica en un tercer hijo. Se cree que la primera descripción moderna de Hemofilia A, fue en 1803 realizada por el Dr. John Conrad Otto, con el estudio de varias familias en las que sólo los hombres presentaban sangrado y sufrían complicaciones asociadas a estas, mientras que las mujeres no(Bowen, 2002). En 1928 el Dr. Hopff, le atribuye a esta condición el nombre de Hemofilia. La primera descripción de la herencia de la HA, fue descrita en 1820 por Nasse, quien refirió la enfermedad como transmitida por mujeres sanas a sus hijos. El primer análisis de un árbol familiar de individuos con HA fue hacia 1885 por Osler, posteriormente por Pratt en 1908 y Koller en 1954. El ultimo se centró en el análisis extenso en Tenna, un pueblo montañoso suizo, del cual se pudo reconstruir el análisis familiar hasta mediados del siglo XVII (Schramm, 2014).

La hemofilia se le conoce igualmente como la “enfermedad de la familia real”, ya que la reina Victoria (1837-1901) era portadora de esta condición. Su hijo Leopoldo, quien sufría de sangrados recurrentes, falleció a la edad de 31 años debido a una hemorragia intracerebral(Schramm, 2014). Así mismo, la enfermedad se propago por varias familias reales de Europa por dos de sus hijas. De las familias reales afectadas estaban la española, Alemana y rusa. Pero el caso más conocido fue el de la familia Rusa, por el Tzarevich Alexei, hijo del Czar Nicholas II. Hoy en día, se conoce que la “enfermedad de la familia real” corresponde a la Hemofilia B(Schramm, 2014).

Posteriormente en 1946, se describió una pequeña fracción plasmática en individuos normales que corregía el tiempo de coagulación de los hemofílicos(Lewis et al., 1946). Este factor, fue identificado más adelante como Factor VIII. En 1944, al mezclar sangre de dos hemofílicos y observar la corrección del tiempo de coagulación, el Dr. Alfredo Pavlosky confirmó de esta manera, la existencia de grupos de complementación en la Hemofilia, los cuales fueron identificados posteriormente como

Hemofilia A y Hemofilia B(Claudia Pamela Radic, 2010). Los primeros concentrados de Factor VIII se obtuvieron en 1970; no obstante, la terapia de reemplazo con Factor VIII que inicio hacia 1980, traía consigo problemas como la infección por VIH, lo cual llevo a que alrededor del 40% de los pacientes tratados resultaran infectados y la muerte de muchos de estos(Graw et al., 2005). El gen del Factor VIII fue clonado y secuenciado por Gitschier y colaboradores en 1984, siendo el gen más grande descrito hasta ese momento. La terapia con Factor VIII recombinante empezó a implementarse en 1993 (Kreuz & Ettingshausen, 2014; Rossetti et al., 2011).

EPIDEMIOLOGÍA

Se estima, que en el mundo existen alrededor de 178.500 individuos con esta condición(Savage, 2014). En el reporte del Annual Global Survey del 2014, donde se incluyeron en el estudio 106 países, reportan 140,313 individuos con diagnóstico de HA. Se calcula que dos tercios de las personas con HA a nivel mundial no tienen acceso al tratamiento debido a su alto costo(Savage, 2014).

Para el caso de Colombia, se determinó en la primera evaluación de la enfermedad por la Cuenta de Alto Costo que hay 1525 individuos con HA. Para el año 2015, la Cuenta de Alto Costo informó que 60% de los pacientes con enfermedad severa están en profilaxis y que existen 356 pacientes con anticuerpos neutralizantes - inhibidores, dos tercios con inhibidores de título alto (más de 5UB). Según datos del FOSYGA para el primer semestre de 2014, la Hemofilia A es la enfermedad “huérfana” más frecuente en Colombia y la que mayor impacto económico genera en el sistema de salud, ya que para dicho periodo se generaron recobros de alrededor de 37 mil millones de pesos. De acuerdo a los estudios realizados sobre Hemofilia A en Colombia, solo existe un estudio que describe el análisis de las Inversiones en el intrón 22 e intrón 1 (int22 e int1). Dicho estudio fue realizado por Garcés, MF (Garces, 2012). En el estudio, se analizaron 30 pacientes con diagnóstico de Hemofilia A severa en los cuales se encontró la INV22 en el 40% y la INV1 en el 10% (que corresponde a 12/30 y 3/30) mediante uso de Long Distance PCR.

SISTEMA DE LA COAGULACIÓN

La hemostasia es el proceso fisiológico que controla la fluidez de la sangre y a su vez, tiene la capacidad de inducir la formación de un coagulo compuesto de plaquetas y filamentos de fibrina en caso de presentar lesión vascular. A este proceso se le conoce como coagulación(Vine, 2009).

La cascada de la coagulación tiene como fin la conversión de protrombina a trombina, que a su vez genera la conversión de fibrinógeno a fibrina. En individuos sanos, la hemostasia se encuentra en un balance riguroso entre mecanismos anticoagulantes y pro coagulantes(Adams & Bird, 2009; Dahlbäck, 2000; Vine, 2009).

La cascada de la coagulación fue introducida en 1964 por dos grupos independientes. En este modelo, cada factor conlleva a la activación de otro que eventualmente, desencadena en la generación de coagulo de fibrina. El número asignado a cada factor, refleja la secuencia en los que fueron descubiertos y no por el momento de acción dentro de la cascada. Este modelo divide la cascada en dos vías distintas, la intrínseca y extrínseca. La vía intrínseca, presenta todos los factores plasmáticos, mientras que la vía extrínseca Involucra el Factor tisular (FT) y Factor VII(Adams & Bird, 2009; Vine, 2009).

El modelo de la cascada de coagulación representó un gran avance en el entendimiento del proceso de la hemostasia. Sin embargo, este modelo no explicaba como la activación del Factor X por la vía extrínseca no compensaba la pérdida del Factor VIII y IX, por lo que se determinó que la vía intrínseca no tiene un rol fisiológico verdadero en la hemostasia. También se determinó que el complejo FT/ Factor VII, iniciador de la vía extrínseca, puede activar el Factor IX de la vía intrínseca. Otro hallazgo que soportó esta teoría, fue el descubrimiento de que la trombina es el activador fisiológico del Factor XI. Por consiguiente, se concluye que el complejo FT/Factor VII es el mayor evento iniciador de la hemostasia(Adams & Bird, 2009; Dahlbäck, 2000; Vine, 2009).

Por esta razón, se propuso pasar del modelo de la cascada de la coagulación a un modelo celular. En este modelo, el proceso de la hemostasia se describe en tres

pasos: iniciación, amplificación y propagación(Adams & Bird, 2009; Dahlbäck, 2000; Vine, 2009)(Figura 1).

- **Iniciación**

El proceso de coagulación inicia con la exposición de células expresando Factor tisular al torrente sanguíneo. Existe evidencia que el FT se expresa en micropartículas presentes en la circulación, provenientes de plaquetas, leucocitos o células endoteliales durante activación o muerte celular(Adams & Bird, 2009; Vine, 2009).

Una vez ocurre la unión del Factor VII circulante al FT, el Factor VII es activado. El complejo activado FT/Factor VII activa al Factor X y Factor IX. Posteriormente, el Factor X activa al Factor V. El Factor X activado y Factor V convierten pequeñas cantidades de protrombina a trombina, la cual jugará un papel importante en la fase de amplificación(Adams & Bird, 2009; Vine, 2009).

- **Amplificación**

La adhesión de plaquetas está mediada por el receptor de colágeno plaquetario (glicoproteína Ia/IIa) y el Factor von Willebrand; formando enlaces entre plaquetas y fibras de colágeno para su activación. Las pequeñas cantidades de trombina amplifican la activación de plaquetas, aumentando su adhesión y promoviendo la activación de Factores V, VIII y IX(Vine, 2009).

Las plaquetas activadas, liberan vesículas con Factor V en forma parcialmente activada, quien después es activada por Factor Xa. El Factor von Willebrand es clivado por la trombina para liberar y activar al FVIII(Vine, 2009).

- **Propagación**

La fase de propagación, se caracteriza por la producción de complejo tenaza y protrombinasa, quienes se instalan en la superficie plaquetaria. El complejo protrombinasa produce grandes cantidades de trombina, la cual convierte el fibrinógeno a fibrina y también activa el Factor XIII, quien estabiliza la fibrina y así finalmente formar el coagulo (Vine, 2009).

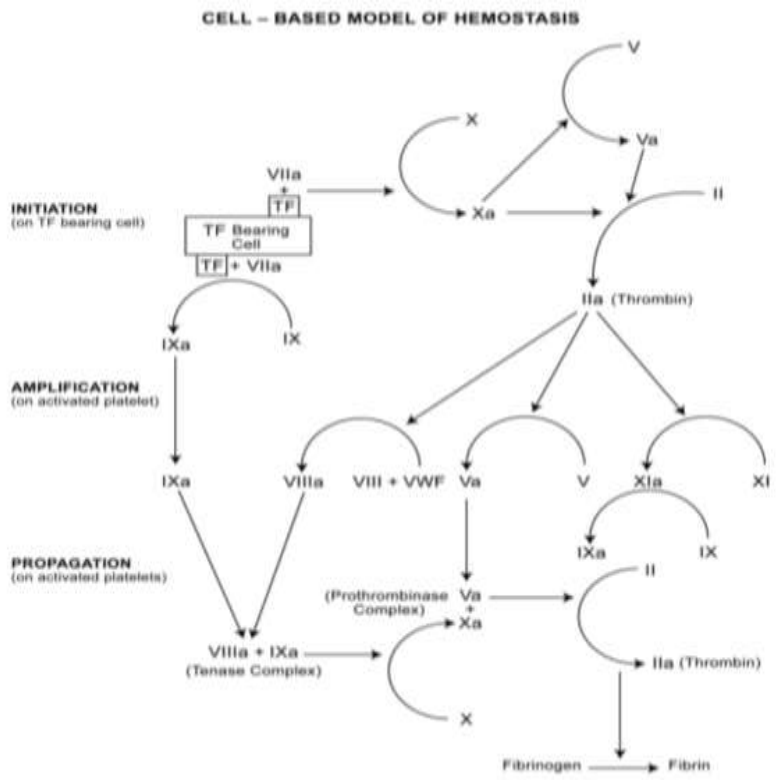


Figura 1. Representación esquemática del modelo celular de la hemostasia. Diagrama representa el modelo celular de la hemostasia incluyendo la fase de iniciación, amplificación y propagación(Vine, 2009).

MANIFESTACIONES CLÍNICAS

La deficiencia del Factor VIII de la coagulación genera una predisposición a sangrar de manera recurrente que puede resultar de difícil manejo. Entre las manifestaciones clínicas de la HA están las hemorragias en órganos internos, músculos y articulaciones, usualmente posterior a procedimientos o traumas menores(Srivastava et al., 2013). La presentación de sangrados espontáneos, dependiendo de la severidad de la enfermedad, se dan a nivel articular, muscular o de tejidos blandos. Clínicamente, la Hemofilia A se presenta en forma severa en el 60% de los pacientes (Factor VIII de coagulación por debajo del 1%), el 15% presenta la forma moderada de la enfermedad (nivel de Factor entre el 1-5%) y el 25% de los pacientes tienen la forma leve de la enfermedad (actividad plasmática de FVIII entre 6 y 30%)(Savage, 2014). En la forma severa, el sangrado se produce de manera espontánea o después

de una lesión; el sangrado espontáneo en las articulaciones, como ocurre en la rodilla, es una de las mayores co-morbilidades la cual conduce a degeneración articular e inflamación crónica, que con el tiempo se torna doloroso e inhabilitante(Srivastava et al., 2013). Con la introducción de infusión de FVIII en 1981 y posteriormente la infusión de FVIII recombinante en 1992, se ha logrado disminuir el impacto de la enfermedad en los pacientes y familias afectadas(Graw et al., 2005).

TRATAMIENTO

TERAPIA DE REMPLAZO CON FACTOR VIII

Desde mediados del siglo XIX, pacientes con HA han sido tratados con terapia de reemplazo del FVIII. No obstante, tomó alrededor de un siglo antes de descubrir el mecanismo de la enfermedad y dos décadas hasta que se desarrolló el primer concentrado de FVIII purificado para uso terapéutico(Graw et al., 2005). Existen dos esquemas de terapia con reemplazo intravenoso, la administración a demanda (en cada sangrado) y la administración profiláctica para prevenir los sangrados.

La terapia profiláctica surge por primera vez en Suecia, a partir de la observación de individuos con HA moderada (niveles FVIII 1- 5UI/dl), que sufrían menos hemorragias espontáneas y por el tratamiento lograban preservar la integridad articular. La meta del manejo profiláctico es la prevención del sangrado articular espontáneo y la degeneración articular(Srivastava et al., 2013).

La vida media de los concentrados de Factor VIII posterior a la infusión es de 8 a 12 horas, similar a la del FVIII endógeno(Srivastava et al., 2013). El concentrado de FVIII altamente purificado se encuentra disponible desde el año 1980 y hacia 1992 el concentrado de FVIII recombinante. (Graw et al., 2005).

INHIBIDORES DEL FACTOR VIII

Los inhibidores son la complicación más severa secundaria al tratamiento en pacientes con Hemofilia A, especialmente el fenotipo severo. Estos neutralizan la función pro coagulante del FVIII e impiden un adecuado funcionamiento. El desarrollo de inhibidores o anticuerpos neutralizantes, está asociado tanto a factores genéticos

del huésped (genotipo, sistema HLA, etnia, historia familiar de inhibidores, polimorfismos en citoquinas, entre otros) y factores ambientales asociados al tratamiento (dosis, intensidad del primer tratamiento, fuente del Factor VIII, edad de inicio, entre otros)(Ghosh & Shetty, 2009; Gouw, van der Bom, & Marijke van den Berg, 2007).

El genotipo constituye, entre los determinantes genéticos, uno de los principales factores de riesgo en la generación de anticuerpos neutralizantes-inhibidores. Se han realizado múltiples estudios que correlacionan el genotipo con la presencia de inhibidores(Boekhorst et al., 2008; Gouw et al., 2013; Gouw et al., 2012; Santagostino et al., 2015). En estos se evidencia que las variantes que conllevan a una ausencia del FVIII, como las mutaciones tipo nonsense, deleciones e Inversiones presentan una fuerte asociación. Debido a su naturaleza, estas mutaciones implican un bajo producto proteico del gen F8. Esto asociado al tratamiento de reemplazo, genera una respuesta inmune de tipo humoral(Ghosh & Shetty, 2009). Estas variantes que conllevan a una ausencia del FVIII son las responsables de la gran mayoría de casos de HA severa(Boekhorst et al., 2008) (Antonarakis, 1995; Antonarakis, Kazazian, et al., 1995; Antonarakis, Rossiter, et al., 1995; Higuchi, Antonarakis, et al., 1991; Higuchi, Kazazian, et al., 1991; Kazazian et al., 1988; Lakich, Kazazian, Antonarakis, & Gitschier, 1993; Wacey et al., 1996; Woods-Samuels, Kazazian, & Antonarakis, 1991). También se han identificado otros tipos de mutaciones presentes en pacientes con HA severa como mutaciones missense, mutaciones que alteran el marco de lectura abierto del gen (frameshift) y errores en sitios de splicing, que se asocian en menor medida con la presencia de inhibidores(Boekhorst et al., 2008; Ghosh & Shetty, 2009).

Otro factor genético de importancia, es la historia de inhibidores en familiares afectados. Se ha descrito un riesgo hasta del 50% entre hermanos y 10% en parientes. Sin embargo, se cree que otros factores no genéticos deben contribuir, porque de ser así, la incidencia sería mucho más alta entre familias(Ghosh & Shetty, 2009).

La composición étnica es otro de los factores genéticos a tener en cuenta, ya que existe una mayor prevalencia de inhibidores en personas afroamericanas y latinas en comparación con caucásicos. Se sabe que el espectro mutacional no cambia entre etnias, por lo que se plantea que estas diferencias se deban a polimorfismos de algunos determinantes de la respuesta inmune como IL2, TNFa o el sistema HLA clase II(de Alencar et al., 2015; Pavlova et al., 2009; Pergantou et al., 2013) o a los haplotipos del FVIII (Viel et al., 2009). Sin embargo, no se ha establecido asociación directa aun con estos factores(Srivastava et al., 2013).

Antes, entre los factores no genéticos, se tenía en cuenta el primer el tipo de FVIII administrado (Gringeri, 2011). Se consideraba que el Factor VIII derivado plasmático resultaba menos inmunogénico que el FVIII recombinante. Estudios recientes han reportado que el cambio de concentrado de FVIII no es un factor de riesgo para la generación de inhibidores (Gouw et al., 2013; Gouw et al., 2012; Gouw et al., 2011; Gringeri, 2011). Variables como la dosis inicial, la intensidad del primer tratamiento y la edad de inicio de tratamiento se deben tener en cuenta(Ghosh & Shetty, 2009).

Los inhibidores se presentan con mayor frecuencia en individuos con HA severa y, en menor proporción, en personas con el fenotipo moderado o leve. De aquí la importancia de determinar la alteración molecular en los pacientes con HA severa, para determinar la posible predisposición a la aparición de inhibidores con el tratamiento y poder plantear medidas estratégicas para evitar esta complicación (Boekhorst et al., 2008; Ghosh & Shetty, 2009; Gouw et al., 2011; Claudia Pamela Radic, 2010).

GEN DEL FACTOR VIII (GEN F8)

CARACTERÍSTICAS

El gen que codifica el Factor VIII de la coagulación (gen F8) se encuentra ubicado en el brazo largo del cromosoma X (Xq28). Representa el 0.1% del cromosoma X (Hoyer, 1994), tiene un tamaño de 186 kb de los cuales, 177 kb corresponden a secuencias intrónicas(Gitschier et al., 1984).El gen contiene 26 exones, de los cuales 24 varían

en tamaño desde 69 pb hasta 262 pb. Los dos exones restantes, el 14 y 26, presentan tamaños de 3,106 pb y 1,958 pb, respectivamente(Graw et al., 2005). El intrón 22, presenta una isla CpG que actúa como promotor bidireccional para dos genes anidados (F8A y F8B). El gen F8A se codifica en sentido contrario al gen F8, el cual se expresa en distintos tipos celulares(Bowen, 2002). Hasta el momento, se le ha atribuido funciones por fuera de la cascada de la coagulación(Graw et al., 2005). El gen F8B comprende la región 5´del intrón 22 y exones 23-26. Este gen, se transcribe en el mismo sentido del gen F8 y codifica un producto proteico más pequeño que el producto del gen F8. Se ha propuesto que el gen F8B codifica una proteína que podría participar en la generación de tolerancia inmune central hacia el Factor VIII (Boekhorst et al., 2008; Bowen, 2002; Gouw et al., 2011). Por ende, cabría esperar que mutaciones que modifiquen la expresión de esta proteína (comprendido entre el intrón 22 y exones del 23-26), generen una deficiencia y posiblemente, una predisposición a la generación de inhibidores frente al tratamiento con FVIII. El gen F8 codifica un ARNm de 9,010 nucleótidos en longitud que comprende una región no trascrita 5´ de 150 nucleótidos, un marco de lectura de 7,056 nucleótidos y una región no transcrita 3´ de 1,806 nucleótidos(Bowen, 2002)(Figura 2).

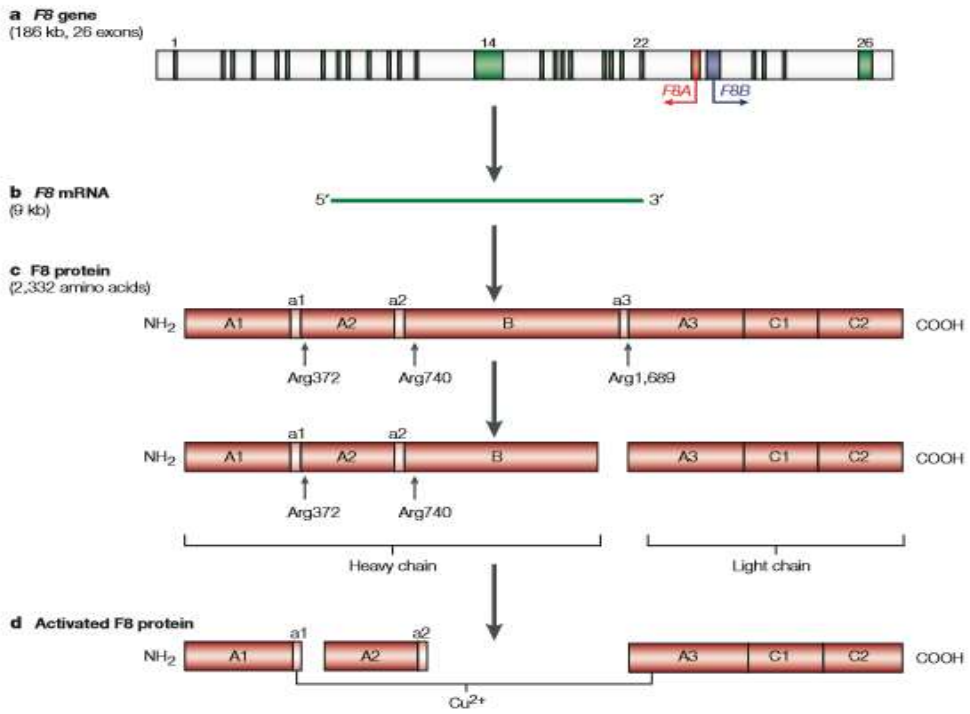


Figura 2. Características del gen del Factor VIII, RNA mensajero y Proteína. El diagrama muestra las características del Factor VIII, gen (F8), así como la producción y el procesamiento de la proteína codificada. **(a)** el gen F8 tiene una longitud de 186 kb y consiste en 26 exones, 24 de los cuales varían de longitud desde 69 hasta 262 nucleótidos; los exones restantes, exones 14 y 26, son de 3,106 y 1,958 nucleótidos de longitud, respectivamente. La mayor parte del exón 26 consiste en una secuencia 3´ no traducida. El intron 22 contiene 2 genes (F8A y F8B) señalado con flechas de colores (rojo y azul, respectivamente) indicando la orientación de la transcripción. **(b)** El ARNm procesado tiene alrededor de 9kb de longitud. **(c,d)** El ARNm del gen F8 es traducido a un precursor proteico de 2,351 aminoácidos (267 kDa), el cual es procesado hacia producto final (panel superior, figura **c**) que solo faltan 19 aminoácidos del extremo N- terminal de la secuencia líder. Posterior procesamiento por trombina (flechas negras apuntando hacia arriba en **c**) que terminan en la activación del F8. Primero, el clivaje en Arg 1,689 (en la unión del dominio B-A3) generando una cadena pesada de tamaño variable (90-210 kDa), que consiste en los dominios A1, A2 y un fragmento heterogéneo del dominio B; durante el proceso, un péptido de 40 aminoácidos (a3) es liberado del producto C-terminal para formar una cadena liviana de 73 kDa que consiste de los dominios A3-C1-C2 (**c**, panel superior). Posterior clivaje por la trombina (**c**, panel inferior), se retira la mayoría del dominio B y se cliva la proteína entre los dominios A1 y A2: clivaje en Arg372 (entre el dominio A1 y A2) y en Arg740 (entre dominios A2 y B) generando dominios de 54 kDa y de 44 kDa. **(d)** La proteína activada es unida en un complejo por calcio (Graw et al., 2005).

PROTEÍNA DEL FACTOR FVIII

La proteína del Factor VIII está constituido por una secuencia de 2,332 aminoácidos, excluyendo los 19 aminoácidos del péptido señal, conocido como pro-cofactor inactivo circulante(Bowen, 2002). La proteína está conformada por 6 dominios A1,A2,B,A3,C1,C2,y tres pequeños péptidos ácidos a1, a2, a3, ordenados Nh2-A1-a1-A2-a2-B-a3-A3-C1-C2-COOH (Bowen, 2002; Graw et al., 2005; Hoyer, 1994). La proteína del Factor VIII, posterior a la activación por la trombina sufre una serie de clivajes. En primera instancia, se cliva el residuo de Arginina en la posición 1,689 entre el dominio B y A3, generando una cadena pesada que consta de los dominios A1,A2 y B(Bowen, 2002; Graw et al., 2005). Posteriormente, la molécula sufre un segundo clivaje, generándose la cadena liviana que contiene los dominios A3, C1 y C2. Finalmente, la trombina hace que el dominio B de la cadena pesada sea clivado y removido del producto final que consta de una cadena pesada N-terminal y una cadena liviana C-terminal unidos por una molécula de Cobre(Bowen, 2002; Graw et al., 2005). Hay que tener en cuenta que el Factor X también puede hacer esta serie de modificaciones. El pro-cofactor FVIII se encuentra unido al Factor von Willebrand en la circulación. Al suceder la actividad proteolítica y la activación del FVIII, este es liberado de esta unión(Bowen, 2002)(Figura 2).

El Factor VIII de la coagulación se sintetiza principalmente en hepatocitos y células endoteliales con una expresión residual en algunas células nucleadas de la sangre. Los dominios A (A1, A2, A3) de la proteína contienen aproximadamente 330 aminoácidos, 980 aminoácidos para el dominio B y los dominios C de aproximadamente 150 aminoácidos en la región carboxi-terminal duplicada. Esta proteína presenta un alto grado de homología con el Factor V de la coagulación, en donde solamente los dominios B de las dos proteínas no están relacionados, y menor grado de homología con la Ceruloplasmina y la Ferroxidasa(Graw et al., 2005; Hoyer, 1994).

Cada dominio del FVIII, presenta diferentes sitios de unión para algunos de los componentes de la casada de la coagulación. La gran mayoría de las interacciones se presentan en regiones de la cadena liviana (dominio A3, C1 y C2) (Graw et al.,

2005)(Figura 3). Se ha descrito hasta el momento funciones de transporte y procesamiento intracelular para el dominio B. Sin embargo, aún no es claro su papel dentro de la actividad coagulante de la proteína(Pipe, 2009). Estudios han reportado que mutaciones dentro de este dominio generalmente no explican fenotipos severos de la enfermedad. No obstante, se ha propuesto mutaciones missense en esta región como explicación de fenotipos leves(Ogata, Selvaraj, Miao, & Pipe, 2011; Pahl, Pavlova, Driesen, & Oldenburg, 2014).

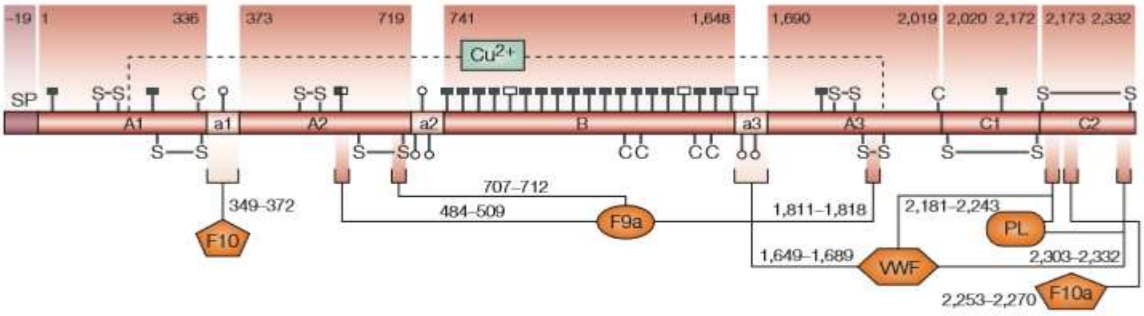


Figura 3. Propiedades e interacción de la proteína del Factor VIII. La figura muestra la totalidad de la proteína del FVIII (incluyendo péptido señal (SP) en extremo N-terminal, los dominios A1, A2, B, A3, C1 y C2, y los dominios intermedios a1, a2 y a3). Los números indican la posición de aminoácidos. Los sitios de interacción del F8 con fosfolípidos (PL) y otros Factores de coagulación (von Willebrand Factor (VWF), Factor de la coagulación IX activado (F9a), Factor 10 (F10) y Factor X activado (F10a)) también son indicados. El patrón de glicosilación en residuos Asn es importante para el transporte de F8 del retículo endoplásmico hacia el aparato de Golgi (cuadrados negros indican los residuos glicosilados, cuadrados blancos indican residuos no glicosilados, cuadrados blancos y negros indican residuos parcialmente glicosilados y cuadrados grises residuos potencialmente glicosilados). Residuos Tyr sulfatados son importantes para el eficiente clivaje por la trombina (círculos blancos). La correcta formación de puentes disufuro (S-S), relativo a la presencia de residuos Cys libres (C), es necesario para el adecuado plegamiento de la proteína (Graw et al., 2005).

