



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA - IZTAPALAPA

DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**“DETECCION DE PORTADORAS Y
FRECUENCIA DE HAPLOTIPOS
EN HEMOFILIA A”**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

Q U E P R E S E N T A:

GUILLERMO ESCAMILLA GUERRERO

MEXICO, D. F.

1997

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA - IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

CASA ABIERTA AL TIEMPO

**“DETECCION DE PORTADORAS Y
FRECUENCIA DE HAPLOTIPOS
EN HEMOFILIA A”**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE :

MAESTRO EN BIOLOGIA

EXPERIMENTAL

QUE PRESENTA:

GUILLERMO ESCAMILLA GUERRERO

MEXICO, D.F.

1997

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**“DETECCION DE PORTADORAS Y
FRECUENCIA DE HAPLOTIPOS
EN HEMOFILIA A “**

TUTOR DE TESIS: DRA. LORENA OROZCO OROZCO

ASESORES DE TESIS: DRA. SARA FRIAS VAZQUEZ

DR. MIGUEL BETANCOURT RULE

ALUMNO Q.F.B. GUILLERMO ESCAMILLA GUERRERO

SITIO DONDE SE REALIZO LA TESIS:

Laboratorio de Biología Molecular y Laboratorio de Hematología del Instituto Nacional de Pediatría. (SSA)

La Maestría en Biología Experimental cuenta con el apoyo de CONACyT según el convenio PFPN/66/92 por considerarse con el nivel de excelencia académica.

Agradezco a CONACyT el apoyo económico que me brindó durante mis estudios, a través de la beca con número de registro 58013

DEDICATORIA

AL DIVINO LABERINTO DE LOS EFECTOS Y DE LAS CAUSAS
POR LA DIVERSIDAD DE LAS CRIATURAS QUE FORMAN
ESTE SINGULAR UNIVERSO,
A LA RAZÓN QUE NO CESARÁ DE SOÑAR
A EL AMOR, QUE NOS DEJA VER A LOS OTROS
COMO LOS VE LA DIVINIDAD,
A ESE MISTERIO DE LA ROSA QUE PRODIGA COLOR Y QUE NO LO VE,
A ESE ARTE QUE ES LA AMISTAD,
A TODOS ESOS RÍOS SECRETOS QUE CONVERGEN EN MI,
A NUESTRO LENGUAJE,
QUE PUEDE SIMULAR LA SABIDURÍA,
A ESE OLVIDO,
QUE ANULA O MODIFICA EL PASADO,
LA COSTUMBRE QUE NOS REPITE Y NOS CONFIRMA COMO UN ESPEJO,
A ESAS MAÑANAS QUE NOS DEPARAN LA ILUSIÓN DEL PRINCIPIO,
A LOS MINUTOS QUE PRECEDEN AL SUEÑO,
A EL SUEÑO Y A LA MUERTE,
ESOS DOS TESOROS OCULTOS,
A LOS ÍNTIMOS DONES QUE NO ENUMERO,
A LA MÚSICA,
MISTERIOSA FORMA DEL TIEMPO
Y EN FIN A TODOS AQUELLOS QUE CON SU PRECIOSA
AYUDA HICIERON
POSIBLE LA REALIZACIÓN DE ESTA TESIS
CUYOS NOMBRES NO ENUMERO
A FIN DE EVITAR UN OLVIDO U OMISIÓN

(Parte del texto es tomado del poema de Borges
"Otro poema de los dones" a quién agradezco su
inspiración)

INDICE

RESUMEN	III
INDICE DE FIGURAS	VIII
INDICE DE TABLAS	IX
INTRODUCCIÓN	1
HISTORIA DE LA HEMOFILIA	4
CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS	6
DIAGNÓSTICO	9
PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACION DEL FVIII	9
CLONACIÓN DEL GEN DEL FVIII	10
ESTRUCTURA DEL FACTOR VIII	11
HOMOLOGÍA CON OTRAS PROTEINAS	13
SITIOS DE PRODUCCIÓN Y TIEMPO DE CLARIFICACIÓN	14
INTERACCIONES DEL FVIII	16
A). CON CATIONES DIVALENTES	16
B). CON EL FACTOR VON WILLEBRAND	16
C). CON FOSFOLIPIDOS	17
PROCESOS DE ACTIVACION E INACTIVACION DEL FVIII	17
DEFECTOS GENETICOS EN HEMOFILIA	19
DELECCIONES	20
INSERCIONES	21
	V

DUPLICACIONES	21
MUTACIONES PUNTUALES	22
MUTACIONES QUE AFECTAN EL PROCESAMIENTO DEL RNAm	23
DELECCIONES PEQUEÑAS	24
PEQUEÑAS INSERCIONES	24
MUTACIONES "DE NOVO"	24
ANÁLISIS DE LIGAMENTO	25
JUSTIFICACION	40
OBJETIVOS	41
HIPOTESIS	42
MATERIAL Y METODOS	43
ESTRATEGIA GENERAL	43
I.- POBLACION SELECCIONADA	45
II.- HISTORIA CLINICA	46
III.- REACTIVOS EMPLEADOS	46
IV.- MUESTRAS BIOLÓGICAS	47
V.- PREPARACION DE SOLUCIONES	47
VI.- METODOS	49
VI.1.- EXTRACCION DE DNA	49
VI.2.- CUANTIFICACION DEL DNA	50
VI.3.- INTEGRIDAD DEL DNA	51
VI.4.- ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS	51
VI.4.1.-PREPARACION DE OLIGONUCLEOTIDOS	51
VI	

VI.4.2.- AMPLIFICACION DEL DNA POR PCR	53
VI.4.3.- ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA	53
VI.4.4.- RESTRICCION CON ENDONUCLEASAS	56
VI.4.5.- ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA	56
VII.- ANÁLISIS DE RESULTADOS	56
RESULTADOS	57
I.- CUADRO CLINICO	57
II.- CREACION DEL BANCO DE DNA	57
III. OPTIMIZACION DE LAS CONDICIONES DE PCR	60
IV. OPTIMIZACION DE LAS CONDICIONES DE RESTRICCION CON ENDONUCLEASAS	60
V.- DETECCION DE PORTADORAS	65
V.1.- ANÁLISIS DE LOS POLIMORFISMOS 18:BCL-I Y 19:HIND-III (RFLPS) MEDIANTE EL USO DE LA PCR	65
V.2.- FRECUENCIA DE POLIMORFISMOS 18:BCL-I Y 19:HIND-III EN PACIENTES.	65
V.3.- FRECUENCIA DE POLIMORFISMO EN LAS MADRES DE LOS CASOS INDICE	68
VI.- ANALISIS DE SEGREGACION DE ALELOS	68
VII.- RELACION CON OTROS GRUPOS ETNICOS	78
DISCUSION	85
CONCLUSIONES	90
HOJA DE CAPTACION DE DATOS	91
BIBLIOGRAFIA	97

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	CASCADA DE COAGULACION	5
FIGURA 2	MAPA GENOMICO DEL FVIII	12
FIGURA 3	ESTRUCTURA DEL FVIII	15
FIGURA 4	INTEGRIDAD DEL DNA	59
FIGURA 5	CURVA DE CONCENTRACION Mg	61
FIGURA 6	ESTANDARIZACION DE OLIGONUCLEOTIDOS Bcl-I	62
FIGURA 7	ESTANDARIZACION DE OLIGONUCLEOTIDOS Hind-III	63
FIGURA 8	PATRON DE DIGESTION CON Bcl-I	64
FIGURA 9	PATRON DE DIGESTION CON Hind-III	66
FIGURA 10	ANÁLISIS DE ALELO Bcl-I EN FAMILIA CON AHF	73
FIGURA 11	FAMILIA CON 2 HIJOS AFECTADOS	74
FIGURA 12	FAMILIA CON AHF ANALIZADA CON EL POLIMORFISMO Bcl-I	75
FIGURA 13	FAMILIA CON AHF ANALIZADA CON RFLP Hind-III	76
FIGURA 14	FAMILIA ANALIZADA CON RFLP Bcl-I	77
FIGURA 15	FAMILIA SIN AHF ANALIZADA CON Bcl-I	79
FIGURA 16	FAMILIA SIN AHF ANALIZADA CON RFLP Hind-III	80

LISTA DE TABLAS

TABLA 1	RELACION DE ACTIVIDAD COAGULANTE RESIDUAL DEL FVIII CON LA SEVERIDAD DEL SANGRADO	8
TABLA 2	DELECCIONES	28
TABLA 3	INSERCIONES	32
TABLA 4	MUTACIONES PUNTUALES	32
TABLA 5	PEQUEÑAS DELECCIONES	36
TABLA 6	PEQUEÑAS INSERCIONES	37
TABLA 7	POLIMORFISMO DEL FVIII. DETECCION POR SOUTHERN BLOT	38
TABLA 8	POLIMORFISMOS DEL DNA DEL FVIII. DETECCION POR PCR	39
TABLA 9	SECUENCIA DE OLIGONUCLEOTIDOS	54
TABLA 10	CONCENTRACION OPTIMAS DE SOLUCIONES	54
TABLA 11	CONDICIONES OPTIMAS PARA PCR	55
TABLA 12	DISTRIBUCION DE PACIENTS HEMOFILICOS ACORDE A CRI- TERIOS DE ACTIVIDAD RESIDUAL	58
TABLA 13	TAMAÑO DE ALELOS PRODUCIDOS POR ENZIMAS DE RES- TRICCION	67
TABLA 14	FRECUENCIA DE ALELOS EN CASOS INDICE	67
TABLA 15	FRECUENCIA DE HAPLOTIPOS EN PACIENTES	70
TABLA 16	FRECUENCIA DE ALELOS EN MADRES DE PACIENTES	70
TABLA 17	HAPLOTIPOS EN MADRES DE HEMOFILICOS	71
TABLA 18	RELACION DEL CARÁCTER DE PORTADORAS	71
TABLA 19	FRECUENCIA DE 18:Bcl-I EN GRUPOS ETNICOS	81
TABLA 20	FRECUENCIA DE 19:Hind-III EN GRUPOS ETNICOS	82
		IX

TABLA 21	FRECUENCIA DE L ÍNDICE DE HETEROCIGOCIDAD EN GRU- POS ETNICOS	83
TABLA 22	ASOCIACION ALELICA ENTRE POLIMORFISMO	84

RESUMEN:

La Hemofilia es una enfermedad que se hereda en forma recesiva ligada al cromosoma X. Un defecto en los genes responsables de la Hemofilia A y B reduce la síntesis de los Factores VIII y IX respectivamente. La incidencia de la Hemofilia A es de 1-2 por cada 10,000 varones nacidos vivos mientras que la incidencia de la Hemofilia B es la quinta parte de la población calculada para la Hemofilia A.

Clínicamente estas enfermedades no pueden ser diferenciadas. El diagnóstico de pacientes hemofílicos se basa en criterios clínicos y de dosificación de la actividad coagulante de los FVIII y FIX, este último permite clasificar a la enfermedad como severa, moderada o leve, sin embargo estos criterios no son útiles para el diagnóstico de portadoras. Actualmente gracias a los avances en el conocimiento de los aspectos moleculares de estas enfermedades se ha intentado establecer estrategias para la detección de portadoras. En el INP, se reciben cerca de 20 casos de hemofílicos A y B al año por lo que es necesario establecer estrategias de detección de portadoras para otorgar un asesoramiento genético adecuado. El análisis de la segregación de los marcadores polimórficos para enzimas de restricción (fragmentos de restricción de longitud polimórfica o RFLPs), permite identificar al cromosoma afectado y establecer estrategias confiables para la detección de portadoras. El presente trabajo tiene por objeto: (1) Determinar el carácter de portadora o sana entre las hermanas de hemofílicos; (2) Determinar la frecuencia de heterocigotas para seleccionar la estrategia para la detección de portadoras con los polimorfismos IVS 18:Bcl-I y IVS 19:Hind-III en la población en estudio; (3) Determinar la frecuencia de polimorfismos IVS 18:Bcl-I y IVS 19:Hind-III en la población bajo estudio; (4) Determinar si existe asociación entre el tipo de polimorfismo y el cuadro clínico de los pacientes, y (5) Conocer la frecuencia de los haplotipos IVS 18Bcl-I/IVS 19:Hind-III y establecer si existe diferencia con otros grupos étnicos. Para lograr estos objetivos se captó una muestra de 197 individuos: 58 casos índice, 8 hermanos afectados y el resto familiares en primer grado. Se analizaron dos RFLPs localizados en el intron 18 y 19 del gen FVIII por reacción en cadena de la po-

limerasa (PCR) y restricción con las enzimas Bcl-I y Hind-III. Encontramos que nuestra población es altamente polimórfica para los RFLPs Bcl-I y Hind-III; no se encontró asociación estadísticamente significativa entre el cuadro clínico y los polimorfismos; la proporción de mujeres heterocigotas o informativas en ambos marcadores fue de 43.6% por lo que puede emplearse indistintamente cualquiera de ellos; se presenta una asociación alélica entre ambos marcadores; el haplotipo más frecuente fue B2/H1; en algunos casos fue posible detectar mutaciones *de novo* por el análisis de RFLPs; se establece la identidad de la población mestiza y sus diferencias con otros grupos étnicos. Así mismo dada la frecuencia de heterocigocidad en ambos marcadores éstos pueden ser de gran utilidad en el diagnóstico prenatal y la detección de portadoras en la población mexicana.

La población mexicana de hemofílicos que ha sido estudiada con algunos RFLPs hasta el momento abarca muy pocas familias. Antes de poder implementar el consejo genético es necesario establecer las frecuencias alélicas de los RFLPs. Nuestro trabajo alcanza este objetivo al abarcar la población de hemofílicos más amplia en México, actualmente establece las frecuencias de polimorfismos y haplotipos más fidedignas para los intrones 18 y 19.

INTRODUCCION

La respuesta fisiológica al daño vascular induce la activación de la hemostasia incluyendo la interacción de los vasos sanguíneos, de las plaquetas y de los factores de la coagulación. Cuando el endotelio vascular sufre algún daño se forma un complejo de plaquetas-endotelio que liberan una serie de mediadores tales como di-fosfato de adenosina (ADP), serotonina, epinefrina, derivados de las prostaglandinas y prostaciclina. Algunos de estos mediadores promueven la vasoconstricción, otros atraen plaquetas para formar un agregado mayor conocido como tapón hemostático primario y otros circunscriben el proceso de coagulación estrictamente al área donde se produjo la lesión del endotelio vascular. El tapón hemostático primario es sólo temporal y requiere la formación de un coágulo que asegure la reparación del daño vascular (1,2). A principios de este siglo los investigadores observaron que si la sangre entraba en contacto con los tejidos se coagulaba, nombrando a la entidad responsable de este proceso tromboplastina hística. En base a esto, Fuld y Spiro en 1904 y Morawitz en 1905 (3) propusieron la teoría clásica de la coagulación la cuál aseguran que se llevaba a cabo en dos etapas: 1) la acción de la tromboplastina hística (Factor Tisular:FT) sobre la protrombina para producir trombina y 2) la acción de la trombina sobre el fibrinógeno para generar fibrina. Los resultados de diversos experimentos sugirieron la presencia de una vía alterna donde no se requiere la participación del factor tisular. Estos hallazgos indujeron a la identificación de enfermedades hereditarias con deficiencias en los factores de coagulación (hemofilia) en las que el plasma no coagula normalmente tras exponerlo al factor hístico. Durante los siguientes 50 años, la tesis de que el factor hístico iniciaba la coagulación siguió siendo considerada (4), sin embargo la diferenciación de la hemofilia en dos patologías y el hecho de que la teoría actual no pudiese explicar la hemorragia en los hemofílicos condujo a la modificación de la teoría de los mecanismos hemostáticos. En 1964 McFarlane propone la hipótesis de la "cascada de la coagulación" al mismo tiempo en que Davie y Ratnoff pro-

pusieron la teoría del “salto de agua”. En ambas teorías se contempla la separación de los factores de coagulación en dos rutas: la vía Extrínseca y la vía Intrínseca y su convergencia en la activación del factor X o vía común a partir de la que se genera la trombina. En las dos hipótesis se postula además un sistema de amplificación en base a un mecanismo de activación secuencial de zimógenos en proteasas activas. En la vía Intrínseca la primera activación se lleva al cabo cuando los factores de contacto como son el factor XII, los cininógenos de alto peso molecular y las precalicreínas interaccionan con una superficie extraña dando lugar a la activación del factor XI que a su vez activa al factor IX. Este último activa al factor X en presencia del factor VIII, iones de calcio y fosfolípidos plaquetarios. En la vía Extrínseca el proceso de coagulación se desencadena por la exposición del factor hístico al factor VII plasmático, este complejo dimérico incide sobre el factor X provocando la presencia de su forma activa en circulación (5,6). Durante una década se consideró que la vía intrínseca era crucial para la hemostasia dada la presencia de los factores VIII y IX que en función de su actividad se explicaba la hemofilia, en tanto que a la vía extrínseca se le atribuyó un papel secundario. Esta concepción fue modificada posteriormente cuando Osterud y Rapaport (7) que demostraron que el complejo el factor VIIa/factor hístico tiene la capacidad de activar al factor IX de la vía intrínseca y al factor X de la vía común, con ello se estableció un puente entre las dos vías de coagulación. Estos mecanismos favorecen la adhesión y la agregación localizada de las plaquetas que junto con la fibrina y la trombina se unen al tapón hemostático primario y el sistema contráctil de actomiosina produciendo retracción del coágulo y confiriéndole mayor estabilidad. Así el sistema de coagulación está regulado por varios mecanismos que permiten circunscribir el proceso de coagulación al sitio dañado y controlar la autoamplificación. Estos mecanismos son la dilución de factores procoagulantes en el flujo sanguíneo, la remoción de partículas y factores activados a través del sistema reticuloendotelial y el antagonismo de los procoagulantes activados por inhibidores circulantes (8). Bajo condiciones normales, éste último es favorecido por el balance entre pro- y anti-

coagulantes, efectos mediados por células endoteliales que además de sintetizar y secretar prostaciclina, vasodilatadores, activadores tisulares tipo plasminógeno (9), expresan una glicoproteína transmembranal denominada Trombomodulina que tiene la capacidad de activar a la proteína C en presencia del cofactor S y de destruir factores V y VIII (10,11). Otro elemento de modulación es la presencia de antitrombina III un inhibidor de las serin- proteasas que pertenece a la gran familia de Serpinas, su forma de activación es a través de los proteoglicanos de heparán sulfato situados sobre la superficie luminal de las células endoteliales, funciona como inhibidor suicida presentando su centro reactivo como un pseudosustrato para la enzima blanco que en su caso es la Trombina y las formas activas de los factores XII y IX así como el X. Los factores activados son protegidos de la degradación si están unidos a las plaquetas (12,13). Otro mecanismo de regulación, es la activación del inhibidor plasmático del Factor Tisular (TFPI) la cual es dependiente de vía concentración de factores IX y X. El TFPI inhibe las del complejo VIIa/FT lo que explica la necesidad de la existencia de ambas vías, ya que el complejo VII/FT genera pequeñas cantidades de FXa necesarias para iniciar las múltiples activaciones interactuantes en la cascada de coagulación (8).

En la teoría actual de la coagulación se establece un sistema en equilibrio entre inhibidores y activadores, así como la interacción de 2 vías que convergen en un punto central que es la conversión de Protrombina a Trombina, molécula que interviene en la modulación de los mecanismos de agregación plaquetaria, en la inducción para la formación de la malla de fibrina y en la activación de los procesos fibrinolíticos. Para la persistencia de la hemostasia es necesaria la producción continuada de FXa por la acción del FIXa y FVIIIa los cuales son generados por la vía Intrínseca. El FVIIIa, iones de calcio y fosfolípidos actúan como cofactores que incrementan en unas 200,000 veces la velocidad catalítica del FIXa optimizando así el mecanismo de ésta ruta de coagulación (Figura 1).

Los trastornos hemorrágicos y de la coagulación son consecuencia de una deficiencia en estos mecanismos. La forma más común de estos desórdenes es la Hemofilia que ha sido descrita en la mayoría de las razas humanas y en varias especies animales incluyendo al perro, el gato y en el caballo (14).

HISTORIA DE LA HEMOFILIA

La reducción de la síntesis de los FVIII y FIX es responsable de la Hemofilia A y B respectivamente. Los primeros reportes de este padecimiento datan de 1,700 años atrás documentados en el Talmud (15) en el cual el Rabino Simón ben Gamaliel otorgaba dispensa de circuncisión a niños en cuyas familias se hubiese presentado muerte de tíos maternos por esta operación, la misma regla rabínica fue aplicada en el siglo XII por Maimonides. A finales del siglo XVIII aparecen varias reseñas que describen lo más cercano a la hemofilia, en todas se menciona a hombres que sufren sangrados post-traumáticos anormalmente prolongados. En 1820 Nasse describe el patrón característico de herencia y es hasta 1886 cuando se reporta el primer caso de hemofilia verdadera en una mujer (16). La primera descripción de la función del Factor antihemofílico en los mecanismos de coagulación fue hecha por Patek y Taylor en 1937 al reexaminar una fracción del precipitado obtenido por acidificación del plasma, confirmando que una pequeña porción corregía en forma sorprendente el tiempo de coagulación de sangre de un hemofílico (17), el mismo Taylor denominó a esta porción "globulina anti-hemofílica" (G. A. H.) y en 1964 Wright le asigna el nombre de Factor VIII en base al lugar que ocupa en el descubrimiento de los diferentes factores de coagulación. Las observaciones realizadas por Pavlovsky en 1947 al mezclar sangre de diferentes hemofílicos *in vitro* mostraron la corrección del tiempo de coagulación, lo que condujo al descubrimiento de una condición clínica y genéticamente similar a la hemofilia.