ALTERACIONES MOLECULARES EN EL GEN F8

Se han descrito distintos tipos de variantes genéticas en el gen F8 (variaciones puntuales, pequeñas y grandes deleciones/inserciones, rearreglos/Inversiones). De las variaciones puntuales, las tipo missense corresponden al 90% de los casos de HA. Las Inversiones representan el 5 al 10% de los casos de HA, sin embargo esta

alteración se presenta principalmente en casos de HA severa(Bowen, 2002); siendo la Inversión del intrón 22 la responsable del 50% de los casos (Graw et al., 2005; Claudia Pamela Radic, 2010).

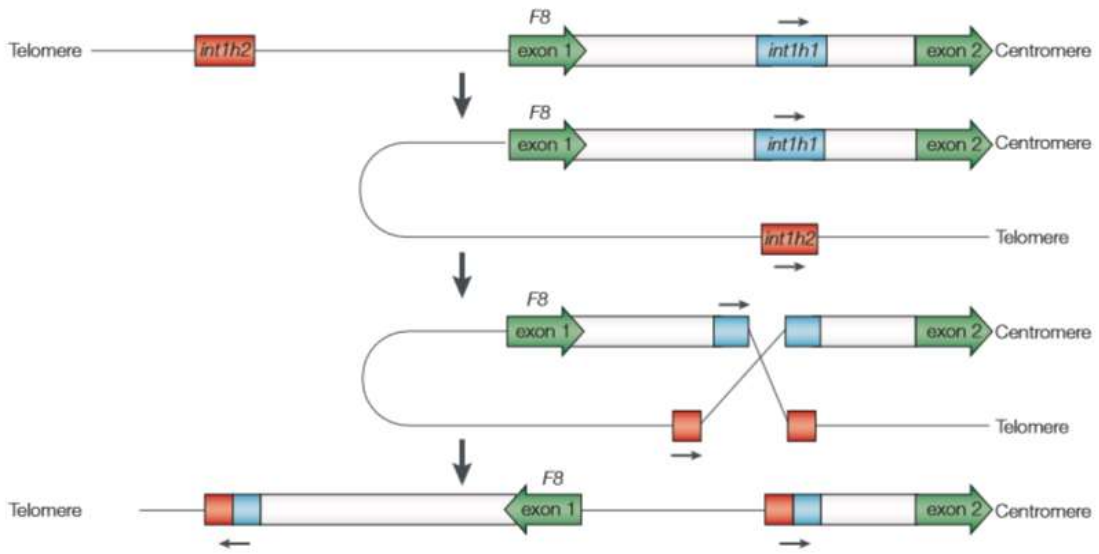


Figura 4. Inversión intrón 1 del Factor VIII de la coagulación. La figura muestra el intrón del Factor VIII de la coagulación, el cual está flanqueado por exones (en verde; dibujados para indicar la dirección de la transcripción), y contiene una secuencia repetida *int1h1* (en azul) flanqueado por secuencias únicas. La línea representa el ADN que se encuentra por fuera del gen F8, y la secuencia repetida *int1h2* indicado por el cuadrado rojo. Las flechas indican la dirección de la secuencia. Los pasos subsiguientes en el diagrama ilustran como ocurre la recombinación homóloga entre las dos repeticiones *int*1*h*explican el origen de la inversión. Esto lleva a la aparición de Hemofilia A alrededor del 1% de los casos (Graw et al., 2005).

En el intrón 1 e intrón 22 del gen F8, existen regiones con secuencias intragénicas homologas a secuencias extragénicas que predisponen a una recombinación anómala durante la meiosis. Esto conlleva a rearreglos intracromosómicos que conducen a una disrupción de la secuencia del gen. Estos rearreglos pueden generar deleciones o duplicaciones asociadas al rearreglo cromosómico (Graw et al., 2005; Li, Carrero, Dong, & Yu, 2015; Claudia Pamela Radic, 2010). Entre un 45-50% de los casos de Hemofilia A severa, la alteración molecular se debe a una Inversión localizada en el

intrón 22 del gen F8 (INV22)(Bowen, 2002; Graw et al., 2005). Esta Inversión, separa los exones 1-22 de los exones 23-26 del gen. Este intercambio se presenta por recombinación no alélica entre la secuencia homóloga intragénica ubicada en el intrón 22 (int22h-1) y otras secuencias homólogas extragénicas (int22h-2 e int22-h3), ubicadas a 400 kb en dirección al telómero corriente arriba del gen (Bowen, 2002; Graw et al., 2005; Rossetti et al., 2008a; Rossiter et al., 1994). Un 0.5-5% de los casos, se deben a la Inversión por recombinación de secuencias homólogas ubicadas en el intrón 1 (INV1) y la otra a 200 kb corriente arriba del gen(Pezeshkpoor, Rost, Oldenburg, & El-Maarri, 2012; Claudia Pamela Radic, 2010; Rossetti et al., 2008b)(Figura 4 y 5).

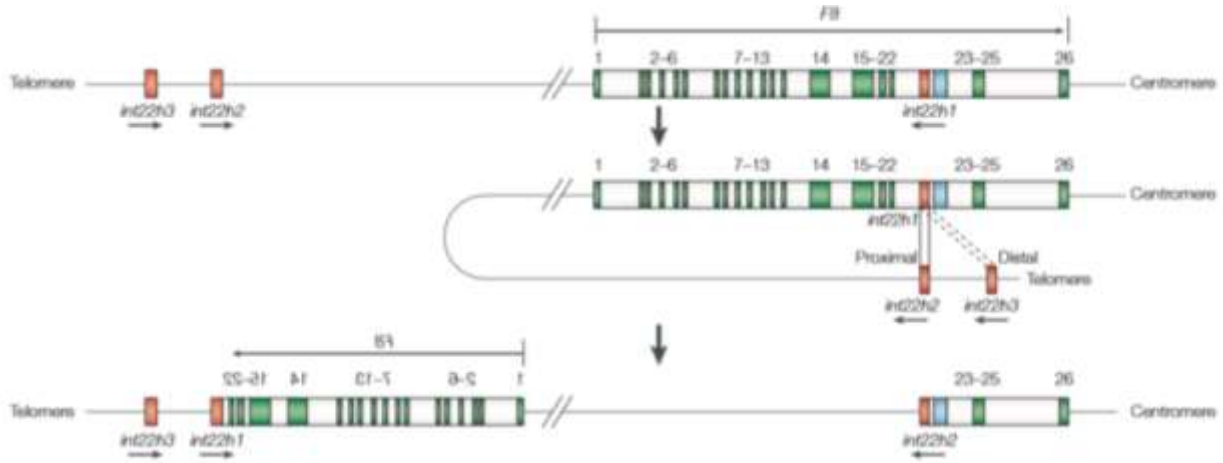


Figura 5. Inversión intrón 22 del Factor VIII de la coagulación. En el intrón 22 del gen F8, un fragmento (referido como *int22h1*) tiene otros dos fragmentos con secuencias similares que son distales al gen F8 (*int22h2* e *int22h3*). Las flechas indican la orientación de las secuencias repetitivas. Por recombinación homóloga intracromosómica, una de estas regiones distales forma una estructura alternativa con el elemento correspondiente dentro del intrón 22, resultando en la inversión de los exones 1-22 respecto a exones 23-26del gen F8. Esto conlleva a Hemofilia A severa en el 35% a 45% de los casos. Aunque *int22h1* puede recombinarse con *int22h2* o *int2h3,* solo se muestra el producto de la recombinación con la región int22h2 (Graw et al., 2005).

Cerca del 50% restante de las mutaciones en individuos con HA severa se debe principalmente a mutaciones que alteran los sitios de splicing, grandes deleciones y mutaciones sin sentido que producen codones de pare y por consiguiente una

proteína truncada (Brackmann et al., 2003; El-Maarri et al., 2005; El-Maarri et al., 2006; Oldenburg, Brackmann, Hanfland, & Schwaab, 2000; Oldenburg et al., 1997; Oldenburg et al., 2003). Sin embargo también se reportan mutaciones puntuales tipo missense.(Graw et al., 2005; S. Y. Lin et al., 2008; Pezeshkpoor et al., 2013; K.-C. G. Rallapalli PM, Tuddenham EG, Gomez K, Perkins SJ, 2014)(Figura 6).

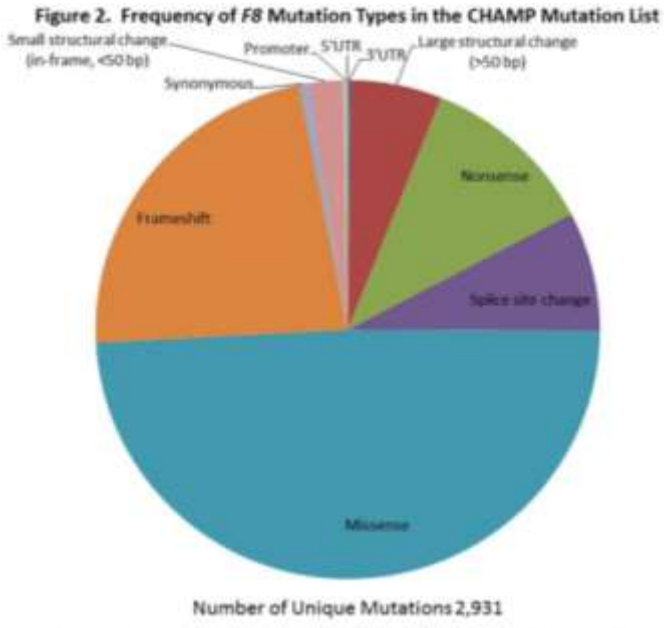


Figura 6. Frecuencia de mutaciones en el gen F8 en la base de datos CHAMP. Distribución por frecuencia de las variaciones patogénicas registradas en la base de datos CHAMP del CDC para todas las formas fenotípicas de Hemofilia A. Tomado de CDC – Centers for Disease Control and Prevention- Hemophilia Homepage. http://www.cdc.gov/ncbddd/hemophilia/champs.html

DIAGNÓSTICO PARA MUTACIONES DEL GEN F8

SOUTHERN BLOT Y LONG DISTANCE PCR

El análisis para la detección de las inversiones de los intrones 22 y 1 se realizaba inicialmente mediante Southern Blot(Ononye & Jenkins, 1999; Rossetti et al., 2011). La metodología de Southern Blot radica en la digestión de ADN genómico de la muestra de cada individuo, seguido de la separación mediante electroforesis en geles de agarosa. Con ello, es posible distinguir diferentes patrones de bandas por la acción

de la enzima de restricción BclI y una sonda (900 bp Eco RI-Sac I fragment of plasmid p462.6, ATCC #57203). Por cada alelo se obtenía tres bandas diferentes (ej. Alelo normal señal de 21.5, 16, y 14 kb, INV22 tipo I 20.0, 17.5 y 14.0 kb e INV22 tipo II 20.0, 16.0, y 15.5 kb(Rossetti et al., 2011). Posteriormente, con la introducción de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, siglas en inglés) y el desarrollo de DNA polimerasas de alta procesividad, se desarrollaron metodologías como Long distance-PCR (LD-PCR) para analizar las alteraciones en los intrónes mencionados(Rossetti et al., 2011; Rossetti et al., 2008b) por medio de cuatro primers diferentes, P y Q que flanquean la región int22h y primers A y B flanqueando las dos regiones homólogas extragénicas. De acuerdo a las parejas de primers que amplificaban se obtenía un producto de tamaño predecible. Esta metodología fue ampliamente utilizada hasta el año 2008-2010. Sin embargo, la misma no permitía discriminar entre la INV22 tipo I y tipo II. Sin embargo, aunque en su momento fue un abordaje de gran interés para reemplazar al Southern Blot, por ser menos laboriosa y de menor costo, la LD-PCR presenta algunas limitaciones como la necesidad de amplificar grandes segmentos (10-12 kb) de ADN y utilización de DNA polimerasas de alta procesividad de mayor costo (Rossetti et al., 2011).

En Argentina, Rossetti et al (Rossetti, Radic, Larripa, & De Brasi, 2005), desarrollaron una metodología alternativa para el análisis de INV22 e INV1 llamada Inverse Shifting PCR. El diseño de esta prueba se basó en la generación de fragmentos de restricción por BCL1 (que permiten la identificación de INV22 tipo I y II) y la metodología de Inverse PCR, previamente diseñada por Ochman en 1988 (Ochman, Gerber, & Hartl, 1988) .

INVERSE SHIFTING PCR

La estrategia de Inverse Shifting-PCR (IS-PCR), consiste en la amplificación específica diferencial de fragmentos de restricción circularizados que presentan cambios de secuencia asociados a determinados rearreglos genéticos, resultando en productos de tamaño definidos y pequeños (Claudia Pamela Radic, 2010; C. P. Radic et al., 2009b).

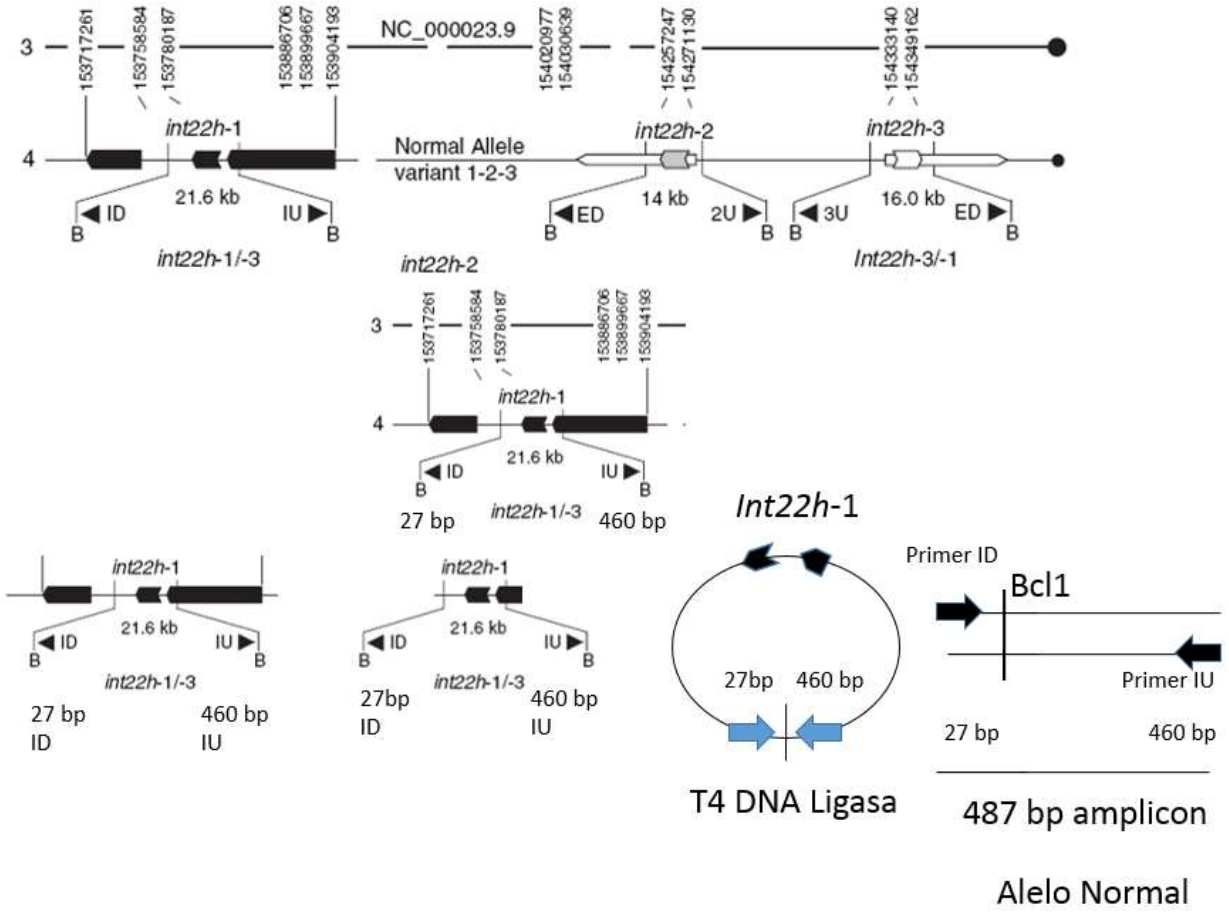


Figura 7. Esquematización de Inverse Shifting PCR y resultado de alelo normal. Diagrama ilustrativo de la reacción de Inverse Shifting PCR. Panel superior muestra la ubicación de los sitios de corte con la enzíma de restricción BCL1, y la ubicación de los primers utilizados en la reacción (ejemplo ID, IU, ED, 2U y 3U) a distancia en pares de bases conocida con relación al sitio de corte con la enzima. Panel inferior, muestra como ejemplo, la circularización del fragmento de restricción con T4 DNA ligasa que contiene la región int22h-1 en el intrón 22 y la dirección de los primers que quedan ahora enfrentados al autoligar los fragmentos, generando un producto de PCR de 487 pb en caso de que no se haya producido rearreglo cromosómico. Tomado y modificado de (Rossetti et al., 2008b).

La obtención de amplicones de distintos tamaños mediante la estrategia de IS-PCR, se basa en la ubicación diferencial de primers a corta distancia previamente conocida de los sitios de restricción (BclI) en cada uno de los fragmentos de interés. De esta manera, el tamaño molecular de cada amplicon es específico para la alteración molecular en la muestra de cada individuo. Este abordaje evita la amplificación directa

de las secuencias int22h (9,5 kb) por LD-PCR. Además, permite detectar los patrones tipo I y tipo II de la Inv22 y estudiar la presencia de la Inv1 de manera simultánea sobre el mismo sustrato obtenido (ADN genómico fragmentado por BclI y circularizado por autoligación) (Figura 7 y 8). Así mismo, el estudio de estos fragmentos de restricción permite identificar todas las variantes genómicas que involucran el int22h (i.e., duplicaciones y deleciones) por medio de una prueba complementaria desarrollada por los mismos autores (Claudia Pamela Radic, 2010; Rossetti et al., 2011; Rossetti et al., 2008b) (Figura 9).

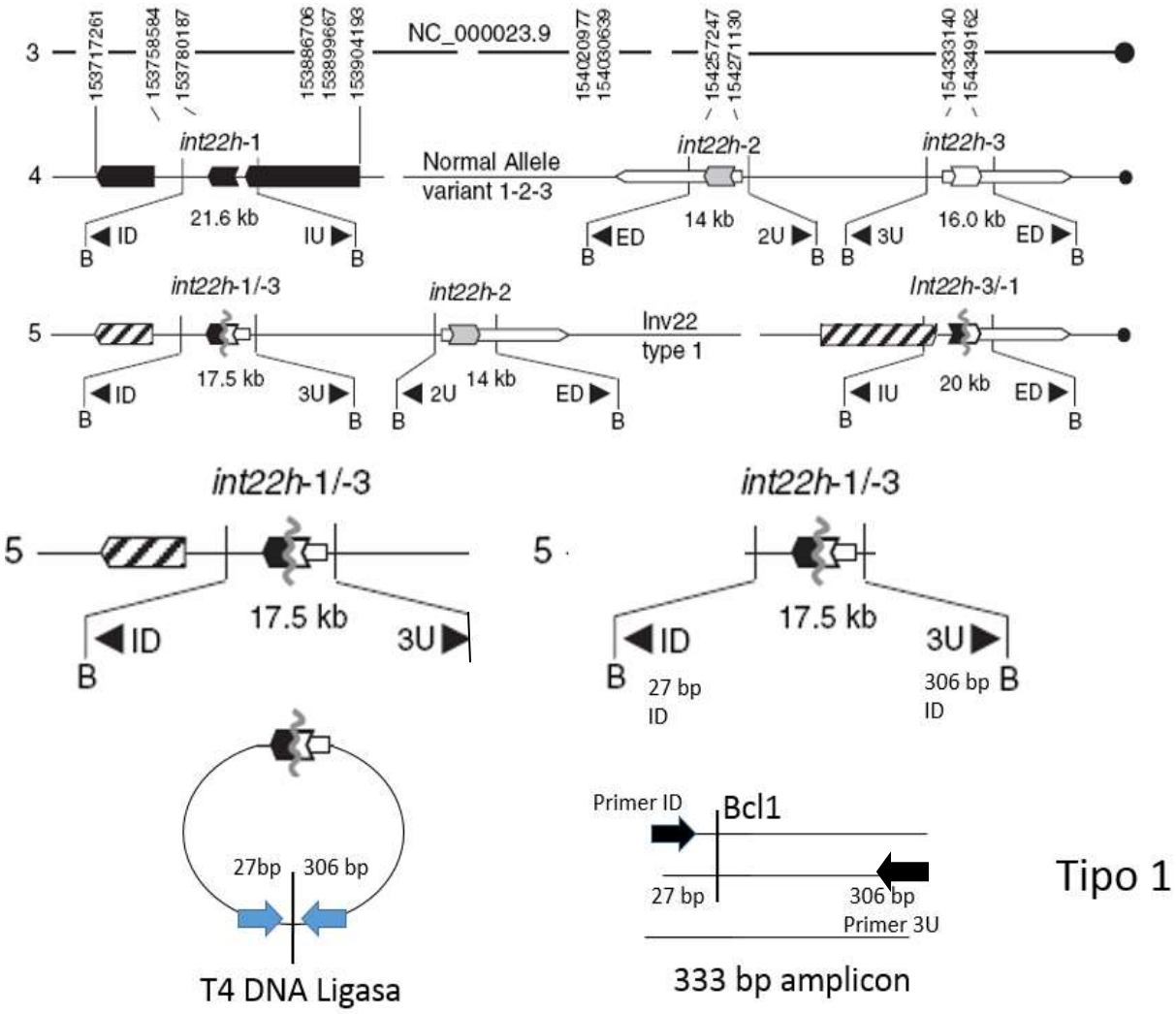
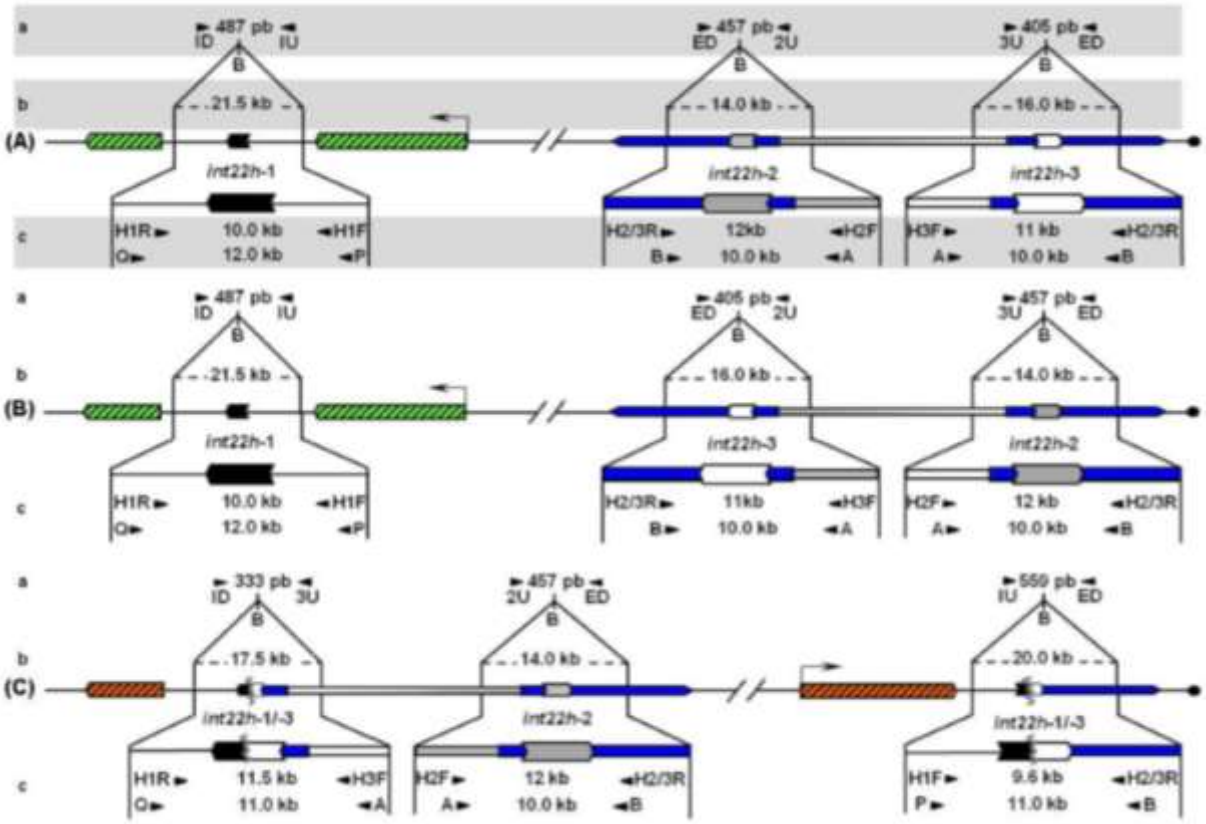


Figura 8. Esquematización de Inverse Shifting PCR y resultado de inversión del intron 22 tipo I. Diagrama ilustrativo de la reacción de Inverse Shifting PCR cuando se ha presentado un rearreglo entre las regiones homologas int22h-1 e int22h-3 Panel superior

muestra la ubicación de los sitios de corte con la enzíma de restricción BCL1, y la ubicación de los primers utilizados en la reacción (ejemplo ID, IU, ED, 2U y 3U) la distancia en pares de bases conocida con relación al sitio de corte con la enzima. Panel inferior, muestra la circularización del fragmento de restricción con T4 DNA ligasa que contiene INV22 tipo 1 la dirección de los primers que quedan ahora enfrentados al autoligar los fragmentos, generando un producto de PCR de 333 pb en caso de que se haya producido rearreglo cromosómico INV22 tipo 1. Tomado y modificado de (Rossetti et al., 2008b).



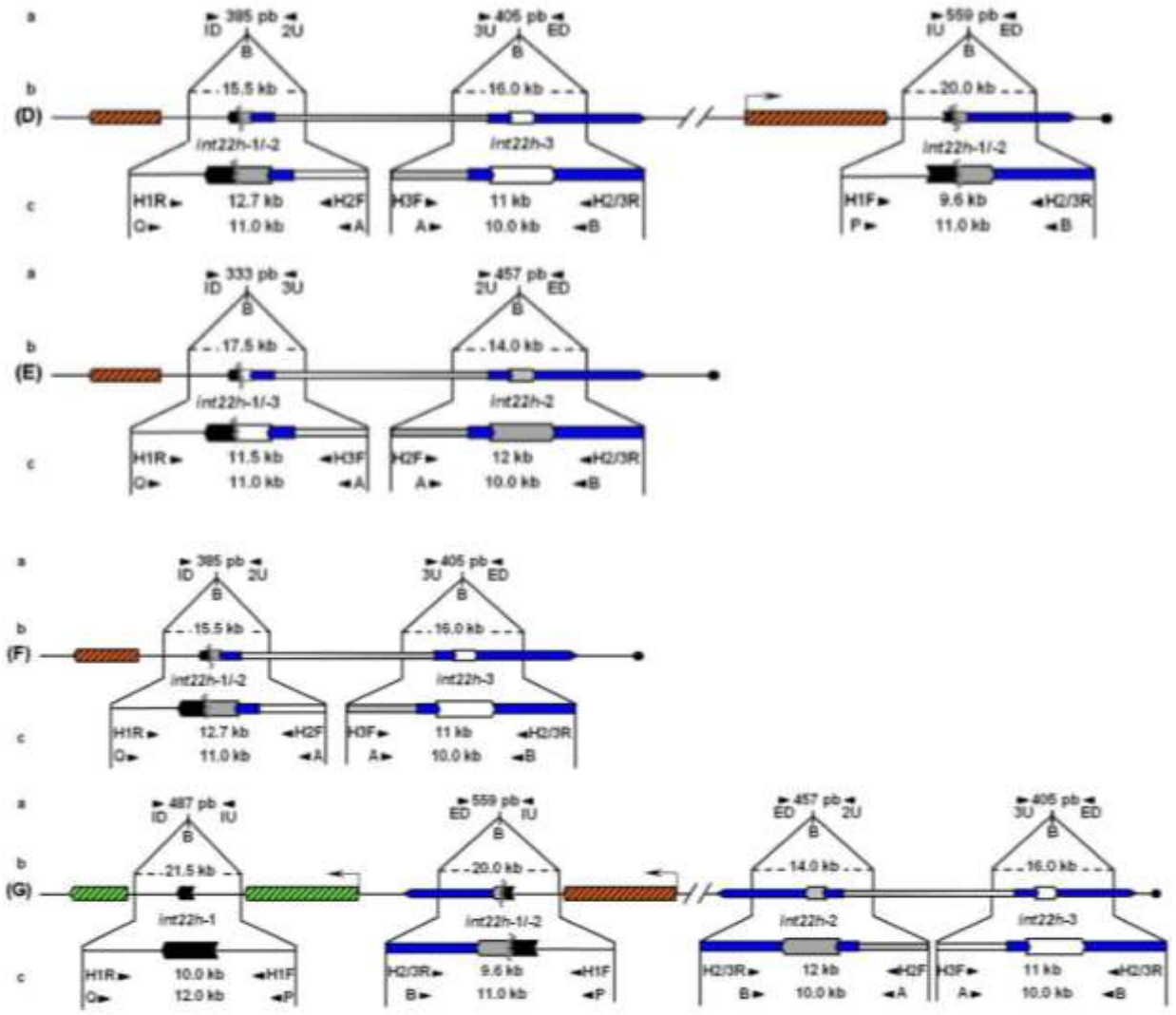


Figura 9. Esquematización del gen F8 y regiones normales (A, B) variantes de recombinación relacionadas a *int22h* (C-G). (A) Alelo normal variante *h*123 (de acuerdo a orientación de las secuencias Xq->Xtel del *int22h1, h2* y *h3*); **(B)** Alelo normal variante *h123* (polimorfismo inversión no deletérea *h123/h132*); **(C)**Inv22 tipo I asociado a HA a partir de recombinación entre *h1* y *h3* de la variante *h123* de la figura (A); **(D)** Inv22 tipo II asociado a HA a partir de recombinación entre *h1* y *h2* de la variante *h132* de la figura (B); **(E)** Del22 tipo I asociada a HA a partir de recombinación entre secuencias de igual orientación *int22h1* y *h3* de variante *h132* de la figura (B); **(F)** Del22 tipo II asociado a HA a partir de recombinación entre *int22h1* y *h2* de variante *h123* de la figura (A); **(G)** Ejemplo de una Dup22 no asociada a HA a partir de recombinación entre secuencias con misma orientación *int22h1* y *h2* de la variante *h123* (A).Tomado de (Claudia Pamela Radic, 2010).

TAMIZAJE MUTACIONAL

Se han utilizado varios abordajes moleculares para la identificación de mutaciones en los exones y en uniones intrón-exón en pacientes con Hemofilia A. Estas metodologías consisten en un tamizaje genético para la identificación de alteraciones en la secuencia del ADN amplificado, tales como: SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism), análisis de heteroduplex en geles de gradiente desnaturalizante (DGGE-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis), CSGE (Conformational Strand Gel Electrophoresis), DHPLC (Denaturing High Pressure Liquid Chromatography), entre otros. El primer análisis de la secuencia del gen del Factor VIII con estas metodologías se llevó a cabo en 1991 mediante DGGE. Este abordaje mostró una tasa de detección del 90% de las muestras analizados (Higuchi, Antonarakis, et al., 1991). La metodologías como DGGE y CSGE consumen mucho tiempo y esfuerzo del investigador,requieren de electroforesis en geles desnaturalizantes, presentan una tasa de detección de mutaciones que varía entre el 75% y 96% (Higuchi, Antonarakis, et al., 1991). Por otro lado, metodologías como DHPLC requieren equipos costosos no disponibles en laboratorios de biología molecular de rutina.

HRM (HIGH RESOLUTION MELTING)

El HRM es un método de análisis post-PCR, diseñado para identificar la variación en secuencias de ácidos nucleicos basado en las curvas de disociación de las cadenas de ADN de acuerdo a su composición de nucleótidos, longitud, contenido de GC y/o complementariedad de las hebras (Hill et al., 2010; Montgomery et al., 2007; Ririe et al., 1997) utilizando equipos de PCR en Tiempo Real. Esta metodología fue descrita originalmente por Ririe y colaboradores en 1997, utilizando un fluorómetro acoplado a un equipo de PCR para identificar la variación en productos amplificados a medida que se llevaba a cabo la disociación de la doble hebra de ADN en presencia de un compuesto fluorescente (SyberGreen)(Ririe et al., 1997). Una vez se lleva a cabo la amplificación por PCR, la fluorescencia disminuirá a medida que se aumente la temperatura y las dos hebras de ADN se disocian (High Resolution Melting)(S. Y. Lin et al., 2008). La estabilidad térmica del producto de amplificación radica en su

composición de nucleótidos. Ante la presencia de una mutación, la estabilidad difiere viéndose reflejado en cambios en la curva de disociación (melting)(Montgomery et al., 2007) (Figura 10).

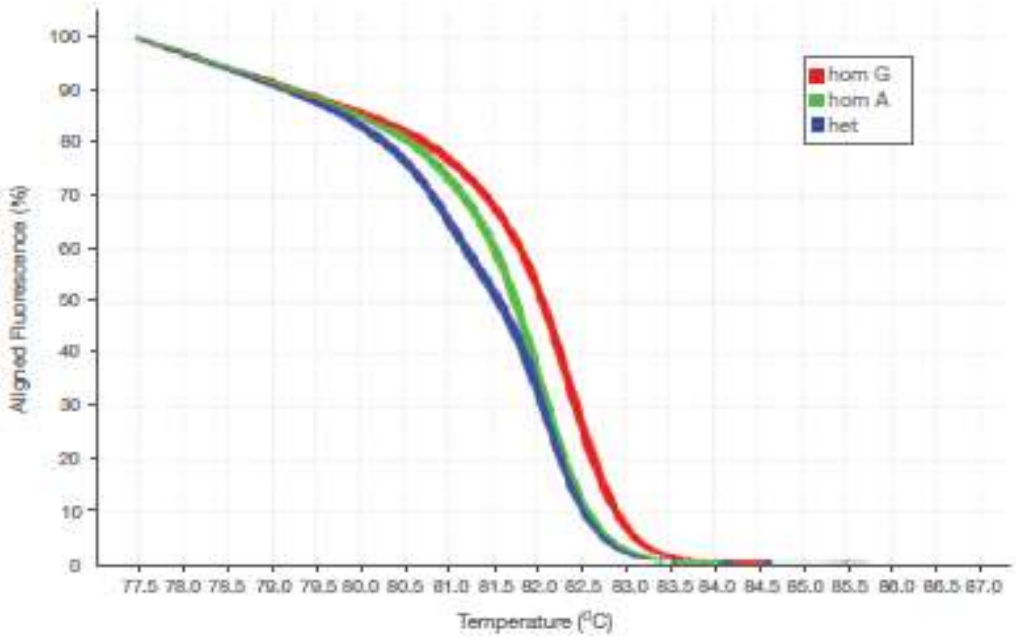


Figura 10. Curva de disociación (melt) a alta temperatura en ADN de doble cadena. La gráfica muestra las curvas de disociación alineadas y la caída de la fluorescencia a medida que la doble cadena se disocia en cadena sencilla. Curva en rojo, homocigoto para guanina, curva verde homocigoto para adenina y curva azul heterocigoto A/G. Tomado de: A Guide to High Resolution Melting (HRM) Analysis, Applied Biosystems.

La metodología HRM ha sido ampliamente utilizada para el tamizaje e identificación de mutaciones en diversas enfermedades genéticas, como la enfermedad granulomatosa crónica, distrofia muscular de Duchenne y Becker, defectos en la Ornitina Transcarbamilasa, entre otros (Er & Chang, 2012; Hill et al., 2010; Montgomery et al., 2007; Ririe et al., 1997). Esta metodología presenta ventajas sobre otras utilizadas previamente, permitiendo un análisis rápido en tiempo real y con costos muy por debajo de otras metodologías. La detección de alteraciones no es dependiente de la composición del buffer utilizado y no requiere la preparación de geles, convirtiéndose así en una metodología de fácil utilización para la detección de

cualquier mutación(Er & Chang, 2012; Hill et al., 2010; Montgomery et al., 2007; Ririe et al., 1997).

Una vez se realiza el análisis de los exones del gen mediante HRM, aquellos que presenten un patrón anormal en la curva de disociación son analizados mediante secuenciación Sanger, con la utilización de dideoxi-terminadores marcados con diferentes fluoróforos y resueltos en electroforesis capilar en un analizador genético(Sanger et al., 1977).

Los métodos de Secuenciación de Nueva Generación se han convertido en la métodología de elección para la rápida identificación de las mutaciones existentes en Hemofilia A en países desarrollados. Sin embargo, debido a su alto costo, estas tecnologías o no están aún disponibles en países como el nuestro, o si lo están, los costos de análisis por muestra no son costo-efectivos.

PROBLEMÁTICA

En países desarrollados, debido a la disponibilidad de métodos de diagnóstico de la Hemofilia A como la secuenciación de nueva generación, permite la identificación de las alteraciones moleculares existentes en cada paciente. Sin embargo, en países como el nuestro estas tecnologías no están disponibles, lo que implica el envío de las muestras por fuera del país para su análisis con costos que oscilan entre los US$1500-2500 por muestra.

El alto costo que implica el análisis de cada paciente y el hecho de que no existe un centro de referencia nacional para el diagnóstico molecular de esta enfermedad, generan la necesidad de desarrollar métodos diagnóstico económicos, que permitan identificar las mutaciones presentes en cada paciente. Esto con el fin de poder brindar la asesoría genética apropiada, realizar correlación genotipo-fenotipo, evaluar el riesgo de desarrollo de inhibidores con base en la terapia empleada y el asesoramiento genético en los casos que se requiera.

PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

A partir del abordaje molecular escalonado mediante el análisis de las inversiones del intrón 1 e intrón 22 por IS-PCR y el análisis de HRM seguido de secuenciación Sanger, permitirá la identificación de la totalidad de mutaciones en el gen del Factor VIII en pacientes con Hemofilia A?

Existe correlación entre el tipo de variación patogénica presente en cada paciente con diversas variables clínicas tales como el desarrollo de inhibidores al Factor VIII o la presencia de artropatía?

OBJETIVO GENERAL

Implementar un abordaje molecular escalonado para la identificación de mutaciones en el gen del Factor VIII de la coagulación y la correlación del genotipo con diversas variables clínicas en una muestra de pacientes con Hemofilia A residentes en la ciudad de Bogotá, D.C. Colombia.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1) Analizar las inversiones de los intrones 22 y 1 del gen del Factor VIII de la coagulación por IS-PCR.
2) Identificar posibles variaciones en los exones del gen del Factor VIII mediante resolución de disociación a alta temperatura (HRM-High Resolution melting) en pacientes que no tengan inversión del intrón 1 o 22.
3) Secuenciar los exones que presenten anormalidad por HRM para identificar las variaciones presentes en dichos exones.
4) Correlacionar los resultados del genotipo con variables clínicas y fenotípicas incluyendo entre otras la severidad de la enfermedad y el desarrollo de resistencia al Factor VIII.
5) Establecer la primera base de datos de variaciones del gen del Factor VIII en pacientes colombianos y comparar los resultados con otras publicaciones regionales y mundiales.

METODOLOGÍA

Tipo de estudio

Estudio descriptivo transversal de cohorte.

Muestra

Se analizaron 37 pacientes con diagnóstico clínico confirmado de Hemofilia A congénita que asisten a la consulta de hematología de dos instituciones hospitalarias en la ciudad de Bogotá, las cuales cuentan con programa para el manejo integral de pacientes con Hemofilia A (Fundación HOMI Hospital de la Misericordia y Clínica Colsubsidio). De estos 37 pacientes de sexo masculino, 33 eran no relacionados. Además, se incluyeron 8 mujeres (6 madres y dos hermanas de pacientes) para establecer su estado de portador.

Las muestras se tomaron previo consentimiento informado por parte de los pacientes o de sus guardianes legales y previa aprobación por los Comités de Ética de las respectivas instituciones participantes. Todos los individuos contaban con cuantificación de la actividad plasmática del FVIII mediante métodos coagulométricos y de acuerdo a estos niveles se clasificó la severidad de la enfermedad (leve, moderada o severa). Además, se tomaron en cuenta datos de la historia clínica como compromiso articular, historia familiar de hemofilia, presencia de inhibidores, entre otros, para ser analizados.

- Criterios de Inclusión:

Pacientes de sexo masculino menores de 18 años de edad con diagnóstico de Hemofilia A (HA) congénita.

- Criterios de Exclusión

Pacientes afectados con Hemofilia A adquirida, con Hemofilia B o con cualquier otro trastorno de la coagulación.

Los árboles genealógicos de los 37 pacientes incluidos en el estudio se encuentran en el anexo 1.

Los datos demográficos y las características clínicas de las 45 muestras analizadas se encuentran en la Tabla 1.

Tabla 1. Datos clínicos y demográficos individuos con HA.

ID	Sexo	Severidad	Age (years)	FVIII:C	Inhib. ¬	Historia familiar HA	Artropatía*	Relaciones Familiares^
HA-01	M	Severo	8	<1.0	NO	NO	NO	
HA-02	M	Severo	10	0,4	NO	SI	SI	
HA-03	M	Severo	6	0,5	NO	SI	NO	
HA-04	M	Severo	5	0,3	NO	NO	NO	
HA-05	M	Severo	17	0,3	NO	SI	SI	
HA-06	M	Severo	3	0,7	SI	NO	NO	Hijo HA-38
HA-07	M	Severo	7	<1.0	SI	NO	SI	Hijo HA-23
HA-08	M	Severo	2	0,6	SI	NO	NO	
HA-09	M	Severo	5	0,7	SI	NO	SI	
HA-10	M	Moderado	14	2	NO	NO	NO	
HA-11	M	Severo	1	0,6	SI	NO	NO	
HA-12	M	Moderado	10	1,8	NO	SI	SI	
HA-13	M	Severo	17	0,8	NO	NO	SI	
HA-14	M	Severo	18	0,8	SI	SI	SI	Hermano HA-15
HA-15	F	NP	11	93	NA	SI	NO	Hermana HA-14
HA-16	M	Severo	14	0,5	SI	NO	SI	
HA-17	M	Moderado	13	3	NO	SI	NO	
HA-18	M	Severo	0.5	0,4	NO	SI	NO	Medio hermano HA-26
HA-19	M	Severo	1	<1.0	NO	SI	NO	

HA-20	M	Leve	4	12	NO	SI	NO	Hermano HA-21, hijo HA-22
HA-21	M	Leve	2	12,4	NO	SI	NO	Hermano HA-20, hijo HA-22
HA-22	F	Portadora	20	70	NA	SI	NA	Madre HA-20,HA-21
HA-23	F	Portadora	28	118	NA	NO	NA	Madre HA-07
HA-24	M	Severo	10	0,5	NO	NO	SI	
HA-25	M	Severo	5	<1.0	NO	NO	NO	
HA-26	M	Severo	5	<1.0	SI	NO	NO	Medio hermano HA-18
HA-27	M	Severo	7	0,4	NO	SI	NO	Hijo HA-28
HA-28	F	Portadora	37	34	NO	SI	NO	Madre HA-27
HA-29	M	Severo	2	0,4	NO	SI	NO	Hermano HA-34
HA-30	M	Severo	17	<1.0	NO	SI	SI	Tío materno HA-29, HA-34
HA-31	M	Severo	16	0,7	SI	NO	SI	
HA-32	M	Moderado	14	3.7	NO	NO	SI	
HA-33	M	Severo	1	0,7	NO	NO	NO	Hijo de HA-39
HA-34	M	Severo	3	0,4	SI	SI	NO	Hermano HA-29
HA-35	M	Severo	1	0,5	NO	NO	NO	
HA-36	M	Severo	0.5	0,4	NO	NO	NO	
HA-37	M	Severo	1	0.2	NO	NO	SI	
HA-38	F	Portadora	22	SD	NA	NO	NA	Madre de HA-06

HA-39	F	Portadora	23	SD	NA	NO	NA	Madre de HA-33
HA-40	M	Moderado	10	3.0	NO	NO	NO	
HA-41	M	Severo	14	0,7	NO	SI	SI	
HA-42	M	Severo	19	<1	SI	NO	SI	
HA-43	M	Severo	11	0,7	NO	NO	SI	
HA-44	F	NP	13	85.7	NA	NA	NA	Hermana HA-16, hija HA-45
HA-45	F	Portadora	37	ND	NA	NA	NA	Madre HA-16, HA-45

ND; sin datos, M; masculino, F; femenino, NP, no portadora. ¬, Inhibidores o historia de inhibidores. * Artropatía o historia de artropatía, ^ Relaciones familiares entre los individuos incluidos en el estudio.

Aislamiento de ADN

Se obtuvo ADN a partir de 200µL de sangre periférica por duplicado. La extracción se llevó a cabo a través de la utilización del kit QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook siguiendo las especificaciones del fabricante. La cuantificación del ADN se llevó a cabo mediante espectrofotometría en un equipo Nanodrop 2000 y se evaluó el radio 260/280nm para determinar la pureza del material genético; el ADN se mantuvo almacenado en tubos eppendorf de 1.5 ml a una temperatura de -20°C.

Análisis de las inversiones de los intrones 22 y 1

El análisis de las inversiones de los intrones 22 y 1 (INV22 e INV1) se realizó mediante Inverse Shifting PCR (IS-PCR) descrita por Rossetti et al.(Rossetti et al., 2008b) (Rossetti et al., 2008a). Los primers que se utilizaron para el análisis de las inversiones del intrón 22 y el intrón 1 se encuentran en el anexo 2.

Dos microgramos de ADN genómico es tratado con 20 U de la enzima de restricción Bcl I (Thermo Fisher Scientific, Whaltham, Massachussetts) bajo condiciones recomendadas por 4 horas en 50 µL de volumen final (Tris- HCl 10 mM pH 7,9, NaCl 50 mM, MgCl2 10 mM, DTT, ditiotreitol, 1 mM, BSA 0,1 mg/ml). El ADN sometido a digestión fue purificado utilizando concentradores centricon 1000 (Amicon, Billerica, Massachussetts) y recuperado en un volumen de 100 µL(Rossetti et al., 2008b).

La auto-ligación se realizó durante toda la noche a 15ºC, en un volumen total de 400 µl (alta dilución), con 3 U de enzima T4 ADN Ligasa (Thermo Fisher Scientific, Whaltham, Massachussetts); usando el buffer de ligación provisto por el proveedor (Rossetti et al., 2008a).

Los fragmentos Bcl I auto-ligados (círculos B) son purificados utilizando concentradores centricon 1000 (Amicon, Billerica, Massachussetts) y recuperado en un volumen de 100 µL.

El análisis de los círculos B se realizó en condiciones de PCR estándar, usando los primers (ID, IU, 2U y 3U) indicados en el anexo 2. El análisis por PCR-multiplex fue realizado con 6 µl del ADN eluído (círculos B) para la Inv22 y 3 µL eluído para la Inv1, en un volumen total de 25 µl, usando 0,5 U de GoTaq Flexi DNA (Promega Corporation, Madison, Wisconsin), 0.6 µM de cada primer, 200 µM dNTP, 1.5 mM MgCl2 para cada inversión. Los productos IS-PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa 2% Nusieve 3:1 agarose (Lonza, Walkerville, Maryland), en Buffer 1X SO y tinción con SyberSafe (Invitrogen, Carlsbad, California).

El programa de termociclador consta de un primer paso de desnaturalización por 94° C por 2 minutos seguido de treinta ciclos de 94 ºC, 30 seg.; 56 ºC, 1 min.; 72 ºC, 1,5 min., y un paso de extensión final por 5 min a 72 ºC(Rossetti et al., 2008b).

Prueba complementaria Int22h

La prueba complementaria INV22 mediante Inverse Shifting PCR (IS-PCR) descrita por Rossetti et al.(Rossetti et al., 2008a, 2008b) permite la identificación de deleciones y duplicaciones asociadas a inth22. Los primers que se utilizan difieren en el uso de un primer (cambio de ID por ED) comparado a los primers utilizados en el análisis de la inversión del intrón 22, anexo 2.

El análisis de los círculos B se realizó en condiciones de PCR estándar usando los primers (ED, IU, 2U, y 3U) indicados en el anexo 2. El análisis por PCR-multiplex fue realizado con 6 µl del ADN eluído (círculos B) en un volumen total de 25 µl, usando 0,5 U de GoTaq Flexi DNA (Promega Corporation, Madison, Wisconsin), 0.6 µM de cada primer, 200 µM dNTP, 1.5 mM MgCl2. Los productos IS-PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa 2% Nusieve 3:1 agarose (Lonza, Walkerville, Maryland), en Buffer 1X SO y tinción con SyberSafe (Invitrogen, Carlsbad, California).

El programa del termociclador consta de un primer paso de desnaturalización por 94° C por 2 minutos seguido de treinta ciclos de 94 ºC, 30 seg.; 56 ºC, 1 min.; 72 ºC, 1,5 min., y un paso de extensión final por 5 min a 72 ºC(Rossetti et al., 2008b).

High resolution melting analysis (HRM)

El análisis para HRM se realizó utilizando el kit Precision Melt Supermix (BioRad, Hercules California) el cual fue analizado en un equipo 96 CFX BioRad real time system. Los primers utilizados para el análisis mediante HRM han sido descritos previamente (S. Y. Lin et al., 2008) y se detallan en el anexo 3. Para el análisis HRM, la totalidad de los exones del gen F8 fueron analizados en 52 reacciones de PCR-HRM.

Se utilizaron 2 µL de ADN genómico (12.5ng/ µL) para cada reacción de PCR que contiene 5 µL 2x Precision Melt Supermix, 2 µL mezcla de primers (10 pmol/µL de cada uno), 1 µL de agua destilada. Después de un paso inicial de desnaturalización a 95 ºC por 2 min, 45 ciclos de 95 ºC, 10 seg.; 53 ºC, 30 seg. + plate read; 72 ºC, 30

seg. seguido de HRM 1 ciclo 95 ºC, 30 seg.; 1 ciclo a 60 ºC +, 1 min; 1 ciclo 65-95 ºC (10 seg/step, slope 0.2 ºC /seg) + plate read. El análisis de HRM se llevó a cabo en el programa Precision Melt analysis software bajo parámetros estándar de melting (melt curve sensitivity set at 50, Tm difference threshold 0.2 degrees).

Amplificación para secuencia

Aquellos fragmentos de amplificación por HRM con un patrón de melting anormal, fueron amplificados por PCR convencional en un termociclador C1000 BioRad thermal cycler utilizando los mismos primers descritos para HRM, purificados y secuenciados mediante metodología Sanger. La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen total de 50uL, que contiene 10 uL buffer Taq polymerasa, 5 uL mix de primers (10 pmol/uL de cada uno), 4 uL dNTP (10 nM cada uno), 2 mM MgCl2, y 1.25 µL de GoTaq DNA Polymerase (Promega Corporation, Madison, Wisconsin) y 5 µL de ADN genómico (12.5 ng/µL). Después del paso inicial de desnaturalización a 95 ºC por 2 min, seguido de 35 ciclos de 95 ºC, 10 seg.; 53 ºC, 30 seg. 72 ºC, 30 seg. y paso de extensión final de 5 min a 72 ºC. Los productos de PCR fueron purificados utilizando PureLink quick PCR purification kit (Invitrogen, Carlsbad, California), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los fragmentos de PCR purificados fueron cuantificados en el equipo Nanodrop 2000 system.

Secuencia con BigDye Terminators

Se utilizaron 5-10 ng de fragmentos de PCR purificados para llevar a cabo la secuenciación con el kit BigDye 3.1 terminator cycle sequencing kit (Applied Biosystems). Los productos de secuencia, fueron purificados utilizando el kit Xterminator (applied Biosystem) siguiendo las recomendaciones del fabricante y los productos se resolvieron mediante electroforesis capilar en un equipo ABI 3500 en las Instalaciones de SSIGMOL en el Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia. Las reacciones de secuencia fueron verificadas para calidad mediante la utilización del programa Sequencing Analysis V5.2 (Applied Biosystems) y para la identificación de variaciones se utilizó el porgrama SeqScape V 5.4 (applied

Biosystems) utilizando como secuencia de referencia NG_011403 (Homo sapiens coagulation factor VIII (F8), RefSeqGene on chromosome X).

La nomenclatura de las variaciones encontradas fueron reportadas siguiendo las recomendaciones del Human Genome Variation Society (HGVS)(den Dunnen & Antonarakis, 2000, 2001; den Dunnen et al., 2016).

Adicionalmente, en algunas muestras en las cuales no se observó alteración en el patrón HRM, se secuenció la totalidad de los exones del gen F8 utilizando los mismos primers y condiciones de amplificación que se utilizaron para el análisis HRM, con una modificación. Para aquellos exones que se fragmentaba la amplificación por PCR de cada exón debido a su tamaño (ver Anexo 3 de primers HRM), en esos casos, se utilizó como primer Forward, el primer Forward del primer segmento del exón y como primer reverso, el primer Reverse del segundo segmento del exón, para obtener la amplificación de todo el exón y secuencias intrónicas aledañas en una sola reacción. Como ejemplo, el exón 4 requería 2 amplificaciones por PCR para HRM denominadas 4.1 y 4.2 cada una con su primer forward y reverse. Para amplificar todo el exón 4 en una sola reacción, se utilizó entonces el primer 4.1 forward y el primer 4.2 reverse. (Anexo 3)

El procesamiento posterior para la secuencia, fue el mismo que se mencionó previamente.

Análisis de microarreglos

El análisis de microarreglos se realizó con el chip CytoScan 750 microarray (Affymetrix, Santa Clara, California) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizó 250 ng de ADN genómico siguiendo las recomendaciones del fabricante. El ADN genómico fue sometido a digestión con Nsp1 a 37°C por 2 hr. Posteriormente fue purificado y ligado a primers-adaptadores a 16°C por 3 hr, seguido de amplificación por PCR. El ADN amplificado, luego es sometido a segundo paso de purificación y posterior digestión con DNAse I a 37°C por 35 min. El ADN digerido es biotinizado por 4 hr a 37°C, con posterior hibridación al chip CytoScan 750K microarrays a 50°C por

18 hr y lavado para remover aquel ADN sin hibridar. La lectura de las muestras se llevó a a cabo en una consola AGCC y ChAS 3.1 (Chromosome Analysis Suite) de Affymetrix.

Análisis software de predicción- análisis funcional *in silico*

Se utilizaron varios software para la predicción funcional de las variantes identificadas para determinar su patogenicidad. Se incluyeron los programas POLYPHEN-2, PROVEAN, Mutation Taster and PhD-SNP (Adzhubei et al., 2010; Capriotti, Calabrese, & Casadio, 2006; Choi, Sims, Murphy, Miller, & Chan, 2012; Schwarz, Cooper, Schuelke, & Seelow, 2014).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para determinar la frecuencia de las variaciones moleculares detectadas en la cohorte de 37 pacientes se sexo masculino analizados, se tomaron en cuenta solamente individuos no relacionados. Por esta razón, para el análisis de la variación detectada en los pacientes HA-18 y HA-26 (medio hermanos maternos); HA-20 y HA-21 (hermanos); HA-29, HA-34 y HA-30 (hermanos los dos primeros y tío materno), solo se consideró una sola vez la variación detectada para el cálculo de frecuencia. Por consiguiente, el número de pacientes de sexo masculino no relacionados es de 33 pacientes.