Vía intrínseca

Precalicerina (PK) + cininógeno de alto peso molecular (HK)

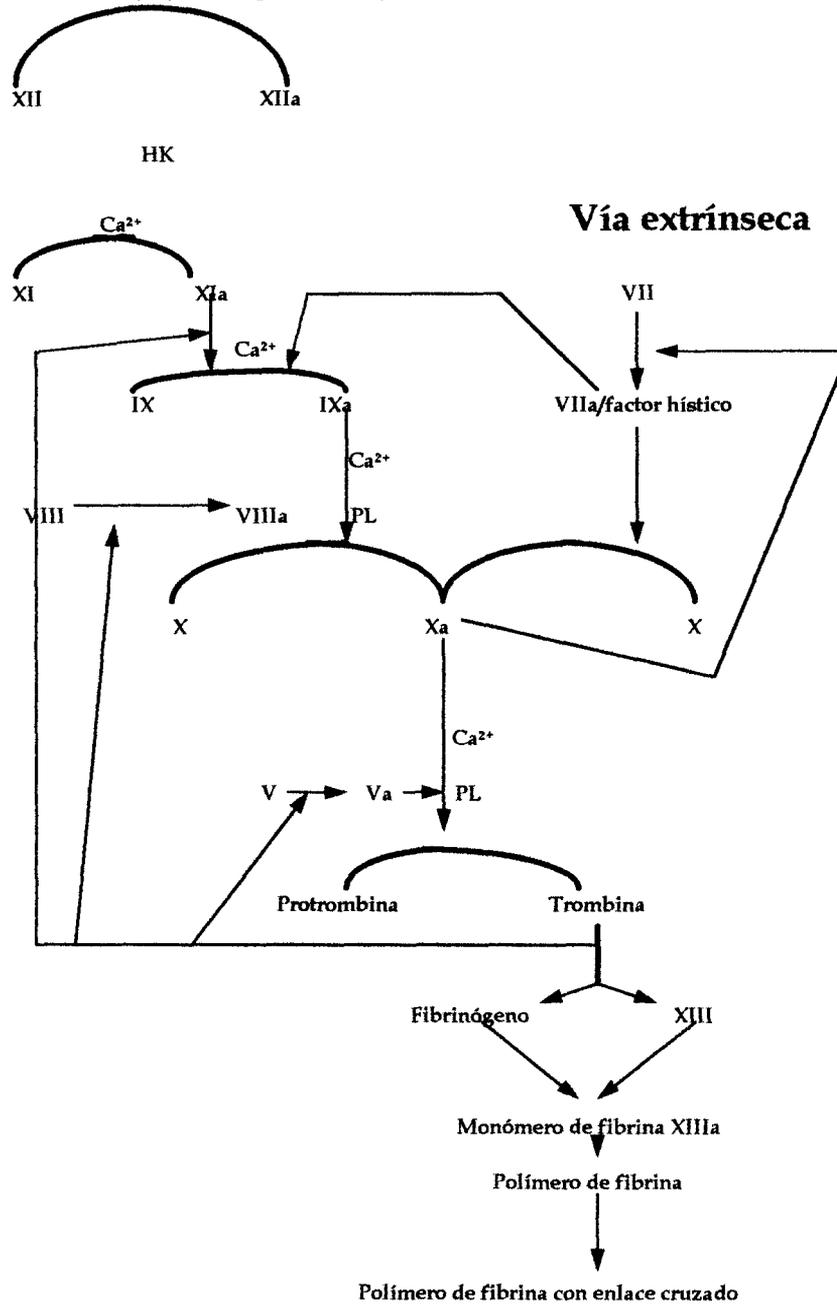


Figura 1: Hipótesis de la cascada de la Coagulación sanguínea propuesta en la década de los sesenta con las modificaciones que se han producido. Cascada clásica (→); Retroalimentación positiva (→); Activación extrínseca-intrínseca (→)

Esta entidad se documentó en 1952 por un paciente de Oxford con diagnóstico de “hipocoprotromboplastinogenemia hereditaria”, causada por la deficiencia del nuevo factor al cual se le denominó de Christmas Eve, componente tromboplástico del plasma (CTP) (18,19), factor anti-hemofílico B o factor IX, dejando la denominación de factor anti-hemofílico A o factor VIII para la más común (hemofilia A o Clásica) (20). Con el desarrollo de anticuerpos policlonales contra FVIII /FvW, en la década de los 70s se comienzan a establecer las diferencias entre las enfermedades de von Willebrand y hemofilia como son el patrón de herencia y la deficiencia de los factores que las producen (21,22). En este mismo período se describe una variante poco usual de hemofilia B, la tipo Leyden que se caracteriza por la deficiencia del FIX en la infancia pero que al entrar a la pubertad el FIX alcanza progresivamente los niveles normales con una tasa de 4-5% por año (23-28). La década de los 80s trajo consigo múltiples cambios en las conceptualizaciones de estas enfermedades, el gen del FIX fue clonado por el grupo de Choo y el Kurachi-Davie en 1982 (29,30) y dos años después el grupo de Gitschier & Wood logran lo mismo con el FVIII (31). Esto ha permitido el desarrollo de métodos para la detección de portadoras, diagnóstico prenatal y la posibilidad de poder explicar las manifestaciones de la enfermedad en relación al tipo de alteración del gen (31-51).

CARACTERISTICAS CLINICAS

La mayoría de los pacientes son varones, la severidad y frecuencia del sangrado guarda una relación inversa con los niveles de actividad coagulante residual (tabla 1). Las primeras manifestaciones de la hemofilia aparecen en etapas tempranas de la infancia, los primeros 6-9 meses el paciente puede parecer normal por la sobreprotección de que es objeto. Con la aparición de los primeros dientes se pueden detectar sangrados intermitentes que pueden persistir durante varios días y se agravan conforme las actividades del infante aumentan. El sangrado en articulaciones es el rasgo más característico de las hemofilias severas (niveles de activi-

dad < 2% del normal) y puede iniciar alrededor de los 2 o 3 años; se reconocen tres etapas en este proceso patológico: 1) hemartrosis o sangrado inicial en las articulaciones 2) panartritis o etapa de inflamación que afecta cartílagos y hueso y, 3) regresión o etapa final con cambios permanentes en las articulaciones como son erosiones y destrucción de cartílagos y huesos que pueden provocar limitaciones funcionales en el paciente. Las rodillas, codos, muñeca, hombros y cadera son los más comúnmente afectados.

Los sangrados por boca y nariz secundarios a traumas locales son característicos en hemofílicos, las infecciones en vías respiratorias parecen predisponer a epistaxis, otros sitios de sangrado común son la lengua y el frenillo. El sangrado ocasionado por cortes superficiales y punciones con aguja se detiene en el tiempo normal, pero laceraciones más profundas y extensas tardan algunas horas o días si no se complican con infecciones. Otros sitios donde frecuentemente se presenta sangrado es en músculo, que puede ser espontáneo o secundario a un traumatismo y en espacios retroperitoneales que pueden alcanzar un volumen tal que cause hipovolemia e hipotensión. Si el volumen de sangre en un hematoma muscular es grande, el proceso de resorción puede ser lento e incompleto persistiendo éste como una lesión quística encapsulada conocida como pseudo-tumor hemofílico.

Hasta antes del descubrimiento del Síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), las causas más importantes de muerte en los hemofílicos era la hemorragia intracraneal provocada por traumatismos leves o en forma espontánea, así como sangrados genito-urinarios donde se presenta secundario a infecciones, cálculos o neoplasmas y del aparato digestivo donde se puede manifestar como úlcera péptica (14).

TABLA 1
**RELACION DE ACTIVIDAD COAGULANTE RESIDUAL DEL FACTOR CON
 LA SEVERIDAD DEL SANGRADO EN HEMOFILIA**

NIVEL DE PLASMA (UI/dl) ^a	MANIFESTACIONES DE SANGRADO
> 40	Ninguna
20 - 40	Tendencia a sangrar después de cirugías mayores no diagnosticadas.
5 - 20	Sangrados menores después de cirugías menores
1 - 5	Sangrados severos después de cirugías menores. Ocasional hemartrosis y sangrado espontáneo.
<1	Hemartrosis y hemorragia espontánea intracraneal y muscular. Anquilosamiento e invalidez

^a: valores obtenidos mediante un ensayo de actividad coagulante con un sustrato deficiente de FVIII y un estándar internacional

DIAGNOSTICO

El diagnóstico de la hemofilia se basa en el examen e historial clínico y en la dosificación del FVIII y FIX. Los casos severos de esta patología no causan problemas en el diagnóstico, generalmente la historia refiere datos de un paciente masculino con sangrados prolongados por daño en dientes y lengua en la infancia, así como sangrados en articulaciones y músculos o posteriores a cirugías. Los casos moderados y leves presentan dificultades en el diagnóstico, especialmente aquellos que no tienen antecedentes heredofamiliares (30-40%) y que no han sido expuestos a intervenciones quirúrgicas o a daño accidental. El diagnóstico diferencial se realiza por exámenes de laboratorio con una batería de pruebas de rastreo que cubran la hemostasia primaria (cuenta de plaquetas, tiempo de sangrado, tiempo de coagulación y torniquete) y la fase plasmática (factores de la vía extrínseca e intrínseca). El diagnóstico definitivo requiere la dosificación del factor VIII o IX que consiste en interaccionar el plasma del paciente con un plasma sustrato deficiente en factor VIII o IX, de tal manera que, el plasma del paciente tiende a corregir el tiempo de coagulación del plasma sustrato, y esta es proporcional al nivel de actividad residual del factor VIII o IX.

PURIFICACION Y CARACTERIZACION DEL FVIII

El FVIII plásmático se aisló de fuentes humanas, bovinas y porcinas. En la sangre el FVIII está unido en forma no covalente con el Factor von Willebrand (FvW) (21, 52). Este complejo se obtiene por diferentes métodos como son: crioprecipitación, precipitación con Concanavalina A, sulfato de amonio, glicina, etanol, propilen-glicol y cromatografía de intercambio iónico o filtración en gel (53-55). La combinación de estos métodos permite purificar un producto en orden de 7,000-10,000 veces relativo al plasma. La disociación del complejo se logra mediante el empleo de soluciones de alta fuerza iónica, β -mercapto etanol o con fosfolípi-

dos, la actividad que se obtenía en estos productos era de 2,300-6,000 U/mg (21,56-60). Mediante la tinción de ácido periódico de Schiff y el empleo de lectinas se comprobó que ambas cadenas contienen carbohidratos, se estableció que los sitios probables de N-glicosilación son en Asn¹⁵⁷ y Asn¹⁶⁷ (61-65).

CLONACION DEL GEN DEL FVIII

A partir del conocimiento de la secuencia de aminoácidos del FVIII se obtuvo una sonda 36 denominada sonda 8.3 pb 5'-CTTTTCCAGGTCAACGTTTCGGAGAAATAAGCCCAAGC que hibridaba con una secuencia conservada en el gen FVIII. A la par se construyó un banco genómico enriquecido de cromosomas X a partir de DNA aislado de un individuo con cariotipo 49 XXXXY. Esta genoteca se construyó por digestión parcial del DNA con Sau3AI y clonación de los fragmentos obtenidos en el fago λ Charon 30. Posteriormente, experimentos de Southern Blot donde se utilizó la sonda 8.3 para hibridar DNA del paciente 4X y un control normal, mostraron una banda única con una intensidad 4 veces mayor en el hombre 4X; una parte de esta región correspondió a el exón 16 del gen del FVIII. Con estos hallazgos se procedió a la clonación del gen rastreando los mRNA-FVIII en diversos tejidos y se aisló un mRNA de 9 kb que codifica para una proteína de $M_R \approx 300,000$ (31,66-68). La clonación del gen condujo a la secuenciación del gen y obtención de un DNA recombinante capaz de expresar la proteína del FVIII.

Con estudios a la par se establece que el gen del factor VIII se localiza en el brazo largo del cromosoma X, el locus del FVIII fue mapeado por enlace con el locus de gen de la Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) en Xq28 (figura 2). La localización específica del gen con respecto a otros locis mediante el uso de análisis de YACs en gel de gradiente de pulso de las regiones proximales y dístas-

les del locus de la G6PD así como la hibridación in situ en células en interfase (69-71), establecen el locus en la región proximal.

ESTRUCTURA DEL FACTOR VIII

Mediante clonación de su cDNA se dedujo la secuencia de los 2,351 aminoácidos que conforman la proteína del FVIII. Los primeros 19 aminoácidos comprenden un núcleo de 10 residuos hidrofóbicos flanqueados por dos residuos cargados que en su conjunto forman el péptido líder, característico de las proteínas secretoras (72), la proteína madura se genera posterior al corte del péptido líder y consta de 2,332 aminoácidos con una masa aproximada de 264,763 D (figura 3).

Entre las modificaciones postraduccionales más importantes que sufre el precursor del FVIII es la N-glucosilación en secuencias consenso Asn-X-Ser o Asn-X-Thr en 19 de 25 diferentes sitios potenciales (73,74), por consiguiente la masa molecular de la proteína circulante en plasma es incrementada a 330,000 D. Los mecanismos postraduccionales de sulfatación, característicos de secuencias con propiedades ácidas de proteínas de secreción no han sido comprobados en la proteína del FVIII, se postula la probabilidad en los residuos de Tyr en las posiciones 346, 395, 407, 718, 719, 722, 1,664 y 1,680.

Un año después de la clonación del gen, mediante experimentos con mutagénesis dirigida y expresión del FVIII, así como de pulso y caza con ³⁵S se comprobó que los residuos en las posiciones 1,664 y 1,680 son blanco de este mecanismo de sulfatación lo que les confiere gran importancia en la interacción con el Factor von Willebrand (75).

Con estos datos y con el apoyo de un análisis computarizado, Vehar en 1984 establece la existencia de dos diferentes dominios: 1) el dominio A que consiste en un segmento triplicado de aproximadamente 330 - 380 aminoácidos, ubicado en la región amino-terminal en los residuos del 1 al 329 y del 380 al 711, y en la región carboxi-terminal de la proteína madura en los residuos del

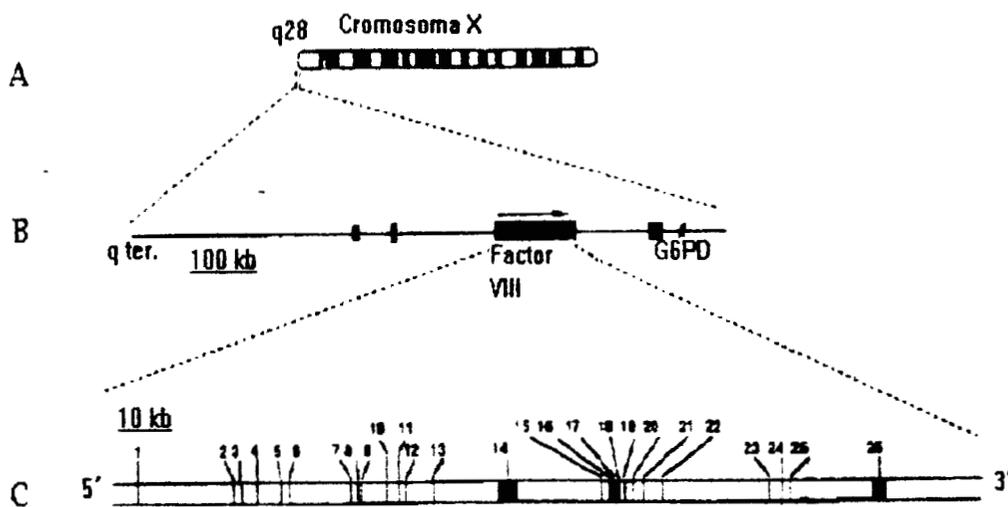


Figura 2: Mapa genómico del gen del FVIII. A) El gen del FVIII se localiza en la banda 28 cerca del extremo Xq. B) El rectángulo G6DP representa al gen de la Glucosa 6-Fosfato Deshidrogenasa que se localiza a la derecha del FVIII. C) El gen consta de 186 Kb y se distribuye en 26 exones representados por las cajas negras, las blancas representan a los intrones.

al 2,019. Se considera que estos segmentos contiene 30% de homología entre ellos dominios y se denominan A_1 , A_2 y A_3 . 2) Al dominio C. contiene también dos segmentos con el 40% de homología denominados como C_1 y C_2 que constan de 150-160 aminoácidos cada uno de ellos, se localizan en la región carboxi-terminal abarcando del residuo 2,019 al 2,174 para C_1 y del 2,176 al 2,332 para C_2 . Tanto los dominios de A_n como de C_n muestran una conservación considerable de los residuos de Cys, lo que implica que la similitud estructural ha sido mantenida dentro de los dominios repetidos, 3) un tercer dominio único es el B que se ubica entre los residuos 712 y 1,648, consta de 925 aminoácidos y en esta región se concentra la mayor parte de las glucosilaciones. Se ha postulado que durante la biosíntesis la cadena sencilla del FVIII es cortada en la posición Arg-1,648 en la secuencia His-Gln-Arg-Glu para generar la región amino-terminal de la cadena ligera, así como se han establecido los sitios de reconocimiento para la acción de la trombina que genera los fragmentos A_1A_2 , A_2B y BA_3 . Por lo que la forma activa con importancia en los mecanismos de coagulación es el trímero $A_3-C_1-C_2$ donde A_2 es vital para su función (76-79).

HOMOLOGIA CON OTRAS PROTEINAS

El FVIII comparte homología a nivel estructural y funcional con el Factor V ya que ambos son cofactores para serin-proteasas que se ensamblan en la superficie de fosfolípidos para activar a zimógenos vitamina K dependientes, (80-83). Ambos tienen un dominio A por triplicado y un dominio B altamente glicosilado que separa los dominios A_2 y A_3 . Existen también sitios de unión para fosfolípidos se ubican en los dominios C duplicados. A diferencia del FVIII, el FV no posee segmentos ácidos entre los dominios A_1 y A_2 o en la región N-terminal de el dominio A_3 (84). La Proteína C Activada (PCA) que es el inhibidor natural de ambos cofactores tienen sitio de reconocimiento común en estas proteínas para el

FVIII se ubica en la cadena ligera en los residuos 2,009-2,018 y en el FV en la cadena ligera en los residuos 1,865-1,874 (85).

También presentan homología estructural con la ceruloplasmina (proteína plasmática unidora de iones cobre), ambas presentan un dominio A por triplicado con homología interna de aproximadamente un 30% (81,86-88), y con las Lectinas de la discoidina del *Dictyostelium* spp que con la que comparte 20% en el dominio C (89-91).

SITIOS DE PRODUCCION Y TIEMPO DE CLARIFICACION

Durante muchos años el definir el tipo celular donde se sintetizaba el FVIII era un misterio biológico, fueron los estudios de transplante de órganos en perros hemofílicos los que dilucidaron la ubicación de síntesis tentativa en el hígado (92-94). También se demostró mediante el uso de cultivo de tejidos que el FVIII se sintetizaba en células endoteliales (95). En 1984 se realizó con éxito el primer transplante de hígado en un hemofílico con éxito, posteriormente presentó niveles de actividad del FVIII en rangos normales (96). La comprobación molecular con hibridación "in situ" demostraron que el hígado, bazo, nodos linfáticos, páncreas, músculo, corazón fetal, placenta y riñón contenían mRNA del FVIII, así como la ausencia de este mensajero en linfocitos, timo, médula ósea, pulmón y cerebro fetal, y en algunas líneas celulares en cultivo como son las HepG2 de hepatocitos y las células endoteliales de vena de cordón umbilical (97,98). Estudios concomitantes con el uso de microscopía electrónica, métodos inmunoquímicos y el seguimiento de los RNAm mostraron que son los hepatocitos los responsables de la síntesis (99-101).

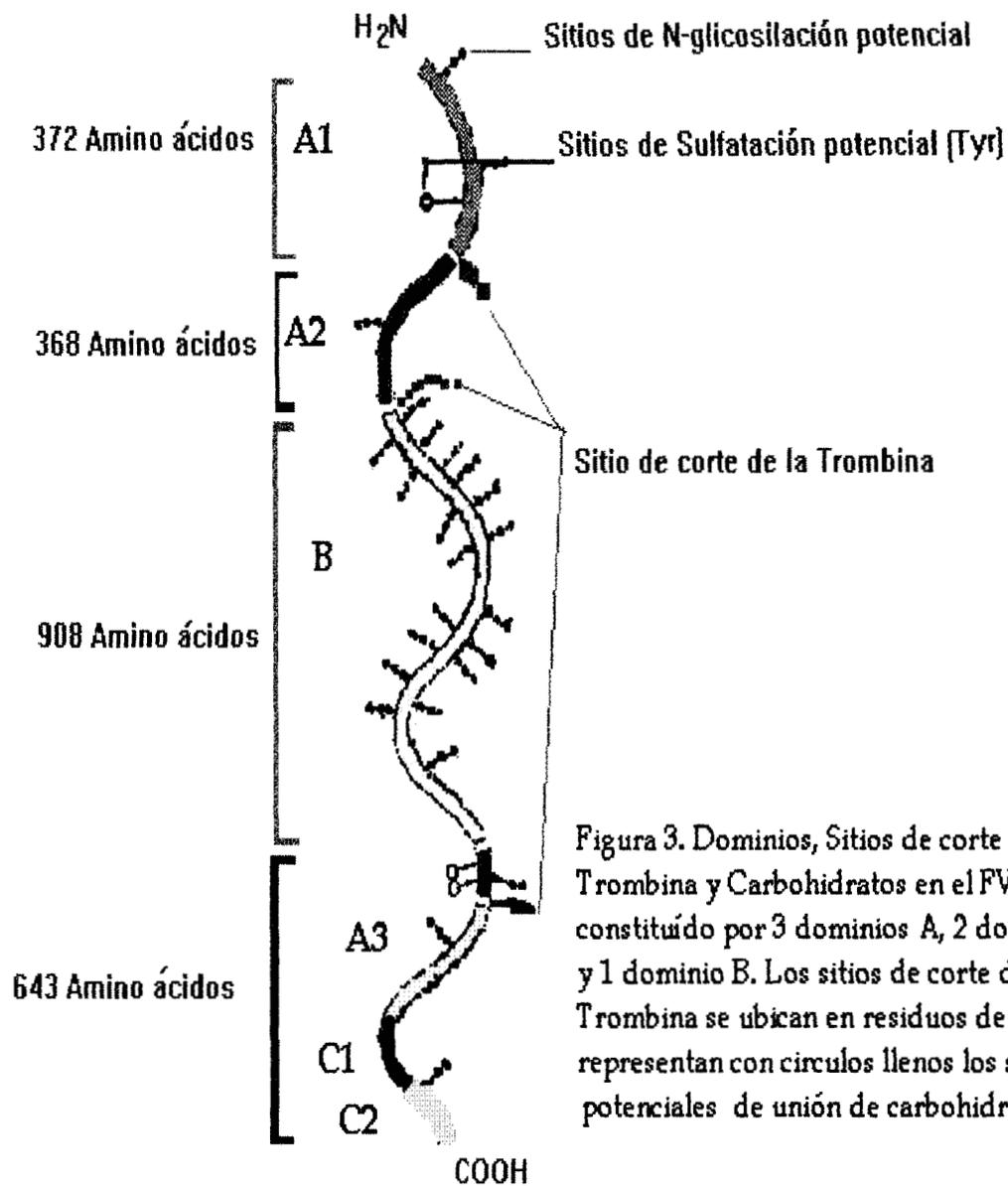


Figura 3. Dominios, Sitios de corte de la Trombina y Carbohidratos en el FVIII. Es constituido por 3 dominios A, 2 dominios C y 1 dominio B. Los sitios de corte de la Trombina se ubican en residuos de Cys. Se representan con círculos llenos los sitios potenciales de unión de carbohidratos.

Se ha observado que cuando se aplica en hemofílicos éste tiene un tiempo de clarificación de aproximadamente 12 horas, en tanto que al administrarse en individuos normales la vida media fue de 2.4 hrs (102,103).

INTERACCIONES DEL FVIII

A).- CON CATIONES DIVALENTES:

En la década de los 80s se dio a conocer que los quelantes fuertes como el EDTA inactivan rápida e irreversiblemente al FVIII de origen porcino, humano y recombinante (104-107) así como la recuperación de actividad posterior a la reposición de cationes siendo más efectivo con el Mn^{2+} seguido por el Ca^{2+} y Co^{2+} . Se han postulado varias teorías acerca de la naturaleza y sitio de interacción del catión con el FVIII, mencionando que el catión puede inducir un cambio conformacional inducido por el catión el cual favorece la unión de la cadena pesada y ligera o un puente directo no covalente por el ión divalente entre las subunidades A1-A2 y el complejo A3-C1C2 a través de sitios de unión localizadas en A1 y A3 (108).

B).- CON EL FACTOR von WILLEBRAND (FvW):

Se ha demostrado que el FVIII/FvW circula en plasma como un complejo no covalente que puede disociarse con agentes reductores o con amortiguadores de alta fuerza iónica (53,109). Así mismo se caracterizó al FvW como una glicoproteína multimérica que evita la proteólisis del FVIII (110). El sitio de unión del FVIII se ubica en la región amino terminal de la cadena ligera de 80 kD (A3-C1C2) en los residuos 1,670-1,684 (111). Mediante mutagénesis dirigida se generaron 3 moléculas de FVIII recombinante con una delección del dominio B ubicado en las posiciones 741-1,648; 741-1,668 y 741-1,689. En la primera y segunda proteína

recombinante la interacción con el FvW no se vio afectada, en tanto que en el tercer recombinante la interacción se perdió completamente, con lo que se corroboran los datos obtenidos mediante anticuerpos monoclonales. Así las Tyr¹⁶⁶⁴ y principalmente Tyr¹⁶⁸⁰ parecen estar directamente involucradas en la interacción con FvW (112).