De la misma manera, se analizaron 8 mujeres (6 madres de pacientes y dos hermanas de dos pacientes diferentes), siendo consideradas como portadoras o posibles portadoras de la alteración.

El Análisis estadístico para evaluar la asociación de las variaciones moleculares detectadas en los pacientes con diversos aspectos clínicos observados, tales como el desarrollo de inhibidores e historia de artropatía se llevó a cabo mediante el test exacto de Fisher. Se estableció un valor $p < 0.05$ como significancia estadística, anexo 4.

RESULTADOS

Inversión intrón 22 y 1 por IS-PCR

Se analizaron un total de 45 muestras, 37 pacientes masculinos con diagnóstico de HA (dentro de los cuales se incluyen dos parejas de hermanos y una pareja de hermanos y un tío, por lo que el número de pacientes no relacionados es de 33) y 8 mujeres posiblemente portadoras (6 madres y dos hermanas) (Tabla 1).

Para fines de análisis estadístico de las variaciones moleculares detectadas, se analizarón sobre el número de pacientes no relacionados afectados. De la misma manera, en el análisis de las frecuencias de variaciones detectadas, no se incluirán las madres de los pacientes para no generar redundancia en los resultados.

La inversión del intrón 22 (INV22) fue identificada por Inverse shifting PCR (IS-PCR) en 14 de 33 pacientes no relacionados (42.4%) (Figura 11). Adicionalmente se identificaron dos madres heterocigotas para la INV22.

Diez muestras fueron positivas para la INV22 tipo I (71.4%) y 4 para la INV22 tipo II (28.6%).

Tres de 33 muestras (9.09%) fueron positivas para la Inversión del intrón 1 (INV1). Adicionalmente se identificó una madre heterocigota para la INV1(Figura 11).

Dos hermanas de pacientes no son portadoras de la mutación identificada en sus hermanos afectados, uno con INV22 y otro con INV1 (HA-15 y HA-45).

Por consiguiente, la INV22 e INV1 fueron identificadas en 17 de 33 pacientes con HA (51.5%).

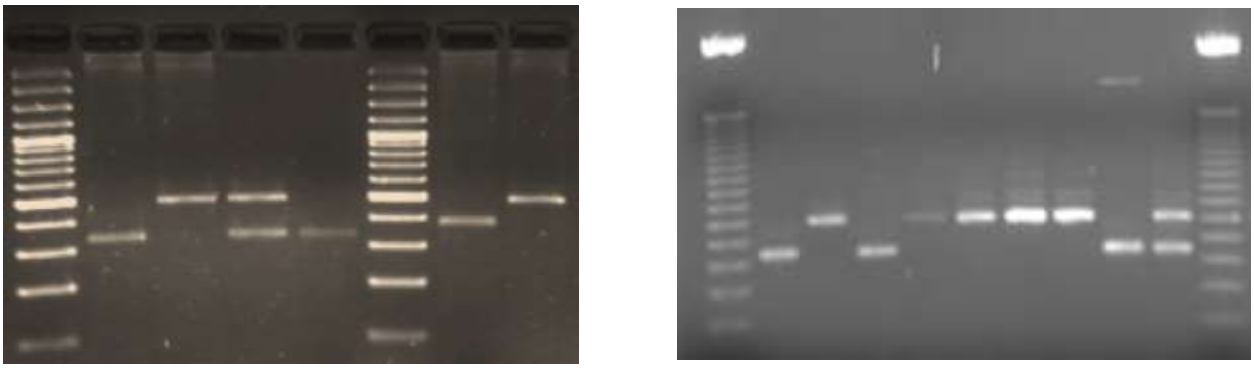


Figura 11. **Inverse shifting-PCR. Panel izquierdo**. Electroforesis en gel de Agarosa Nusive al 2% para Inv22. Carril 1 y 6 marcador de peso molecular de 100pb. Carril 2 y 5 Inv22 Tipo I (333pb). Mujer portadora de Inv22 Tipo I carril 4. Carril 7 Inv22 Tipo II (385pb). Carril 3 y 8 negativos para Inv22 (487pb). **Panel derecho.** Electroforesis en gel de Agarosa Nusive al 2% para Inv1. Marcador de peso molecular de 50 pb carril 1 y 11. Carril 2, 4, 9 positivos para Inv1, mujer portadora carril 10. Carril 3, 5, 6, 7, 8 negativos para Inv1.

Prueba complementaria Int22h

Todas las muestras que presentaron INV22 fueron analizadas para identificar posibles deleciones o duplicaciones asociadas int22h por medio de la prueba complementaria mediante Inverse Shifting PCR (IS-PCR) descrita por Rossetti et al.(Rossetti et al., 2008a, 2008b). Se analizaron las 16/37 muestras de varones con HA positivos para INV22 y las dos madres heterocigotas para INV22.

No se identificó la presencia de deleciones o duplicaciones asociadas a la int22h en esta cohorte (Figura 12).

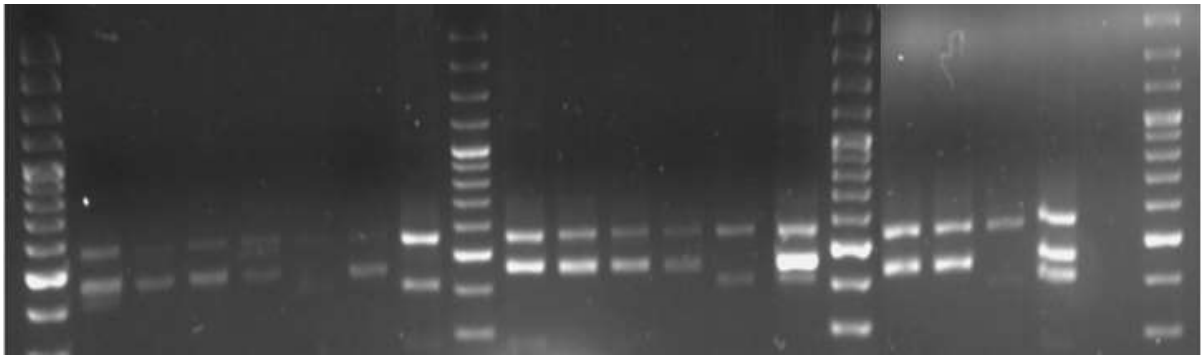


Figura 12. Prueba complementaria Int22h. Electroforesis en gel de Agarosa Nusive al 2% para Prueba complementaria INV22. Carril 1, 9, 16 y 22 marcador de peso molecular de 100pb. Carril 2, 3, 4, 5, 7, 10, 11, 12, 13, 15, 17 y 18 INV22 tipo I sin deleción 22. Carril 6, 8, 14 y 19 INV22 Tipo II sin deleción 22. Carril 15 portadora INV22 tipo I y carril 20 portadora INV22 tipo II.

Análisis de HRM

Se realizó análisis de HRM a las muestras negativas para la INV22 e INV1. Este análisis incluyó tanto a madres de pacientes, como a pacientes con hermanos afectados (21 de 43 muestras, 48.8%) (Figura 13). No se observó amplificación en tres muestras (HA-07, HA-11, HA-13) en uno o más exones del gen F8. La muestra (HA-07) presentó ausencia de amplificación del exón 1 al 14. Para verificar éste resultado, se realizó otra reacción de amplificación con diferente aislamiento de ADN observándose el mismo resultado. En la madre del individuo HA-07 (HA-23), se observó amplificación de todos los exónes del gen F8, como es de esperarse dado a su estado de heterocigosidad (presencia de un alelo normal y un segundo alelo con la deleción). La muestra HA-13 no amplificó en dos ocasiones distintas para el exón 13. En la muestra HA-11 no amplificó el exón 26. En todos los casos, se descartó la posibilidad de pobre calidad del ADN como causa de falla de amplificación por PCR, ya que otros exones fueron amplificados simultáneamente de manera satisfactoria. Además, los controles utilizados mostraron los amplificados de PCR esperados. De esta forma, 3 de 43 muestras (7%) presentaron ausencia de amplificación en uno o más exones lo que indica la existencia de grandes deleciones. Las tres muestras (HA-07, HA-11 y HA-13) al igual que la muestra de la madre de HA-07 (HA-23), fueron

analizadas posteriormente por la plataforma microarray CytoScan750 para confirmar la presencia de las deleciones (Affymetrix, Santa Clara, California) (Figura 14).

Las 17 muestras restantes presentaron diferencias en las curvas melting en el análisis HRM con un promedio de 3 a 4 fragmentos por muestra (Figura 13). Estos fragmentos fueron sometidos a secuenciación para establecer la presencia de variantes en cada una de las muestras.

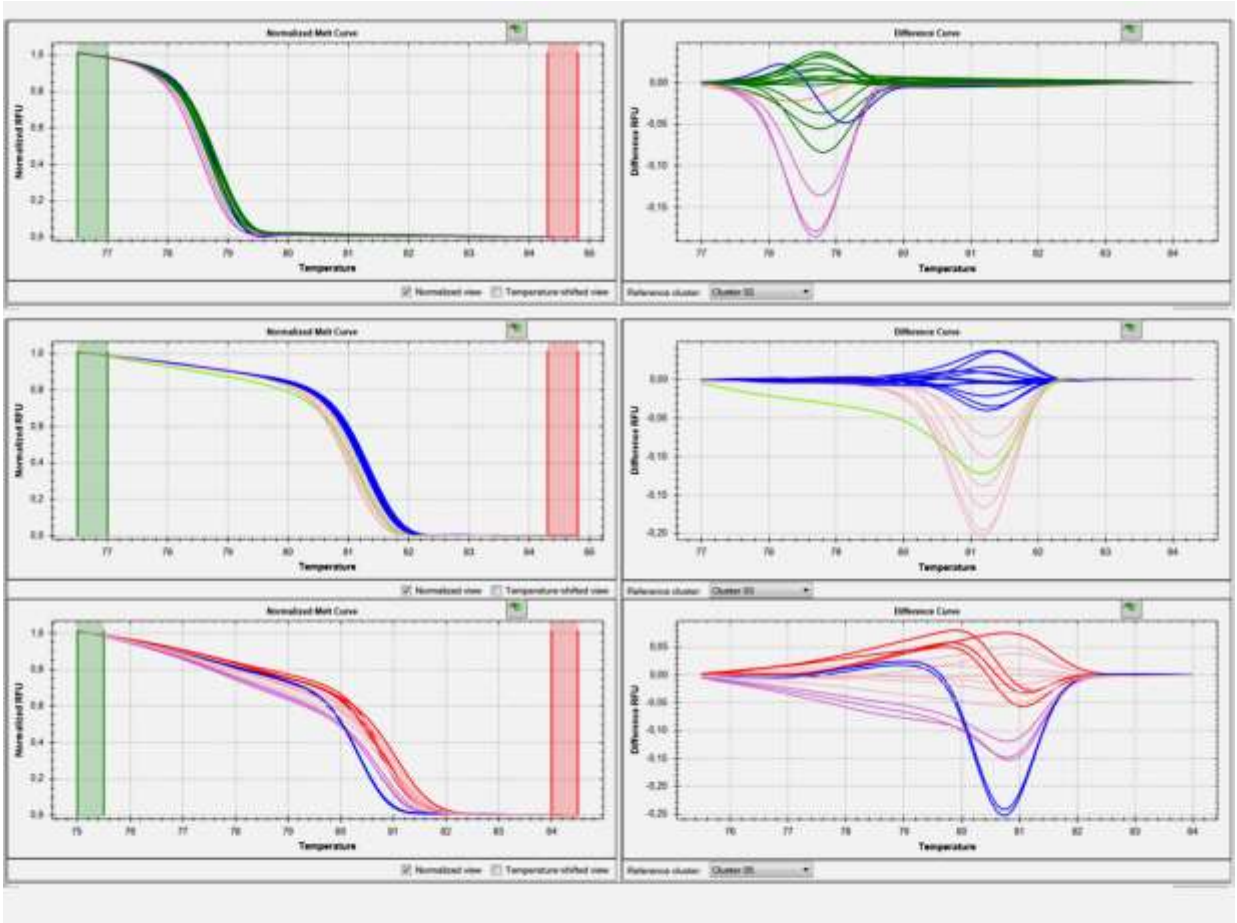


Figura 13. Análisis de HRM (High Resolution Melting Analysis). Las figuras de la izquierda muestras las Curvas melting para algunos exones analizados (exones 1.1, 3 y 4.1). En el eje de la X se encuentra la temperatura y en el je de la Y, las Unidades de Fluorescencia Relativa normalizadas (RFU). Se observa para cada segmento del gen presenta una curva melting con temperatura de disociación (Tm) distinta. Las curvas de la derecha, muestran en el eje de la X, la temperatura y en el eje de la Y, las diferencias en unidades relativas de fluorescencia. Así mismo, para algunas muestras se aprecian diferencias en la temperatura de disociación (Tm), ejemplo imagen derecha superior, línea en color azul, la cual presenta un patrón de disociación diferente a otras muestras. Ese resultado sugiere diferencias moleculares, etiquetando a dicha muestra para análisis por secuencia.

Secuenciación de ADN

Se llevó a cabo la secuenciación Sanger en aquellos fragmentos que mostraron diferentes curvas melting en el análisis de HRM. Se realizó la secuencia en los fragmentos de las 17 muestras que mostraron un patrón anormal en HRM (excluyendo las 3 muestras que mostraron deleción y la madre del paciente HA-07).

Inicialmente, se identificaron variantes patogénicas en 9 de 13 pacientes analizados por HRM (Tabla 2). La Figura 14 ilustra algunas de las variaciones detectadas por secuencia en las muestras analizadas. Los electroferogramas resaltan la ubicación de las variaciones con relación a la secuencia de referencia.

Como se mencionó previamente, este análisis incluyo tanto a madres de pacientes, como a casos en donde existían hermanos afectados. La muestra HA-39, madre del paciente HA-33, mostró una deleción patogénica de 2 pb en el exón 2 del gen F8 en estado de heterocigosidad. La muestra del paciente no mostró anormalidad en la curva melting en dicho exón. Ante este resultado, se procedió a analizar por secuencia el exón 2 en la muestra del paciente (HA-33), identificando la misma deleción de 2 pb. Este resultado, representa un falso negativo para la detección por HRM en esta muestra.

Se identificaron variantes tipo missense en 7 pacientes (21.2%) muestras, variante tipo nonsense en dos pacientes (6%) y dos pequeñas deleciones (de 2 y 4 nucleótidos) que alteran el marco de lectura (6%). La gran mayoría de las mutaciones identificadas en este estudio se encuentran en los primeros dominios de la proteína (Figura 15).

En 4 pacientes (HA-03, HA-05, HA-35, HA-36) en los cuales no se detectó variación patogénica después de secuenciar los fragmentos que el análisis de HRM indicaba como posibles sitios de ubicación de las variantes patogénicas, se procedió a secuenciar la totalidad de la región codificante del gen con excepción del exón 14 con los recursos disponibles. Este análisis permitió la identificación de 2 variantes patogénicas adicionales en los pacientes HA-35 y HA-36 (Tabla 2) para un total de

11/33 (33.3%) pacientes no relacionados con variaciones patogénicas detectadas por secuencia.

Además, se identificó un polimorfismo presente grupo familiar (HA-20, 21, 22) y en tres individuos no relacionados (HA-24, 32 y 40) mediante análisis de PCR-HRM y secuenciación. El cambio c.1356T>G, p.S1288S es una variante sinónima (no genera cambio sobre la secuencia de aminoácidos en la proteína). Esta variante está reportada en la base de datos ExAC con una frecuencia alélica de 0.13 (0.05-0.5).

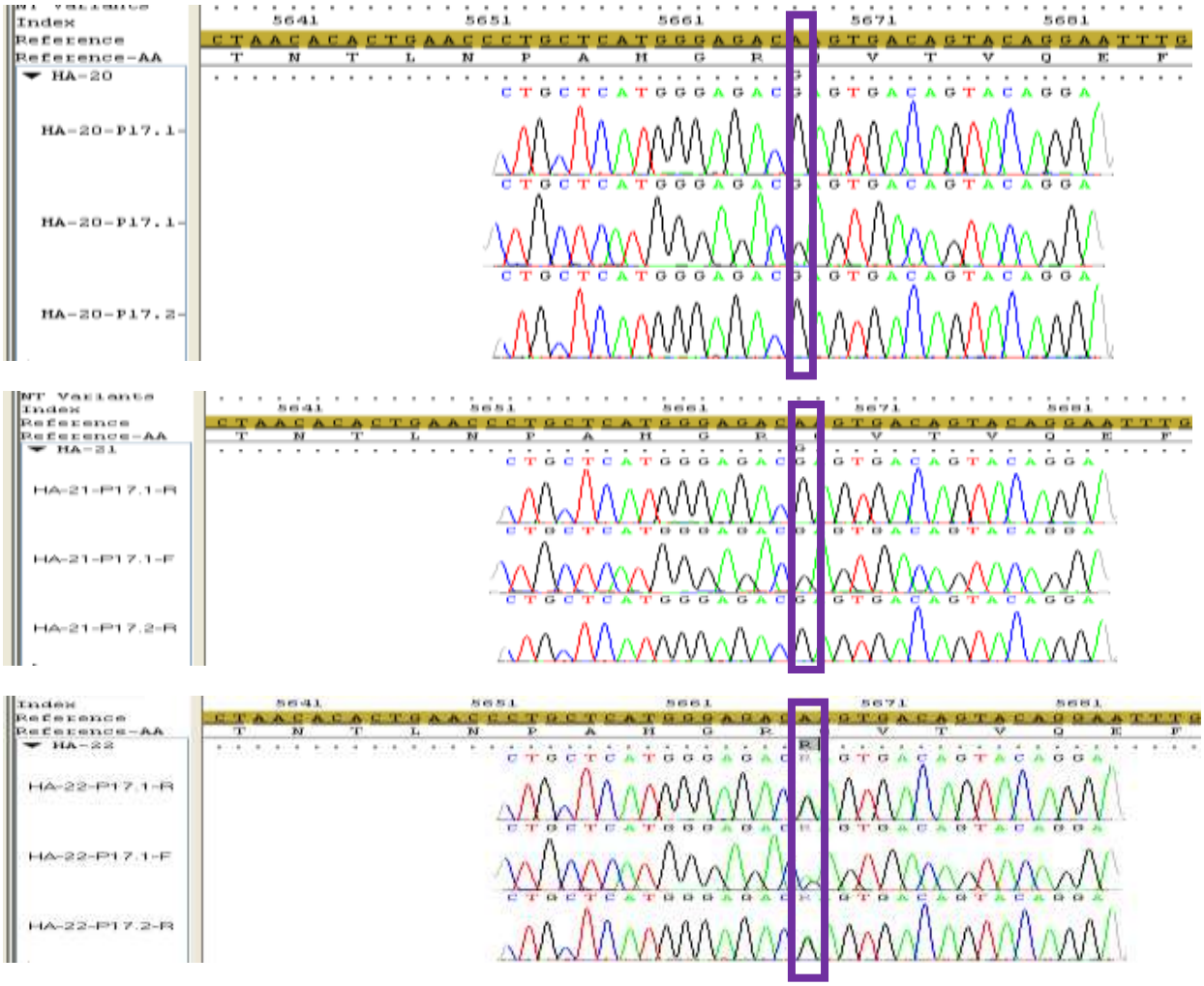
Tabla 2. Variantes genéticas identificadas en individuos con HA de Colombia.

ID	Variante genética	Sustitución de amino ácido	Tipo de variante	Exón /Intrón	FVIII: C	Severidad HA	Reportada prev.
HA-07	Del exón 1_14		Gran deleción	1 _14	<1	Severo	Si
HA-10	c.157 C>T	p.V653M	Missense	13	2	Moderado	Si
HA-11	Del exón 26		Gran deleción	26	0,6	Severo	Si
HA-13	Del exón 13		Gran deleción	13	0,8	Severo	Si
HA-17	c.1292 T>C	p.L431S	Missense	9	3	Moderado	Si
HA-18,26	c.274 G>T	p.G92C	Missense	3	0,4	Severo	Si
HA-20,21*	c.5666 A>G	p.Q1889R	Missense	17	12	Leve	No
HA-24	c.5953 C>T	p.R1985*	Nonsense	18	0,5	Severo	Si
HA-32	c.2095 A>G	p.M699V	Missense	13	3,7	Moderado	Si
HA-33*	c.207_208delGT	p.F207Lfs*12	Pequeña deleción/Frame shift	2	0,7	Severo	Si
HA-35	c.399T>A	p.Y133*	Nonsense	4	0,5	Severo	No
HA-36	c.209_212delTTGT	p.F70*	Pequeña deleción/Frame	2	0,4	Severo	Si

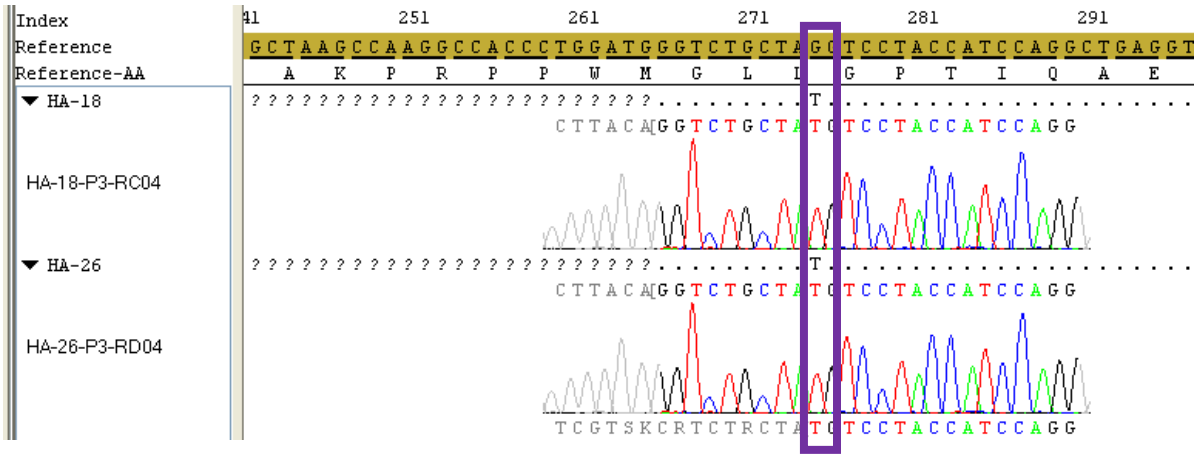
			shift				
HA-37	c.262 A>G	p.M88V	Missense	2	0,2	Severo	No
HA-40	c.1892 A>G	p.N631S	Missense	12	3	Moderado	Si

*variante patogénica identificada adicionalmente en la madre de cada paciente en estado heterocigoto.

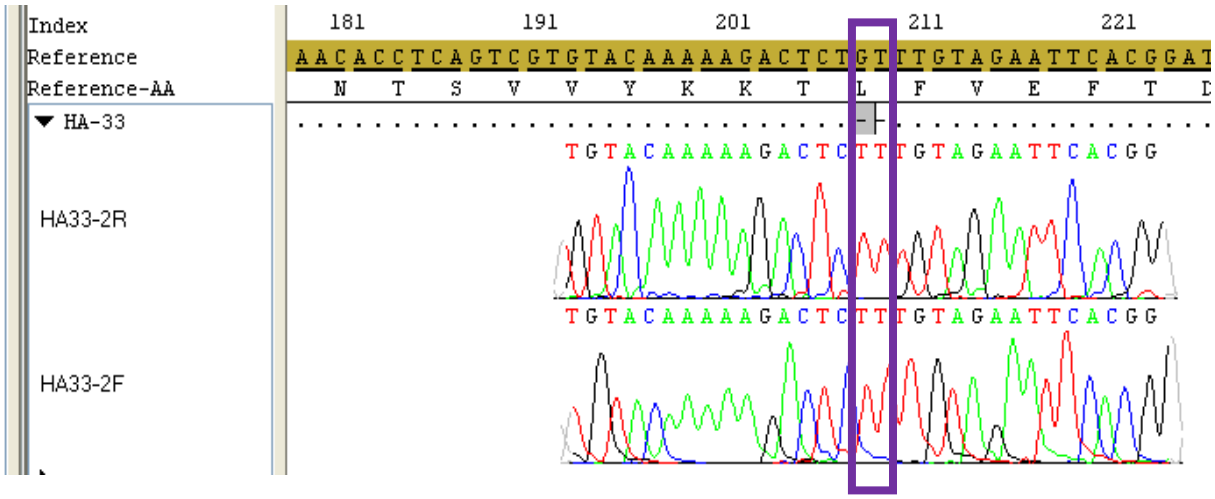
A)



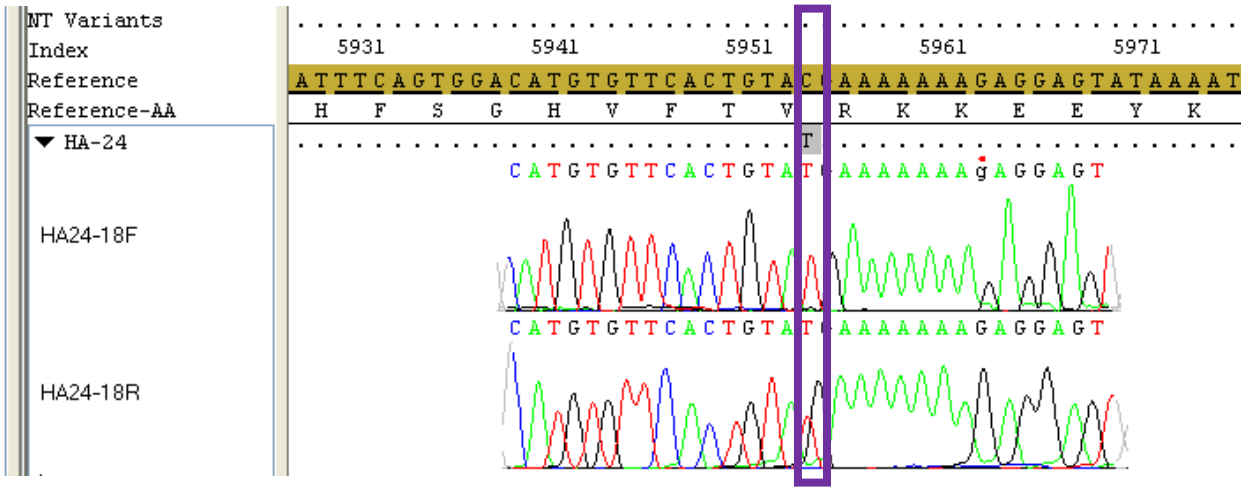
B)


Index
Reference
Reference-AA
HA-18
HA-18-P3-RC04
HA-26
HA-26-P3-RD04

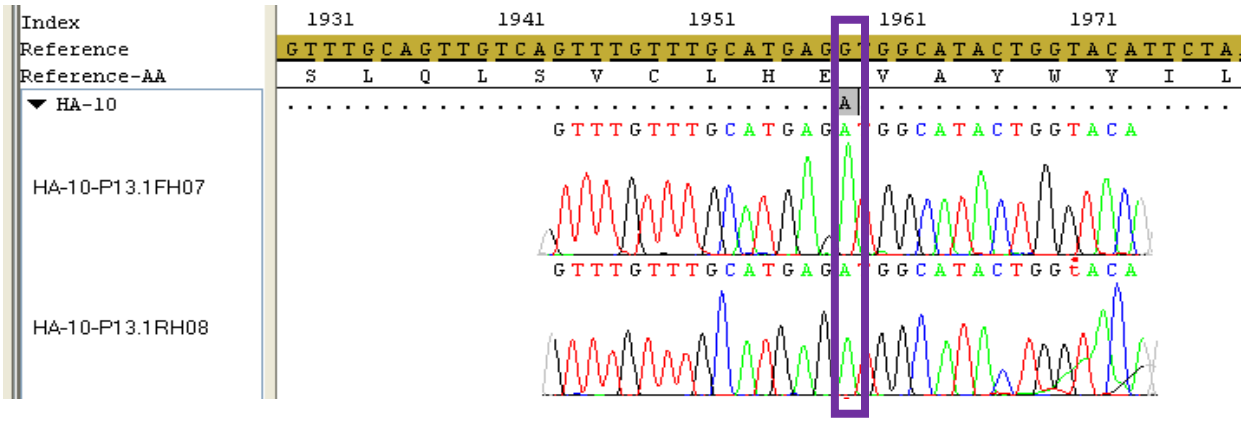
C)


Index
Reference
Reference-AA
HA-33
HA33-2R
HA33-2F

D)


NT Variants
Index
Reference
Reference-AA
HA-24
HA24-18F
HA24-18R

E)


Index
Reference
Reference-AA
HA-10
HA-10-P13.1FH07
HA-10-P13.1RH08

F)

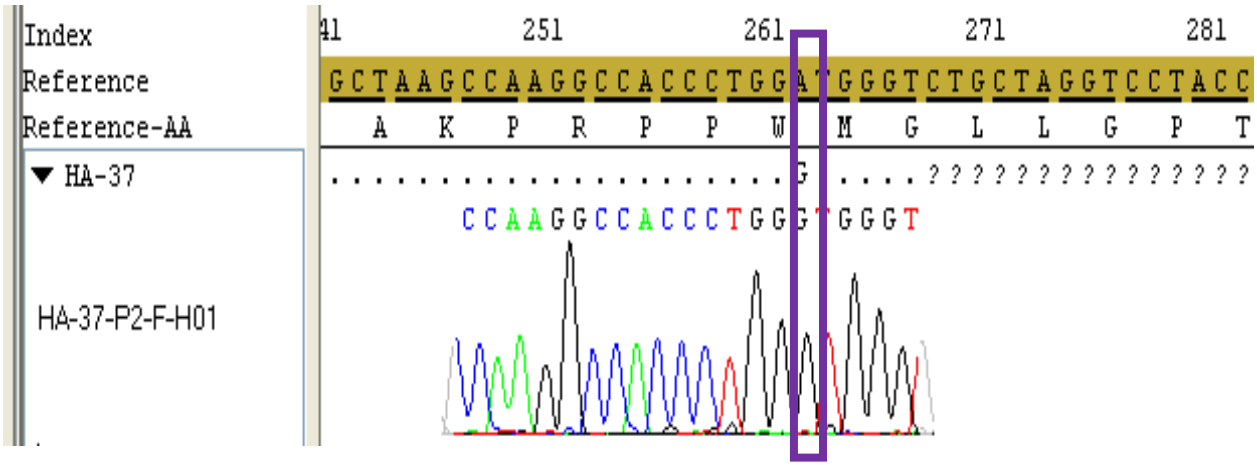

Index
Reference
Reference-AA
HA-37
HA-37-P2-F-H01

Figura 14. Secuenciación Sanger en individuos colombianos con HA. A) HA-20, HA-21, c.5666A>G (p.Q1889R), exón 17, HA-22 madre portadora, c.5666A>R (p.Q1889Q,R). **B)** Medios hermanos HA-18, HA-26, exón 3, c.274G>T (p.G92C). **C)** HA-33, mutación frameshift en exón 2, c.207-208delGT (p.F207Lfs12*). **D)** HA-24, exón 18. c.5953C>T (p.R1985*) mutación nonsense. **E)** HA-10, exón 13, c.1957C>T (p.V653M). **F)** HA-37, exón 2, c.262 A>G (p.M88V).