C).- CON FOSFOLIPIDOS:

El complejo tenaza está constituido por el FVIIIa, FIXa, FX, Ca²⁺ y fosfolípidos, donde las tres proteínas están enlazadas al fosfolípido por receptores que se expresan en plaquetas activadas. Experimentos de inhibición por competencia entre anticuerpos policlonales o aloanticuerpos dirigidos contra la cadena ligera del FVIII (dominios A3-C1-C2) y fosfolípidos plaquetarios, demostró que el sitio de reconocimiento para fosfolípidos se ubica en esta región (113,114). Evidencias obtenidas posteriormente, confirmaron esta concepción al utilizar péptidos sintéticos que contienen los residuos entre 2,302 y 2,332 del FVIII en aproximadamente un 90% la interacción de fosfolípidos plaquetarios con el FVIII (115). En pacientes hemofílicos se detectó la presencia de mutaciones puntuales en el dominio C que se reflejan en las interacciones entre FVIII/Fosfolípidos (116).

PROCESOS DE ACTIVACION E INACTIVACION DEL FVIII

La interacción del FVIII con diferentes serin-proteasas como la Trombina, el FXa, el FIXa y a la proteína C activada (APC) que modulan su actividad mediante proteólisis limitada han sido ampliamente estudiadas. Los primeros estudios de activación demuestran que la activación del FVIII por la Trombina en fase sólida va disminuyendo conforme se retira la enzima activadora, ésto se relacionada con un proceso de proteólisis. Estudios colaterales de Western blott y la secuenciación de aminoácidos corroboraron la formación de una especie estable

FVIIIa a pH 6.6 que decae rápidamente en presencia de EDTA que es concomitantemente con la desaparición de los polipéptidos de alto peso molecular como son el A1-A2-B de 210 kDs y de el fragmento A1-A2 de 90 kDs. Se establece que el primer sitio de corte por la Trombina es en el lado carboxi terminal del FVIII en el residuo Arg⁷⁴⁰ y Arg¹⁶⁸⁹ que genera el polipéptido A3-C1C2 y elimina el sitio de unión de la proteína de FvW, un segundo corte en la posición 372 de la cadena de 90 kDs genera dos fragmentos conocido como A1 y A2 (53,65,67,79,109,117).

El FXa actúa sobre el FVIII en presencia de la Proteína C Activada (PCA) incrementando su actividad en 30 veces. Se sugiere un mecanismo de retroalimentación en el cual pequeñas cantidades de FXa generado por la acción del FIXa sobre el FX, provoca la activación y subsecuente inactivación del FVIII en función del proceso de digestión, resultados similares se obtienen por acción de la Trombina. Las posiciones afectadas son en los residuos 372, 740 y 1,689 generando los péptidos A1, A2 y A3-C1C2. Un segundo ataque enzimático se ha detectado en las posiciones 1,721 y 336 el primero genera un fragmento de 67 kDs del segmento A3-C1C2 y el segundo se detectó en el dominio A1, estos cortes ocurren después de la máxima activación del cofactor, lo que se asocia con la pérdida de actividad procoagulante (118-120).

Los procesos de inactivación del FVIII se dan por combinación de dos cortes el primero en la posición 372 y el segundo se produce en el dominio A1 en la posición 336, este último al igual que la generación de diferentes productos de degradación del dominio A2 en la posición Arg⁵⁶²-Gly⁵⁶³ son mediados por la PCA, cabe destacar que entre otra de sus funciones está la de inactivar a la forma FVIIIa que es generada por la trombina (53,119,121,122).

Mediante el empleo de FVIII mutante, obtenido de pacientes hemofílicos y el uso de mutagénesis dirigida se ha podido establecer con claridad diversos eventos en los procesos de activación e inactivación de esta proteína como son: a) aquellos mutantes que presentan sustitución de Arg⁷⁴⁰ y Arg¹⁶⁴⁸ son resistentes al

corte en estos sitios pero activados posterior al corte de la trombina en las posiciones 372 y 1,689; b) la eliminación del dominio B del fragmento B-A1A2 no es importante para la activación, como sucede con la variante FVIII des 789-1,562 que retiene sólo 142 de los 909 residuos de aminoácidos de el dominio B; c) la sustitución de Arg³⁷² o Arg¹⁶⁸⁹ por Ile no sufren activación por acción de la trombina; d).detección de moléculas disfuncionales obtenidas de pacientes hemofílicos moderados presentan resistencia al corte con Trombina por la sustitución de Arg³⁷² por Cys o Arg¹⁶⁸⁹ por Cys (120,123-125) .

DEFECTOS GENETICOS EN HEMOFILIA

Fenotípicamente, los pacientes con hemofilia son deficientes de factor VIII, esta deficiencia presenta un alto grado de variabilidad con niveles que oscilan de <1% hasta el 60%. La heterogeneidad en el fenotipo puede ser medida no sólo en términos de severidad clínica sino también por la presencia o ausencia de inhibidores del FVIII administrado terapéuticamente. Esto se demostró en algunos pacientes estudiados en los que se observó actividad antigénica pero no coagulante del FVIII, a ellos se les denomina pacientes con material de reacción cruzada positiva (CRM+). Esto establece un intento de clasificación acorde a el fenotipo expresado en los pacientes. Los primeros casos se describen en el estudio de reacciones de inhibición por anticuerpos contra FVIII en estudios cualitativos e inmunoradiométricos (IRMA) en los que se cuantificó la concentración de FVIII:Ag en los plasmas de 43 pacientes hemofílicos demostrándose que en 18 de éstos se presentaba el CRM+ con niveles que variaban desde 2.3 hasta 23% de VIII:Ag ante cuatro diferentes anticuerpos (126-128). En base a estos datos se establecieron tres grupos de pacientes: el primero corresponde a aquellos casos que expresan cantidades mínimas de una molécula cualitativamente anormal y que se identifica mediante el uso de anticuerpos; el segundo son los que expresan también un molécula anormal que no es reconocida por los anticuerpos y el último es aquel en la cual el defecto

impide la expresión o secreción del FVIII. En 1985 se describió la ubicación del epítotope sobre el que se dirigen los aloanticuerpos usados en la clasificación de CRM, correspondiendo a la cadena ligera de 69,000 KDs que se deriva del dominio C (129). El primer gran compendio que abarcó más de 500 pacientes con diagnóstico de hemofilia estaban analizados mediante técnicas de DNA recombinante a fin de establecer las causas de la deficiencia del FVIII fue realizado en julio de 1988, se reportó que en 26 pacientes el defecto involucró una mutación puntual que genera un codón de terminación que provoca la síntesis de un molécula mas corta y afuncional. En otros 20 pacientes no relacionados entre sí se demostró la deleción de parte del gen del FVIII, casi en todos ellos se manifestó esta deficiencia como una hemofilia severa. En el resto de los pacientes las mutaciones no se caracterizaron con las sondas genéticas disponibles en ese momento y la mayoría quedó ubicada en mutaciones puntuales y deleciones pequeñas (129-140).

En la última década, con el desarrollo de diferentes metodologías en el área de la Biología Molecular se ha dado un gran salto en la detección y el establecimiento de las mutaciones responsables de la enfermedad. Las alteraciones en este gen se engloban en dos grandes grupos: grandes mutaciones que abarcan deleciones, inserciones y duplicaciones y pequeñas mutaciones en las que encontramos mutaciones puntuales que conducen a alteraciones en el marco de lectura, sustitución de un aminoácido por otro, mutación sin sentido, alteración en el procesamiento del RNAm, pequeñas deleciones e inserciones y las mutaciones en las regiones reguladoras (141).

Deleciones:

A la fecha se han descrito aproximadamente 60 deleciones totales o parciales (tabla 2), con una variación amplia en tamaño, todas ellas a excepción de tres se traducen en un fenotipo severo y que posterior a la terapia substitutiva con proteína recombinante o natural condicionan la aparición de inhibidores por la ausencia de regiones inmunodominantes con un riesgo 5 veces mayor que otros fenotipos

severos en los que no se involucren este tipo de deleciones. Dos de las tres excepciones involucran al exón 22 y presentan un fenotipo moderado, el tercer caso con un fenotipo similar tiene una deleción que involucra al exón 23 y 24. La frecuencia de estas mutaciones es baja ya que en estudios que abarcan 1,386 pacientes hemofílicos sólo se han detectado 34 (2.5%) (140-142). Hasta el momento no se han reportado la presencia de “puntos calientes” en el gen FVIII.

Inserciones:

Se han reportado dos casos que involucran la inserción de secuencias de DNA extrañas al FVIII, en ambos casos son elementos de alta repetición conocidos como LINE (L1) (tabla 3). Estas están presentes en 10,000 copias de oligonucleotidos que abarcan aproximadamente el 5%, de los cuales 3,000 se consideran como elementos transponibles, sólo unos cuantos de ellos son elementos retrotransponibles, esto es, se produce una nueva inserción mediada por el RNA y es mediante una transcripción reversa en DNA que se reinsertan en otro sitio genómico (elementos móviles). En ambos casos se traduce como hemofilia severa, el lugar de inserción se localiza en diferentes regiones del exón 14, se postula que ocurre como una mutación “*de novo*” abarcando dos tercios de la región 3’ de elementos L1 en los que se presume la posibilidad de que sean resultado de una retrotransposición de un elemento activo localizado en el cromosoma 22 (51,143). Se considera que la frecuencia de esta mutación es muy baja ya que no se encontraron inserciones de este tipo en un estudio posterior que incluyó a 800 pacientes (144).

Duplicaciones:

Se han descrito dos tipos de duplicaciones, la primera es la más importante, origina el 40% aproximadamente de los pacientes con un fenotipo severo, el tamaño es variable y se localiza en el intron 22. Este sitio es considerado como un “punto caliente” (145-147). La segunda duplicación se ubicó en el exón 13 y genera un fenotipo moderado.

Mutaciones Puntuales:

Cerca del 95% de las mutaciones reportadas en la región codificable del FVIII son mutaciones puntuales, a la fecha se han reportado 80 diferentes y consisten en sustitución, deleción e inserciones de un pequeño número de nucleótidos. De las diferentes mutaciones caracterizadas hasta ahora 27 son mutaciones que generan codones de terminación y conducen a un cuadro clínico severo y 47 se caracterizan por la sustitución de un aminoácido por otro, 29 de ellas se expresan como un fenotipo moderado y 18 como leve. Se ha observado que una misma mutación en el FVIII puede conducir a diferentes grados de severidad del cuadro clínico. Por ejemplo, un paciente que presenta una transición de pirimidinas (C→T) en el codón 1,689 manifestó un fenotipo severo, en tanto que otros dos pacientes con el mismo defecto presentaron un cuadro clínico moderado; otro ejemplo es la transición de purinas (G→A) en el codón 2,209 que causó un fenotipo severo en un paciente mientras que en otro el cuadro clínico fue moderado, en estudios la misma mutación fue reportada y presenta un fenotipo severo y en otro un fenotipo moderado como es el caso de la transversión (G→T) en el codón 2,307. Otros ejemplos son las mutaciones individuales localizadas en los codones 162 y 372 con un cambio de Arg→His; en el 2,159 y 2,307 con cambio de Arg→Gln que conducen a fenotipos moderado o leves y la sustitución en el codón 326 de una Val→Leu que se asocia a fenotipos severos o moderados. Dos explicaciones se dan a estos hechos: la primera se enfoca en la posibilidad de la existencia de un segundo sitio de mutación/polimorfismo no detectado, la segunda está en función de la habilidad del técnico para determinar la actividad residual del FVIII (144,149).

La mayoría de mutaciones puntuales reportadas se localizan en los exones 8, 11, 14, 18, 23, 24 y 26 (tabla 4), ésto es debido a que entre el exón 14 y 26 se comprende aproximadamente el 55% de la longitud total del RNAm del FVIII, en otros exones a pesar de su tamaño comparativamente menor como son el 7, 11, 12 y 16 presentan un número elevado de mutaciones (150,151). El 38% de las mu-

taciones puntuales se presenta en las islas CpG con transiciones de C→T o G →A, este islote se caracteriza por su grado de hipermutabilidad como consecuencia de la metilación mediada por la desaminación de la 5-metil citocina. Mutaciones recurrentes se ubican en 16 sitios diferentes: codones 282; 336; 372; 372; 527; 1,689; 1,941; 2,116; 2,147; 2,150; 2,159; 2,209; 2,209; 2,228; 2,307 y 2,307, así como 4 sitios con mutaciones múltiples: codones 531, 593, 704 y 1,997 (144).

Aproximadamente el 5% de los pacientes hemofílicos presentan un exceso de FVIII:Ag en relación al FVIII:C, estos casos son denominados como CRM+, se han asociado a mutaciones que interfieren con la estabilidad de la proteína coagulante como puede ser en los residuos de Arg³⁷², Arg¹⁶⁸⁹, Arg²²⁰⁹, Tyr¹⁶⁸⁰, involucrados ya sea en sitios de corte para la Trombina, sitios que son sulfatados y son críticos en la unión con el FvW, aquellos que interfieren con el plegamiento de la proteína porque la sustitución se da en núcleos hidrofóbicos o interferencia en alguno de los pasos de la ruta de modificación post-traducciona (114,152-158).

Mutaciones que afectan el procesamiento del RNAm:

En varios estudios realizados de transcripción "ectópica" en linfocitos humanos, se ha puesto de manifiesto algunos mecanismos de procesamiento aberrante en el RNAm del gen del FVIII como consecuencia de mutaciones que afectan diferentes puntos en las secuencias consenso, como son: mutación en el dinucleótido GT de la región donadora o en el dinucleótido AG en la región aceptora (en el intron 5: AG→GG y en el intron 6: AG→AC) en ambos casos se genera un fenotipo severo. Una segunda variante es la mutación dentro de las secuencias consenso de la unión intron-exón en la región del donador (Gly²⁰⁵; Leu¹⁸⁴³ & Gln⁵⁶⁵) y en la región del aceptor que se expresan como fenotipos moderado/leves. La tercer variante reportada es la creación de una región donadora o aceptora "de novo" o críptica como el caso detectado en el exón 4 y en el exón 11, ambos con fenotipos leves.

De las mutaciones en la región en el extremo 5' sólo se ha reportado un caso que afecta una extensión de 1 kb, se considera que es baja la incidencia ya

en los estudios de Higuchi en 1992 y de Gitscher en el mismo año no lograron detectar un solo caso de cambio de alguna de las bases que constituyen esta región que comprende 528 pb en una población que abarcó 127 y 100 hemofílicos respectivamente.

Deleciones pequeñas:

Se han reportado un total de 8 deleciones (tabla 5) con rangos de 1-23 pb, 6 de ellas manifiestan un fenotipo severo que es causado por la terminación prematura en la traducción, dos de ellas se presentan en la secuencia TGAAGA que abarca los residuos 340-341 que son similares a las secuencias consenso (TGA/GA/GG/TA/C) que se han marcado como un "punto caliente" para deleciones (150,159,160).

Pequeñas Inserciones:

Son cuatro las inserciones reportadas (tabla 6), todas ellas generan una terminación prematura en la traducción del gen del FVIII (161).

Mutaciones "de novo":

En el pasado, al contar sólo con los ensayos de coagulación y la determinación de la fracción antigénica ha sido difícil establecer con certeza el origen preciso de una mutación en hemofilia así como la detección de portadoras (162-164).

La determinación de número de casos de hemofilia A que son generados por una mutación "de novo" es importante para establecer el riesgo de la descendencia masculina. En familias con un hemofílico esporádico donde la mutación "de novo" puede probarse, se establece que el riesgo de subsecuente nacimiento es aproximadamente igual al de la población general. Haldane en 1935 asume que, para que una enfermedad se mantenga en la población, la pérdida de alelos enfermos debido a selección natural no debe exceder a los ganados por nuevas mutaciones. En especial en las enfermedades letales ligadas al cromosoma X, la tasa de mutaciones en hombres y mujeres debe ser igual, esto es, la proporción a

la que deba ocurrir una mutación “de novo” debe ser de un tercio (30%), como ejemplo es el de la hemofilia A. En estudios realizados a fin de determinar la proporción de casos que son esporádicos, se abarcaron 949 y 246 familias estableciéndose una frecuencia de 0.164 y 0.120 respectivamente para casos clasificados como esporádicos o “de novo” (165); sin embargo, es de resaltar que en estos estudios uno de los grandes problemas fue el de establecer la diferencia entre una mutación “de novo” y una mutación transmitida en forma matrilineal a generaciones previas, intentando resolver este problema se aplicaron cálculos matemáticos en los que se involucraba un análisis de discriminación lineal y de probabilidades “a priori” de los antecedentes heredofamiliares de 21 madres reportadas como mutaciones “de novo” se sugirió que sólo el 76% eran portadoras y que el 24% restante correspondían a mutaciones “de novo” (166).

ANALISIS DE LIGAMENTO

Un gran impacto en el estudio de las enfermedades genéticas de carácter dominante como recesivo es sin duda la detección de portadoras y la implementación del diagnóstico prenatal con el apoyo de la Biología Molecular. En la práctica, son dos metodologías que se han empleado en el rastreo de un gen defectuoso en una familia a fin de poder establecer el carácter de portadora o sana y las condiciones para el uso del diagnóstico prenatal. El primero se conoce como método directo, consiste en la identificación de las mutaciones en los pacientes, seguido por un análisis de todos los miembros de la familia en riesgo. El segundo procedimiento es un método indirecto que utiliza el análisis de polimorfismos en el DNA que permiten seguir la segregación de los cromosomas en una familia. Estos polimorfismos pueden ser utilizados como marcadores génicos cuando están cercanos al gen o son intragénicos, esto se conoce también como Análisis de ligamento (167).

Los polimorfismos, por definición, son variaciones en las secuencias del DNA, las cuales no tienen un efecto visible en la expresión del gen o genes en

los que se ubican, están presentes con una frecuencia mayor del 1% en la población normal. Generalmente se localizan en secuencias extragénicas o en intrones y cuando llegan a incidir en exones, generalmente son transiciones o transversiones en la tercera posición de un codón, por lo que la mutación no necesariamente cambia al aminoácido en cuestión, o se manifiesta como una mutación silenciosa que no afectará la función de la proteína expresada. La mayoría de los polimorfismos afectan un sólo nucleótido, este cambio crea o elimina un sitio de reconocimiento para una enzima de restricción alterando los patrones de digestión del DNA, lo que puede ser fácilmente detectado por métodos electroforéticos y se conoce como Fragmentos de Restricción de Longitud Polimórfica (Restriction Fragment Length Polymorphism o RFLP). En aquellos que no se ve afectado el sitio de reconocimiento pueden ser detectados usando sondas oligonucleótido-específicas denominadas ASO (allele-specific oligonucleotides). Un segundo tipo de polimorfismo que depende de la extensión física del Número Variable de Repeticiones en Tandem (VNRT: variable number tandem repeats) que abarca una longitud cuya repetición puede ser desde una base hasta 50 o más. Las secuencias VNTR pueden ser fácilmente analizadas por amplificación con PCR dando un marcador polimórfico de gran utilidad (168-175).

En la hemofilia A los polimorfismos que se han detectado y que son de utilidad para diagnóstico son nueve (tabla 6 y 7): siete de ellos son RFLPs, uno es un dinucleótido de repetición (VNRT) y otra es una secuencia polimórfica que puede ser detectada por el uso de ASO (141,176-180).

La versatilidad que se le ha dado al uso de los polimorfismos abarca desde las sondas de enlace en las que su ubicación está muy cercana a la región del gen de interés que presenta el defecto, cabe destacar que cuando el marcador es intragénico existe una baja probabilidad de (181,182). Otras aplicaciones son la determinación de la frecuencia alélica, en los casos de herencia relacionada al cromosoma X establece que las mujeres son potencialmente informativas cuando son

heterocigotas (los alelos de cada par de genes son diferentes) y su frecuencia de heterocigocidad depende de la frecuencia alélica en la población en general, con ayuda de el análisis de RFLPs donde sólo dos alelos están presentes en función de la presencia (2 ó +) o ausencia (1 ó -) del sitio de corte para la enzima de restricción. La frecuencia máxima de heterocigocidad debe ser del 50% siempre y cuando ambos alelos ocurran con la misma frecuencia dentro de la población. Cuando el análisis inicial arroja resultados de no informativas, se busca un segundo RFLP en el cual esta familia sea informativa, se logra seleccionando polimorfismos que están físicamente cercanos o dentro de un mismo gen como resultado de un desequilibrio de enlace o de una asociación alélica no al azar. Con los resultados obtenidos de la detección de polimorfismos y la frecuencia alélica se puede establecer su frecuencia en los diferentes grupos étnicos.