La mayoría de las variantes identificadas en este estudio han sido reportadas previamente en la literatura, con excepción de las variantes c.5666A>G p.Q1889R presente en dos individuos masculinos y su madre heterocigota (HA-20, 21, 22) responsable de un fenotipo leve, la variante c.262 A>G p.M88V y c.5953C>T p.R1985* identificadas en dos individuos con HA severa (Figura 14, Tabla 2).

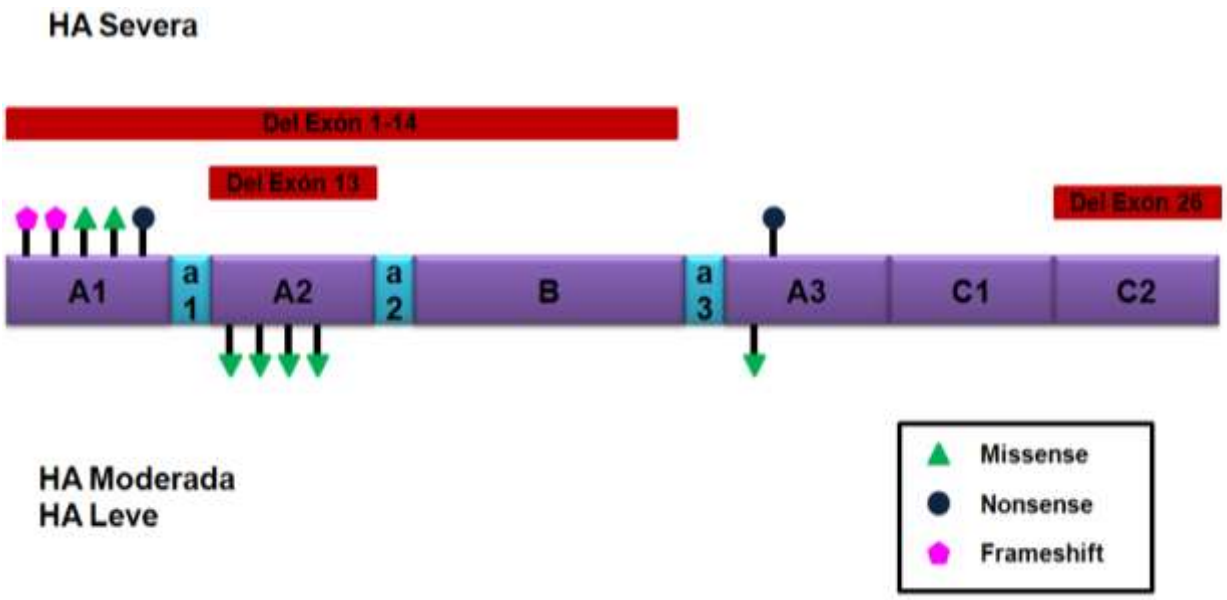
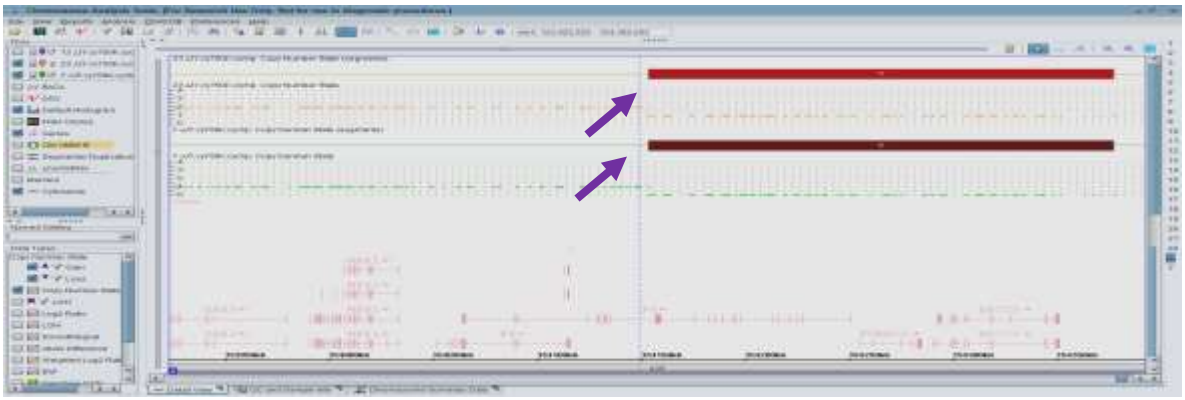


Figura 15. Distribución de variantes patogénicas dentro de la proteína FVIII en pacientes colombianos. La parte superior de la figura muestra las variantes patogénicas encontradas en pacientes con HA severa, mientras que en la mitad inferior se encuentran aquellas halladas en HA leve y moderada. Se aprecia como gran mayoría de las mutaciones encontradas en este estudio se encuentran en los primeros dominios de la proteína, dominio A1 y A2 (exones 2, 3, 4, 9 y 13).

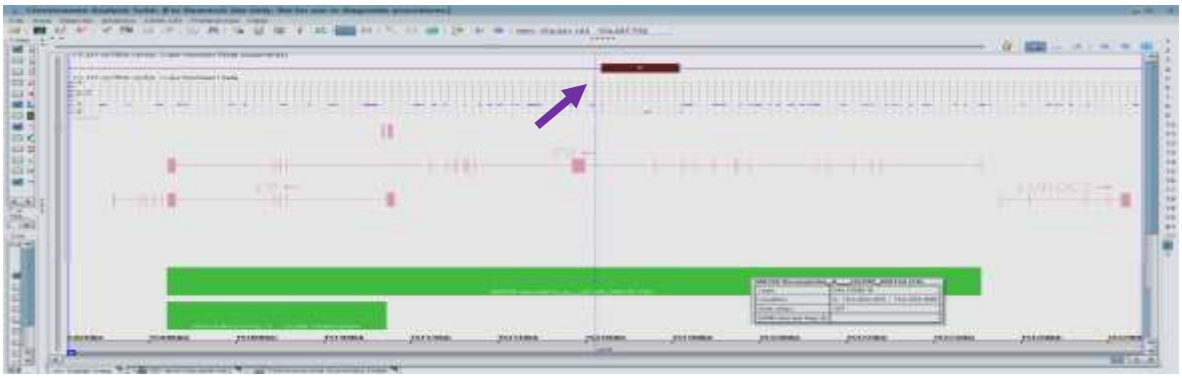
Análisis de microarreglos (Microarrays).

Para confirmar las grandes deleciones identificadas por amplificación PCR-HRM, se llevó a cabo el análisis de microarreglos en las 3 muestras que mostraron ausencia de amplificación en uno o varios exones en el análisis de HRM y en la muestra de la madre de HA-07 utilizando la plataforma CytoScan 750k microarray (Affymetrix, Santa Clara, California). Se identificó en el paciente HA-07 y en la muestra de la madre (HA-23) la presencia de una gran deleción que involucra del exón 1 al 14, con un total de 223,573 bp (arr[hg19]Xq28 (154153703-154377276)x0) que compromete a 5 genes F8, FUNDC2, MTCP1NB, MTCP1 y BRCC3. La madre presenta la misma deleción en estado heterocigoto (arr[hg19] Xq28 (154153703-154377276)x1) (Figura 16). El individuo HA-13 presenta una deleción de 17,979 bp que involucra parte del intrón 12, exón 13 e intrón 13 (arr[hg19 Xq28 (154163600-154181579)x0). En el individuo HA-11 no se identificó deleción por el análisis de microarreglos, incluso cuando se disminuyó el filtro al tamaño de 1 kb. Haciendo un análisis detallado de la región del exón 26 se evidenció que hay un bajo número de sondas incluidas en el chip CytoScan 750k array cubriendo esta región. Por ende, es de esperarse la ausencia de detección de deleciones en esta región mediante el análsis de mircroarreglos (Figura 16). Para esta muestra (HA-11), se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa con base en la amplificación del exón 26 del gen F8 para confirmar la ausencia de amplificación (Figura 17).

A)



B)



C)

Figura 16. Análisis de microarreglos CytoScan 750 (Affymetrix). A) Señal inferior indicando HA-07 (individuo con HA) con una gran deleción del exón 1 al exón 14 que compromete un total de 223,573 pb (arr[hg19] Xq28 (154153703-154377276)x0) e involucra 5 genes F8, FUNDC2, MTCP1NB, MTCP1 y BRCC3. Señal superior, HA-23 madre de HA-07, presenta la misma deleción en estado heterocigoto (arr[hg19] Xq28 (154153703-154377276)x1). **B)** Individuo HA-13 con una deleción de 17,979 bp que involucra parte del Int12, exón13 e Int13 (arr[hg19] Xq28 (154163600-154181579)x0). **C)** Individuo HA-11 con deleción del exón 26 detectado por HRM. Sin embargo, el análisis de microarreglos no identificó la deleción debido a la ausencia de marcadores en la región del exón 26 (flecha).

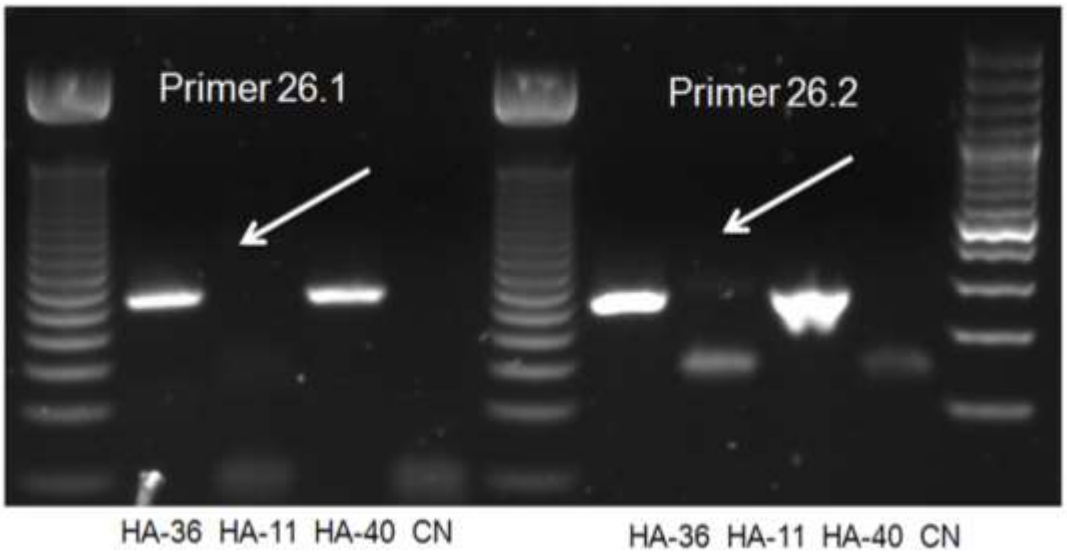


Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa para exón 26 en muestras de pacientes con HA. Ausencia de amplificación para el exón 26 (segmentos 26.1 y 26.2) para HA-11. HA-26 y HA-40 muestran amplificación de fragmentos tal como se espera con base en el diseño de primers. Carriles 1 y 6, 50 bp ladder alélico. Carril 11, 100bp ladder alélico. Carriles 5 y 10 control negativo. Presencia de dímeros de primer tanto en el CN como en la muestra HA-11 para el segmento de amplificación con los primers 26.2F y R.

Análisis funcional *in silico*

Se llevó a cabo el análisis de predicción para establecer la patogenicidad de las variantes tipo missense identificadas en este estudio que no habían sido reportadas previamente en las bases de datos para mutaciones en Hemofilia A (Hemophilia A Mutation Database, Hemobase, CHAMP-CDC). La Tabla 3 resume los resultados obtenidos en cuatro software de predicción: Polyphen-2, Provean, Mutation Taster y PhD-SNP.

Tabla 3. Análisis de predicción para variantes missense nuevas identificadas en individuos con HA en Colombia

ID	Variante genética ^	Cambio de aminoácido	Severidad	Polyphen-2	Provean	Mutation Taster	PhD-SNP
HA-37	c.262A>G	p.M88V	Severo	Probably damaging score 1.0	Neutral	Disease causing	Disease
HA-20,21	c.5666A>G	p.Q1889R	Leve	Possibly damaging score 0.798	Neutral	Disease causing	Neutral

^ Mutaciones no reportadas en bases de datos de Hemofilia A CHAMP CDC, Hemobase, Factor VIII Variant Database

Correlación genotipo-fenotipo

Veinte de 33 pacientes no relacionados presentaron INV22, INV1 o gran deleción (60.6%). Diecinueve de estos 20 pacientes (95%) tienen un fenotipo severo (actividad plasmática de FVIII menor del 1%). Un individuo (HA-12) tiene FVIII:C de 1.8% y presenta la INV22. (Tabla 1).

Once pacientes presentaron variaciones puntuales o pequeñas deleciones. De estos 11 pacientes, siete presentan un fenotipo severo. Uno de ellos (HA-33) presenta una pequeña deleción de dos nucleótidos que conlleva a una alteración en el marco de lectura y un codón de parada corriente abajo c.207-208delGT, p.F207Lfs12*, también identificada en la madre en estado heterocigoto (HA-39). Otro paciente, HA-36 presenta una deleción de 4 nucleótidos c.209-212delTTGT, p.F70*. Dos pacientes (HA-24 y HA-35) presentan variación patogénica tipo nonsense c.5953C>T, p.R1985* y c.399T>A, p.Y133*. Los otros dos individuos de fenotipo severo son medio hermanos por parte materna (HA-18 y HA-26) con una variante missense c.274G>T,

p.G92C. Las 5 muestras restantes con mutaciones missense presentan un fenotipo moderado o leve (Tabla 2). Por lo tanto, el fenotipo severo estuvo principalmente asociado a la INV22, INV1, gran deleción, pequeña deleción y mutaciones puntuales tipo nonsense. Las mutaciones tipo missense se asociaron principalmente a un fenotipo leve y moderado.

Quince de los 33 pacientes no relacionados (45.4%) tienen historia familiar de HA.

Once de los 33 (33.3%) presentan historia de inhibidores. De ellos, 7 tienen INV22, uno presenta INV1, 2 presentan gran deleción y uno con una mutación missense.

Todos los pacientes con historia de inhibidores presentan un fenotipo severo. Nueve de 11 recibieron FVIII recombinante en los primeros días de exposición, y 2 recibieron FVIII derivado plasmático. Solo un individuo de 11 tiene historia familiar de inhibidores. Ocho pacientes tienen anticuerpos inhibidores de títulos altos y tres con títulos bajos de inhibidor.

No se observó asociación estadísticamente significativa entre una variante genética particular y la presencia de inhibidores. Se evaluó si la presencia de INV22 estaría asociada al desarrollo de inhibidores. La INV22 fue identificada en 7 de 11 individuos con historia positiva para inhibidores (63.3%) contra 9 de 24 casos (37.5%) de individuos sin historia de inhibidores (Fisher’s exact test p 0.27).

Nueve de 16 individuos (56%) con INV22 presentaron artropatía comparado a 6 de 19 (31.5%) sin INV22 (Fisher’s exact test p 0.18) anexo 4.

DISCUSIÓN

Se implementó un abordaje molecular escalonado costo-efectivo que consiste en la realización de IS-PCR (C. P. Radic et al., 2009a; Rossetti et al., 2011; Rossetti et al., 2005, 2008a) para la identificación de INV22 e INV1, seguido de un tamizaje molecular por HRM de los 26 exones del gen (en 52 reacciones de PCR) y posterior secuenciación en aquellas regiones que posiblemente albergaban la variante patogénica identificados por HRM.

Se analizaron un total de 37 individuos con HA (33 no relacionados) y 8 mujeres (seis madres y dos hermanas). Las dos hermanas resultaron ser no portadoras de la variante identificada en sus hermanos afectados y todas las madres resultaron ser heterocigotas para la variante patogénica identificada en sus hijos afectados.

Con este abordaje, hemos logrado identificar, por primera vez en Colombia, la variante patogénica responsable de Hemofilia A en 31 de 33 pacientes no relacionados con HA (94%) además de determinar el estado de portadoras en las madres de los pacientes.

La reacción IS-PCR para la detección de las inversiones en el intrón 22 y 1, es altamente efectiva y de fácil realización para detectar estar alteraciones. Las frecuencias de las variantes patogénicas encontradas en este estudio son similares a las reportadas en otras poblaciones, incluyendo algunos estudios latinoamericanos. En Argentina, reportan un 41% para la INV22 (De Brasi, Candela et al. 2000) y 39% (Rossetti et al., 2004). Resultados similares se observaron en Venezuela en individuos con HA severa (Albanez, Ruiz-Saez, Boadas, de Bosch, & Porco, 2011). En México, la frecuencia reportada de INV22 fue de 45% (Mantilla-Capacho et al., 2007). En Costa Rica, la INV22 estuvo presente en 21/34 individuos (61.7%), mientras que no se identifica la INV1 (Salazar-Sanchez et al., 2010). El único estudio previo en Colombia encontró una frecuencia de INV22 en 40% de pacientes y la INV1 en 10%(Garces, 2012). Por otro lado, en nuestro estudio se observó una mayor frecuencia de INV1 (9.09%%) en individuos con HA severa, comparado con reportes de México y Venezuela de 0% y 1.6% en Argentina. Aún no es posible afirmar que la INV1 sea

más frecuente en nuestra población, ya que sería necesario ampliar la muestra de pacientes para determinar con mayor precisión si esta frecuencia más alta, se sostiene o no.

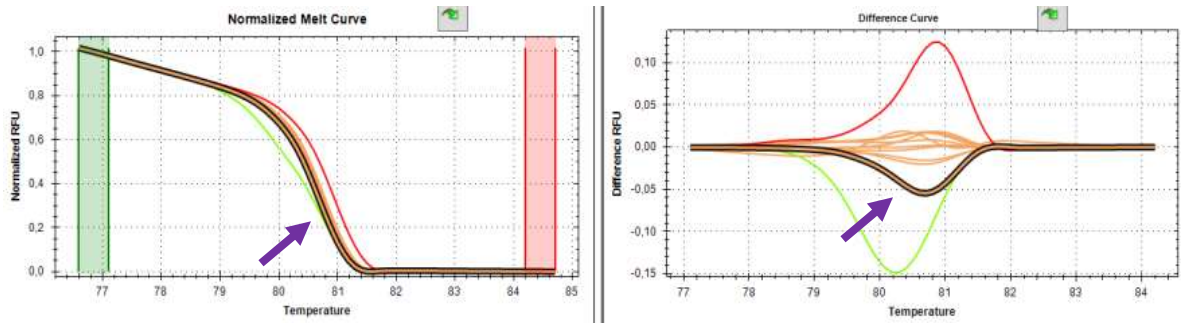
El análisis HRM es una metodología de tamizaje molecular post-PCR fácil, rápido y costo-efectivo por lo que en los últimos años se ha convertido en el método de elección sobre metodologías previas de tamizaje molecular (Laurie, Smith, & George, 2007; S.-Y. Lin et al., 2008). El análisis de HRM bajo parámetros estándar de melting (melt curve sensitivity set at 50, Tm difference threshold 0.2 degrees), permitió la identificación de variantes a través de secuenciación de ácidos nucléicos en 9 de 13 pacientes. El análisis de HRM fue positivo, en promedio, en 3 de 52 fragmentos por muestra. En cuatro pacientes, no fue posible identificar la variante patogénica por HRM y secuenciación. Este resultado puede deberse, a falsos negativos en la reacción de HRM o que la variante responsable de la condición esté por fuera de las regiones comprendidas en el análisis de HRM implementado (región promotora, región 3´UTR, regiones intrónicas profundas). El análisis HRM se basa en las curvas melting (curvas de disociación) que difieren, por un lado, en las distintas temperaturas de melting (Tm) de los amplicones y por otro lado, en las diferencias en la curva debido a estados de heterocigosidad u homocigosidad (Ririe et al., 1997). Debido a que los amplicones obtenidos fueron de individuos masculinos, y el gen en cuestión se encuentra en el cromosoma X, sólo es posible analizar las diferencias en la curva de temperatura melting (disociación), por ser una entidad ligada al cromosoma X. Por ende, las diferencias del estado de hetero u homocigosidad no pueden ser evaluadas en Hemofilia A, excepto para las madres incluidas en el estudio.

Sólo existen dos estudios previos donde implementan la metodología de HRM como prueba de tamizaje molecular en HA. Un estudio realizado por Lin et al. (S. Y. Lin et al., 2008) utilizó HRM para evaluar la aplicación clínica de esta metodología en HA. Analizaron 43 muestras que comprendían mujeres portadoras e individuos afectados. Estas muestras fueron analizadas mediante dHPLC y solo algunas fueron analizadas con HRM. Los hallazgos de dHPLC fueron considerados como Gold Standard, de tal manera, para las portadoras se identifico en el 100% de los casos la variante, mientras que para los pacientes, mediante HRM, se identificó la variante en 25/28

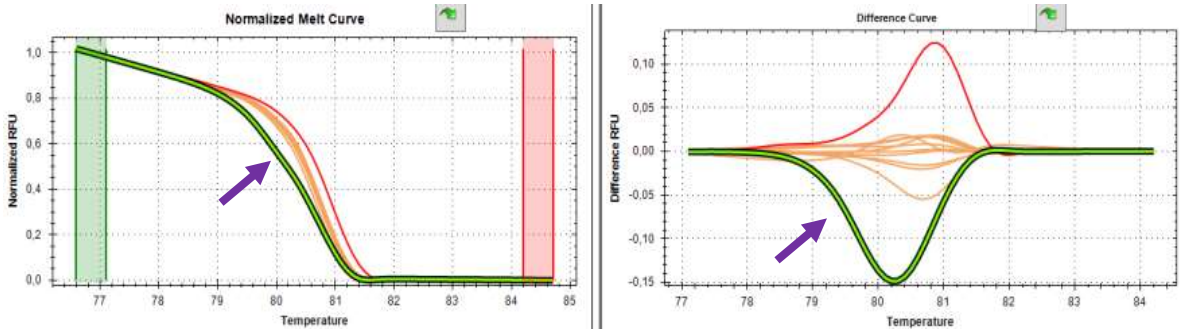
pacientes (90%) y no se detectó alteración en 3/28 (10%). Los autores indicaron como posible causa de la ausencia de detección en el 10% de los pacientes, que el análisis HRM no detecta algunas variaciones en estado hemicigoto, como es el caso de varones con HA, mientras que las variaciones son detectadas en las curvas melting cuando la muestra es heterocigota e indican que una posible solución sería mezclar el ADN de cada pacientes con un control para detectar las alteraciones en "heterocigosidad". El dHPLC requiere de la mezcla de ADN wild type con el ADN en estudio para hacer el análisis en heteroduplex. Aunque esto no es necesario para el caso de HRM ya que logra identificar alteración en estado hemicigoto, proponen que al realizar un análisis en heteroduplex podría mejorar la sensibilidad del estudio en hemicigotos. Sin embargo, en otro estudio realizado por Laurie et al. (Laurie et al., 2007) en el cual se utilizó la mezcla de ADN de un control con cada muestra de pacientes cuya variante patogénica ya era conocida, la prueba de HRM-PCR falló en identificar la región que albergaba la variante patogénica en 2 de 20 individuos (10%) analizados. Con relación a estos reportes, es importante indicar que la variante presente en el individuo HA-33 (una deleción de 2 pb en exón 2) en el presente estudio fue identificada debido al hallazgo de un patrón anormal de melting en el exón 2 en la muestra de la madre (HA-39) durante el análisis de HRM. La muestra del paciente no mostró un patrón anormal de HRM en el análisis de este fragmento (Falso negativo) (Figura 18).

En la Figura 18 se observa el análisis HRM para el exón 2 en varias muestras. Las diferentes curvas resaltadas en dicho análisis corresponden a muestras en las cuales presentaban una curva melting diferente y la identificación positiva de variantes patogénicas en dicho exón (HA-37, HA-39), mientras que para la muestra HA-33 mostró un patrón HRM similar a la mayoría de muestras sin variación en este.

A)



B)



C)

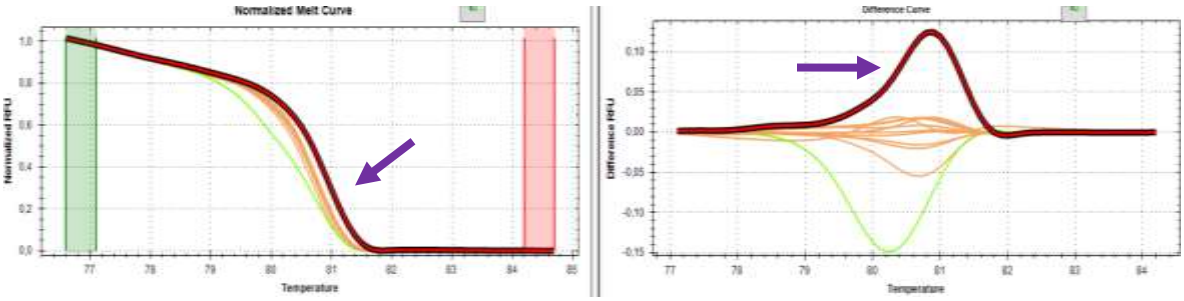


Figura 18. Análisis de HRM muestras HA-33, HA-37 HA-39. A) Análisis de HRM muestra HA-33. Curva melting con Tm dentro de lo esperado para el exón 2 (flecha morada). **B)** Análisis de HRM muestra HA-39 (madre de HA-33). Curva melting con Tm diferente al esperado para exón 2. El caso HA-33 presenta una variante tipo frameshift en exón 2, c.207-208delGT, p.F207Lfs12*, al igual que su madre (HA-39) en estado heterocigoto. **C)** Análisis de HRM muestra HA-37. Curva melting con Tm diferente al esperado para el exón 2. Esta muestra presenta una mutación tipo missense en exón 2, c.262A>G, p.M88V.

Por otro lado, el resultado negativo en 4 pacientes después de realizar HRM y secuenciación, planteaba, o que las variantes patogénicas en dichas muestras no

estuviese albergada en las regiones analizadas, o posibles fallas (falsos negativos) en la metodología HRM implementada. Se procedió a secuenciar la totalidad de la región codificante del gen, junto con las regiones intrónicas aledañas, con excepción del exón 14 del gen, y se detectó la variante patogénica en dos de las 4 muestras (HA-35, HA-36).

No es claro el porqué la reacción HRM falló en detectar la variante patogénica en estas muestras, ya que los amplicones para los exones del gen donde se albergan las variaciones detectadas, tenían un tamaño en pares de bases dentro de lo recomendado para este tipo de análisis (entre 100 a 300 pares de bases), que para HA-35, exón 4 el cual se analizó en dos segmentos separados, tenían 200 y 209 pb cada uno, y para HA-36, exón 2 un amplicón de 211pb. Podría plantearse que en la fragmentación de algunos de los exones del gen para que el amplicón cumpliera con los requerimientos del tamaño recomendado, la variación quedara ubicada en el sitio de unión de los primers o cercano a ellos. Sin embargo, las variaciones detectadas en las muestras HA-35 y HA-36 se encontraban aproximadamente en el medio del fragmento amplificado por lo cual este factor tampoco incidiría en estos falsos negativos (Figura 19).

No se tiene una explicación para los falsos negativos analizados en el presente trabajo, pero como se indicó previamente, otros estudios en los cuales se utilizó la misma metodología, también presentaron falsos negativos en la detección.

Exón 4 con regiones intrónicas

(4.1F)TGAGTGTACAGTGGATATAGAAAGGACAATTTTATTTCTTCCTGCTATAGGAGCTGAATAT/AGAT
GATCAGACCAGTCAAAGGGAGAAAGAAGATGATAAAGTCTTCCCTGGTGGAAGCCATACATATGTCTGGCA
GGTCCTGAAAGAGAATGGTCCAATGGCCTCTGACCCACTGTGCCTTACCTACTCATATCTTTCTCATGTGGAC
CTGGTAAAAGACTTGAATTCAGGCCTCATTGGAGCCCTACTAGTATGTAGAGAAGGTAAGTGTATGAAAGC
GTAGGATTGAGATGAAATAAGCA(4.2R)GAGAAGTACAA

Figura 19. Secuencia del exón 4 con secuencias intrónicas adyacentes. Resaltado en color morado y verde secuencia de los primers utilizados para amplificar el exón 4 en dos segmentos separados, 4.1 y 4.2 respectivamente; en amarillo secuencias aceptor y donador

de splicing; en gris se resalta la secuencia codificante y en rojo está señalado la variación c.399T>A, p.Y133*. Se observa como la variación detectada no se encuentra en región de unión de los primers utilizados para la amplificación fragmentada del exón 4.

El análisis de microarreglos se llevó a cabo en todos los individuos que presentaron ausencia de amplificación por duplicado en el análisis de HRM en uno o más exones (Figura 16). La razón por la que se eligió ésta metodología sobre la de MLPA (Multiple Ligation Primer Amplification) se debe a que el microarreglo permite, por un lado, delimitar con exactitud la región comprometida en la deleción y por otro, la detección de otras regiones involucradas. Además, el análisis de MLPA para el FVIII hubiera identificado lo que ya se había detectado por la amplificación de HRM, ya que las sondas de MLPA van dirigidas a secuencias exónicas del gen.

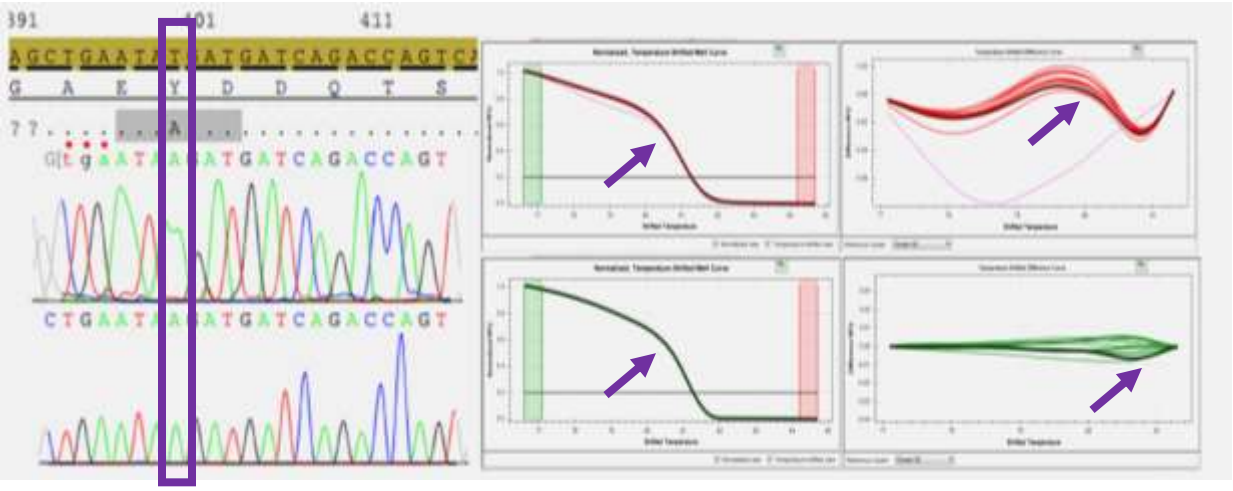
El individuo HA-07 y su madre, presentan una gran deleción que involucra del exón 1 al 14 con la pérdida de un total de 223,573 bp (arr[hg19] Xq28(154153703-154377276)x 0. La madre presenta la misma alteración en estado heterocigoto (arr[hg19] Xq28 (154153703-154377276)x 1) (Figura 16). Deleciones similares se han reportado en la literatura (Giannelli et al., 1998; Kemball-Cook & Tuddenham, 1997; Kemball-Cook, Tuddenham, & Wacey, 1998; Krebs et al., 2003; Lindvall & Swedenborg, 2006; Margaglione et al., 2008; K.-C. G. Rallapalli PM, Tuddenham EG, Gomez K, Perkins SJ 2013; Rallapalli, Kemball-Cook, Tuddenham, Gomez, & Perkins, 2013; Rydz, Leggo, Tinlin, James, & Lillicrap, 2013; Tuddenham et al., 1994). Sin embargo, no es posible precisar si se trata de la misma alteración, ya que ninguno de esos estudios utilizó microarreglos de ADN para caracterizar la deleción. En este caso, la deleción incluye cuatro genes adicionales FUNDC2, MTCP1NB, MTCP1 y BRCC3.

El individuo HA-13 presentó una deleción de 17,979 bp que involucra parte del intrón 12, exón 13 e intrón 13 (arr[hg19] Xq28 (154163600-154181579)x0). Para el caso del individuo HA-11, hubo ausencia de amplificación por HRM para el exón 26 en dos ocasiones. Sin embargo, el análisis con el microarreglo CytoScan 750 no detectó la deleción, incluso cuando se cambian los parámetros de análisis a un filtro de 1 kb. De

hecho, un análisis detallado del CytoScan 750 reveló una baja densidad de marcadores y sondas (SNP y CNV) cubriendo este exón, razón por la cual no se evidencia la deleción por el análisis de microarreglo. Es de esperarse el mismo resultado en cualquiera de las plataformas (CytoScan HD o SNP 6.0 Affymetrix), ya que todos provienen de la misma casa comercial, las cuales no incluyen marcadores en la región del exón 26 (Figura 16).

Se detectaron variantes patogénicas mediante secuenciación post-HRM en 9 de 13 pacientes no relacionados inicialmente. No se detectó variante patogénica en 4 de 13 pacientes lo que obligó a secuenciar la totalidad de la región codificante, con excepción del exón 14 (tiene 3106 nucleótidos) por limitaciones económicas en el estudio, como una aproximación para detectar las variantes en dichas muestras. Esto permitió la identificación de las variantes patogénicas en 2 pacientes adicionales (HA-35 y HA-36), aumentando a 11 de 13 variantes detectadas por secuencia. Como puede apreciarse en la Figura 20, las curvas melting en el análisis HRM no mostró ninguna alteración en su perfil de disociación que hicieran sospechar la existencia de una variación en la secuencia en dichos segmentos.

A)



B)

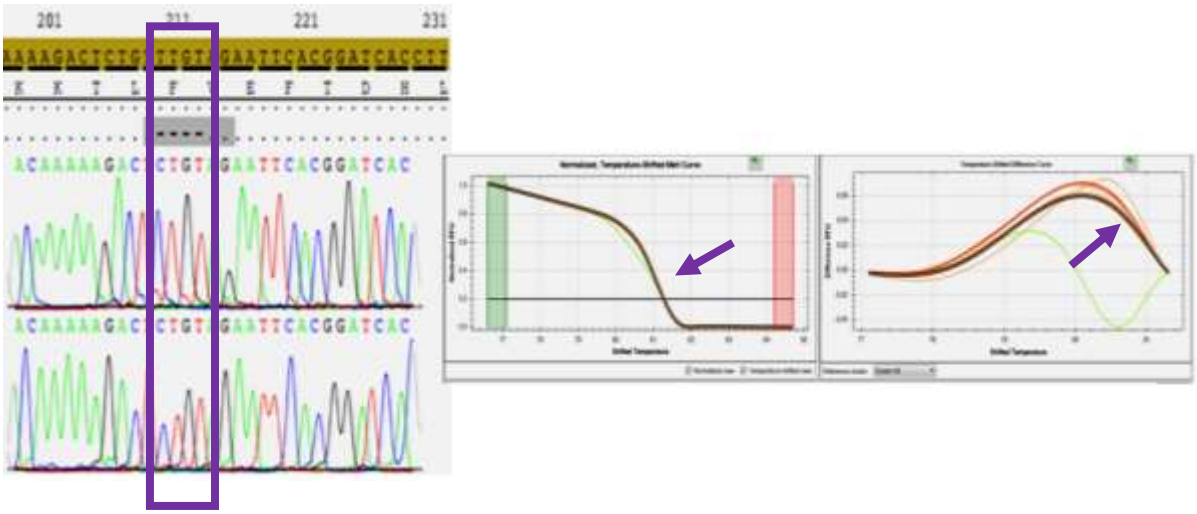


Figura 20. Electroferograma y HRM muestras HA35 y HA36. Evidencia de falsos negativos por análisis de HRM. **A)** Electroferograma (izquierdo) y curva melting HRM (derecha) de la muestra HA35. En el electroferograma se observa a variante patogénica identificada, mutación tipo nonsense en exón 4, c.399T>A (p.Y133*). En el HRM se observa una curva melting con temperatura de melting esperada para el exón 4 (flecha morada). **B)** Electroferograma (izquierdo) y curva melting HRM (derecha) de la muestra HA36. En el electroferograma observamos a variante patogénica identificada, mutación tipo frameshift consistente en pequeña deleción de 4 nucleótidos en exón 2 con codón de parada prematura c.209-212delTTGT, p.F70*. En el HRM se observa una curva melting con temperatura de melting esperada para el exón 2 (flecha morada).

Muchas de las variaciones detectadas por secuencia en este estudio habían sido reportadas en la literatura previamente (Tabla 2). Otras variantes, no han sido reportadas a la fecha en ninguna de las bases de datos de variaciones patogénicas en Hemofilia A. Entre estas variantes se encuentran c.5666 A>G, p.Q1889R, identificada en dos pacientes con HA leve (HA-20 y HA-21), y en la madre biológica de los pacientes en estado de heterocigosidad; otras variante no reportadas previamente son las variaciones missense c.262A>G p.M88V (Figura 14) y la variación nonsense, c.399T>A, p.Y133* (Figura 20). La variante missense c.262A>G p.M88V ha sido clasificada como patogénica en 3 de 4 Software de predicción utilizados (Adzhubei et al., 2010; Capriotti et al., 2006; Choi et al., 2012; Schwarz et al., 2014) mientras que la variación c.5666 A>G, p.Q1889R fue clasificada como posiblemente patogénica (score 0.798) con el software Polyphen-2, patogénica con Mutation taster y neutral con otros

dos programas de predicción (Adzhubei et al., 2010; Capriotti et al., 2006; Choi et al., 2012; Schwarz et al., 2014)(Tabla3, Figura 14).

La correlación genotipo-fenotipo mostró que la mayoría de pacientes con hemofilia A Severa, presentan variaciones patogénicas tipo INV22, INV1, gran deleción, frameshift y nonsense. Solo dos pacientes tienen variaciones tipo missense, y en dos pacientes no se ha detectado la variación

Cinco individuos tienen HA moderada. Uno de ellos tiene la INV22 (nivel de Factor VIII 1.8%) hallazgo que se espera encontrar en un fenotipo severo de la enfermedad. Una posible explicación es que el reactivo para cuantificar la actividad del FVIIII tiene limitaciones en discriminar niveles bajos de FVIII. Este paciente, clínicamente se comporta como un caso severo, presentando artropatía y se encuentra en profilaxis. Los cuatro individuos restantes, tienen variantes de único nucleótido tipo missense, las cuales han sido reportadas previamente c.157C>T p.V653M (HA-10), c.1292T>C p.L431S (HA-17), c.2095A>G p.M699V (HA-37) y c.1892A>G p.N631S (HA-40) (Tabla 2, Figura 14).

Dos individuos presentaron un fenotipo leve. Ambos son hermanos y presentan la variante c.5666A>G p.Q1889R con valores de actividad de plasmática de FVIII en 12% y 12.4%. La variante también está presente en la madre en estado heterocigoto, con actividad del FVIII de 70%. Esta variante no ha sido descrita previamente como se indicó previamente.

Del total de 33 pacientes no relacionados, 27 pacientes presentan un fenotipo severo (81.8%). De estos, 23 de los 27 pacientes presentaron INV22, INV1, gran deleción, frameshift y variación nonsense (85.2%), variaciones asociadas con el fenotipo severo de la enfermedad (actividad plasmática de FVIII menor del 1%). Dos pacientes con hemofilia A severa, presentan variación missense c.274G>T, p.G92C encontrada en dos medio hermanos (HA-18 y HA-26) y la otra c.262 A>G, p.M88V en HA-37. En dos pacientes no se ha identificado la variación patogénica.

En 15 de los 33 pacientes no relacionados (45.4%) tienen historia familiar de HA, un valor algo inferior a lo reportado en la literatura de dos terceras partes de pacientes con historia familiar (Graw et al., 2005).

Once de los 33 pacientes (33.3%) presentan historia de inhibidores, un porcentaje similar a lo reportado para otras poblaciones analizadas (Gouw et al., 2011). Todos los pacientes con historia de inhibidores presentan un fenotipo severo. No se observó una asociación entre una variante genética particular y la presencia de inhibidores como se indicó previamente. La presencia de la INV22 no se encontró estadísticamente asociada al desarrollo de inhibidores tal como ha sido reportado en la literatura en otros estudios (Ghosh & Shetty, 2009; Goodeve & Peake, 2003; Kreuz & Ettingshausen, 2014; Mantilla-Capacho et al., 2007; Oldenburg, El-Maarri, & Schwaab, 2002; Tantawy et al., 2011).

De la misma manera, no se observó una asociación estadísticamente significativa entre ninguna de las variantes patogénicas detectadas y la presencia de artropatía (p 0.18).

Las alteraciones moleculares detectadas en pacientes con Hemofilia A no relacionados se distribuyeron en 14/33 paciente con INV22 (42.4%), 3/33 para INV1 (9.1), grandes deleciones en 3/33 (9.1%), variaciones nonsense (2/33 6%), variaciones frameshift (2/33 6%) y variaciones missense en 7/33 (21.2%). No se detectó la variación patogénica en 2/33 pacientes (6%). En total se identificó la variación patogénica en 94% de los pacientes no relacionados analizados. Las variaciones detectadas en el presente estudio (excluyendo las inversiones 1 y 22, y las grandes deleciones) se encuentran ubicadas principalmente en los dominios A1 y A2 de la proteína (Figura 15). Nuestros resultados difieren un poco de lo reportado en la base de datos de Hemofilia A del CDC (Center for Disease Control)en donde la gran mayoría de las variaciones reporatadas se encuentran distribuidas en los dominios A1, A2, A3, C1 y C2 de la proteína para todos los fenotipos. Sin embargo para la HA severa, también se han reportado con similar frecuencia variaciones patogénicas en el dominio B. Esto radica en que el tipo de variaciones asociadas con un fenotipo severo, Indistintamente de donde se presenten dentro del gen, son lo suficientemente

deletéreas. Por otro lado, para los fenotipos leve y moderado el dominio B se encuentra mínimamente afectado.

Una posible explicación para las dos muestras en las cuales no se encontró la variación patogénica en el presente estudio, es que dichas variaciones estén ubicadas en el exón 14 del gen, exón que no fue secuenciado en dichas muestras por razones económicas o estar ubicadas en otras regiones del gen no cubiertas por el análisis realizado, tales como región 3 UTR, o regiones intrónicas profundas.

Estudios previos han reportado que, en general, no se logra identificar la mutación causal en un 2% de los casos cuando se hace el análisis de INV22-INV1, unión intrón-exón y análisis de regiones codificantes(Hallden, Knobe, Sjorin, Nilsson, & Ljung, 2012; Pezeshkpoor et al., 2013). Varios de estos estudios, han demostrado la existencia de variaciones en intrones que generen alteración de splicing. Para dichos casos, se debe implementar otras metodologías que permitan identificar estas alteraciones como la secuenciación completa del gen por técnicas de nueva generación o el análisis del RNA mensajero para detectar variantes de splicing. (Nougier et al., 2014; Pezeshkpoor et al., 2013; Zimmermann, Meier, Oldenburg, Muller, & Rost, 2012).

Por otro lado, se ha reportado un tercer rearreglo involucrando a las regiones homólogas en el gen de la Hemofilia A (Pezeshkpoor et al., 2012). Este tercer rearreglo se presenta debido a una región de repetición en el intrón 1 del F8 y una segunda región de repetición en el intrón 2 de una duplicación invertida del gen IKBKG corriente arriba del gen F8. Este rearreglo no es posible identificarlo por la metodología de IS-PCR implementada en este trabajo, debido a que involucra regiones distintas a las analizadas Int1h e Int22h. Este rearreglo ha sido reportado en un caso de HA severa descrito previamente donde se observó ausencia total de RNAm (El-Maarri et al., 2006).

CONCLUSIONES

Hemos implementado, por primera vez en Colombia, un abordaje molecular escalonado costo-efectivo para la identificación de variantes patogénicas en una cohorte de pacientes con Hemofilia A. Este análisis sistemático se implementó debido al alto costo que genera al sistema de salud las metodologías más recientes para el diagnóstico molecular como la secuenciación de nueva generación.

Con el abordaje implementado, hemos podido identificar la variante patogénica en el 94% de nuestra cohorte (31 de 33 individuos). Además, se identificó en 100% de los casos la variación en mujeres portadoras por el análisis escalonado.

La mayoría de los pacientes presentan un fenotipo severo de la enfermedad en la muestra analizada.

La metodología de IS-PCR para la detección de inversión en los intrones 1 y 22, es altamente efectiva y de fácil realización para la identificación de dichos rearreglos.

La frecuencia obtenida en este estudio para INV22 es similar a la de reportes previos en la literatura. Sin embargo, se detectó una mayor frecuencia para la INV1 (9.1%) que la reportada para otras poblaciones Latinoamericanas, Norteamericanas y Europeas.

Se identificaron otras variaciones responsables del fenotipo severo como las grandes deleciones por medio del análisis HRM, las cuales fueron confirmadas por medio de análisis de microarreglos, delimitando con exactitud la deleción.

Adicionalmente se detectaron variaciones tipo nonsense, y frameshift asociadas a HA severa.

En cuanto a las variaciones puntuales están presentes en pacientes con fenotipo leve, moderado y severo.

La mayoría de las variantes identificadas en el presente estudio, has sido reportadas en la literatura y en bases de datos de variaciones patogénicas de Hemofilia A. Sin embargo se detectaron tres variantes patogénicas nuevas, las cuales no se

encuentran reportadas en las bases de datos de la CDC, Hemobase y Hemophilia A database, dos en individuos con HA severa (c.262A>G; p.M88V), (c.399T>A; p.Y133*) y otra variante en dos hermanos con HA leve y su madre heterocigota (c.5666A>G; p.Q1889R).

La metodología de análisis HRM, aunque fue costo-efectiva para la identificación de un buen número de variaciones patogénicas en el abordaje molecular escalonado implementado, presentó falsos negativos para algunas muestras, por lo cual es necesario trabajar en modificaciones de la metodología empleada que permitan la identificación de las variaciones en todas las muestras analizadas.

No se encontró una asociación estadísticamente significativa entre las variaciones patogénicas identificadas y el desarrollo de artropatía, o el desarrollo de inhibidores. Sin embargo, se evidenció que aquellas variaciones patogénicas que alteran severamente la proteína y tienen un alto impacto funcional, se asocian al fenotipo severo de la enfermedad.

El análisis molecular en el contexto de la HA es necesario para el abordaje integral de la enfermedad. Con ello se puede llevar a cabo una correlación genotipo-fenotipo permitiendo determinar la severidad de la enfermedad y profundizar en la predisposición a la generación de inhibidores. Además, permite dar un adecuado asesoramiento genético e identificación de mujeres portadoras.

RECOMENDACIONES

Ampliar el número de muestra para establecer la frecuencia de la INV1 en nuestra población.

Llevar a cabo modificaciones en la metodología de análisis HRM para detectar las muestras falso negativas identificadas en el presente estudio.

Llevar a cabo el análisis del exón 14 de las dos muestras en las cuales no se identificó la variación patogénica.

Implementar la metodología de análisis para el tercer rearreglo identificado en HA.

Implementar la metodología de análisis a partir de RNA de las muestras de pacientes en los cuales no se identifique variación patogénica por este abordaje escalonado, para la identificación de variaciones que alteren el splicing del gen.

PRODUCTOS ACADÉMICOS

- Jornada de asesoramiento genético a familias con HA en Clínica Infantil Colsubsidio (15, 18 y 20 enero, 2016).
- Jornada de asesoramiento genético a familias con HA en Fundación HOMI (Viernes 25 de Marzo, 2016)
- Jornada de asesoramiento genético a familias con HA en Clínica Infantil Colsubsidio (10 y 12 de Octubre, 2016).
- Charla académica “Genética en Hemofilia A”, Jornada Académica Hemofilia en pacientes pediátricos. Viernes 15 de Abril, 2016. Grupo de Hemato-oncología, Fundación HOMI.
- Presentación de Poster “Molecular analysis for Hemophilia A patients in a cohort from Bogotá, Colombia” en el Congreso del American College of Medical Genetics, 8 al 12 de Marzo, 2016 Tampa, FL. Poster number 528.
- Presentación de Poster “Molecular analysis for Hemophilia A patients in a cohort from Bogotá, Colombia” en el Curso de la Escuela Latinoamericana de Genética Humana, 1 al 7 de Mayo, 2016 Caxias do Sul, RS, Brasil.

- Presentación de Poster “Systematic molecular analysis in Hemophilia A patients in a cohort from Bogotá, Colombia” en el congreso de la Federación Mundial de Hemofilia, 24 al 28 de Julio, Orlando, Fl. Poster number 318.
- Presentación oral “Systematic molecular analysis in Hemophilia A patients in a cohort from Bogotá, Colombia” en el congreso de la Asociación Colombiana de Genética Humana, 27 al 29 de Octubre, Bucaramanga, Colombia.
- Presentación del trabajo al Premio Nacional de Medicina, Academia Nacional de Medicina 2016, modalidad de Ciencias Básicas, “Análisis molecular escalonado para la identificación de mutaciones en pacientes Colombianos con Hemofilia A”.
- Sometimiento a publicación el artículo titulado 'Systematic molecular analysis of Hemophilia A patients in a cohort from Colombia' by Yunis, Luz; Linares, Adriana; Cabrera, Edgar; Yunis, Juan.

AGRADECIMIENTOS

Queremos agradecer a todos los pacientes y sus familias por la participación en este estudio.

Un especial agradecimiento a la Dra. Adriana Linares Ballesteros por su asesoría clínica, discusiones y enseñanzas acerca de los aspectos clínicos de Hemofilia A y del desarrollo de inhibidores en el presente trabajo.

Agradezco al Dr. Edgar Cabrera de la Fundación HOMI por la asesoría clínica prestada.

Nuestros agradecimientos al Centro de Tratamiento Integral de Hemofilia de la Clínica Infantil Colsubsido, así como al Centro de Investigaciones Clínicas de Colsubsidio.

Nuestro Agradecimiento al Centro de Tratamiento Integral de Hemofilia de la Fundación Hospital de la Misericordia (HOMI),

Un agradecimiento especial a las Enfermeras Claudia Suarez Molano, Yadira Valderrama Vargas y Angie Ubaque por su participación en la recolección de las muestras y su disposición a colaborar permanentemente.

Expreso mi agradecimiento al Instituto de Genética de la Universidad nacional de Colombia (IGUN) lugar donde se llevó a cabo el análisis de las muestras del presente estudio.

Un especial agradecimiento a Rita Baldrich (Msc) y a Blanca Schroeder del Servicio de Secuenciación, Instituto de Genética Universidad Nacional de Colombia (SSIGMOL) por su colaboración permanente.

A Servicios Médicos Yunis Turbay y Cia., por el apoyo para realizar los análisis de microarreglos de ADN.

Apoyo Financiero

Este trabajo contó con el apoyo financiero de la División de Investigaciones Bogotá (DIB), Hermes proyecto #27597 Universidad Nacional de Colombia a JJY.

LKY recibió apoyo de la “Convocatoria Nacional de Jóvenes Investigadores e Innovadores 2015-Colciencias”.

Lugar de realización

Todos los análisis fueron realizados en las instalaciones del Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia, con excepción del análisis de microarreglos el cual se llevó a cabo en las instalaciones de Servicios Médicos Yunis Turbay y Cia. SAS.