TABLA 2
DELECCIONES

Exones deletados	Tamaño (Kb)	[FVIII:C] (%)	Fenotipo	Inhibidores	Reportada por
1 - 26	>210	?	Severo	No	Casarino, 1986
1 - 26	>210	?	Severo	Si	Casula, 1990
1 - 6	>55	<1	Severo	Si	Millar, 1990
1 - 5	>35	<1	Severo	No	Huguchi, 1990
1	>2	<1	Severo	No	Youssofian, 1988
1	>1	<1	Severo	No	Millar, 1990
1	?	?	Severo	?	Higuchi, 1991
Intron 1	7	?	Severo	No	Levinson, 1990
2 - 3	9 - 12	<1	Severo	No	Youssofian, 1988
3 - 13	60	<1	Severo	Si	Youssofian, 1988
3 - 5	11.7	<1	Severo	No	Millar, 1990
3	1.7 - 2.0	<1	Severo	No	Higuchi, 1988

4 - 25	133 - 145	<1	Severo	No	Youssoufian, 1988
5 - 13	57	<1	Severo	Si	Millar, 1990
5, 6	?	?	Severo	?	Gitschier, 1988
5, 6	2.5 - 10	?	Severo	Si	Levinson, 1990
5	2	?	Severo	No	Bröcker-Vriends, 1990
5 ó 6	2	?	Severo	?	Bröcker-Vriends, 1988
6	10	?	Severo	No	Levinson, 1990
6	7	<1	Severo	No	Youssoufian, 1987
6	3 - 6	?	Severo	No	Levinson, 1990
7 - 22	110	?	Severo	Si	Casula, 1990
7 - 14	40 - 56	<1	Severo	No	Youssoufian, 1988
7 - 9	15 - 20	<1	Severo	Si	Higuchi, 1988
11 - 22	60	?	Severo	Si	Antorakis, 1985
14 - 22	>36	?	Severo	Si	Nafa, 1990
14 - 22	?	?	Severo	Si	Lillicrap, 1992
14 - 21	50	<1	Severo	Si	Millar, 1990
14	12 - 16	?	Severo	Si	Higuchi, 1989
14	6	<1	Severo	Si	Mikami, 1988

14	2.3 - 3.0	<1	Severo	No	Higuchi, 1989
14	2.5	<1	Severo	No	Youssoufian, 1987
14	2.5	?	Severo	?	Woods-Samuels, 1991
15 - 21	?	?	Severo	?	Higuchi, 1991
15- 18	13	?	Severo	Si	Camerino, 1986
15	?	?	Severo	?	Antorakis, 1992
17 - 19	?	?	Severo	No	Wehnert, 1989
18, 19	?	?	Severo	?	Grover, 1987
19 - 21	4.7	<1	Severo	Si	Millar, 1990
22	5.5	2.5	Moderado	No	Youssoufian, 1987
Intron 22	?	?	Severo	No	Wehnert, 1989
Intron 22	?	?	Moderado	No	Wehnert, 1989
23 - 26	?	?	Severo	Si	Din, 1989
23 - 26	?	?	Severo	Si	Lavergne, 1992
23 - 25	>16	<1	Severo	No	Youssoufian, 1987
23 - 25	39	<1	Severo	Si	Gitschier, 1985

23 - 24	?	?	Moderado	No	Lavergne, 1992
24 - 25	>3.4	<1	Severo	No	Youssofian, 1987
26	22	<1	Severo	No	Gitschier, 1985
26	>18	<1	Severo	No	Higuchi, 1989
26	14	<1	Severo	No	Youssofian, 1988
26	8.7	?	Severo	?	Bernardi, 1987
26	>2	?	Severo	No	Nafa, 1990
26	>2	?	Severo	No	Youssofian, 1987
26	>2	?	Severo	?	Bernardi, 1989
26	?	?	Severo	?	Antorakis, 1992
26	?	?	Severo	No	Lavergne, 1992
26	?	?	Severo	No	Lavergne, 1992
26	?	?	Severo	No	Lavergne, 1992

TABLA 3
INSERCIONES

Exón	Naturaleza de la Inserción	Fenotipo	Reportada por
14	Elementos LINE (3.8Kb)	Severo	Kazazian, 1988
14	Elementos LINE (2.1Kb)	Severo	Kazazian, 1988

TABLA 4
MUTACIONES PUNTUALES

Exón/ Intron	Codón	Cambio de nucleó- tido	Cambio de codón	[FVIII:C] (%)	Fenotipo	Presencia Inhibidor	Reportado por
E:1	-5	CGA → TGA	Arg → Term.	<1	Severo	No	Pattinson, 1990
E:1	11	GAA → GTA	Glu → Val	?	Leve	No	Gitschier, 1992
I:2	-	CGA → TGA	-	<1	Severo	No	Gitschier, 1985
E:2	89	AAG → ACG	Lys → Thr	?	Leve	?	Higuchi, 1991
E:3	91	ATG → GTG	Met → Val	?	Leve	?	Higuchi, 1991
E:4	162	GTG → ATG	Val → Met	8/5	Moderado	No	Gitschier, 1992
E:4	166	AAA → ACA	Lys → Thr	19	Leve	?	Higuchi, 1991
E:4	170	TCA → TTA	Ser → Leu	3.5	Moderado	No	Chan, 1989
I:4	-	CGA → CAA	-	5-10	Leve	No	Youssofian, 1988
E:5	205	G/gt..ag/GG → T/	Gly → Thr	3.2	Moderado	?	Higuchi, 1991
I:5	-	ag/ → gg/	-	<1	Severo	No	Naylor, 1991

I:6	-	ag/→ac/	-	?	Severo	?	Antorakis, 1992
E:7	255	TGG→TGA	Trp→Term	?	Severo	?	Antorakis, 1992
E:7	266	GTG→GGG	Val→Gly	?	Leve	?	Higuchi, 1991
E:7	272	GAA→GGA	Glu→Gly	2	Moderado	No	Youssoufian, 1988
E:7	282	CGC→CAC	Arg→His	?	Severo	?	Higuchi, 1991
E:7	293	TTC→TCC	Phe→Ser	?	Leve	?	Higuchi, 1991
E:7	295	ACT→GCT	Thr→Ala	14-16	Leve	?	Higuchi, 1991
E:8	326	GTA→CTA	Val→Leu	?	Severo	No	Kogan, 1990
E:8	326	GTA→CTA	Val→Leu	?	Moderado	?	Higuchi, 1990
E:8	336	CGA→TGA	Arg→Term	0	Severo	No	Gitscher, 1988
E:8	372	CGC→TGC	Arg→Cys	3	Moderado	No	Shima, 1989
E:8	372	CGC→CAC	Arg→His	5	Leve	No	Arai, 1989
E:9	412	TTG→TTT	Leu→Phe	10.5	Leve	?	Higuchi, 1991
E:9	425	AAA→AGA	Lys→Arg	?	Severo	?	Higuchi, 1991
E:9	427	CGA→TGA	Arg→Term	<1	Severo	No	Pattinson, 1990
E:10	473	TAT→CAT	Tyr→His	?	Leve	?	Higuchi, 1991
E:10	473	TAT→TGT	Tyr→Cys	2.7/3.5	Moderado	?	Higuchi, 1991
E:10	479	GGA→AGA	Gly→Arg	2	Moderado	No	Naylor, 1993
E:11	504	CTG→CTT	Leu→Leu	?	Leve	?	Antonarakis, 1992
E:11	527	CGG→TGG	Arg→Trp	14.5-18	Leve	?	Higuchi, 1991
E:11	527	CGG→TGG	Arg→Trp	?	?	?	Antonarakis, 1992
E:11	531	CGC→TGC	Arg→Cys	6.7/4.2	Leve	?	Higuchi, 1991
E:11	531	CGC→GGC	Arg→Gly	9.2	Leve	?	Higuchi, 1991
E:11	535	ACT→GGT	Ser→Gly	?	?	?	Antonarakis, 1992
E:11	542	GAT→GGT	Asp→Gly	?	Severo	?	Higuchi, 1991
E:11	565	CA/gt→AAG/gt	Gln→Lys	?	Moderado	?	Higuchi, 1991
E:12	566	ATA→ACA	Ile→Thr	<1	Severo	?	Hoyer, 1991
E:12	577	TCT→CCT	Ser→Pro	?	?	?	Antonarakis, 1992

Error

An error occurred while processing this page. See the system log for more details.

E:18	1941	CGA→TGA	Arg→Term	<1	Severo	No (2),	Youssoufian,1986
E:18	1941	CGA→CAA	Arg→Gln	5	Moderado	No	Levinson, 1990
E:19	1997	CGG→TGG	Arg→Trp	3.4/2.6	Moderado	?	Higuchi, 1991
E:22	2101	TTT→TTG	Phe→Leu	11	Leve	?	Higuchi, 1991
E:22	2116	CGA→TGA	Arg→Term	<1	Severo	No	Youssoufian,1986
E:22	2116	CGA→CCA	Arg→Pro	<1	Severo	?	Levinson, 1987
E:22	2119	TCC→TAC	Ser→Tyr	5-8	Leve	?	Higuchi, 1991
E:23	2147	CGA→TGA	Arg→Term	<1	Severo	No (2)si(3)	Levinson, 1987
E:23	2150	CGT→CAT	Arg→His	5-7	Leve	?	Higuchi, 1991
E:23	2159	CGC→TGC	Arg→Cys	7.4-12	Leve	No	Gitschier, 1992
E:23	2163	CGC→CAC	Arg→His	?	Moderado	?	Antonarakis, 1992
E:23	2166	GTT→GCT	Leu→Ser	<1	Severo	No	Levinson, 1990
E:24	2209	CGA→CTA	Arg→Leu	3	Moderado	No	Millar, 1991
E:24	2209	CGA→TGA	Arg→Term	0	Severo	Si (3)No (4)	Gitschier, 1985
E:24	2209	CGA→CAA	Arg→Gln	<1	Severo	No	Bernardi, 1988
E:24	2209	CGA→CAA	Arg→Gln	2-5	Moderado	No	Levinson, 1990
E:24	2209	CGA→CAA	Arg→Gln	7	Leve	Si	Schwaab, 1992
E:25	2229	TGG→TGT	Trp→Cys	3	Moderado	Si	Naylor, 1991
I:25	-	CAA→CGA	-	<1	Severo	No	Gitschier, 1985
E:26	2300	CCG→CTG	Pro→Leu	7.5	Leve	?	Higuchi, 1991
E:26	2304	CGC→TGC	Arg→Cys	?	Leve	?	Higuchi, 1991
E:26	2307	CGA→TGA	Arg→Term	0	Severo	No	Gitschier, 1985
E:26	2307	CGA→CTA	Arg→Leu	2	Moderado	No	Inaba, 1989
E:26	2307	CGA→CTA	ArgLeu	<1	Severo	No	Schwaab, 1992
E:26	2307	CGA→CAA	Arg→Gln	10	Leve	No	Gitschier, 1986
E:26	2307	CGA→CAA	Arg→Gln	2	Moderado	No	Casula, 1990

TABLA 5
PEQUEÑAS DELECCIONES

Exón/Intron	Codon	Tamaño de delección (pb)	Fenotipo	[FVIII:C] (%)	Inhibidores	Reportado por
Intron 3	104-111	23	Severo	?	?	Higuchi, 1991
Exón 8	340-341	4 (AATG)	Severo	?	No	Kogan, 1988
Exón 8	341	2 (GA)	Severo	?	?	Antonarakis, 1992
Exón 14	1212	1 (C)	Severo	?	No	Naylor, 1993
Exón 14	1439	1 (A)	Severo	?	?	Antonarakis, 1992
Exón 14	1535-6	2 (GA)	Severo	?	?	Higuchi, 1991
Exón 23	2136	2 (AA)	Severo	?	?	Antonarakis, 1992
Exón 26	2204-5	3 (CTC)	Moderado	?	?	Antonarakis, 1992

TABLA 6
PEQUEÑAS INSERCIONES

Exón	Naturaleza de Inserción	Fenotipo	Reportada por
11	1pb (G en codón 513)	Severo	Antonarakis, 1992
14	1pb (TCA→TCAA en codón 1395)	Severo	Higuchi, 1991
14	1pb (A en región de 8A en el codón 1439)	Severo	Higuchi, 1991
17	1pb (A en región de 4A en codón 1888)	Severo	Higuchi, 1991

TABLA 7
POLIMORFISMO DE DNA DEL FVIII: DETECCION BASADA
EN SOUTHERN BLOT

Locus	Tipo	Enzima de Res- tricción	Alelo (kb) - / +	Sonda en Sou- thern blot	Reportado por
Intron 18	RFLP	Bcl-I	1.1 / 0.8	p114.12	Gitschier, 1985
Intron 22	RFLP	Xba-I	6.2 / 4.8(1.4)	p482.6	Wion, 1988
Exón 26 (3')	RFLP	Bgl-I	20 / 5	Sonda C	Antonarakis, 1985
Intron 19	RFLP	Hind-III	2.7 / 2.6	F8e16/19	Ahrens, 1987
Región 3'	RFLP	Msp-I	7.5 / 4.3+3.2	p625.3	Youssoufian, 1987
Intron 22	RFLP	Msp-I	4.0 / 3.8	Sonda B	Inaba, 1990
Región 5'	RFLP	Taq-I	9.5 / 4.0	p701.1	Kenwick, 1991
Intron 13	VNRT	repeticiones de (CA) _n	-	-	Lalloz, 1991
Intron 7	Secuencia poli- mórfica	-	-	ASO	Kogan, 1988

TABLA 8

POLIMORFISMOS DE DNA DEL FVIII: ANALISIS BASADO EN PCR

SITIO	POLIMOR- FISMOS	PRIMER CEBADOR	FRAGMENTO / DIGESTION	REPORTADO POR
INT: 18	Bcl-I	5'-TAAAAGCTTTAAATGGTCTAGGC---3' 5'- TTCGAATTCTGAAATTATCTTGTTTC- 3'	142 / 99 + 43	Kogan, 1987
INT: 22	Xba-I	5'- CACGAGCTCTCCATCTGAACATG-----3' 5'-GGGCTGCAGGGGGGGGGGACAACAG-3'	96 / 68 + 28	Kogan, 1987
INT: 19	Hind-III	5'- GGCGAGCATCTACATGCTGGGATGAGC-3' 5'- GTCCAGAAGCCATTCCCAGGGGAGTCT-3'	717 / 469 + 167 + 81	Graham, 1990
INT : 13	VNRT	5'- TGCATCACTGTACATATGTATCTT -3' 5'- CCAAATTACATATGAATAAGCC--- 3'	8 alelos	Lalloz, 1991
DXS52	VNRT	5'- GGCATGTCATCACTTCTCTCATGTT - 3' 5'- CACCACTGCCCTCACGTCACCTT- ---- 3'	14 alelos	Richards, 1991
INT: 7	Secuencia polimórfica	----- -----	-	Kogan, 1988

JUSTIFICACION:

A pesar de que en nuestro país no se cuenta con datos exactos, se considera que la incidencia de la Hemofilia A es de 1-2 por cada 10,000 varones nacidos vivos y se considera que 1/3 de los casos son debidos a mutaciones "de novo", similar a la reportada a nivel mundial. El diagnóstico y seguimiento de estos pacientes se basa en criterios clínicos y de dosificación de la actividad coagulante del Factor VIII, sin un diagnóstico y tratamiento oportuno puede ser letal. Asimismo, la detección de portadoras y el diagnóstico prenatal que se ha intentado hasta la fecha en México se basó en la correlación de la fracción coagulante con la anti-génica de este factor con resultados ambiguos y poca o nula aplicación práctica (183). Considerando que en el Instituto Nacional de Pediatría se tienen captadas 80 familias de hemofílicos A, y que anualmente se reciben cerca de 20 casos nuevos, en el laboratorio de Biología Molecular y el de Hematología nos proponemos determinar el carácter de portadora o sana en las hermanas de los hemofílicos, para ello se establecerá inicialmente la frecuencia de heterocigotas y así seleccionar las estrategias más adecuadas en la detección de portadoras a fin de proporcionar un asesoramiento genético adecuado.

OBJETIVOS:

1. Determinar el carácter de portadora o sana entre las hermanas de hemofílicos.
2. Determinar la frecuencia de heterocigotas para seleccionar la estrategia para la detección de portadoras con los polimorfismo IVS 18:Bcl-I y IVS 19:Hind-III.
3. Determinar la frecuencia de los polimorfismo IVS 18:Bcl-I y IVS 19:Hind-III en la población bajo estudio.
4. Determinar si existe asociación entre el tipo de polimorfismo y el cuadro clínico de los pacientes.
5. Conocer la frecuencia de los haplotipos IVS 18Bcl-I/IVS 19:Hind-III y establecer si existe diferencia con otros grupos étnicos.

HIPOTESIS:

- Si el origen étnico de las poblaciones influye en la distribución de los alelos, entonces en la población mexicana ésta será diferente a la reportada.

- El grado de severidad de la Hemofilia es dependiente del tipo de polimorfismo presente.

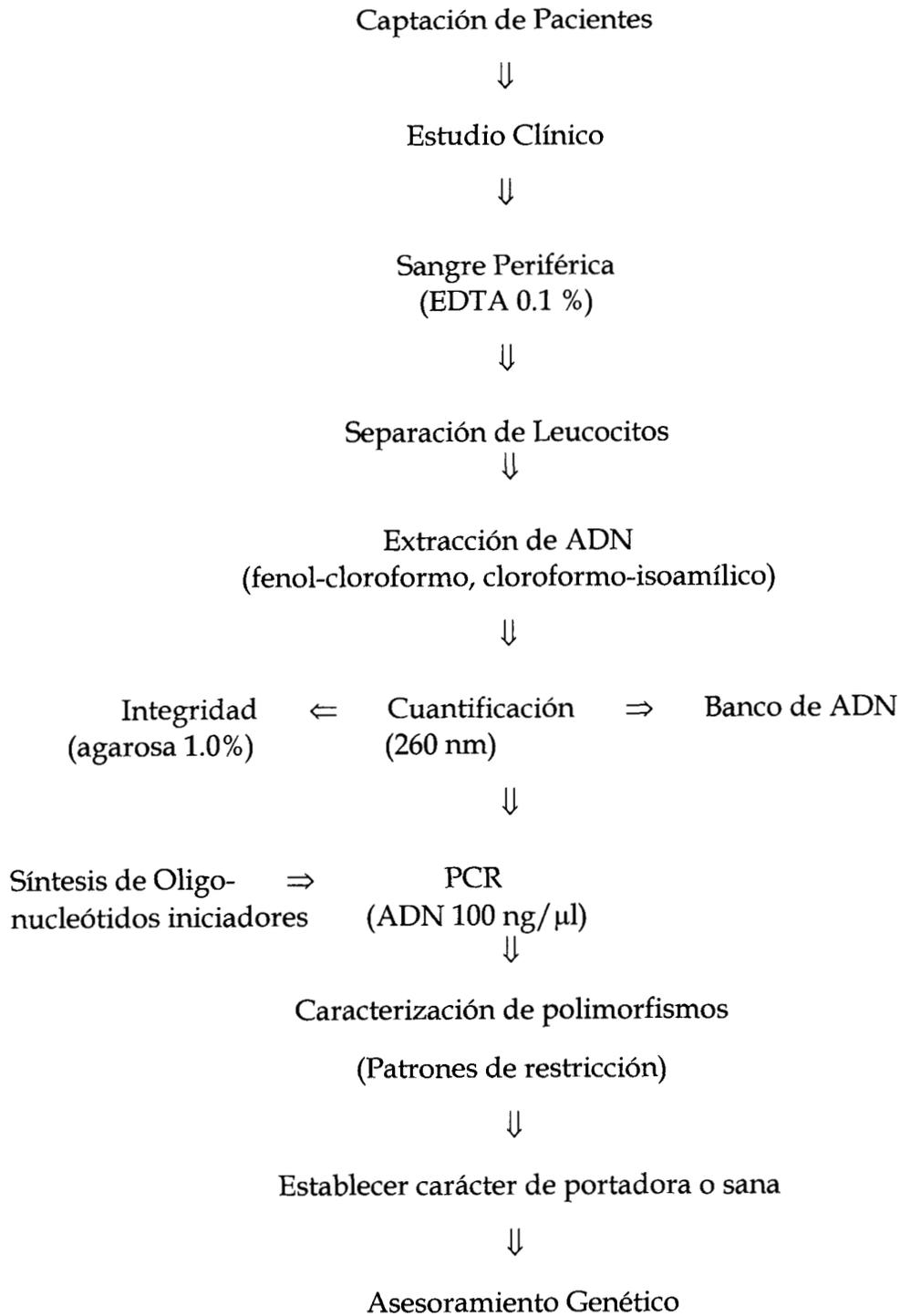
MATERIAL Y METODOS:

ESTRATEGIA GENERAL

Para cumplir con los objetivos de este trabajo se captó una población de 58 casos índices con diagnóstico clínico y de laboratorio de hemofilia tipo A. Se tomó una muestra de sangre periférica de los pacientes seleccionados y de sus familiares en primer grado y se extrajo el DNA a partir de leucocitos totales. A todas las muestras se les evaluó la pureza, concentración e integridad para crear un banco de DNA.

A partir de la secuencia del gen reportada por Gitschier y cols. (66-68), se sintetizaron las secuencias de oligonucleótidos necesarios para amplificar los intrones 19 y 22 del gen del FVIII. La amplificación por PCR se llevó acorde a las condiciones requeridas para cada par de oligonucleótidos y al tamaño de los productos (ver diagrama de flujo).

DIAGRAMA DE FLUJO



I.- POBLACION SELECCIONADA:

La población objetivo estuvo constituida por 197 individuos: 58 casos índice con Hemofilia A, 8 hermanos afectados, 114 mujeres familiares de 1er. grado (55 madres y 59 hermanas) y 17 hombres sanos (15 padres y 2 hermanos) a fin de poder establecer el análisis de segregación. La muestra se clasificó en los siguientes grupos:

Grupo I: Pacientes con hemofilia A dignosticados clínicamente y por determinación de la actividad coagulante residual del FVIII.

Grupo II: Portadoras obligadas, aquellas con más de un hijo, 1 hijo y 1 hermano o 1 hijo y 1 tío afectado.

Grupo III: Portadoras probables, aquellas con un hijo afectado o bien las hermanas de los pacientes.

Grupo IV: Individuos del sexo masculino familiares en primer grado de los pacientes con hemofilia.

Se incluyó el grupo IV a fin de poder establecer el análisis de segregación de alelos. El número de padres fueron los únicos que acudieron a la toma de muestra.

Se excluyeron los pacientes con diagnóstico de SIDA o Hepatitis, por razones de seguridad.

Entre la población captada se consideró como Mestizo a aquellos entre los cuales los padres y los cuatro abuelos fueran nacidos en México y sin otros antecedentes extranjeros conocidos.

II.- HISTORIA CLINICA

Para cada uno de los casos se llenó una hoja de captación de datos (se anexa al final del trabajo) que incluyó historia clínica, exámenes de laboratorio y gabinete, el árbol genealógico y origen étnico. Los pacientes fueron clasificados como severos, moderados o leves.

III.- REACTIVOS EMPLEADOS

REACTIVO	MARCA
⇒ Agarosa	SIGMA
⇒ Albúmina bovina	SIGMA
⇒ Acido Bórico	MERCK
⇒ Acrilamida	BIORAD
⇒ Alcohol Isoamílico	MERCK
⇒ 2-β-mercapto etanol	SIGMA
⇒ Bcl-I	AMERSHAM
⇒ bis-Acrilamida	BIORAD
⇒ Borato sódico	MERCK
⇒ Bromuro de Etidio	SIGMA
⇒ Cloroformo	MERCK
⇒ Cloruro de Magnesio	MERCK
⇒ Cloruro de Sodio	MERCK
⇒ Dodecil sulfato sódico (SDS)	BDH
⇒ EDTA	SIGMA

⇒ Etanol	MERCK
⇒ Eter etílico	MERCK
⇒ Fenol	MERCK
⇒ Fosfato monobásico de potasio	MERCK
⇒ Hidróxido de Sodio	MERCK
⇒ Hind-III	AMERSHAM
⇒ Hipoclorito de sodio	BAKER
⇒ Isopropanol	MERCK
⇒ Marcador de pesos Lambda Hind-III	B.R.L.
⇒ Taq polimerasa	GIBCO
⇒ Persulfato	BIORAD
⇒ Proteínasa K	SIGMA
⇒ Temed	BIORAD
⇒ Tris-HCl	MERCK
⇒ Trizma base	SIGMA

IV.- MUESTRAS BIOLÓGICAS

Se obtuvo una muestra en anticoagulante de sangre periférica (entre 7-15 ml) de los pacientes y sus familiares de primer grado.

V.- PREPARACION DE SOLUCIONES

- Amortiguador de Lisis de Glóbulos Rojos (ALGR): Tris-HCl 10mM, MgCl₂ 5 mM, NaCl 10 mM, se ajusta a pH 7.6.

- Amortiguador de Lisis de Glóbulos Blancos (ALGB): tris-HCl 10 mM pH 7.6, EDTA pH 8.0 10 mM, NaCl 50 mM, SDS 0.2%, proteinasa K 200 mgr/ml.
- Fenol saturado: 500 grs de Fenol; 3.3 ml de mercaptoetanol; 6.6 ml de amortiguador Tris 1M a pH 8; 487.5 µl de NaOH 10 M y 333.33 ml de H₂O destilada. Se ajusta pH a 7.8. Se almacena en envase ámbar.
- Mezcla Fenol/Cloroformo: Se prepara al momento de uso: 1 volumen de Fenol saturado con 1 volumen de Cloroformo.
- Mezcla de Alcohol Isoamílico/cloroformo: Se mezclan 24 volúmenes de Cloroformo con 1 volumen de alcohol Isoamílico.
- NaCl 5 M:
- Amortiguador TE: contiene solución de Tris 1 mM y solución de EDTA 0.1 mM
- Amortiguador TBE 10X: 324 gr. de Tris ; 100 gr. de Acido Bórico; 19 gr. de EDTA y agua bidestilada c.b.p. 2 litros. Ajuste de pH a 8.0-8.8.
- Bromuro de Etidio: 10 mg/ml
- Agarosa al 2%: 1 gr. de agarosa en 50 ml de amortiguador TBE 1X
- Colorante de bromofenol-xilencianol : 0.05%/0.05% en agua destilada.
- Acrilamida al 30% : 29 gr. de Acrilamida, 1 gr. de bis-Acrilamida en 100 ml. de agua mezclada con 3 µl de bromuro de etidio (10mg/ml).
- Poliacrilamida al 12%: Para preparar 15 ml.: 3 ml. de TBE 5X; 4.6 ml. de acrilamida al 30%; 7.2 ml. de agua; 150 µl de persulfato de amonio al 10% y 15 µl de TEMED.
- Acrilamida al 30%: 29 gr. de Acrilamida, 1 gr. de bis-Acrilamida en 100 ml. de agua. Se prepararon 15 ml. con: 3 ml. de TBE 5X; 4.6 ml. de Acrilamida al 30%; 7.2 ml. de agua; 150 µl de Persulfato de Amonio al 10% y 15 µl de TEMED.