BIBLIOGRAFIA

Abou-Elew, H., Ahmed, H., Raslan, H., Abdelwahab, M., Hammoud, R., Mokhtar, D., & Arnaout, H. (2011). Genotyping of intron 22-related rearrangements of F8 by inverse-shifting PCR in Egyptian hemophilia A patients. *Ann Hematol, 90*(5), 579-584. doi: 10.1007/s00277-010-1115-x

Adams, R. L., & Bird, R. J. (2009). Review article: Coagulation cascade and therapeutics update: relevance to nephrology. Part 1: Overview of coagulation, thrombophilias and history of anticoagulants. *Nephrology (Carlton), 14*(5), 462-470. doi: 10.1111/j.1440-1797.2009.01128.x

Adzhubei, I. A., Schmidt, S., Peshkin, L., Ramensky, V. E., Gerasimova, A., Bork, P., . . . Sunyaev, S. R. (2010). A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods,* 7(4), 248-249. doi: 10.1038/nmeth0410-248

Albanez, S., Ruiz-Saez, A., Boadas, A., de Bosch, N., & Porco, A. (2011). Identification of factor VIII gene mutations in patients with severe haemophilia A in Venezuela: identification of seven novel mutations. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Haemophilia, 17*(5), e913-918. doi: 10.1111/j.1365-2516.2011.02500.x

Antonarakis, S. E. (1995). Molecular genetics of coagulation factor VIII gene and hemophilia A. [Research Support, Non-U.S. Gov't

Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.

Review]. *Thromb Haemost, 74*(1), 322-328.

Antonarakis, S. E., Kazazian, H. H., & Tuddenham, E. G. (1995). Molecular etiology of factor VIII deficiency in hemophilia A. [Research Support, Non-U.S. Gov't

Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.

Review]. *Hum Mutat, 5*(1), 1-22. doi: 10.1002/humu.1380050102

Antonarakis, S. E., Rossiter, J. P., Young, M., Horst, J., de Moerloose, P., Sommer, S. S., . . . Inaba, H. (1995). Factor VIII gene inversions in severe hemophilia A: results of an international consortium study. [Multicenter Study

Research Support, Non-U.S. Gov't

Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *Blood, 86*(6), 2206-2212.

Bagnall, R. D., Waseem, N., Green, P. M., & Giannelli, F. (2002). Recurrent inversion breaking intron 1 of the factor

VIII gene is a frequent cause of severe hemophilia A. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Blood, 99*(1), 168-174.

Boekhorst, J., Lari, G. R., D'Oiron, R., Costa, J. M., Novakova, I. R., Ala, F. A., . . . WL, V. A. N. H. (2008). Factor VIII genotype and inhibitor development in patients with haemophilia A: highest risk in patients with splice site mutations. [Multicenter Study]. *Haemophilia, 14*(4), 729-735. doi: 10.1111/j.1365-2516.2008.01694.x

Bowen, D. J. (2002). Haemophilia A and haemophilia B: molecular insights. [Corrected and Republished Article

Review]. *Mol Pathol, 55*(2), 127-144.

Brackmann, H. H., Albert, T., Graw, J., Oldenburg, J., Schramm, W., & Schwaab, R. (2003). [Gathering and evaluation of phenotype data of haemophilia A patients for correlation with genotype data]. *Hamostaseologie, 23*(1), 24-27. doi: 10.1267/Hamo03010024

Brinkhous, K. M. (1981). An overview: hemophilia and hemostasis. [Research Support, Non-U.S. Gov't

Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *Prog Clin Biol Res, 72*, 259-275.

Capriotti, E., Calabrese, R., & Casadio, R. (2006). Predicting the insurgence of human genetic diseases associated to single point protein mutations with support vector machines and evolutionary information. *Bioinformatics, 22*(22), 2729-2734. doi: 10.1093/bioinformatics/btl423

Castaldo, G., D'Argenio, V., Nardiello, P., Zarrilli, F., Sanna, V., Rocino, A., . . . Salvatore, F. (2007). Haemophilia A: molecular insights. [Research Support, Non-U.S. Gov't

Review]. *Clin Chem Lab Med, 45*(4), 450-461. doi: 10.1515/CCLM.2007.093

Choi, Y., Sims, G. E., Murphy, S., Miller, J. R., & Chan, A. P. (2012). Predicting the functional effect of amino acid substitutions and indels. *PLoS One,* 7(10), e46688. doi: 10.1371/journal.pone.0046688

Dahlbäck, B. (2000). Blood coagulation. *The Lancet, 355*(9215), 1627-1632. doi: 10.1016/s0140-6736(00)02225-x

de Alencar, J. B., Macedo, L. C., de Barros, M. F., Rodrigues, C., Shinzato, A. H., Pelissari, C. B., . . . Visentainer, J. E. (2015). New associations: INFG and TGFB1 genes and the inhibitor development in severe haemophilia A. *Haemophilia, 21*(4), e312-316. doi: 10.1111/hae.12685

den Dunnen, J. T., & Antonarakis, S. E. (2000). Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion. *Hum Mutat, 15*(1), 7-12. doi: 10.1002/(sici)1098-1004(200001)15:1<7::aid-humu4>3.0.co;2-n

den Dunnen, J. T., & Antonarakis, S. E. (2001). Nomenclature for the description of human sequence variations. *Hum Genet, 109*(1), 121-124.

den Dunnen, J. T., Dalgleish, R., Maglott, D. R., Hart, R. K., Greenblatt, M. S., McGowan-Jordan, J., . . . Taschner, P. E. (2016). HGVS Recommendations for the Description of Sequence Variants: 2016 Update. *Hum Mutat, 37*(6), 564-569. doi: 10.1002/humu.22981

Djulbegovic, B., & Goldsmith, G. H., Jr. (1995). Guidelines for management of hemophilia A and B. [Comment

Letter]. *Blood, 85*(2), 598-599.

El-Maarri, O., Herbiniaux, U., Graw, J., Schroder, J., Terzic, A., Watzka, M., . . . Oldenburg, J. (2005). Analysis of mRNA in hemophilia A patients with undetectable mutations reveals normal splicing in the factor VIII gene. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *J Thromb Haemost, 3*(2), 332-339. doi: 10.1111/j.1538-7836.2005.01140.x

El-Maarri, O., Singer, H., Klein, C., Watzka, M., Herbiniaux, U., Brackmann, H. H., . . . Oldenburg, J. (2006). Lack of F8 mRNA: a novel mechanism leading to hemophilia A. [Case Reports

Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Blood, 107*(7), 2759-2765. doi: 10.1182/blood-2005-09-3702

Er, T. K., & Chang, J. G. (2012). High-resolution melting: applications in genetic disorders. [Research Support, Non-U.S. Gov't

Review]. *Clin Chim Acta, 414*, 197-201. doi: 10.1016/j.cca.2012.09.012

Garces, M. F. (2012). *Estudio molecular de la inversión de los intrones 1 y 22 del Factor VIII de la coagulación en un grupo de pacientes pediátricos Colombianos con diagnóstico de Hemofilia A.* Master, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C.

Ghosh, K., & Shetty, S. (2009). Immune response to FVIII in hemophilia A: an overview of risk factors. [Review]. *Clin Rev Allergy Immunol, 37*(2), 58-66. doi: 10.1007/s12016-009-8118-1

Giannelli, F., Green, P. M., Sommer, S. S., Poon, M., Ludwig, M., Schwaab, R., . . . Brownlee, G. G. (1998). Haemophilia B: database of point mutations and short additions and deletions--eighth edition. *Nucleic Acids Res, 26*(1), 265-268.

Gitschier, J., Wood, W. I., Goralka, T. M., Wion, K. L., Chen, E. Y., Eaton, D. H., . . . Lawn, R. M. (1984). Characterization of the human factor VIII gene. *Nature, 312*(5992), 326-330.

Goodeve, A. C., & Peake, I. R. (2003). The molecular basis of hemophilia A: genotype-phenotype relationships and inhibitor development. *Semin Thromb Hemost, 29*(1), 23-30. doi: 10.1055/s-2003-37936

Gouw, S. C., van den Berg, H. M., Fischer, K., Auerswald, G., Carcao, M., Chalmers, E., . . . van der Bom, J. G. (2013). Intensity of factor VIII treatment and inhibitor development in children with severe hemophilia A: the RODIN study. [Multicenter Study

Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Blood, 121*(20), 4046-4055. doi: 10.1182/blood-2012-09-457036

Gouw, S. C., van den Berg, H. M., Oldenburg, J., Astermark, J., de Groot, P. G., Margaglione, M., . . . van der Bom, J. G. (2012). F8 gene mutation type and inhibitor development in patients with severe hemophilia A: systematic review and meta-analysis. *Blood, 119*(12), 2922-2934. doi: 10.1182/blood-2011-09-379453

Gouw, S. C., van der Bom, J. G., & Marijke van den Berg, H. (2007). Treatment-related risk factors of inhibitor development in previously untreated patients with hemophilia A: the CANAL cohort study. [Multicenter Study

Research Support, Non-U S Gov't]. *Blood, 109*(11), 4648-4654.

Gouw, S. C., Van Der Bom, J. G., Van Den Berg, H. M., Zewald, R. A., Ploos Van Amstel, J. K., & Mauser-Bunschoten, E. P. (2011). Influence of the type of F8 gene mutation on inhibitor development in a single centre cohort of severe haemophilia A patients. *Haemophilia, 17*(2), 275-281. doi: 10.1111/j.1365-2516.2010.02420.x

Graw, J., Brackmann, H. H., Oldenburg, J., Schneppenheim, R., Spannagl, M., & Schwaab, R. (2005). Haemophilia A: from mutation analysis to new therapies. [Research Support, Non-U.S. Gov't

Review]. *Nat Rev Genet, 6*(6), 488-501. doi: 10.1038/nrg1617

Gringeri, A. (2011). Factor VIII safety: plasma-derived versus recombinant products. [Comparative Study

Research Support, Non-U.S. Gov't

Review]. *Blood Transfus, 9*(4), 366-370. doi: 10.2450/2011.0092-10

Hallden, C., Knobe, K. E., Sjorin, E., Nilsson, D., & Ljung, R. (2012). Investigation of disease-associated factors in haemophilia A patients without detectable mutations. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Haemophilia, 18*(3), e132-137. doi: 10.1111/j.1365-2516.2011.02737.x

Hemophilia, W. F. o. (2014). Report on the Annual Global survey 2014. In W. F. o. Hemophilia (Ed.), (pp. 50). Online: World Federation of Hemophilia.

Higuchi, M., Antonarakis, S. E., Kasch, L., Oldenburg, J., Economou-Petersen, E., Olek, K., . . . Kazazian, H. H., Jr. (1991). Molecular characterization of mild-to-moderate hemophilia A: detection of the mutation in 25 of 29 patients by denaturing gradient gel electrophoresis. [Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *Proc Natl Acad Sci U S A, 88*(19), 8307-8311.

Higuchi, M., Kazazian, H. H., Jr., Kasch, L., Warren, T. C., McGinniss, M. J., Phillips, J. A., 3rd, . . . Antonarakis, S. E. (1991). 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. [Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *Proc Natl Acad Sci U S A, 88*(16), 7405-7409.

Hill, H. R., Augustine, N. H., Pryor, R. J., Reed, G. H., Bagnato, J. D., Tebo, A. E., . . . Wittwer, C. T. (2010). Rapid genetic analysis of x-linked chronic granulomatous disease by high-resolution melting. [Research Support, N.I.H., Extramural

Research Support, Non-U.S. Gov't]. *J Mol Diagn, 12*(3), 368-376. doi: 10.2353/jmoldx.2010.090147

Hoyer, L. W. (1994). Hemophilia A. [Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.

Review]. *N Engl J Med, 330*(1), 38-47. doi: 10.1056/NEJM199401063300108

Jayandharan, G. R., & Srivastava, A. (2012). Role of molecular genetics in hemophilia: from diagnosis to therapy. [Research Support, Non-U.S. Gov't

Review]. *Semin Thromb Hemost, 38*(1), 64-78. doi: 10.1055/s-0031-1300953

Kazazian, H. H., Jr., Wong, C., Youssoufian, H., Scott, A. F., Phillips, D. G., & Antonarakis, S. E. (1988). Haemophilia A resulting from de novo insertion of L1 sequences represents a novel mechanism for mutation in man. [Research Support,

U.S. Gov't, P.H.S.]. *Nature, 332*(6160), 164-166. doi: 10.1038/332164a0

Kemball-Cook, G., & Tuddenham, E. G. (1997). The Factor VIII Mutation Database on the World Wide Web: the haemophilia A mutation, search, test and resource site. HAMSTeRS update (version 3.0). *Nucleic Acids Res, 25*(1), 128-132.

Kemball-Cook, G., Tuddenham, E. G., & Wacey, A. I. (1998). The factor VIII Structure and Mutation Resource Site: HAMSTeRS version 4. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Nucleic Acids Res, 26*(1), 216-219.

Krebs, H., Domsch, C., Adelhard, K., Brackmann, H. H., Graw, J., Oldenburg, J., . . . Schramm, W. (2003). [The national GTH haemophilia registry as database within the scope of the German human genome project]. *Hamostaseologie, 23*(1), 18-23. doi: 10.1267/Hamo03010018

Kreuz, W., & Ettingshausen, C. E. (2014). Inhibitors in patients with haemophilia A. [Review]. *Thromb Res, 134 Suppl 1*, S22-26. doi: 10.1016/j.thromres.2013.10.016

Lakich, D., Kazazian, H. H., Jr., Antonarakis, S. E., & Gitschier, J. (1993). Inversions disrupting the factor VIII gene are a common cause of severe haemophilia A. [Research Support, Non-U.S. Gov't

Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *Nat Genet, 5*(3), 236-241. doi: 10.1038/ng1193-236

Laurie, A. D., Smith, M. P., & George, P. M. (2007). Detection of factor VIII gene mutations by high-resolution melting analysis. *Clin Chem, 53*(12), 2211-2214. doi: 10.1373/clinchem.2007.093781

Lewis, J. H., Soulier, J. P., & Taylor, F. H. (1946). Chemical, clinical and immunological studies on the products of human plasma fractionation; the coagulation defect in hemophilia; the effect in vitro and in vivo on the coagulation time in hemophilia of a prothrombin and fibrinogen-free normal plasma and its derived protein fractions. *J Clin Invest, 25*(6), 876-879.

Li, J. N., Carrero, I. G., Dong, J. F., & Yu, F. L. (2015). Complexity and diversity of F8 genetic variations in the 1000 genomes. *J Thromb Haemost, 13*(11), 2031-2040.

Lin, S.-Y., Su, Y.-N., Hung, C.-C., Tsay, W., Chiou, S.-S., Chang, C.-T., . . . Lee, C.-N. (2008). Mutation spectrum of 122 hemophilia A families from Taiwanese population by LD-PCR, DHPLC, multiplex PCR and evaluating the clinical application of HRM. [journal article]. *BMC Medical Genetics, 9*(1), 1-14. doi: 10.1186/1471-2350-9-53

Lin, S. Y., Su, Y. N., Hung, C. C., Tsay, W., Chiou, S. S., Chang, C. T., . . . Lee, C. N. (2008). Mutation spectrum of

122 hemophilia A families from Taiwanese population by LD-PCR, DHPLC, multiplex PCR and evaluating the clinical application of HRM. *BMC Med Genet., 9:53.*(doi), 10.1186/1471-2350-1189-1153.

Lindvall, K., & Swedenborg, N. (2006). UMAS Hemophilia Database. *Stud Health Technol Inform, 122*, 853.

Mantilla-Capacho, J. M., Beltran-Miranda, C. P., Luna-Zaizar, H., Aguilar-Lopez, L., Esparza-Flores, M. A., Lopez-Guido, B., . . . Jaloma-Cruz, A. R. (2007). Frequency of intron 1 and 22 inversions of Factor VIII gene in Mexican patients with severe hemophilia A. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Am J Hematol, 82*(4), 283-287. doi: 10.1002/ajh.20865

Margaglione, M., Castaman, G., Morfini, M., Rocino, A., Santagostino, E., Tagariello, G., . . . Mannucci, P. M. (2008). The Italian AICE-Genetics hemophilia A database: results and correlation with clinical phenotype. *Haematologica, 93*(5), 722-728. doi: 10.3324/haematol.12427

Montgomery, J., Wittwer, C. T., Palais, R., & Zhou, L. (2007). Simultaneous mutation scanning and genotyping by high-resolution DNA melting analysis. *Nat Protoc, 2*(1), 59-66. doi: 10.1038/nprot.2007.10

Nougier, C., Roualdes, O., Fretigny, M., d'Oiron, R., Costa, C., Negrier, C., & Vinciguerra, C. (2014). Characterization of four novel molecular changes in the promoter region of the factor VIII gene. *Haemophilia, 20*(2), e149-156. doi: 10.1111/hae.12346

Ochman, H., Gerber, A. S., & Hartl, D. L. (1988). Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. *Genetics, 120*(3), 621-623.

Ogata, K., Selvaraj, S. R., Miao, H. Z., & Pipe, S. W. (2011). Most factor VIII B domain missense mutations are unlikely to be causative mutations for severe hemophilia A: implications for genotyping. *J Thromb Haemost, 9*(6), 1183-1190. doi: 10.1111/j.1538-7836.2011.04268.x

Oldenburg, J., Brackmann, H. H., Hanfland, P., & Schwaab, R. (2000). Molecular genetics in haemophilia A. [Review]. *Vox Sang, 78 Suppl 2*, 33-38.

Oldenburg, J., El-Maarri, O., & Schwaab, R. (2002). Inhibitor development in correlation to factor VIII genotypes. [Research Support, Non-U.S. Gov't

Review]. *Haemophilia, 8 Suppl 2*, 23-29.

Oldenburg, J., Grimm, T., Becker, J., Olek, K., Brackmann, H. H., & Schwaab, R. (1997). Mutations in severe hemophilia A: distribution within the factor VIII gene, origin and

influence on inhibitor development. *Beitr Infusionsther Transfusionsmed, 34*, 224-230.

Oldenburg, J., Schroder, J., Graw, J., Ivaskevicius, V., Brackmann, H. H., Schramm, W., . . . Schwaab, R. (2003). [Significance of mutation analysis in patients with haemophilia A]. *Hamostaseologie, 23*(1), 6-12. doi: 10.1267/Hamo03010006

Ononye, C., & Jenkins, P. V. (1999). Inversion mutation analysis in hemophilia a by restriction enzyme analysis and southern blotting. *Methods Mol Med, 31*, 151-157.

Pahl, S., Pavlova, A., Driesen, J., & Oldenburg, J. (2014). Effect of F8 B domain gene variants on synthesis, secretion, activity and stability of factor VIII protein. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Thromb Haemost, 111*(1), 58-66. doi: 10.1160/TH13-01-0028

Pavlova, A., Delev, D., Lacroix-Desmazes, S., Schwaab, R., Mende, M., Fimmers, R., . . . Oldenburg, J. (2009). Impact of polymorphisms of the major histocompatibility complex class II, interleukin-10, tumor necrosis factor-alpha and cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 genes on inhibitor development in severe hemophilia A. *J Thromb Haemost,* 7(12), 2006-2015. doi: 10.1111/j.1538-7836.2009.03636.x

Pergantou, H., Varela, I., Moraloglou, O., Economou, M., Spanou, K., Kapsimali, Z., . . . Platokouki, H. (2013). Impact of HLA alleles and cytokine polymorphisms on inhibitors development in children with severe haemophilia A. *Haemophilia, 19*(5), 706-710. doi: 10.1111/hae.12168

Pezeshkpoor, B., Rost, S., Oldenburg, J., & El-Maarri, O. (2012). Identification of a third rearrangement at Xq28 that causes severe hemophilia A as a result of homologous recombination between inverted repeats. [Case Reports

Research Support, Non-U.S. Gov't]. *J Thromb Haemost, 10*(8), 1600-1608. doi: 10.1111/j.1538-7836.2012.04809.x

Pezeshkpoor, B., Zimmer, N., Marquardt, N., Nanda, I., Haaf, T., Budde, U., . . . El-Maarri, O. (2013). Deep intronic 'mutations' cause hemophilia A: application of next generation sequencing in patients without detectable mutation in F8 cDNA. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *J Thromb Haemost, 11*(9), 1679-1687. doi: 10.1111/jth.12339

Pipe, S. W. (2009). Functional roles of the factor VIII B domain. *Haemophilia, 15*(6), 1187-1196. doi: 10.1111/j.1365-2516.2009.02026.x

Radic, C. P. (2010). *Genética molecular de hemofilia: caracterización de mutaciones en hemofilia B, expresión de hemofilia en mujeres y desarrollo de nuevos métodos de análisis de inversiones.* Doctorado en ciencias biológicas,

Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires Argentina. Retrieved from http://digital.bl.fcen.uba.ar/gsdl-282/cgi-bin/library.cgi?a=d&c=tesis&d=Tesis_4794_Radic (4794)

Radic, C. P., Rossetti, L. C., Zuccoli, J. R., Abelleyro, M. M., Larripa, I. B., & De Brasi, C. D. (2009a). Inverse shifting PCR based prenatal diagnosis of hemophilia-causative inversions involving int22h and int1h hotspots from chorionic villus samples. [Evaluation Studies

Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Prenat Diagn, 29*(12), 1183-1185. doi: 10.1002/pd.2393

Radic, C. P., Rossetti, L. C., Zuccoli, J. R., Abelleyro, M. M., Larripa, I. B., & De Brasi, C. D. (2009b). Inverse shifting PCR based prenatal diagnosis of hemophilia-causative inversions involving int22h and int1h hotspots from chorionic villus samples. *Prenat Diagn., 29*(12), 1183-1185. doi: 1110.1002/pd.2393.

Rallapalli PM, K.-C. G., Tuddenham EG, Gomez K, Perkins SJ. (2014). Factor VIII variant database. In E. A. f. H. a. a. d. (EAHAD) (Ed.). http://www.factorviii-db.org/index.php: EAHAD.

Rallapalli PM, K.-C. G., Tuddenham EG, Gomez K, Perkins SJ (2013). Factor VIII variant database. http://www.factorviii-db.org

Rallapalli, P. M., Kemball-Cook, G., Tuddenham, E. G., Gomez, K., & Perkins, S. J. (2013). An interactive mutation database for human coagulation factor IX provides novel insights into the phenotypes and genetics of hemophilia B. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *J Thromb Haemost, 11*(7), 1329-1340. doi: 10.1111/jth.12276

Ririe, K. M., Rasmussen, R. P., & Wittwer, C. T. (1997). Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. [Research Support, Non-U.S. Gov't

Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *Anal Biochem, 245*(2), 154-160. doi: 10.1006/abio.1996.9916

Rossetti, L. C., Candela, M., Bianco, R. P., de Tezanos Pinto, M., Western, A., Goodeve, A., . . . De Brasi, C. D. (2004). Analysis of factor VIII gene intron 1 inversion in Argentinian families with severe haemophilia A and a review of the literature. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Blood Coagul Fibrinolysis, 15*(7), 569-572.

Rossetti, L. C., Radic, C. P., Abelleyro, M. M., Larripa, I. B., & De Brasi, C. D. (2011). Eighteen years of molecular genotyping the hemophilia inversion hotspot: from southern

blot to inverse shifting-PCR. [Research Support, Non-U.S. Gov't

Review]. *Int J Mol Sci, 12*(10), 7271-7285. doi: 10.3390/ijms12107271

Rossetti, L. C., Radic, C. P., Larripa, I. B., & De Brasi, C. D. (2005). Genotyping the hemophilia inversion hotspot by use of inverse PCR. [Comparative Study

Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Clin Chem, 51*(7), 1154-1158. doi: 10.1373/clinchem.2004.046490

Rossetti, L. C., Radic, C. P., Larripa, I. B., & De Brasi, C. D. (2008a). Developing a new generation of tests for genotyping hemophilia-causative rearrangements involving int22h and int1h hotspots in the factor VIII gene. [Research Support, Non-U.S. Gov't

Validation Studies]. *J Thromb Haemost, 6*(5), 830-836. doi: 10.1111/j.1538-7836.2008.02926.x

Rossetti, L. C., Radic, C. P., Larripa, I. B., & De Brasi, C. D. (2008b). Developing a new generation of tests for genotyping hemophilia-causative rearrangements involving int22h and int1h hotspots in the factor VIII gene. *J Thromb Haemost., 6*(5), 830-836. doi: 810.1111/j.1538-7836.2008.02926.x. Epub 02008 Feb 02912.

Rossiter, J. P., Young, M., Kimberland, M. L., Hutter, P., Ketterling, R. P., Gitschier, J., . . . et al. (1994). Factor VIII gene inversions causing severe hemophilia A originate almost exclusively in male germ cells. [Research Support, Non-U.S. Gov't

Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *Hum Mol Genet, 3*(7), 1035-1039.

Rydz, N., Leggo, J., Tinlin, S., James, P., & Lillicrap, D. (2013). The Canadian "National Program for hemophilia mutation testing" database: a ten-year review. [Review]. *Am J Hematol, 88*(12), 1030-1034. doi: 10.1002/ajh.23557

Salazar-Sanchez, L., Jimenez-Cruz, G., Mendez, M., Chaverri, P., Alvarado, P., Schroder, W., . . . Oldenburg, J. (2010). Molecular analysis of FVIII gene in severe HA patients of Costa Rica. *Hamostaseologie, 30 Suppl 1*, S150-152.

Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A, 74*(12), 5463-5467.

Santagostino, E., Auerswald, G., Benson, G., Dolan, G., Jimenez-Yuste, V., Lambert, T., . . . Zupancic Salek, S. (2015). Switching treatments in haemophilia: is there a risk of inhibitor development? [Research Support, Non-U.S. Gov't

Review]. *Eur J Haematol, 94*(4), 284-289. doi: 10.1111/ejh.12433

Savage, N. (2014). Born in the Blood. *Nature, 515*(7528), S158-S159. doi: 10.1038/515S158a

Schramm, W. (2014). The history of haemophilia - a short review. [Historical Article

Review]. *Thromb Res, 134 Suppl 1*, S4-9. doi: 10.1016/j.thromres.2013.10.020

Schwarz, J. M., Cooper, D. N., Schuelke, M., & Seelow, D. (2014). MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat Methods, 11*(4), 361-362. doi: 10.1038/nmeth.2890

Srivastava, A., Brewer, A. K., Mauser-Bunschoten, E. P., Key, N. S., Kitchen, S., Llinas, A., . . . Street, A. (2013). Guidelines for the management of hemophilia. [Practice Guideline]. *Haemophilia, 19*(1), e1-47. doi: 10.1111/j.1365-2516.2012.02909.x

Tantawy, A. A., Mackensen, S. V., El-Laboudy, M. A., Labib, J. H., Moftah, F., El-Telbany, M. A., & Mansour, W. A. (2011). Health-related quality of life in Egyptian children and adolescents with hemophilia A. *Pediatr Hematol Oncol, 28*(3), 222-229. doi: 10.3109/08880018.2010.535116

Tuddenham, E. G., Schwaab, R., Seehafer, J., Millar, D. S., Gitschier, J., Higuchi, M., . . . et al. (1994). Haemophilia A: database of nucleotide substitutions, deletions, insertions and rearrangements of the factor VIII gene, second edition. *Nucleic Acids Res, 22*(17), 3511-3533.

Viel, K. R., Ameri, A., Abshire, T. C., Iyer, R. V., Watts, R. G., Lutcher, C., . . . Howard, T. E. (2009). Inhibitors of factor VIII in black patients with hemophilia. [Research Support, N.I.H., Extramural]. *N Engl J Med, 360*(16), 1618-1627. doi: 10.1056/NEJMoa075760

Vine, A. K. (2009). Recent advances in haemostasis and thrombosis. [Review]. *Retina, 29*(1), 1-7. doi: 10.1097/IAE.0b013e31819091dc

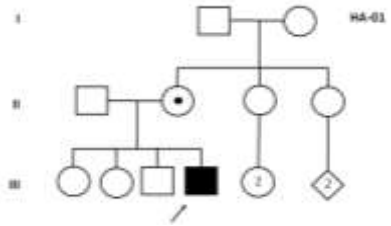
Wacey, A. I., Kemball-Cook, G., Kazazian, H. H., Antonarakis, S. E., Schwaab, R., Lindley, P., & Tuddenham, E. G. (1996). The haemophilia A mutation search test and resource site, home page of the factor VIII mutation database: HAMSTeRS. *Nucleic Acids Res, 24*(1), 100-102.