VI.- METODOS

VI.1.- EXTRACCION DE DNA (184,185):

Se tomó una muestra de 5-10 cc de sangre periférica con anticoagulante EDTA en relación de 9:1, y se centrifugó durante 30 minutos a 3,000 rpm. Se tomó la capa de leucocitos, se colocó en 3 ml de solución para lisis de eritrocitos (ALGR) y se centrifugó 10 minutos a 3,000 rpm. La pastilla de leucocitos se lavó dos veces más con ALGR a fin de eliminar la mayor cantidad de la hemoglobina generada de la lisis de los eritrocitos.

Se resuspendió el paquete de leucocitos en 180 μ l de ALGR más 1.5 ml de Amortiguador de Lisis de Glóbulos Blancos (ALGB) mg/ml). Se incubó durante 24 horas a 42 °C para obtener un hidrolizado de leucocitos.

Se purificó el ADN contenido en el hidrolizado de la siguiente manera:

Se agregaron al hidrolizado 2 ml de fenol saturado, se agitó suavemente hasta obtener una mezcla homogénea y se centrifugó 10 minutos a 3,000 r.p.m. La fase superior se transfirió a un tubo limpio evitando romper la interfase. Se repitió el proceso una vez más.

La fase superior del proceso anterior se pasó a un tubo limpio y se agregaron 2 ml de la mezcla fenol/cloroformo (v/v), se agitó suavemente y se centrifugó 10 minutos a 3,000 r.p.m., se trasvasó la fase superior sin tocar la interfase y se repitió el paso anterior.

A la fase superior se agregaron 2 ml de la mezcla de cloroformo/isoamílico (24:1), se agitó suavemente y se centrifugó 10 minutos a 3,000 r.p.m., se repitió el proceso una vez más.

Se agregaron 5 μ l de NaCl 60 mM y 5 ml de etanol absoluto a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se agitó suavemente para acelerar la precipitación del DNA.

Para recuperar el DNA, se extrajo de la solución con una pipeta Pasteur sellada con punta curva y se secó por unos minutos a temperatura ambiente. Para eliminar el exceso de sales se enjuagó en etanol al 70% a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió en 200 μ l en amortiguador TE.

VI.2.- CUANTIFICACION DEL DNA

Para cuantificar el DNA se utilizó un espectofotómetro a una longitud de onda λ de 240, 260 y 280 nm. Se diluyó 1 ml de la muestra de DNA en 250 μ l de agua estéril y se registró la densidad óptica a las tres longitudes mencionadas. El dato obtenido se aplicó en la siguiente fórmula para calcular la concentración de DNA:

$$\text{DO} \times \text{F} \times \text{DIL} = \text{DNA } \mu\text{g/ml}$$

donde:

DO = densidad óptica

F = constante equivalente a 0.05

DIL= volumen de dilución equivalente a 250 μ l

Se consideró como criterio de pureza el cociente $\text{D.O.}_{260}/\text{D.O.}_{280}$ mayor o igual a 1.6 y el de $\text{D.O.}_{260}/\text{D.O.}_{240}$ mayor o igual a 1.6.

Se ajustó la concentración del DNA para almacenarlo en un rango de 200 - 400 ng.

VI.3.- INTEGRIDAD DEL DNA

Después de la extracción se comprobó la integridad del DNA por medio de una electroforesis en un gel de agarosa al 2% con 2.5 μ l bromuro de etidio por 40 minutos a 80 volts. Para la electroforesis se mezcló 1 μ l de muestra con 2 μ l de colorante azul de bromofenol-xilencianol, 5 μ l de agua estéril y 2 μ l de bromuro de etidio, se realizó un corrimiento de 20 minutos a 100 V. Después de la electroforesis el DNA se observó en un transiluminador y se fotografió.

VI.4.- ANALISIS DE POLIMORFISMOS

La estrategia consistió en la caracterización de los polimorfismos de los alelos por análisis de fragmentos de longitud polimórfica (RFLPs) mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y digestión con enzimas de restricción. La primera fase comprendió la preparación de los oligonucleótidos seleccionados previamente.

VI.4.1.- PREPARACION DE OLIGONUCLEOTIDOS (186):

Se utilizó el método de Fosforoamidita en un oligosintetizador de cuatro columnas Applied Biosystem. La síntesis de oligonucleótidos es un acoplamiento cíclico de monómeros (A,T,G,C), para obtener un multímero de una longitud y una secuencia previamente determinadas. Cada síntesis comprendió una serie de ciclos, en cada uno de los cuales se agregó un nucleótido a la cadena en crecimiento en una mezcla de 10 μ l de Tris-HCl 50 mM pH 8.3, 10 mM MgCl₂, 5 mM DDT, 2 nM dNTP y 37°C. La reacción consistió de cuatro pasos principales, partiendo inicialmente del hecho de que se tienen ancladas a un soporte sólido (columnas) por su extremo 3' y en forma independiente, a todas las amiditas; el proceso se inició lavando las columnas que contienen el monómero inicial

(amiditas) con dicloroetano y después se sucedieron en forma continua los siguientes pasos:

Desprotección del grupo 5-hidroxilo de la unidad terminal 2-desoxirribosa, removiendo el grupo 4,4'-dimetiltritol (DMTr) con dicloroetano, después se eliminaron los residuos de agua con acetonitrilo.

Acoplamiento: formación de un puente 3'-5' internucleotídico con el grupo fosfato del desoxirribonucleótido siguiente, posteriormente se bloquearon los grupos hidroxilo sin reaccionar para garantizar que sólo se incremente la secuencia correcta en los ciclos siguientes. Finalmente se oxidó el puente de triéster fosfato y se detuvo la reacción con una mezcla de 5 U de polinucleótido cinasa (Boehringer Manhein). Estos pasos se repitieron consecutivamente según el número de monómeros de las secuencias que se sintetizaron.

Después de que se completó la síntesis, el oligómero sintético se separó del soporte sólido y se liberó de los grupos protectores, esto se realizó incubando el soporte con el oligonucleótido unido en una solución acuosa de amonio (30% v/v) a 55°C por un periodo de 5-12 horas.

La purificación del oligonucleótido se realizó mediante el uso de columnas de intercambio iónico de Shepadex G-25 (Pharmacia) conocidas también como columnas NAP, que se estabilizaron previamente con agua a fin de eliminar el amortiguador de almacenamiento, el oligonucleótido se recobró diluido libre de subproductos y de iones amonio, en el amortiguador de elución en tubos Eppendorf. Se concentró en un roto-evaporador durante 3 horas. Se reconstituyó en agua bidestilada y se determinó su concentración por espectrofotometría de luz UV a 240/260/280 nm. Los oligonucleótidos sintetizados se muestran en la tabla 9.

VI.4.2.- AMPLIFICACIÓN DEL DNA POR PCR (187,188).

La reacción de amplificación se realizó en un termociclador Perkin Elmer (Thermal Cycler 9600). Se mezclaron 100 ng de DNA genómico con una solución que contenía: amortiguador para el fragmento Stoffel de la Taq polimerasa (10 mM Tris-HCl, pH 8.3; 50 mM KCl), 200 μ M de dNTPs, 0.2-0.5 mM de oligonucleótidos iniciadores F y R, 1.5-3.0 U del fragmento Stoffel de la Taq polimerasa y 6.8 mM de MgCl₂ en un volumen final de 25-50 μ l. Se colocó en un tubo de reacción 1.0 μ l el DNA de un individuo normal como control positivo con el volumen específico de la mezcla de amplificación y como control negativo se colocó sólo la mezcla de amplificación para asegurar ausencia de contaminación.

Las condiciones óptimas de reacción de PCR se muestran en las tablas 10-11.

Los pasos que se siguieron para la preparación de la mezcla de reacción fueron los siguientes:

1. Se preparó el volumen total de la mezcla de amplificación (MA) en función del número de muestras.
2. Se colocó el DNA problema (1 μ l) en tubos eppendorf de 0.5 ml.
3. Al tubo con el DNA problema se adicionaron 49 μ l de MA.

VI.4.3.- ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA

Se corrieron 8-12 μ l de las muestras amplificadas en un gel de agarosa al 2% durante 1 h a 85 V. Los productos de PCR se visualizaron y se fotografiaron en un transiluminador de luz UV. Se corroboraron los pesos moleculares de cada amplificado en base a su migración y con respecto al marcador de pesos λ /Hind III o ϕ X 174/Hae III. El gel se tiñó con bromuro de etidio a una concentración final de 1 μ g/ml.

TABLA 9

SECUENCIA DE OLIGONUCLEOTIDOS PARA HEMOFILIA

LOCALIZACION	SECUENCIA	TAMAÑO DEL AMPLIFICADO (pb)
Intron 18	5'- TTCGAATTCTGAAATTATCTTGTTTC - 3' 5'- TAAAAGCTTTAAATGGTCTAGGC - 3'	144
Intron 19	5'- GGCGAGCATCTACATCGTGGGATGAGC - 3' 5'- GTCCAGAAGCCATTCCCAGGGGACTCT - 3'	724

TABLA 10

CONCENTRACIONES OPTIMAS DE SOLUCIONES

PARA PCR

REACTIVO	VOLUMEN (µl)	[STOCK]	[FINAL]
Taq polimerasa	0.5	10 U/µl	0.1U/µl
Amortiguador (10x)	5.0	10X	1X
dntps (3mm)	0.5	10 mM (c/u)	1 mM (c/u)
primer Forward (10pm)	0.5	200 ng/µl	2 ng/µl
primer Reverse (10pm)	0.5	200 ng/µl	2 ng/µl
MgCl ₂ (10nm)	4.0	25 Mm	0.8 mM
DNA (200 ng)	1.0	200 ng/µl	4 ng/µl
H ₂ O cbp	50.0		

TABLA 11

CONDICIONES OPTIMAS PARA PCR EN Perkin Elmer Thermal Cycler 9600

Fase	Ciclo	Tiempo / Temperatura
Desnaturalizar	1 Ciclo	2 Min. / 94°C
Amplificación	30 Ciclos	A).-Desnaturalización: 20 seg / 94°C B).- Alineación: 20 seg / 55°C C).- Síntesis: 30 seg / 72°C
Amplificación Final	1 Ciclo	A).- Desnaturalización: 12 seg / 94°C B).-Alineación: 20 seg / 65°C C).-Síntesis: 7 Min. / 72°C
Hold	1 Ciclo	4 °C

VI.4.4.- RESTRICCIÓN CON ENDONUCLEASAS

Después de la PCR se tomaron 10 µl del amplificado se incubaron toda la noche con 15 µl de la mezcla de reacción para la restricción que contenía: 5 µl Bcl I o Hind III; 2.5 µl de amortiguador y 7.5 µl de agua bidestilada.

VI.4.5.- ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA

Los productos de digestión se sometieron a una electroforesis en geles de poliacrilamida del 6-12%. Se mezclaron 10 µl de cada uno de los amplificadores restringidos con 2 µl de colorante azul de bromofenol-xilencianol y 7 µl de agua destilada. Se colocaron en cada uno de los pozos del gel y se corrieron a 100 V durante 2 h en un amortiguador de corrida TBE. El gel se tiñó con bromuro de etidio. El resultado se observó en un transiluminador de luz UV y por último se fotografió en películas polaroid 667, utilizando filtros rojo y amarillo.

VII.- ANÁLISIS DE RESULTADOS.

- Se clasificaron los individuos entre aquellos que tenían antecedentes hereditarios familiares y aquellos con caso único.
- En base a los resultados obtenidos se aplicó la ecuación de Hardy-Weinberg para obtener la frecuencia alélica esperada y el índice de heterocigocidad.
- Se estableció la combinación adecuada de polimorfismos para el haplotipo en estudio y se calculó la frecuencia.
- Se compararon las frecuencias de polimorfismos, índices de heterocigocidad, y la frecuencia de los haplotipos entre nuestra población y los diferentes grupos étnicos reportados en la literatura empleando la prueba de X^2 .

RESULTADOS

Se incluyeron en el estudio a todos los pacientes que acudieron a la Consulta Externa de Hematología del I.N.P. en el período comprendido de 1994-1995. La población estuvo constituida por 197 individuos: 58 casos índice con Hemofilia A; el resto de los individuos fueron familiares en 1er grado: 114 mujeres (55 madres y 59 hermanas), 8 hermanos afectados y 17 hombres sanos (15 padres y 2 hermanos).

I.- CUADRO CLINICO

A todos los pacientes se les realizó historia clínica completa incluyendo pedigree y determinación de la dosificación del FVIII. Los pacientes se clasificaron en base a la gravedad del cuadro clínico y la función del FVIII de acuerdo con los criterios internacionales en severos, moderados o leves (tabla 1).

Se encontró que el 58.62% de los pacientes tenían un cuadro clínico severo y en su mayoría han cursado con sangrados espontáneos y hemartrosis, en el 22.41% fue moderado y el 18.96 % leve (tabla 12).

Los análisis de pedigree mostraron que el 36.36% de las madres eran portadoras obligadas. En tanto que el 63.63% no refieren antecedentes heredo-familiares.

II.- CREACION DEL BANCO DE DNA

En todos los casos la concentración de DNA de la población captada osciló entre 0.8 y 2.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, como criterio de pureza se tomó un cociente mayor a 1.6 calculado de la relación entre los valores obtenidos a 260 nm (ácidos nucleicos) y 240 nm (fenol contaminante) o 280 nm (proteínas). En todos se logró obtener un DNA íntegro (figura 4).

TABLA 12
DISTRIBUCION DE PACIENTES HEMOFILICOS ACORDE A
CRITERIOS DE ACTIVIDAD RESIDUAL DEL FVIII

HEMOFILICOS	CASOS CON AHF ^a	CASOS SIN AHF ^a	PORCENTAJE %
LEVES	5	6	18.96
MODERADOS	4	9	22.41
SEVEROS	14	20	58.62
TOTAL	23	35	100.0

a: AHF = ANTECEDENTES HEREDOFAMILIARES

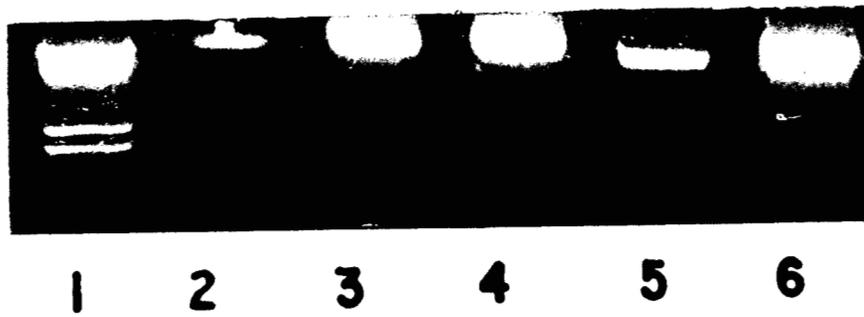


FIGURA 4: Integridad del DNA obtenido por el método de Fenol-Cloroformo. carriles 1 y 7: DNA λ digerido con Hind-III; carriles 2 al 6: DNA de pacientes hemofílicos.

III.- OPTIMIZACION DE LAS CONDICIONES DE PCR

Se procedió a cuantificar cada uno de los oligonucleótidos y después de crear el banco de DNA se establecieron las condiciones óptimas para la amplificación en la PCR. Se utilizaron muestras de DNA de individuos sanos para estandarizar la reacción y obtener los controles positivos.

Para la realización de este procedimiento se probaron varias concentraciones de los oligonucleótidos, dNTPs, Magnesio y DNA. Además se estandarizaron las temperaturas de alineación y el número de ciclos. Inicialmente se obtuvieron las condiciones requeridas para la amplificación de cada intron: concentraciones óptimas de los oligonucleótidos en un intervalo de 20 a 90 ng y la cantidad requerida de Magnesio, obtenida después de correr una curva de concentración variable, fue de 10mM (figura 5). La temperatura de alineación y el número de ciclos fue dependiente del contenido de G y Cs en los oligonucleótidos. Las concentraciones de dNTPs, Enzima y DNA fue la misma para cada reacción. Por lo tanto, los parámetros críticos para la amplificación fueron la temperatura de alineación, el número de ciclos y la concentración de $MgCl_2$. En las tablas 10-11 se muestran las concentraciones de los reactivos y las temperaturas necesarias para la amplificación.

En la figura 6 y 7 se muestran DNAs amplificados con los oligonucleótidos para los intrones 18 y 19 para PCR de algunos paciente.

IV.- OPTIMIZACION DE LAS CONDICIONES DE RESTRICCIÓN CON ENDO-NUCLEASAS.

Para ello se probaron muestras de DNA de individuos sanos tanto hombres como mujeres y pacientes hemofílicos .

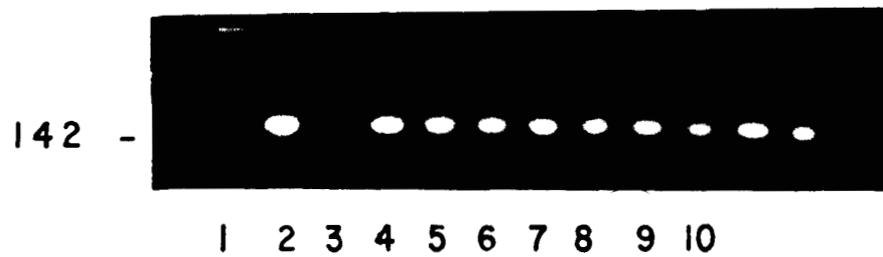


Figura 5: Curva para obtener concentración óptima de Magnesio. Carril 1: Marcador de pesos digerido con Hind-III; carriles 2 y 4: con MgCl_2 10 mM; carril 3: control negativo; carril 5-7 con MgCl_2 con 12 mM; carriles 8-10 con MgCl_2 con 8 mM.

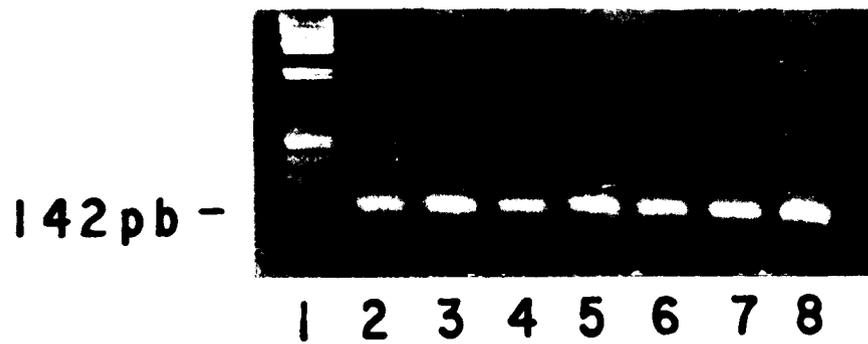


Figura 6: estandarización de los oligonucleótidos para 18:Bcl-1 en PCR. Carril 1: marcador de pesos; carriles 2-5. Controles sanos; carriles 6-8: muestras de hemofílicos

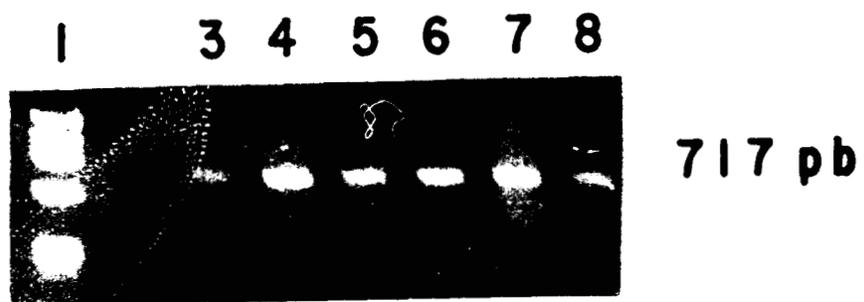


Figura 7: Estandarización de los oligonucleótidos 19:Hind-III para la PCR. Carril 1: marcador de pesos λ Hind-III; carril 2: control negativo; carriles 3-6: controles sanos; carriles 7-8: pacientes hemofílicos.

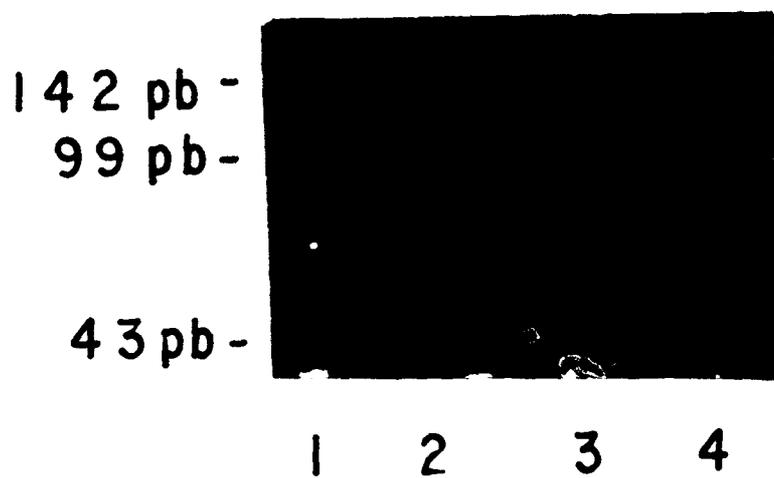


Figura 8: Productos de digestión del amplificado del polimorfismo 18:Bcl-1: Carril 1: DNA sin digerir, carril 2: homocigoto para el alelo B1; carril 3: homocigoto para el alelo B2; carril 4: heterocigoto B1/B2.

El producto amplificado para estudiar el polimorfismo 18:Bcl-I es de 142 pb, que al ser digerido por la enzima Bcl-I se corta en 2 fragmentos uno de 99 y otro de 43 pb (Figura 8). El producto amplificado para estudiar el polimorfismo 19:Hind-III es de 724 pb, que al ser digerido con la enzima Hind-III debe generar un fragmento constante de 490 pb y un fragmento restante de 234 pb que cuando se digiere genera 2 fragmentos: uno de 157 y otro de 77 pb (Figura 9).

V.- DETECCION DE PORTADORAS

V.1.- ANALISIS DE LOS POLIMORFISMOS 18:Bcl-I y 19:Hind-III (RFLPs) MEDIANTE EL USO DE LA PCR.

En esta parte se incluyeron sólo las familias en las que se contaba con el caso índice y la madre, se estudiaron 299 alelos de 55 familias. Los alelos provenían de 55 casos índice, 55 madres (20 portadoras obligadas), 55 hermanas, 7 hermanos afectados y 17 hombres sanos (15 padres y 2 hermanos).

Para el análisis de los polimorfismos en el intron 18 y 19, se denominó por convención alelo 1 (B1 y H1) al que no contiene el sitio de restricción para la enzima y alelo 2 (B2 y H2) al que sí lo contiene (Tabla 13). La combinación de los polimorfismos B y H definen 4 haplotipos B1-H1, B1-H2, B2-H1 y B2-H2.

V.2.- FRECUENCIA DE POLIMORFISMOS 18:Bcl-I y 19:Hind-III EN PACIENTES.

La frecuencia y distribución de los alelos se muestra en la tabla 14, los alelos que se presentaron con mayor frecuencia fueron el B2 (56%) y el H1 (53%).

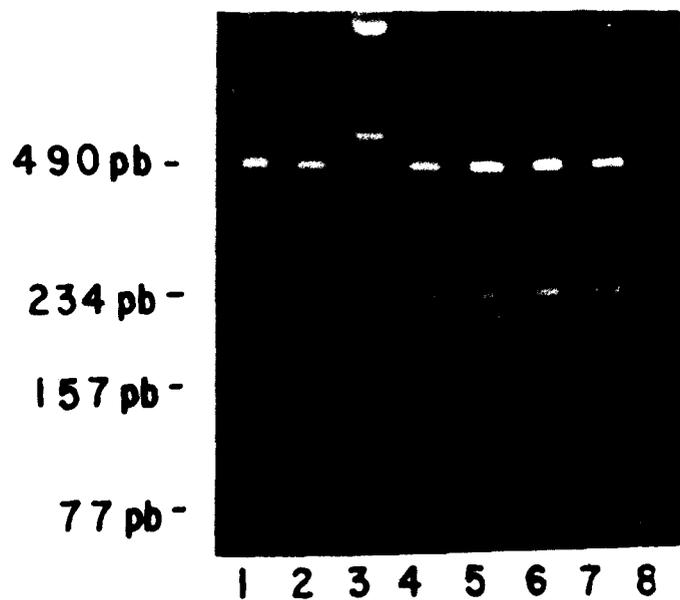


Figura 9: Patrón electroforético para el amplificado de 19:HindIII. Carriles 1,5 y 6: heterocigoto para los alelos H1/H2; carriles 2: homocigoto para el alelo H2; carril 3: DNA λ digerido con Hind-III; carriles 4 y 7: homocigotos para el alelo H1; carril 8: control negativo.

TABLA 13
TAMAÑO DE LOS ALELOS PRODUCIDOS POR
LAS ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

LOCUS	ENZIMA DE RES- TRICCIÓN	SITIO DE CORTE	LONGITUD DE ALELO (pb)	
		1	142	B1
INTRON 18	Bcl-I	2	99,43	B2
		1	490,234	H1
INTRON 19	Hind-III	2	490,157,77	H2

TABLA 14: FRECUENCIA DE ALELOS EN CASOS INDICE

RFLP	ALELO	PACIENTES (n=58)	
		No.	%
Bcl-I	1	26	44.82
	2	32	55.17
Hind-III	1	31	53.45
	2	27	46.55

El análisis de los haplotipos (tabla 15) mostró que la combinación B2/H1 fue la más frecuente (53.45%), seguida por B1/H2 (41.37%). La frecuencia para los haplotipos B1/H1 (1.72%) y B2/H2 (3.44%) fueron significativamente más bajas. El análisis en pacientes con antecedentes heredofamiliares presentó una distribución similar en contraste con los que no refieren antecedentes en los que no se encontraron diferencias significativas ($p>0.05$) entre los haplotipos B2/H1 y B1/H2. Para buscar si existe asociación entre haplotipos y manifestaciones clínicas, se calculó la frecuencia de éstos en los alelos sanos y enfermos, sin embargo no se encontraron diferencias significativas ($p>0.05$).

V.3.- FRECUENCIA DE POLIMORFISMO EN LAS MADRES DE LOS CASOS INDICE.

De las 55 madres estudiadas encontramos que el 43.64% fue heterocigota (índice de heterocigocidad= 0.436) tanto para el polimorfismo 18:Bcl-I como para el polimorfismo 19:Hind-III (tabla 16). Cabe mencionar que en las mujeres al igual que en los pacientes los alelos B2 y H1 se presentaron con mayor frecuencia.

El análisis de los haplotipos mostró una distribución en las frecuencias similar a la de los pacientes (tabla 17).

VI.- ANALISIS DE SEGREGACION DE ALELOS

Se realizó un análisis de la segregación de los alelos con la finalidad de diagnosticar a las portadoras. En 10 familias de los casos índices la madre fue heterocigota y portadora obligada (F2, F4, F5, F6, F7, F8, F11, F12, F14, F15) se seleccionaron 6 por tener hijas (F2, F4, F6, F7, F8 y F14), de ellas en 4 familias fue posible la detección del carácter de portadora por el estudio de RFLPs (F2 con una portadora, F4 con una portadora, F7 una sana, F8 con dos portadoras y una sana), cabe destacar que en dos de estas familias se contaba con muestra del padre para

establecer su genotipo y poder asegurar así cual fue el alelo heredado por línea materna, en el resto de las familias no pudo dilucidarse por no contar con el genotipo del padre que no acudió a consulta. De 14 familias heterocigotas sin antecedentes (F26, F28, F30, F31, F36, F38, F39, F40, F43, F47, F48, F53, F56, F58) seleccionamos 10 (F26, F28, F30, F31, F38, F40, F43, F47, F48 y F56) con un total de 16 niñas, sólo se logró establecer el estado de sana en 4 familias (F28 con tres, F31 con una, F38 una sana, F43 una sana, F47 una sana, F48 una sana) por seguimiento del alelo en riesgo, las 8 niñas restantes de este grupo se clasificaron como casos inconclusos (tabla 18).

En la figura 10 se muestra un ejemplo del análisis de polimorfismo 18:Bcl-I en una familia con antecedentes familiares donde la madre, portadora obligada, fue heterocigota para este marcador (B1/B2) (carril 1). El caso índice es hemicigoto para el alelo B1(alelo afectado) (carril 2), en tanto que el padre es hemicigoto para el alelo 2 (carril 3), la hermana heterocigota presenta el alelo 1 de la madre y el alelo 2 del padre, por lo que se diagnóstica como portadora.

En la figura 11 observamos una familia donde la madre también es heterocigota y portadora obligada (B1/B2) (carril 7), el caso índice y un hermano afectado fueron hemicigotos para el alelo B1 (carril 4 y 5 respectivamente), un segundo hermano sano y el padre son hemicigotos para el alelo B2 (carriles 2 y 3 respectivamente), por lo que se establece que es el alelo B1 el que se cohereda con la enfermedad, la hermana es heterocigota con B1/B2 lo que le confiere el carácter de portadora.

En la figura 12 observamos una madre informativa y portadora obligada (B1/B2) (carril 2), el caso índice es hemicigoto para B1 (carril 3) y la hermana homocigota para B2 (carril 4), con estos datos se infiere que ésta última no heredó el alelo afectado (B1) por lo tanto no es portadora de la enfermedad.

--

TABLA 15: FRECUENCIA DE HAPLOTIPOS EN PACIENTES

HEMOFILIA : 18:Bcl-I/ Hind-III

PACIENTES	HAPLOTIPO (B/H)				TOTAL
	B1/H 1	B1/H2	B2/H1	B2/H 2	
No.	1	24	31	2	66
%	1.72	41.37	53.45	3.44	100.0

TABLA 16: FRECUENCIA DE ALELOS DE MADRES DE HEMOFILICOS

GENOTIPO	18:Bcl-I		19:Hind-III	
	No.	%	No.	%
1	48	43.63	60	54.54
2	62	56.36	50	45.46

**TABLA 17: HAPLOTIPOS 18:Bcl-I/19:Hind-III
EN MADRES DE HEMOFILICOS**

	HAPLOTIPO					TOTA
	B1/H1	B1/H 2	B2/H 1	B2/H 2	B ^{1/2} /H ^{1/2}	L
No.	2	22	34	4	48	110
%	1.8	20	30.9	3.6	43.6	100

TABLA 18: RELACION DEL CARACTER DE "PORTADORA"

	HIJAS PORTADORAS		SANAS		INCONCLUSO	
	No.	%	No.	%	No	%
AHF^a						
n=10	4	40.0	2	20.0	4	40.0
S.AHF^b						
n=16	0	00.0	8	50.0	8	50.0
TOTAL						
n=26	4	15.3	10	38.5	12	46.2

a: Con antecedentes heredofamiliares

b: Sin antecedentes heredofamiliares

El análisis del polimorfismo para 19:Hind-III se muestra en la figura 13 donde la madre es informativa H1/H2 y portadora obligada (carril 3), el caso índice es hemicigoto H1 al igual que un hermano afectado (carril 1 y 4 respectivamente), una de las hermanas es heterocigota H1/H2 (carril 2) y otra es homocigota H1/H1, en base a el genotipo de esta hermana se infiere que el genotipo paterno es hemicigoto H1 por lo que la homocigota es portadora y la hermana heterocigota es sana. Estos resultados fueron confirmados por el análisis del polimorfismo 18:Bcl-I (figura 14). Como puede notarse la ausencia de la banda de 77 pb es consecuencia de la poca cantidad de DNA empleado para esta restricción.

En aquellas familias en las que no se refieren antecedentes familiares, al aplicar el mismo análisis se pudo establecer el carácter de sana, no así el de portadora, a pesar de contar en algunas de ellas con el genotipo paterno. En la figura 15 se observa que la madre es heterocigota B1/B2 (carril 1), el caso índice es hemicigoto para B1 (carril 2), dos de las hermanas son homocigotas para el alelo B2 (carriles 3 y 5) y la tercer hermana es heterocigota (carril 4). Al considerarse que el alelo afectado es B1, las hermanas homocigotas se consideran como no portadoras, en el caso de la tercer hermana se requieren estudios complementarios para establecer si es portadora. Por otra parte en este estudio también se lograron detectar mutaciones "*de novo*". En una familia sin AHF (figura 16): La madre informativa (B1/B2) (carril 3), sin embargo tanto el caso índice como en el hermano sano son hemicigoto para B1 (carriles 1 y 2), la hermana es homocigota B1/B1 (carril 4). Dado el carácter recesivo ligado al X de la enfermedad, estos datos sugieren que la mutación responsable de la enfermedad es "*de novo*", por lo que la madre y la hermana del pacientes no son portadoras.

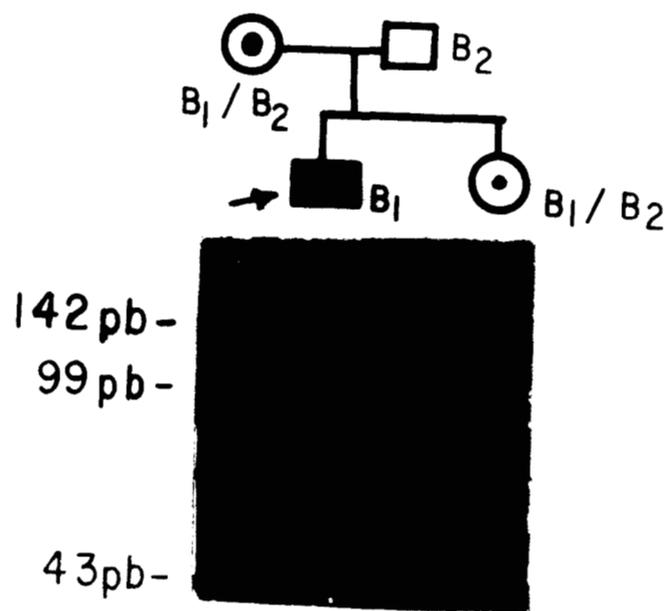


Figura 10: Análisis del alelo 18:Bcl-I en una familia con antecedentes heredo familiares. Carril 1: madre portadora obligada heterocigota para los alelos B_1/B_2 ; carril 2: caso índice hemicigoto para el alelo B_1 ; carril 3: padre hemicigotoa para el alelo B_2 ; carril 4 hermana portadora heterocigota para los alelos B_1/B_2 .

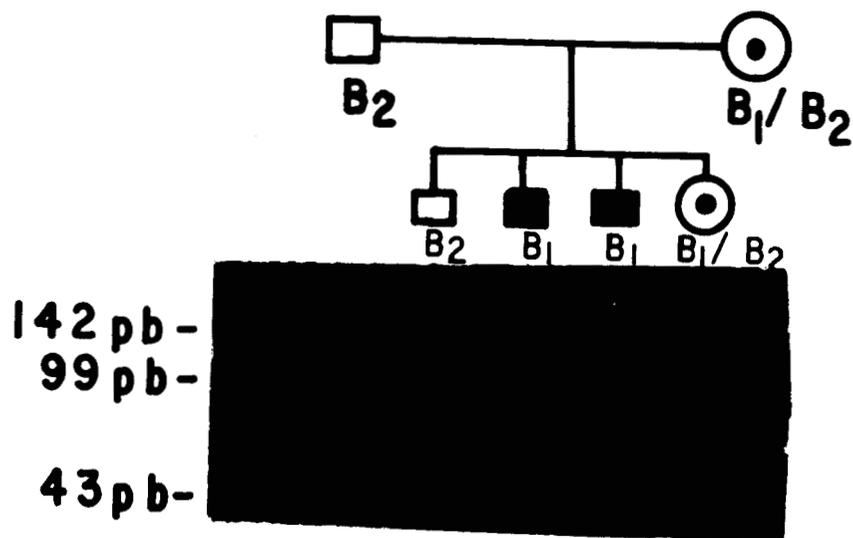


Figura 11 : PCR en una familia con dos casos de hemofilia. Carril 1: marcador de pesos; carril 2: padre hemicigoto para el alelo B_2 ; carril 3: hermano sano hemicigoto para el alelo B_2 ; carril 4: caso índice hemicigoto para el alelo B_1 ; carril 5: hermano afectado hemicigoto para el alelo B_1 ; carril 6: hermana portadora heterocigota para los alelos B_1/B_2 ; carril 7: madre portadora obligada heterocigota para los alelos B_1/B_2 .

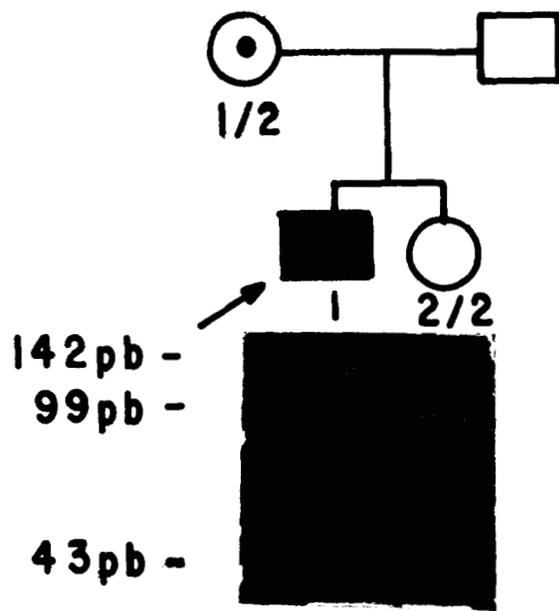


Figura 12: Familia con antecedentes familiares analizada con el polimorfismo 18:Bcl-I. Carril 1 madre heterocigota (B1/B2); carril 2: caso índice hemicigoto (B1); carril 3 hermana homocigota para alelo (B2).

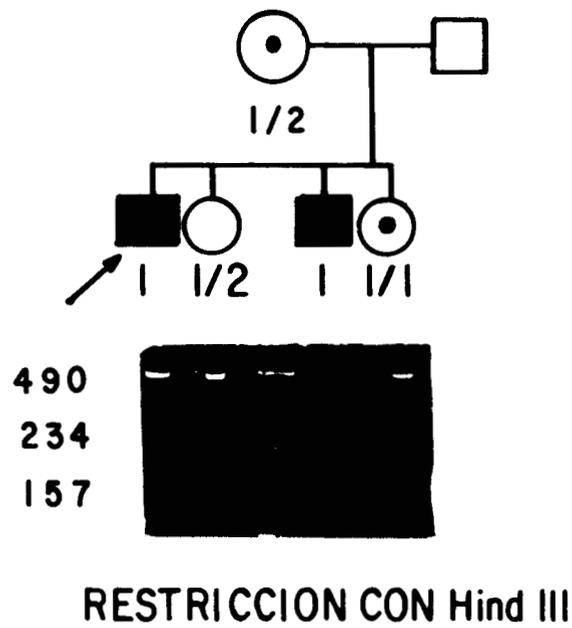


FIGURA 13: Familia analizada con RFLP Hind-III. Carril 1: caso índice hemicigoto para H1; carril 2: hermana heterocigota no portadora (H1/H2); carril 3: madre portadora obligada heterocigota (H1/H2); carril 4: hermano afectado hemicigoto (H1); carriles 5: hermana homocigota portadora (H1).

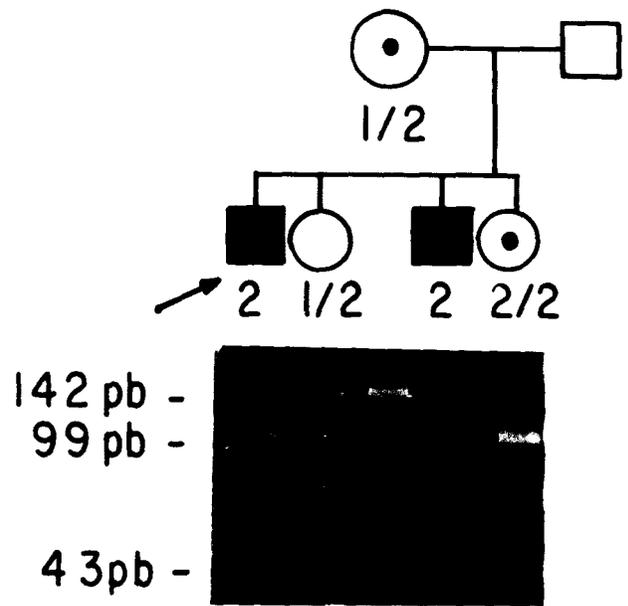


Figura 14: Familia analizada con RFLP Bcl-I. Carriles 1 y 4 caso índice y hermano afectado, hemicigotos a (B2); carril 2: hermana heterocigota (B1/B2), no portadora; carril 3: madre informativa (B1/B2), portadora obligada; carriles 5: hermana portadora, homocigota para el alelo B2

Con este análisis se logró hacer el diagnóstico de certeza en 23.6% de los casos; de las 59 hermanas captadas se excluyeron 4 por no tener madre, por ende de 55 hermanas, 4 fueron portadoras y 9 no portadoras. En 30=54.6% la madre no fue informativa por RFLPs y en 12= 21.8% se requería la muestra del padre.

El consejo genético se otorgó con certeza en las 13 hermanas diagnosticadas y en forma empírica a las restantes.

VII.- RELACION CON OTROS GRUPOS ETNICOS

Al comparar los datos obtenidos del análisis de las frecuencias de polimorfismos, índices de heterocigocidad y haplotipos en este estudio con las frecuencias reportadas en otras poblaciones (174,176,180), se encontró como se muestra en las tablas 19 y 20 que nuestra población Mestiza tanto para los polimorfismos 18:Bcl-I y 19:Hind-III presentó mayor similitud con los Vascos e Indios y una diferencia significativa ($p < 0.05$) con lo descrito para los grupos étnicos de Anglo Americanos, Afro-Americanos, Suizos y Malayos. En la tabla 21 se muestra la comparación con los índices de heterocigocidad, para 18:Bcl-I manifiesta una mayor aproximación con los grupos Anglo-Americano, Vasco, Indio, Polinesio y Maori, y una diferencia significativa con los grupos Africo-Americano, Suizo, Chino, Malayo y Thai, en contraste con lo reportado para el polimorfismo 19:Hind-III que sólo tiene similitud con los Vascos e Indios y una diferencia con los Africo-Americanos, Anglo-Americano, Suizos, Chino y Malayos. Por otra parte con los haplotipos obtenidos, se estableció la relación entre estos y los reportados, encontrando una fuerte asociación positiva entre los diferentes haplotipos de cada grupo étnico mediante X^2 . El análisis muestra que el haplotipo B1/H2 alcanza un 83% en el grupo Afro-americano, en tanto que el B2/H1 hasta un 78% en los grupos restantes, en tanto que para la población Mestiza es de un 53 y 56% respectivamente (tabla 22).

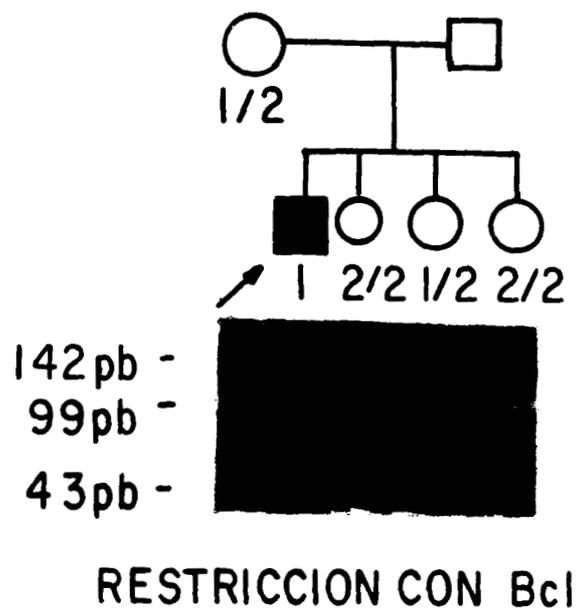


Figura 15: Familia sin antecedentes familiares analizada con el polimorfismo Bcl-I. Carril 1: madre heterocigota (B1/B2); carril 2: caso índice, hemicigoto (B1); carriles 3 y 5: hermanas homocigotas (B2), no portadoras; carril 4: hermana heterocigota (B1/B2), indeterminada.

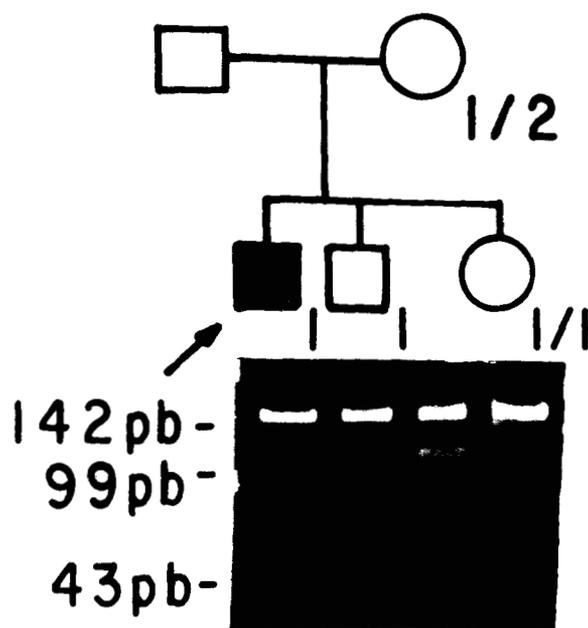


Figura 16. Familia sin antecedentes familiares analizada con RFLP Bcl-I. Carril 1: caso índice (B1); carril 2: hermano sano hemicigoto (B1); carril 3: madre informativa (B1/B2); carril 4: hermana homocigota (B1), no portadora.