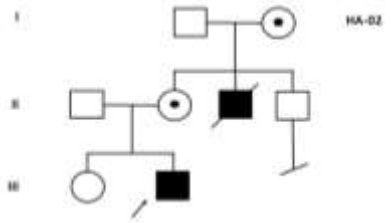
Woods-Samuels, P., Kazazian, H. H., Jr., & Antonarakis, S. E. (1991). Nonhomologous recombination in the human genome: deletions in the human factor VIII gene. [Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *Genomics, 10*(1), 94-101.

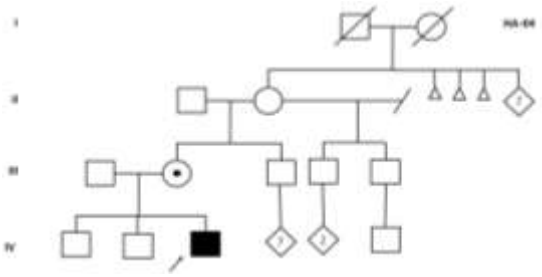
Zimmermann, M. A., Meier, D., Oldenburg, J., Muller, C. R., & Rost, S. (2012). Identification and characterization of

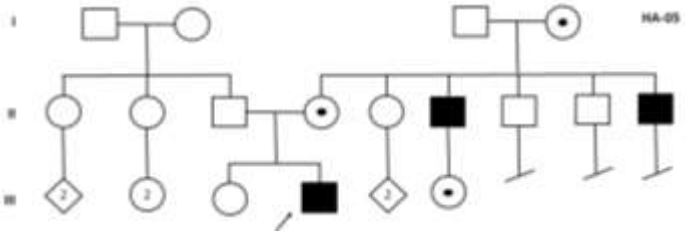
mutations in the promoter region of the factor VIII gene. [Letter]. *J Thromb Haemost*, *10*(2), 314-317. doi: 10.1111/j.1538-7836.2011.04574.x

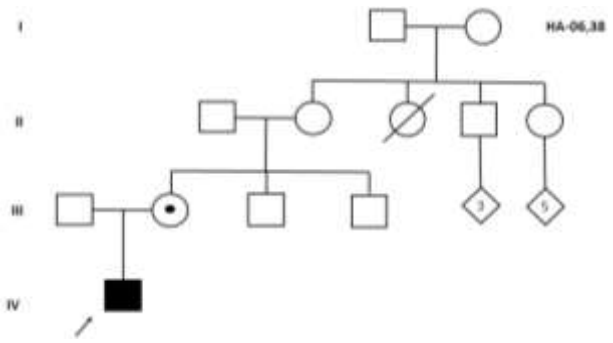
Anexo 1. Árboles genealógicos de pacientes con HA en Colombia.

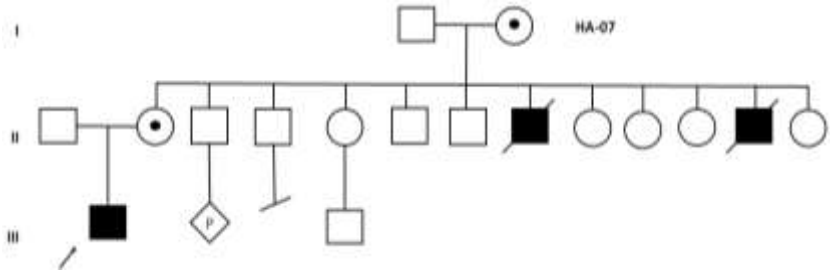


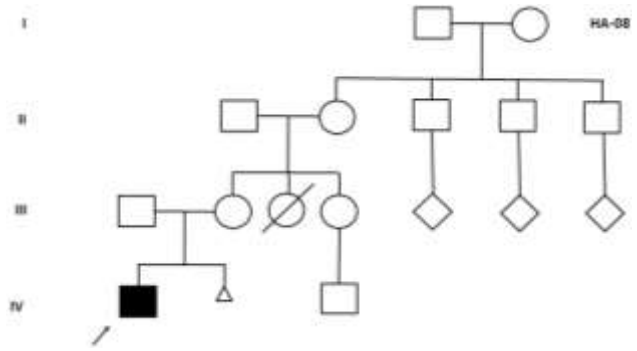


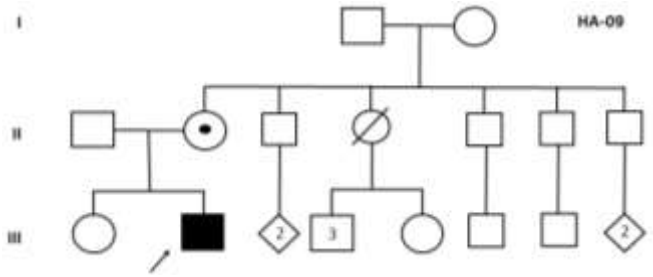


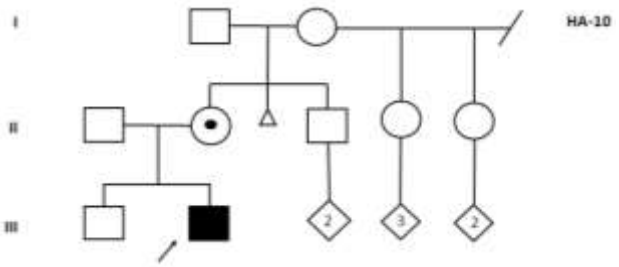


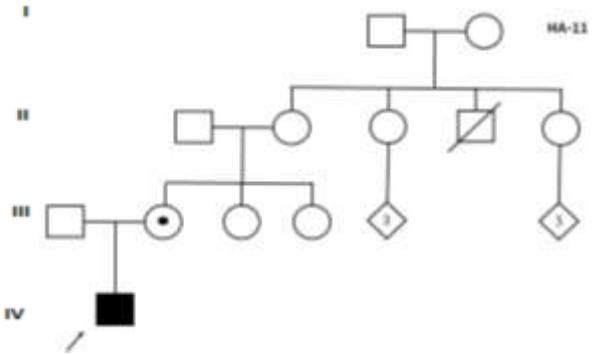

I
II
III
IV
HA-06,38
3
5

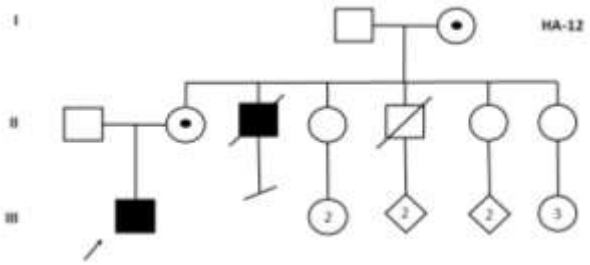

I
II
III
HA-07
P

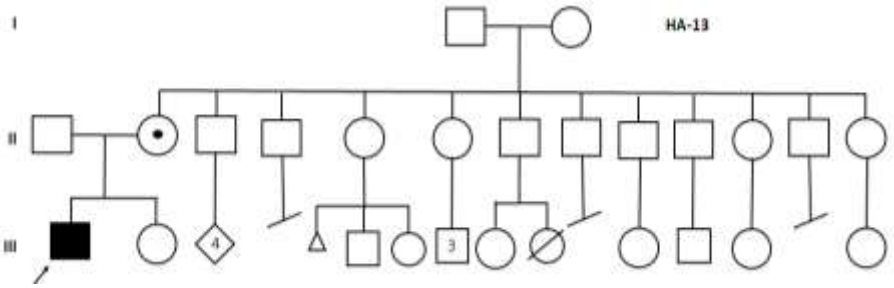

I
II
III
IV
HA-08

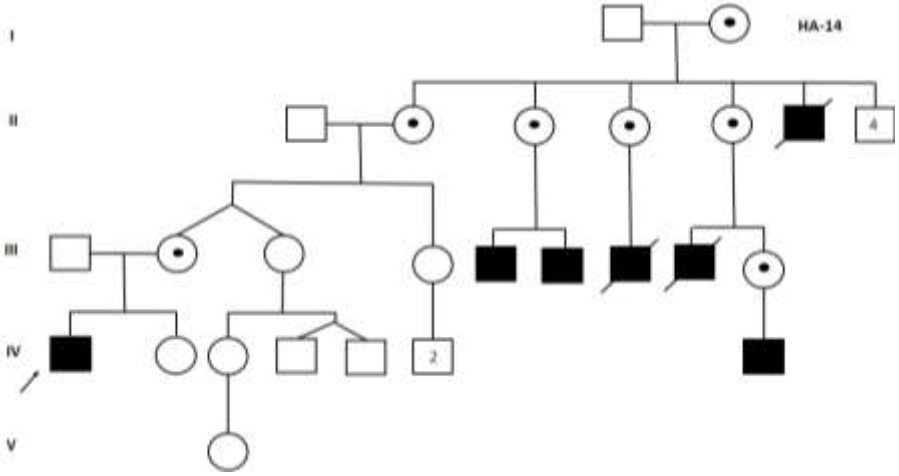

I
II
III
HA-09
2
3
2

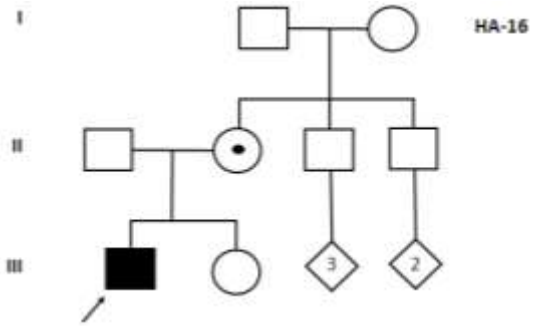

I
II
III
HA-10
2
3
2

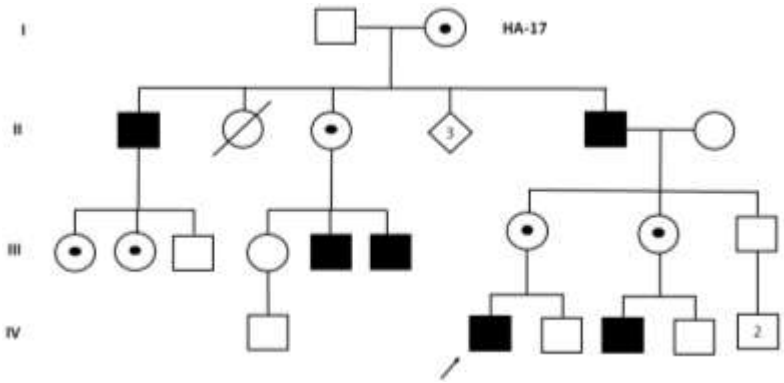

I
II
III
IV
HA-11

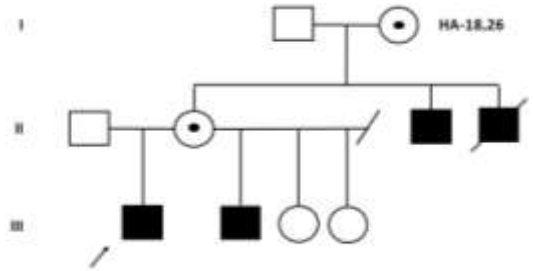

I
II
III
HA-12
2
2
2
3

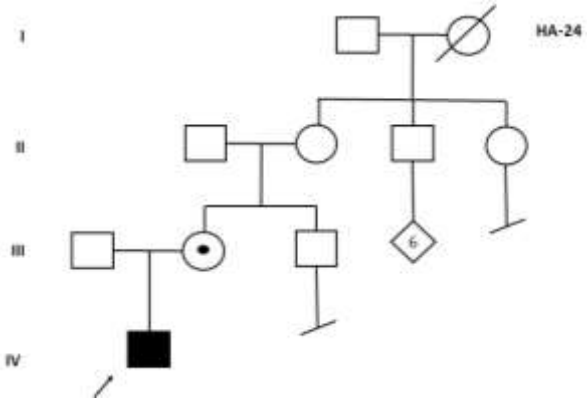

I
II
III
HA-13
4
3

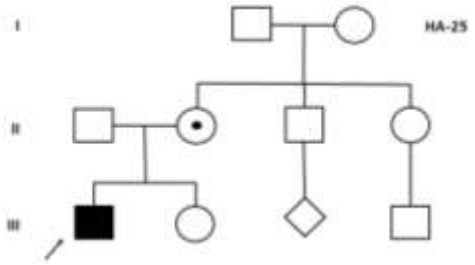

HA-14
I
II
III
IV
V
4
2

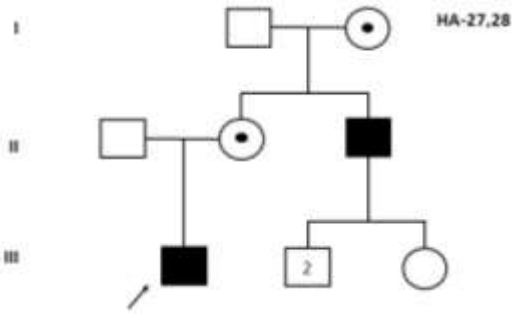

HA-16
I
II
III
3
2

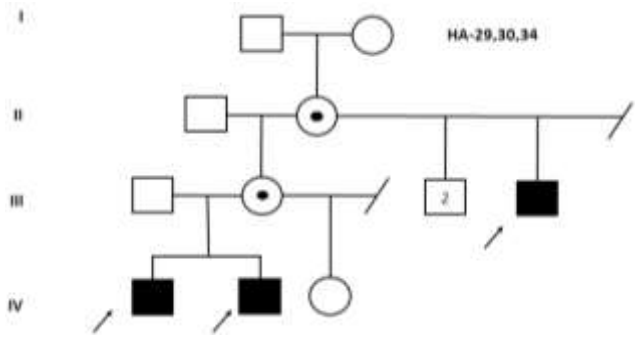

HA-17
I
II
III
IV
3
2

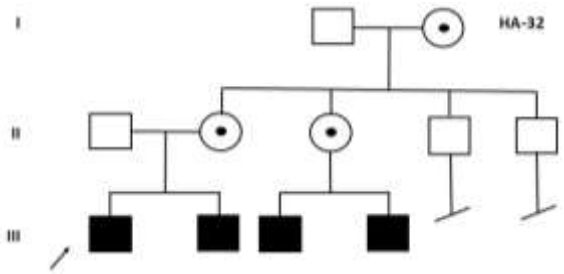

I
II
III
HA-18.26

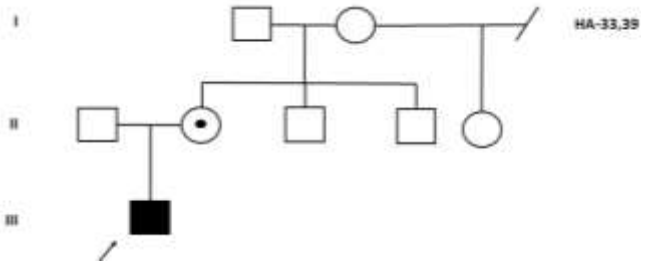

I
II
III
IV
HA-24
6

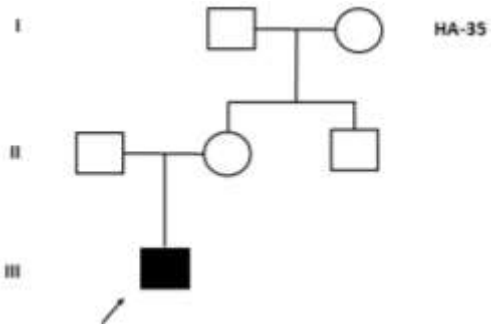

I
II
III
HA-25

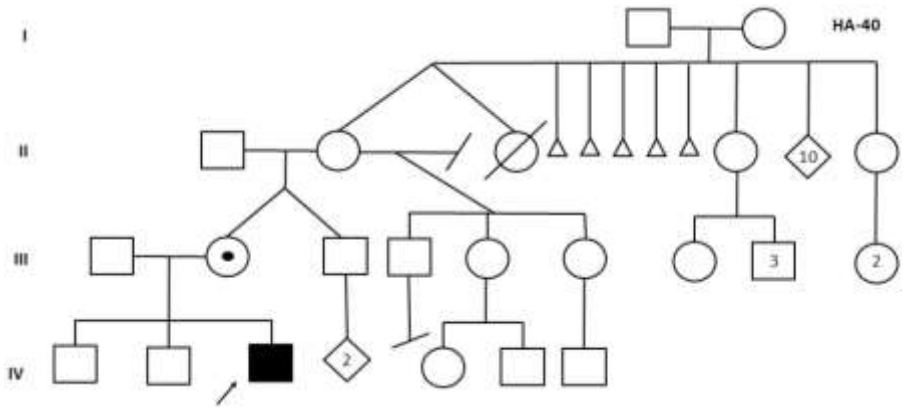

I
II
III
HA-27,28
2

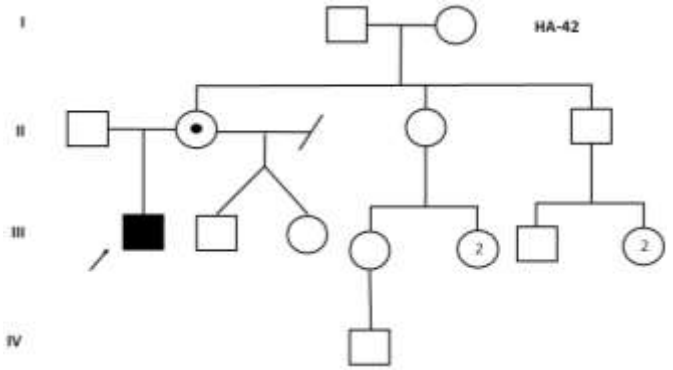

I
II
III
IV
HA-29,30,34
2

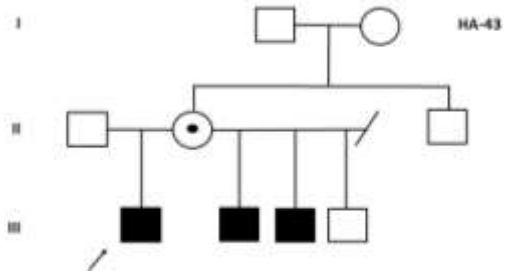

I
II
III
HA-32


I
II
III
HA-33,39

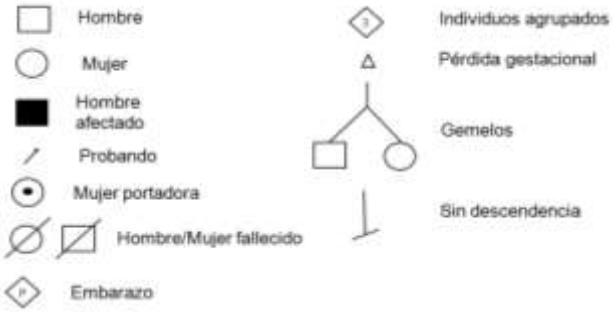

I
II
III
HA-35


HA-40
I
II
III
IV
10
3
2
2


HA-42
I
II
III
IV
2
2


HA-43
I
II
III

Simbología


Hombre
Mujer
Hombre afectado
Probando
Mujer portadora
Hombre/Mujer fallecido
Embarazo
Individuos agrupados
Pérdida gestacional
Gemelos
Sin descendencia

Anexo 2. Primers utilizados para la detección de las Inversiones en el intrón 22 e intrón 1. Tomado de (Rossetti et al., 2008b).

22-ID	ACATACGGTTTAGTCACAAGT
22-ED	TCCAGTCACTTAGGCTCAG
22-IU	CCTTTCAACTCCATCTCCAT
22-2U	ACGTGTCTTTTGGAGAAGTC
22-3U	CTCACATTGTGTTCTTGTAGTC
1-IU	GCCGATTGCTTATTTATATC
1-ID	TCTGCAACTGGTACTCATC
1-ED	GCCTTTACAATCCAACACT

Anexo 3. Primers utilizados para amplificación de todos los exones y uniones intrón-exon en el gen de la hemofilia A para análisis con HRM y secuenciamiento (S. Y. Lin et al., 2008).

Exón	Oligo (5´-3´)	Tamaño amplificado
HA – 1-1F	CCACTGATAAAAAGGAAGCA	226
HA – 1-1R	GTGGAGAGCTCTATTTGCAT	
HA – 1-2F	CCTCCTGGGAGCTAAAGATA	246
HA – 1-2R	CGATCAGACCCTACAGGA	
HA-2F	TTGAAGTGTCCACCAAAATGAACGACT	211
HA-2R	GATACCCAATTTCATAAATAGCATTCA	
HA-3F	GTACTATCCCCAAGTAACCTT	204
HA-3R	CATAGAATGACAGGACAATAGG	
HA – 4-1F	CTTTGAGTGTACAGTGGATATAGAA	200
HA – 4-1R	AAAGATATGAGTAGGTAAGGCACA	
HA – 4-2F	TGATAAAGTCTTCCCTGGTG	209

HA – 4-2R	TGCTTATTTCATCTCAATCCT	
HA-5F	CCTCCTAGTGACAATTTCCTA	188
HA-5R	AGCAGAGGATTTCTTTCAGGAATCCAA	
HA-6F	CATGAGACACCATGCTTAGCT	224
HA-6R	AACTCTGGTGCTGAATTTGGAAGACCCT	
HA – 7-1F	CCTAGCAAGTGTTTTCCATT	246
HA – 7-1R	AGGTCCATCAAGAGTGTTTG	
HA – 7-2F	GCCACAGGAAATCAGTCTAT	236
HA – 7-2R	TTCATTTTAAAGATCCAAGA	
HA – 8-1F	TGAGCCAATTCAATCTCTTT	237
HA – 8-1R	ATCATCAAACCTGACCACAT	
HA – 8-2F	TAATGAAGAAGCGGAAGACT	245
HA – 8-2R	TTTTGAGTATGGGGAAGAGA	
HA – 9F	CCCAACCTCTCATCTTTTT	250
HA – 9R	CCAGACTTTTTCTTCTTACCTG	
HA-10F	GGATTTGATCTTAGATCTCGC	204
HA-10R	ATTTTAGTTGTTATTGATGA	
HA – 11-1F	CAGATTTGTAGAACCCTTGC	216
HA – 11-1R	TAGAGTAATAGCGGGTCAGG	
HA – 11-2F	CTGCCAGGAGAAATATTCAA	239
HA –11-2R	AAGGGGACATACACTGAGAA	
HA-12F	GCATTTCTTTACCCCTTTCA	230
HA-12R	CTTTATTCACCACCCACTG	
HA – 13-1F	CATGACAATCACAATCCAAA	244
HA – 13-1R	AGAATGGGAATAGGGTGAGT	
HA – 13-2F	GAGGTGGCATACTGGTACAT	219
HA – 13-2R	ATACGAATGGCTAGTGAAGC	
HA – 14-1F	CTGTGTTATGAGTAACCAGAGT	243

HA – 14-1R	CCTAGTGCTAGGGTGTCTTG	
HA – 14-2F	AATGCCATTGAACCAAGA	238
HA – 14-2R	CATATTTGGCTTCTTGGAGA	
HA – 14-3F	TCTTGCGACAGAGTCCTACT	242
HA – 14-3R	TTTCTTCAACTCTGTTGCTG	
HA – 14-4F	TCAGGCCTCCAATTAAGAT	250
HA – 14-4R	GGTCCACCAGACTCAGTAAG	
HA – 14-5F	AGA TAC CAC TCT ATT TGG CA	229
HA – 14-5R	AAC TTT GAA TAA GGC ATT A	
HA – 14-6F	TGGTAGGTTATTTAAAGGGAAA	248
HA – 14-6R	GCATTCTGTCATGAATCAAA	
HA – 14-7F	CCATCAGTCTGGCAAAATA	250
HA – 14-7R	ATCCACCTTGCTGATTCTG	
HA – 14-8F	CACAAAATCCAGATATGTCGT	235
HA – 14-8R	CCATCTCTTTGAGTCCTACG	
HA – 14-9F	AGGAAAGGGTGAATTTACAA	249
HA – 14-9R	TTTTGCCTAGTGCTCAGTAA	
HA – 14-10F	TTGCCTCAGATACATACAGTG	250
HA – 14-10R	TGCATGCATATTTCTCTACAA	
HA – 14-11F	AAAACTTGGAAGGCTTGG	250
HA – 14-11R	TTGTAGTCTATCTGTGTGAGG	
HA – 14-12F	GGTCCAAAAACATGAAACAT	245
HA – 14-12R	ATAAGATGCTGCTGGAAGAT	
HA – 14-13F	GGTCCTATTCCAAGACAACTC	250
HA – 14-13R	AGATGTTTTGGGCAAGTCT	
HA – 14-14F	CACATACAAGAAAGTTGAGAACA	250
HA – 14-14R	GCTTTCTGTTGCTACTCTCAG	
HA – 14-15F	TGGAATGAAGCAAACAGAC	250
HA – 14-15R	TTTGTCCCTCATTTATTGCT	
HA – 14-16F	ATACCATTTTGTCCCTGAAC	249

HA – 14-16R	TGTCAAAATCTTCCTTCTTCA	
HA – 14-17F	TTCAGTCAGATCAAGAGGAAA	246
HA – 14-17R	TCAAATGTCACAAGAGCAGA	
HA – 15F	TATTGCTTTTCCTCTGCTTT	214
HA – 15R	TTTCTTGTAATTCCACTGTCC	
HA – 16-1F	GGGATGTAAACCCTAAGGAC	228
HA – 16-1R	ATGATGTTGCACTTTCCAA	
HA – 16-2F	CTCTCGTCCCTATTCCTTCT	232
HA – 16-2R	TAAACCAAAAAGTGGTCAGC	
HA – 17-1F	ACTCATAGGATTGATGTCTTCC	238
HA – 17-1R	TAAAAGTGGGATCTTCCATC	
HA – 17-2F	CTAACACACTGAACCCTGCT	241
HA – 17-2R	TCATTTGTCAAAGTGCAATC	
HA – 18F	TTTTAACAGGCTTCTCTGTG	246
HA – 18R	AGGTAGAAGAAAGAGCACAAAC	
HA – 19F	AAATAATTTCTGTTCCTGTTG	222
HA – 19R	ATTCCAGAAAGGAAGAAAGC	
HA-20F	CCATTTTCATTGACTTACATTTGAG	193
HA-20R	AGATATAATCAGCCCAGGTTC	
HA-21F	GAATTTAATCTCTGATTTCTCTAC	168
HA-21R	GAGTGAATGTGAATACATTTCC	
HA-22F	AAATAGGTTAAAATAAAGTGTTAT	206
HA-22R	GACTAATTACATACCATTAAG	
HA-23F	CTCTGTATTCACTTTCCATG	250
HA-23R	ACAGTTAGTCACCCTACCCA	
HA-24F	GCTCAGTATAACTGAGGCTG	249

HA-24R	CTCTGAGTCAGTTAAACAGT	
HA – 25-1F	GGTGACCAAGAGGCTAC	170
HA – 25-1R	GACTGCTGGAGATGAGGA	
HA – 25-2F	CAG GGA GTA AAA TCT CTG C	155
HA – 25-2R	TGGTATTTTTTTTCTTTCTT	
HA – 26-1F	AGAAGTGAGAAAAGCGTCTG	244
HA – 26-1R	ACCCTCAGTAGAGGTCCTG	
HA – 26-2F	GAATTCACCCCCAGAGTT	234
HA – 26-2R	AGAAATGCAGGACTGATGAT	

Anexo . Análisis estadístico relación entre INV22 e inhibidores, INV22 y artropatía. Prueba Chi 2 (p>0.05)

Results			
	Inhibitor	No Inhibitor	*Marginal Row Totals*
Inv22	7	9	16
No Inv22	4	15	19
Marginal Column Totals	11	24	35 (Grand Total)

The Fisher exact test statistic value is 0.27297. The result is *not* significant at p < .05.

Results			
	Arthropathy	No Arthropathy	*Marginal Row Totals*
Inv22	9	7	16
No Inv22	6	13	19
Marginal Column Totals	15	20	35 (Grand Total)

The Fisher exact test statistic value is 0.182122. The result is *not* significant at p < .05.