TABLA 19: FRECUENCIA DE LOS POLIMORFISMOS

18: Bcl-I EN GRUPOS ETNICOS

GRUPO ETNICO	RELACION M/F	CROMOSOMAS	FRECUENCIA GENICA (1) / (2)
AFRICANO-AMERICANO	29 / 28	85	0.80 / 0.20
ANGLO-AMERICANO	27 / 71	69	0.24 / 0.76
SUIZOS	98 / 35	168	0.23 / 0.77
• VASCOS	32 / 36	104	0.29 / 0.71
• INDIOS	28 / 26	80	0.30 / 0.70
CHINOS	32 / 18	68	0.26 / 0.74
MALAYOS	22 / 23	68	0.21 / 0.79
* MESTIZOS	66 / 55	176	0.44 / 0.56

* Presente estudio

- Grupos étnicos con mayor similitud

TABLA 20: FRECUENCIA DE POLIMORFISMO

19:Hin-III EN GRUPOS ETNICOS

GRUPO ETNICO	RELACION M/F	CROMOSOMAS	FRECUENCIA
			GENICA (1) / (2)
AFRICANO-AMERICANO	31 / 30	91	0.22 / 0.78
ANGLO-AMERICANO	29 / 22	73	0.75 / 0.25
SUIZOS	98 / 33	164	0.74 / 0.26
• VASCOS	32 / 36	104	0.72 / 0.28
• INDIOS	28 / 26	80	0.71 / 0.29
CHINOS	31 / 18	67	0.76 / 0.24
MALAYOS	22 / 21	64	0.77 / 0.23
* MESTIZOS	66 / 55	176	0.54 / 0.46

* Presente estudio

- Grupos étnicos con mayor similitud

**TABLA 21: FRECUENCIA DEL INDICE DE HETEROCIGOCIDAD EN EL IN-
TRON 18:Bcl-I & 19:Hind-III EN GRUPOS ETNICOS**

GRUPO ETNICO	18:Bcl-I	19:Hind-III
AFRICANO-AMERICANO	0.320	0.343
ANGLO-AMERICANO	• 0.420	0.375
SUIZOS	0.352	0.284
VASCOS	• 0.412	◇ 0.403
INDIOS	• 0.420	◇ 0.411
CHINOS	0.385	0.365
MALAYOS	0.332	0.354
POLINESIO	• 0.419	-----
MAORIS	• 0.444	-----
THAI	0.340	-----
* MESTIZOS	• 0.436	◇ 0.436

* Presente estudio

• Frecuencias similares para 18:Bcl-I

◇ Frecuencias similares para 19:Hind-III

TABLA 22: ASOCIACION ALÉLICA ENTRE LOS POLIMORFISMOS

18:Bcl-I & 19:Hind-III

GRUPO ETNICO	HAPLOTIPOS B/H				TOTA	X ²
	B1/H1	B1/H2	B2/H1	B2/H2		
					L	
AFRO-AMERICANO	5	71	5	4	85	18.74
ANGLO-AMERICANO	4	11	52	2	69	37.25
SUIZOS	7	26	109	15	157	60.1
VASCOS	8	17	72	7	104	37.13
INDIOS	9	11	57	7	84	17.49
CHINOS	6	9	46	6	67	15.47
MALAYOS	6	5	50	3	64	12.87
MESTIZOS (SOLO HEMOFILICOS)	1	27	35	3	66	51.8
MESTIZOS (POBLACION TOTAL CAPTADA)	2	52	79	7	140	105.6
TOTAL	48	229	505	54	836	440.9

p> 0.05 en todos los casos.

DISCUSION

La aplicación de la biología molecular a la medicina ha revolucionado los métodos de diagnóstico en muchas enfermedades donde el defecto es invalidante o letal. Uno de los avances más importantes en Hemofilia ha sido la identificación de algunas de las alteraciones moleculares en pacientes y portadoras (141,145,180) lo que ha permitido otorgar asesoramiento genético de certeza y el diagnóstico prenatal.

La hemofilia A es una enfermedad recesiva ligada al cromosoma X, en los casos severos puede conducir a la muerte en etapas tempranas. No existe un tratamiento definitivo hasta el momento (1,4,9). En los últimos 20 años, con los avances tecnológicos, se han ampliado las expectativas de vida hasta los 66 años. Los ensayos de terapia génica empiezan a revelar resultados alentadores en modelos animales (189), sin embargo aún existe una enorme brecha para su aplicabilidad en humanos. Queda como un gran reto vencer las infecciones vírales en la aplicación de hemoderivados y la posibilidad de ofrecer a las mujeres con familiares hemofílicos, la oportunidad de tener conocimiento con mayor certeza acerca de su progenie.

Estudios previos indican que dos tercios de los casos de hemofílicos son heredo-familiares y un tercio son mutaciones "*de novo*" surgidas en la madre o en el producto mismo (167). En el presente trabajo de 55 familias que acudieron a la consulta externa de Hematología del I.N.P. por el análisis del árbol genealógico, sólo en 20 de ellas (36.36%) se documentó el estado de portadora, ésto tuvo implicaciones importantes pues en el resto de las familias sólo se pudo dar un asesoramiento genético empírico. Con lo se demuestra la necesidad de contar con estrategias adecuadas para la detección de portadoras, por lo que éste fue el propósito de el presente trabajo.

En la década de los 70s, el método más seguro para la detección de portadoras se basaba en el análisis del árbol genealógico y la determinación de la actividad residual del FVIII (190). En la década de los 80s estos métodos se refinaron al combinarse con la determinación de la fracción antigénica del FVIII mediante la técnica de Laurell por electroinmunoforesis y el análisis estadístico que se denominó análisis bivariante o discriminante (191-195). Sin embargo la valoración bioquímica e inmunológica a través de las proteínas en sangre de mujeres con riesgo de ser portadoras no proporcionó resultados satisfactorios debido a que no había una relación confiable entre los niveles normales de la fracción coagulante con la fracción antigénica, lo que generó resultados ambiguos (183). En esta misma década surge la clonación y caracterización del gen del FVIII, lo que conduce a nuevas posibilidades para la detección de portadoras y el diagnóstico prenatal.

En este trabajo aplicando un método indirecto (166, 181, 182, 191, 196, 197), que utiliza el análisis de la segregación de los cromosomas mediante la caracterización de marcadores genéticos como los polimorfismos que son variaciones en las secuencias del DNA que no tienen un efecto visible en la expresión del gen y están presentes con una frecuencia mayor del 1% en la población normal (168), se logró otorgar el diagnóstico de certeza a 14 de 55 hermanas (tabla 21) de pacientes hemofílicos. Observamos que este tipo de análisis presenta varias ventajas: a) el índice de error está sujeto a la probabilidad de presentarse un fenómeno de recombinación, lo que es remoto si se utilizan marcadores intragénicos; b) se requiere una mínima cantidad de DNA; c) no es influenciado por el fenómeno de lyonización y; d) no se muestra afectación por la heterogeneidad de las mutaciones responsables de esta enfermedad. Las limitaciones importantes que fueron tomadas en consideración antes de su aplicación fueron 1) la frecuencia de los polimorfismos alélicos es variable en diferentes poblaciones, por lo que se requirió conocer la frecuencia de cada alelo en la muestra a estudiar; 2) la madre debe ser heterocigota para los polimorfismos estudiados (madre informativa) y 3) en la mayoría de los

casos sólo cuando la madre es portadora obligada se logró asegurar la asignación o exclusión del estado de portadora en las hijas.

En el presente trabajo las frecuencias obtenidas de dos RFLPs localizados en los intrones 18 y 19 : 18:Bcl-I y 19:Hind-III se compararon con los datos reportados de otros grupos étnicos en los que se había realizado un análisis similar(174,176,180): las frecuencias alélicas para el intron 18 y 19 fueron características y distintivas de la población mestiza, donde para 18:Bcl-I prevalece el alelo B2 (55.17%), en tanto que para 19:Hind-III el alelo H1 (53.45%), con porcentajes que difieren entre un 15-20% con la mayoría de los grupos étnicos. La relación del alelo 18:B1 y 19:H2 de mayor prevalencia, tienen cierto paralelismo con excepción de los Africano-Americano que presentan una inversión tanto en frecuencia como en los alelos predominantes (177,182).

Así mismo, ambos polimorfismos presentaron una frecuencia similar de heterocigocidad siendo de 43.6% que corresponde a 24 de las 55 familias con madres, de ellas sólo 16 familias tienen hijas comprendiendo un total de 26 individuos. En 6 de estas 16 familias no fue posible establecer el carácter de portadora o sana en las hijas, lo que representó el 38.5% (10/26) de las niñas, por no contar con el genotipo del padre. En el 62.5% (10/16) de las familias restantes se concentraron 16 niñas de las cuales 6 (23.0%) se clasificaron como portadoras y 10 (38.5%) como sanas. Colateral a la detección de portadoras, el análisis de RFLPs permitió la identificación de 1 caso donde la mutación ocurrió "*de novo*" en el caso índice. En los casos sin antecedentes heredofamiliares, en múltiples ocasiones, la madre refiere no tener conocimiento de esta enfermedad en la familia, por lo que se considera la posibilidad en México del 30% como índice de mutación de novo. Este evento fue tomado en consideración para el asesoramiento genético.

El índice de heterocigocidad para ambos polimorfismo fue el de mayor uso para la comparación en los datos captados de diferentes grupos étnicos entre las poblaciones que manifiestan esta patología. Se observó una mayor apro-

ximación en 18:Bcl-I con los grupos Anglo-Americanos, Vascos, Indio, Polinesio y Maori, en tanto que para 19:Hind-III fue con los grupos de Vascos e Indios (174,179,177,186).

Para buscar si existe asociación entre el cuadro clínico y polimorfismos o haplotipos se calculó la frecuencia de éstos en los alelos sanos y enfermos, sin embargo no se encontraron diferencias significativas. Estos resultados posiblemente son el reflejo de la alta tasa de mutación que presenta el gen del FVIII, lo que disminuye la posibilidad de ligamiento entre éstas y marcadores genéticos, ya que aparentemente cualquier alelo tiene la misma posibilidad de ser mutado. La importancia del conocimiento de la frecuencia de los alelos en la población estriba principalmente en su potencial aplicabilidad en la genética clínica. Esto adquiere importancia si se considera el hecho de que no existe un tratamiento definitivo para la enfermedad por lo que su prevención mediante el asesoramiento genético y el diagnóstico prenatal es fundamental. A pesar de la importancia de este estudio para la detección de portadoras es necesario implementar nuevas metodologías que permitan la detección directa de las mutaciones en los pacientes y en sus familiares femeninas como el SSCP (polimorfismos conformacionales de cadena sencilla) y la detección de puntos calientes mediante restricción con TaqI (188,190,197).

Considerando que la población analizada en este estudio es la más amplia hasta ahora en México, nuestros datos establecen las frecuencias de polimorfismos y haplotipos para los intrones 18 y 19 más fidedignas con respecto a otros trabajos. Al comparar nuestro trabajo que abarcó un total de 55 familias conteniendo 110 mujeres con los dos únicos trabajos realizados con población mexicana para el intron 18:Bcl-I por investigadores de la Universidad de Nuevo León en la ciudad de Monterrey (198) con una población captada de 8 familias con 27 mujeres, establecen la prevalencia del 67% para el alelo B1 (1.2 Kb por Southern blot) y porcentajes de índice de heterocigocidad de 48.2%, los investigadores en la ciudad de Guadalajara (199) con un total de 5 familias con 15 mujeres en la población cap-

tada manifiestan un índice de heterocigocidad de un 57%, el alelo con mayor prevalencia no es reportado, las diferencias en los índices de heterocigocidad y frecuencia alélica pueden establecerse en base al tamaño de la población estudiada.

Ya que los individuos heterocigotos para 18:Bcl-I coinciden con los heterocigotos para 19:Hind-III, al igual que sucede con los individuos homocigotos para ambos intrones, se establece una fuerte asociación alélica entre los diferentes polimorfismos (174), de aquí se desprende que en la detección de portadoras se recomienda el uso de sólo uno de ellos, en especial el 19:Hind-III el que presenta dos ventajas sobre 18:Bcl-I: a) puede ser analizado en forma directa en geles de agarosa y, b) al presentar un sitio de corte invariante, éste le sirve de control interno en el proceso de digestión. Nuestros estudios demostraron que el polimorfismo de sitios de restricción asociados con la hemofilia A son informativos y permiten el diagnóstico en el 62.5% de las familias informativas y que lo requieren, el resto no contaba con el genotipo paterno. En relación a las familias (32/55=52%) donde los polimorfismos de 18:Bcl-I y 19:Hind-III no fueron informativos, se ha establecido el estudio de otros elementos como son los VNTR en los intrones 13 y 22 (de actual implementación en el laboratorio de Biología Molecular).

Así mismo se establece la identidad de la población mestiza y sus diferencias con otros grupos étnicos.

Algunas dificultades en el análisis de enlace de polimorfismos le son inherentes a la metodología y sólo pueden ser evitadas manteniendo atención y vigilancia en los detalles como pueden ser la mala identificación de la muestra, el no tener disponibles a los miembros de la familia, fallos técnicos como es una restricción parcial, errores en pipeteo, contaminación de sondas, etc., el tener RFLP no informativos, entrecruzamientos, así como el mantener en mente que la paternidad no siempre puede ser establecida (180,191,192,197).

CONCLUSIONES

Mediante nuestro estudio se estableció:

- ◆ Las frecuencias de los polimorfismos fueron:

IVS 18:Bcl-I

B1: 44.82%

B2: 55.17%

IVS 19:Hind-III

H1: 53.45%

H2: 46.55%

- ◆ Las frecuencias de polimorfismo entre población sana y enferma es la misma por lo tanto no existe asociación entre el cuadro clínico y el tipo de polimorfismo.
- ◆ El índice de heterocigocidad para ambos polimorfismos en la población estudiada fue igual 43.6%, por lo que se puede emplear indistintamente cualquiera de ellos para la detección de portadoras.
- ◆ La frecuencia de los polimorfismos fue:

B1/H1 = 1.72%	B2/H1 = 53.45%
B1/H2 = 41.37%	B2/H2 = 3.44%
- ◆ En algunos casos fue posible detectar mutaciones *de novo* por el análisis de RFLPs.
- ◆ Se establece la identidad de la población mestiza y sus diferencias con otros grupos étnicos.

Así mismo dada la frecuencia de heterocigocidad en ambos marcadores éstos pueden ser de gran utilidad en el diagnóstico prenatal y la detección de portadoras en población mexicana.

HOJA DE CAPTACION DE DATOS

I.-FICHA DE IDENTIFICACION

FECHA _____

NOMBRE _____

1.- REGISTRO

123456

2.-LUGAR DE PROCEDENCIA(VERANEXO)

78

3.-DIRECCION COMPLETA _____

4.- EDAD ACTUAL EN AÑOS

.9

5.- ORIGEN ETNICO (VER ANEXO)

PADRE 10

MADRE 11

ABUELO P 12

ABUELA P13

ABUELO M 14

ABUELA M 15

6.-EDAD DEL ABUELO MATERNO AL NACIMIENTO DE LA MADRE

14

7.- EDAD DE LA ABUELA MATERNA AL NACIMIENTO DE LA MADRE

15

8.- EDAD DE MADRE AL NACIMIENTO DEL CASO INDICE

16

9.-TIPO DE HEMOFILIA: 0 = HEMOFILIA A 1 = HEMOFILIA B

17

9a.- SEVERIDAD DE LA HEMOFILIA: 0=SEVERA 1=MODERADA 2= LEVE

18

10.- EDAD DE LAS MANIFESTACIONES CLINICAS EN AÑOS

.19

11.- EDAD AL DIAGNOSTICO DE HEMOFILIA EN AÑOS

.20

12.- CONSANGUINIDAD DE LOS PADRES 0=NO 1= SI 9= SE IGNORA

21

13.- TALLA

22

14.- PESO

23

MOTIVOS DE LA SOSPECHA DIAGNOSTICA

- 15.- SANGRADO_(VER CLAVES) 24
- 16.- HISTORIA FAMILIAR : 0 = NO 1 = SI 9 = SE IGNORA 25

ANTECEDENTES

VARIABLES 17 A 23 ANOTAR EL NUMERO

- 17.- NUMERO DE HERMANOS AFECTADOS 26
- 18.- NUMERO DE HERMANOS SANOS 27
- 19.- NUMERO DE HERMANAS 28
- 20.- NUMERO DE TIOS MATERNOS AFECTADOS 29
- 21.- NUMERO DE TIOS MATERNOS SANOS 30
- 22.- NUMERO DE PRIMOS HERMANOS MATERNOS AFECTADOS 31
- 23.- OTROS FAMILIARES AFECTADOS 32

ANTECEDENTES PERSONALES

VARIABLES 24 Y 25 ANOTAR NUMERO

- 22.- NUMERO DE HOSPITALIZACIONES 32
- 23.- NUMERO DE TRANSFUSIONES 33
- 24.- NUMERO DE APLICACIONES DE CRIOPRECIPITADOS 34
- 25.- NUMERO DE APLICACIONES DE FVIII RECOMBINANTE 35

COMPLICACIONES

26.- AFECTACION EN ARTICULACIONES (VER ANEXO)

□36

27.- INFECCIONES VIRALES (VER ANEXO)

□37

ARBOL GENEALOGICO

26.-ENZIMAS DE RESTRICCION _____

27.-PATRON DE RESTRICCION: _____

28.-PATRON DE SSCP _____

ANEXO DE HOJA DE CAPTACION DE DATOS

VARIABLE 2: LUGAR DE PROCEDENCIA:

- | | |
|---------------------------|----------------------|
| 1.- AGUASCALIENTES | 17.- MORELOS |
| 2.- BAJA CALIFORNIA NORTE | 18.- NAYARIT |
| 3.- BAJA CALIFORNIA SUR | 19.- NUEVO LEON |
| 4.- CAMPECHE | 20.- OAXACA |
| 5.- COAHUILA | 21.- PUEBLA |
| 6.- COLIMA | 22.- QUERETARO |
| 7.- CHIAPAS | 23.- QUINTANA ROO |
| 8.- CHIHUAHUA | 24.- SAN LUIS POTOSI |
| 9.- DISTRITO FEDERAL | 25.- SINALOA |
| 10.- DURANGO | 26.- SONORA |
| 11.- ESTADO DE MEXICO | 27.- TABASCO |
| 12.- GUANAJUATO | 28.- TAMAULIPAS |
| 13.- GUERRERO | 29.- TLAXCALA |
| 14.- HIDALGO | 30.- VERACRUZ |
| 15.- JALISCO | 31.- YUCATAN |
| 16.- MICHOACAN | 32.- ZACATECAS |

VARIABLE 5: ORIGEN ETNICO:

- 1.- MESTIZO (INDIO-ESPAÑOL)

2.- ANGLOSAJON

3.- MEDITERRANEO (FRANCES, ITALIANO, GRIEGO).

4.-JUDIO ASHKENAZAI

5.- SEFARADITA

6.- NEGRO AFRICANO

7.- ARABE

8.- ORIENTAL (CHINO, JAPONES)

9.- OTROS

VARIABLE 15: SANGRADO

1.- MUCOSAS

2.- MUSCULAR

3.- INTRACRANEANA

4.- OTROS

VARIABLE 26 Y 27: COMPLICACIONES

AFECTACION EN ARTICULACIONES

1.- RODILLA

2.- TOBILLO

3.- CODO

4.- HOMBRO

5.- CADERA

6.- MUÑECA

7.- OTROS

INFECCIONES

1.-SIDA

2.-HEPATITIS

3.- OTROS

9.- SE IGNORA

BIBLIOGRAFIA:

1. Evan, J. S. and Dawie, E. W. Hemophilia A, Hemophilia B and von Willebrand Diseases. in *The Molecular basis of Blood Diseases*. Stomatoyannopoulos, G. (Eds). Saunders Company .1987;Cap.XVI:575-630
2. Man, K. G. The assembly of Blood Clotting complex on membranes.TIBS. 1987;.12:229-233
3. Morawitz, P. The chemistry of blood coagulation. *Ergebnisse der Physiologie biologischen Chemi und experimentelle Pharcacologie*.4:307-422. Reimpreso en Harmann R.C. Gunther, P. F.(trad.) 1958, Thomas, Springfield, Illinois.
4. Ratnoff, O. D. The development of knowledge about haemostasis and thrombosis in *Haemostasis and Thromobosis by Bloom, A. L., Forbes, C. L., Thomas, D. P. and Tuddenham E.G.D.* Churchill Livingsstone Company.1994; Cap. I: 3-30
5. Rosemberg, R. F. Physiology of coagulation: The fluid phase in *Hematology of infancy and chilhood* by Nathan, D.G. and Oski, F. A. (eds). Saunders Company. Philadelphia (1987).
6. Davie, E.W., Fujikawa, K., Kisiel, W. The coagulation cascade: Initiation, maintenance and regulation. *Biochemistry*.1991;30:10363-10370
7. Osterud B. and Rapaport, S. Activation of factor IX by reaction product of tissue factor and factor VII. Additional pathway for initiating blood coagulation. *P.N.A.S. USA*. 1977;74:5260-5264
8. Broze, G. J. The lipoprotein-associated coagulation inhibitor that inhibits the factor VII-tissue factor complex also inhibits factor Xa: Insight into its possible mechanism of action. *Blood*. 1988;71:335-400
9. Furie, B. and Furie, B. C. The Molecular basis fo Blood Coagulation. *Cell*.1988; 53:503-518
10. Esmon, C.T. The roles of protein C and thrombomodulin in the regulation of blood coagulation. *J. Biol. Chem*.1989;264:4743-4746.
11. Esmon, C. T., Taylor, F.B., Snow, T.R. Inflammation and coagulation: Linked processes potentially regulated through a common pathway mediated by protein C. *Thrombosis and Haemostasis*.1991;66:160-165

12. Carlson, T.H., Simon, T.L., Atencio, A.C. In vivo behaviour of human radioiodinated antithrombin III: distribution among 3 physiological pools. *Blood* 1985;66: 13-19.
13. Carrel, R.W., Evans, D.L., Stein, P.E. Mobile reactive centre of serpins and the control of thrombosis. *Nature*.1991;353:576-578
14. Rizza, C.R. Haemophilia and related inherited coagulation defects. In *Haemostasis and Thrombosis* by Bloom, A.L., Forbes, C. L., Thomas, D. P., Tuddenham, E. G. D. Churchill Livingstone Company. 1994;Cap.34: 819-841
15. Rosner, F. Hemophilia in the Talmud and Rabbinic writings. *Ann. intern. Med.*1969;70: 833-837
16. Ingram, G.I.G. The history of haemophilia. *J.clin. Path.*1976;29:469-479
17. Patek, A. J. and Taylor, F. H. L. Hemophilia. Some properties of a substance obtained from normal human plasma effective in accelerating the coagulation of hemophilic blood. *J. Clin. Invest.*1937;16: 113-117.
18. Biggs, R., Douglas, A. S., Macfarlane, R.G., Dacie, J. V., Pitney, W. R., Merskey, C. and O'Brien, J. R. Christmas disease: condition previously mistaken for haemophilia. *Brit. Med. J.*1952;2:1378-1381.
19. Aggeler, P. M., White, S. G., Glendenning, M. B., Page, E. W., Leake, T. B., Bates, G. Plasma thromboplastin component (PTC) deficiency: a new disease resembling hemophilia. *Procs. of the Society for Experimental Biology and Medicine.*1952;79:692-694
20. Soulier, J. P., Larrieu, M. J. Differentiation of hemophilia into two groups. *New Engl. J. Med.* 1953;249:547-553
21. Weiss, H.J. and Hoyer, L.W. von Willebrand factor: dissociation from antihemophilic factor procoagulant activity. *Science.*1973;182:1149-1154
22. Gralnick, H. R. And Coller, B.S. Molecular defects in haemophilia a and von Willebrand's disease. *Lancet.*1976;1:837-839
23. Roberts, H.R., Grizzle, J.E., McLester, W.D., Penick, G.D. Genetic variants of hemophilia B: detection by means of specific inhibitor. *J.Clin.Invest.* 1968;47:360-365
24. Yang, H.C., Immunological studies of factor IX (Christmas factor) II. Counter immuno electrophoresis method for factor IX antigen. *Thr. Res.*1978;13:97-109

- 25.Orstavik, K. H., Osterud, B., Prydz, H., Berg, K., Electroimmunoassay of factor IX in hemophilia B. *Thr.Res.*1978;7:373-382
- 26.Thompson, A.R. Factor IX antigen by radioimmunoassay. Abnormal factor IX protein in patients on warfarin therapy and whitr hemophilia B. *J.Clin. Invest.*1977;59:900-910
- 27.Yang, H.C. Immunoradiometric assay of factor IX antigen. *B.J. Haemat.* 1978;39:215-224
- 28.Holmberg, L., Gustavii, B., Cordesius, E., Kristofferson, A.C., Ljung, R., Lofberg. L., Stromberg, R., Nilsson, I.M. Prenatal diagnosis of hemophilia B by an immunoradiometric assay of factor IX. *Blood.*1980;56:397-401
- 29.Choo, K.H., Gould, K.G., Rees, D.J.G., Brownlee, G.G. Molecular cloning of the gene for human antihemophilic factor IX. *Nature.*1982;299:178-180
- 30.Kurachi, K., Davie, E.W. Isolation and characterization of a cDNA coding for human factor IX. *P.N.A.S.USA.*1982;79:6461-6464
- 31.Gitschier, J., Wood, W. Y., Goralks, T. M., Wion, K. L., Chen, E. Y., Eaton, D. H., Vehar, G. A., Capon, D. J., Lawn, R. M. Characteritaton of the human Factor VIII gene. *Nature.*1984;312:326-330
- 32.Graham, J.B. Genetic control of factor VIII. *Lancet.*1980;1:340-342
- 33.Bottema, C. D. K., Ketterlin, R. T., Li, S., Yoon, H-S., Phillips, J. A., and Sommer, S. S. Missense mutations and evolutionary conservation of amino acids: Evidence that many of the amino acids in Factor IX functions as "Spacer" element. *Am. J. Hum. Genet.*1991;49:820-833
- 34.Yoshitake, S., Sehach, G., Foster, D. C., Davie, E. W. and Kurachi, K. Nucleotide sequence of the gene for human Factor IX (antihemophilic Factor B). *Biochemistry.*1985;24:3736-3750
- 35.Baron, M., Norman, D. G., Harvey, T. S., The 3-dimensional structure of the first EGF-like module of human Factor IX comparasion with EGF and TGF- α . *Protein Science.*1992;1:81-90
- 36.Gianelli, F., Green, P. M., High, K. A., Lozier, D. P., Ludwing, M., Ok, K., Reistma, P. M., Goossens,. M., Yoshioka, A., Sommer, S. S. and Brownlee, G. G. He-

- mophilia B: Database of point mutations and short additions and deletions. Nucl. Ac. Research.18.4053-4059 (1990).
- 37.Koeberl, D. D., Battema, C. D. K., Kitterling, R. P., Bridge, P.I., Lillicrap, D. P., Sommer, S. S. Mutations causing haemophilia B direct estimate of underlying rates of spontaneous germ-line transitions transversions, and deletions in a human gene. Am. J. Hum Genet.1990;47:202-217
 - 38.Bottema, C. D. K., Ketterling, R. P., Yoo, H-S., Sommer, S. S. The pattern of Factor IX germ-line mutation in Asians is similar to that of Caucasians. A. J. Hum. Genet.1990;47:835-841
 - 39.Bottema, C. D. K., Bottema, M. J., Ketterling, R. P., Yoon, H-S., Janco, R. L., Phillips, J. A. R., Sommer, S. S. Why does the human Factor IX gene have a G+C content of 40%?. Am. J. Hum. Genet.1991;49:839-850
 - 40.Green, P. M., Montadon, A. J., Bently, D. R., Ljung, R., Nilsson, J. M., Gianelli, F. The incidence and distribution of CpG→TpG transitions in the coagulation Factor IX gene. A fresh load at CpG mutational hot spots. Nucl. Ac.Res.1990; 18:3227-3231
 - 41.Sommer, S. S. Assessing the underlying pattern of human germ-line mutation: lesson from the Factor IX gene. FASEB J.1991;6:2767-2774
 - 42.Gispert, S., Vidaud, M., Vidaud, D. A promoter defect correlates with an abnormal coagulation Factor IX gene expression in a French family (Haemophilia B Leyden). Am. H. Hum. Genet.1989;45:A189
 - 43.Higuchi, M., Kazazian, H-H., Kasch, L., Warren, T. C., McGinniss, M. J., Phillips, J. H. A., Kasper, C., Janco, R., Antorakis, S. E. Molecular characterization of severe hemophilia A suggests that about half the mutations are not within the coding regions and splice junctions of the Factor VIII gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.1991;88:7405-7409
 - 44.Gitschier, J. Maternal duplications associated with gene deletion in sporadic Hemophilia. Am. J. Hum Genet.1988;43:274-279
 - 45.O'Brien, D. P., Pattinson, J. K., Tuddenham, E. G. D. Purification and characterization of Factor VIII 372-Cys: a hypofunctional cofactor from a patient with moderately severe Hemophilia A. Blood.1990;75:1664-1672

46. Gitschier, J., Wood, W. Y., Shuman, M. A., Lawn, R. M. Identification of a missense mutation in the Factor VIII gene of a mild hemophiliac. *Science*. 1986;232:1415-1416
47. Youssoufian, H., Kazazian, H-H., Phillips, D. G., Aronis, S., Tsiftis, G., Brown, V. A., Antorakis, S. E. Recurrent mutations in haemophilia A give evidence for CpG mutation hotspots. *Nature*. 1986;324:380-382
48. Reiner, A. P. and Thompson A. R. Screening for nonsense mutations in patients with severe hemophilia A can provide rapid, direct carrier detection. *Hum. Genet*. 1992;89:88-94
49. Shirna, M., Ware, J., Yoshioka, A. Fukui, H., Fulcher, C. A. An arginine to Cysteine amino acid substitution at a critical thrombin cleavage site in a dysfunctional Factor VIII molecule. *Blood*. 1984;74:1612-1617
50. Higuchi, M., Kochan, L., Schwaab, R., Egli, H., Brackmann, H-H., Horst, J., Olek, K. Molecular defects in hemophilia A: Identification and characterization of mutations in the Factor VIII gene and family analysis. *Blood*. 1989;74:1045-1051
51. Kazazian, H-H., Wong, C., Youssoufian. Haemophilia resulting from de novo insertion of L1 sequences represents a novel mechanism for mutation in man. *Nature*. 1988;332:164-166
52. Legaz, M.E., Schmeer, G., Counts, R.B., and Davie, E. W. Isolation and characterization of human factor VIII (antihemophilic factor). *J. Biol. Chem*. 1973;248:3946-3950
53. Vehar, G.A. and Davie, E.W. Preparation and properties of bovine factor VIII (antihemophilic factor). *Biochem*. 1980;19:401-410
54. Newman, J., Johnson, A.J., Karpatkin, M.H. and Puszkin, S. Methods for the production of clinically effective intermediate and high-purity factor VIII concentrates. *Br. J. Haematol*. 1971;21:1-3
55. Hershgold, E.J., Davison, A.M. and Janszen, M.E. Isolation and some chemical properties of human factor VIII (antihemophilic factor). *J. Lab. Clin. Med*. 1971;77:185-189
56. Griggs, T.S., Cooper, H.A., Webster, W.P., Wagner, R.H., and Brinkhous, K.M. Plasma aggregating factor (bovine) for human platelets: A marker for study of antihemophilic and von Willebrand factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1973;70:2814-2818

57. Counts, R.B., Paskell, S.L., and Elgee, S.K. Disulfide bonds and the quaternary structure of factor VIII/von Willebrand factor. *J.Clin. Invest.*1978;62:702-705
58. Andersson, L.O., and Brown, J.E. Interaction of factor VIII-von Willebrand factor with phospholipid vesicles. *Biochem.J.*1981;200:161-165
59. Lajmanovich, A., Hundry-Clergeon, G., Freyssinet, J.M., and Marguerie, G. Human factor VIII procoagulant activity and phospholipid interaction. *Biochem. Biophys. Acta.*1981;678:132-140
60. Tuddenham, E.G.D., Trabold, N.C., Collins, J.A., and Hoyer, L.W. The properties of factor VIII coagulant activity prepared by immunoabsorbent chromatography. *J.lab.Clin.Med.*1979;93:43-48
61. Fulcher, C.A., Roberts, J.R., Holland, L.Z. and Zimmerman, T.S. Human factor VIII procoagulant protein. Monoclonal antibodies define precursor-product relationships and functional epitopes. *J.Clin.Invest.*1985;76:117-122
62. Fulcher, C.A., and Zimmerman, T.S. Characterization of the human factor VIII procoagulant protein with a heterologous precipitating antibody. *Proc. Natl.Acad. Sci.USA.*1982;79:1648-1653
63. Fass, D.N., Knutson, G.J. and Katzmann, J.A. Monoclonal antibodies to porcine factor VIII coagulant and their use in the isolation of active coagulant protein. *Blood.*1982;59:594-600
64. Weinstein, M.J., Fulcher, C.A., Chute, L.E., and Zimmerman, T.S. Apparent molecular weight of purified human factor VIII procoagulant protein compared with purified and plasma factor VIII procoagulant protein antigen. *Blood.* 1983;62:1114-1117
65. Rotblat, F., O'Brien, O.P., O'Brien, F.J., Goodall, A.H. and Tuddenham, E.G.D. Purification of human factor VIII:C and its characterization by western blotting using monoclonal antibodies. *Biochem.*1985;24:4294-4300
66. Toole, J. Y., Knopf, J. L., Wozney, J. M., Sultzman, L. A., Buecker, J. L., Pittman, D. D., Kaufman, R. J., Brown, E., Shoemaker, C., Orr, E. C., Amphlett, W. G., Foster, W. N., Coe, M. L., Knutson, F. J., Fass, D. N., Hewick, R. M. Molecular cloning of a cDNA encoding human antihemophilic Factor. *Nature.*1984;312:342-347
67. Vehar, G. A., Keyt, B., Eaton, D., Rodriguez, H., O'Brien, D. P., Rotblat, F., Oppermann, H., Keck, R., Wood, W. Y., Harkins, R. N., Tuddenham, E. G., D., Lawn, R. M., Capon, D. I. Structure of human Factor VIII. *Nature.* 1984;312:337-342

68. Wood, W. Y., Capon, D. Y., Simonsen, C. C., Eaton, D. L., Mgitschier, J., Keyt, B., Seeburg, P. H., Smith, D. H., Hollingshead, P., Wion, K. L., Delwart, E., Tuddenham, E. G. D., Vehar, G. A., Lawn, R. M. Expression of active Human Factor VIII from recombinant DNA clones. *Nature*.1984; 312:330-336
69. Poustka, A., Detrich, A., Langenstein, G., Toniolo, D., Warren, S.T., & Lehrach, H. Physical map of Xq27-qter: Localizing the region of the fragile X mutation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1991;88:8302-8306
70. Freije, D., Schlessinger, D. A 1.6 Mb contig of yeast artificial chromosomes around the human factor VIII gene reveals three regions homologous to probes for the DXS115 locus and two for the DXYS64 locus. *Am.J.Human Genet*.1992;51:66-88.
71. Trask, B. J., Massa, H., Kenwrick, S., & Gitschier, J. Mapping of human chromosome Xq28 by two color fluorescence in situ hybridization of DNA sequences to interphase cell nuclei. *Am.J.Human Genet*.1991;48:1-15.
72. Perlman, D., Halvorson, H., A putative signal peptidase recognition site and sequence in eukaryotic and prokaryotic signal peptides. *J.Mol.Biol*. 1983;167:394-396
73. Kornfel, R., Kornfel, S. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Ann. Rev. Biochem*.1985;54:631-660
74. Tuddenham, E.G.D., Trabold, N.S., Collins, J.A., Hoyer, L.W. The properties of factor VIII coagulant activity prepared by immunoadsorbent chromatography. *J.Lab.Clin.Med*. 1979;93:40-53
75. Pittman, D., Walsley, L., Murray, B., Wang, J., Kaufman, R. Analysis of structural requirements for FVIII function using site-directed mutagenesis. *Thrombosis and Haemostasis*.1987;58:804a
76. Gitschier, J., Kogan, S., Levinson, B., Tuddenham, E. G. D. Mutations of Factor VIII cleavages sites in hemophilia A. *Blood*.1988;72:1022-1028
77. O'Brien, D. P. and Tuddenham, G. D. Purification and characterization of Factor VIII 1,689-Cys: A nonfunctional cofactor occurring in a patient with severe Hemophilia A. *Blood*. 1989;73:2117-2122
78. Hoyer, L.W. and Trabold, N.C. The effect of thrombin on human factor VIII. *J.Lab.Clin.Med*.1981;97:50-54

79. Fulcher, C.A., Roberts, J.R. and Zimmerman, T.S. Thrombin protolysis of purified factor VIII procoagulant protein: Correlation of activation with generation of a specific polypeptide. *Blood*.1983;61:807-812
80. Mann, K. G., Nesheim, M. E ., Chueh, W. E., Haley, P., Krishnaswamy, S. The Vitamin K-dependent enzyme complexes. *Blood*.1990;76:1-16
81. Kane, W., Davie, E. Blood coagulation factor V and VIII: structural and functional similarities and their relationships to hemorrhagic and thrombotic disorders. *Blood*.1988; 71:539-555
82. van Dieijen, G., Tans, G., Tosing, J., Hemker, H.C. The role of phospholipid and factor VIIIa in the activation of bovine factor X. *J.Biol.Chem.* 1981;256:3433-3441
83. Kane, W. & Majerus, P. Purification and characterization of human coagulation factor V. *J.Biol.Chem.*1981;256:1002-1006
84. Jenny, R., Pittman, D., Toole, J., Kriz, R., Aldape, R., Hewick, R., Kaufman, R., Mann, K. Complete cDNA and derived amino acid sequence of human FV. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*.1987;84:4846-4856
85. Walker, F.J., Scandella, D., Fay, P.J. Identification of the binding site for Activated protein C on the light chain of factor V and VIII. *J. Biol. Chem.* 1990;265:1484-1489
86. Ortel, T., Takahashi, N., Putnam, F. Structural model of human ceruloplasmin based on internal triplication, hydrophobic/hydrophilic character and secondary structure of domains. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 1984;81:4761-4768
87. Curzon, G., O'Reilly, S. A coupled iron-caeruloplasmin oxidation system. *Bi-chem. Biophys. Res. Com.*1960;2:284-287
88. Goldstein, I., Kaplan, H., Edelson, H., Weissman, G., Caeruloplasmin. A scavenger of superoxide anion radicals. *J. Biol. Chem.*1979; 254:4040-4042
89. Ryden, L., Bjork, Y. Reinvestigation of some physicochemical and chemical properties of caeruloplasmin (ferroxidase). *Biochem.* 1976;15:3411-3416
90. Poole, S., Firtel, R., Lamar, E., Rowekamp, W. Sequence and expression of the discoidin I gene family in dictyostelium discoideum. *J.Mol.Biol.* 1981;153: 273-278
91. Stubbs, J.D., Lekutis, C., Singer, K.L., Bui, A., Yuzuki, D., Srinivasan, U, Parry, G. cDNA cloning of a mouse mammary epithelial cell surface protein reveals the

- existence of epidermal growth factor-like domains linked to factor VIII-like sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1990;87:8417-8421
92. Marchioro, T.L., Hougie, C., Ragde, H., Epstein, R.B., and Thomas, E.D. Hemophilia: Role of organ homografts. *Science.* 1969;163:188-192
93. Webster, W.P., Zukoski, C.F., Hutchin, P., Reddick, R. L., Mandel, S.R., and Penick, G.D. Plasma factor VIII synthesis and control as revealed by canine organ transplantation. *Am. J. Physiol.* 1972;220:1147-1157
94. Storb, R., Marchioro, T.L., Graham, T.C., Willemin, M., Hougie, C., and Thomas, E.D. Canine hemophilia and hemopoietic grafting. *Blood.* 1972;40:234-238
95. Tuddenham, E.G.D., Lazarchick, J., and Hoyer, L.W. Synthesis and release of factor VIII by cultured human endothelial cells. *Br. J. Haematol.* 1981;47:617-622
96. Lewis, J.H., Bontempo, F.A., Spero, J.A., Gorenc, T.J., Ragni, M.V., and Starzl, T. E., Liver transplantation in a hemophiliac. *N. Engl. J. Med.* 1985;312:1189-1191
97. Rall, L.B., Bell, G.I., Caput, D., Truett, M.A., Masiarz, F.R., Najarian, R.C., Valenzuela, P., Anderson, H.D., Din, N., and Hansen, B. Factor VIII:C synthesis in the kidney. *Lancet.* 1985;1:44-48
98. Wion, K.L., Kelly, D., Summerfield, J.A., Tuddenham, E.G.D., and Lawn, R.M. Distribution of factor VIII mRNA and antigen in human liver and other tissues. *Nature.* 1985;317:726-728
99. Kelly, D.A., Summerfield, J.A., Tuddenham, E.G.D. Localization of factor VIII:C:antigen in guinea-pig tissues and isolated liver cell fractions. *Br. J. Haematol.* 1984;56:535-540
100. Zelechowska, M.G., van Mourik, J.A., and Brodniewicz-Proba, T. Ultrastructural localization of factor VIII procoagulant antigen in human liver hepatocytes. *Nature.* 1985;317:729-732
101. Stel, H.V., van der Kwast, Th. H., and Veerman, E.C. Y. Detection of factor VIII/coagulant antigen in human liver tissue. *Nature.* 1983;303:530-533
102. Tuddenham, E.G.D., Lane, R.S., Rotblat, F., Johnson, A.J., Snape, T.J., Middleton, S., and Kernoff, P.B.A. Response to infusions of polyelectrolyte fractionated human factor VIII concentrate in human haemophilia A and von Willebrand's disease. *Br. J. Haematol.* 1982;52:259-264
103. Over, J., Sixma, J. J., Doucet-deBruine, M.H.M., Trieschnigg, A.M.C., Vlooswijk, R.A.A., Beeser-Visser, N.H., and Bouma, B.N. Survival of ¹²⁵iodine-labeled factor

- VIII in normals and patients with classic hemophilia. *J.Clin.Invest.* 1978;62:223-226
- 104.Fass, D.N., Knutson, G.J., Katzmann, J. A. Monoclonal antibodies to porcine factor VIII coagulant and their use in the isolation of active coagulant protein. *Blood.* 1982;59:594-600.
- 105.Mikaelsson, M. E., Forsman, N. , Oswaldsson, U.M. Human factor VIII: A calcium linked protein complex. *Blood.* 1983;62:1006-1015
- 106.Andersson L-O, Forsman N, Huang K et al. Isolation and characterization of human factor VIII: Molecular forms in commercial factor VIII concentrate, cryoprecipitate and plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*1986;83:2979-2983
- 107.Eaton D.L., Hass, P.E., Riddle, L. et als. Characterization of recombinant human factor VIII. *J.Biol.Chem.*1987; 262:3285-3290
- 108.Nordfang, O., Ezban, M. Generation of active coagulation factor VIII from isolated subunits. *J.Biol. Chem.* 1987;263:1115-1118
- 109.Hoyer, L.W. The factor VIII complex: Structure and funtion.*Blood.*1981;58: 1-13
- 110.Tuddenham, E.G.D., Lane, R.S., Rotblat, F.Johnson, A.J., Snape, T.J., Middleton, S., Kernoff, P.A.B. Response to infusions of polyelectrolyte fractionated human factor VIII concentrate in human haemophilia A and von Willebrand's disease. *Br. J. Haematol.* 1982;52:259-267
- 111.Foster P.A., Fulcher, C.A., Houyghton, R.A., Zimmerman, T.S. An immuogenic region within residues Val¹⁶⁷⁰-Glu⁶⁸⁴ of the factor VIII light chain induces antibodies which inhibit binding of factor VIII to von Willebrand factor. *J.Biol.Chem.*1988;263:5230-5234
- 112.Leyte, A., van Schijndell, H., Niehrs, C., Huttner, W., Verbeet, M., Mertens, K., van Mourik, J. Sulphation of Tyr¹⁶⁸⁰ of human blood coagulation factor VIII is essential for the interaction of factor VIII vith von Willebrand factor. *J.Biol.Chem.* 1991;266:740-746
- 113.Kemball-Cook, G., Edwards, S.J., Sewerin, K., Andersson, L.O., Barrowcliffe, T.W. Factor VIII procoagulant protein interacts with phospholipid vesicles via its 80 kD light chain. *Thrombosis and Haemostasis.*1988;60:442-446
- 114.Arai, M., Inaba, H., Higuchi, M. Y cols.:Direct characterization of factor VIII in plasma: Detection of a mutation altering a thrombin cleavage site (arginine 372 histidine). *P.N.S.A.USA.* 1989;86:4277-4281

115. Foster, P. A., Fulcher, C.A., Houghton, R. A., Zimmerman, T. S. Synthetic factor VIII peptides with amino sequences contained within the C2 domain of factor VIII inhibit factor VIII binding to phosphatidyl serine. *Blood*.1990; 75:1999-2004
116. Gitschier, J., Wood, W., Tuddenham, E. Detection and sequence of mutations in the FVIII gene of haemophiliacs. *Nature*.1985; 315:427-430
117. Switzer, M.E., McKee, P.A. Reactions of thrombin with human factor VIII/von Willebrand factor protein. *J. Biol. Chem.* 1980;255:10606-10611
118. Lollar, P., Knutson, G., Fass, D., Activation of porcine FVIII:C by thrombin and FXa. *Biochem.* 1985;24:8056-8059
119. Eaton D., Rodriguez, H., Vehar, G., Proteolytic processing of human FVIII. Correlation of specific cleavages by thrombin FXa and activated protein C with activation and inactivation of Factor VIII coagulant activity. *Biochem.* 1986;25:505-512
120. Eaton D.L., Wood, W., Eaton, D. Hass, P., Hollinshead, P., Wion K., Mather, J., Lawn, R., Vehar, G., Gorman, C. Construction and characterization of an active FVIII variant lacking the central one third of the molecule. *Biochem.* 1986;25: 8343-8347
121. Fulcher, C., Gardiner, J., Griffin, J., et al. Proteolytic inactivation of human FVIII procoagulant protein by activated protein C and its analogy with FV. *Blood*.1984;63:486-490
122. Fay, P.J., Smudzin, T.M., Walker, F.J., Activated protein C catalyzed inactivation of human factor VIII and factor VIIIa: identification of cleavage sites and correlation of proteolysis with cofactor activity. *J. Biol. Chem.* 1991;266:20139-20145
123. Pittman, D., Kaufman, R., Proteolytic requirements for thrombin activation of anti-haemophilic factor (FVIII). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1988;85:2429-2433
124. O'Brien, D.P. Tuddenham, E.G.D. Purification and characterization of factor VIII 1689-Cys: A non-functional cofactor occurring in a patient with severe haemophilia A. *Blood*. 1989;73:2117-2122
125. O'Brien, D.P., Pattinson, J.K., Tuddenham, E.G.D. Purification and characterization of factor VIII 372-Cys: A hypofunctional cofactor from a patient with moderately severe haemophilia A. *Blood*. 1990;75:1664-1672

- 126.Hoyer, L.W., Brekenridge, R.T.: Immunologic studies of antihemophilic factor (AHF, factor VIII): Cross-reacting material in a genetic variant of hemophilia A. *Blood*. 1968;32:962-966
- 127.Denson, K.W.E., Biggs, R.G., Haddon, M.E., Borret, R., Cobb,K.: Two types of haemophilia (A⁺ and A⁻): A study of 48 cases. *Br.J.Haematol* 1969; 17: 163-167
- 128.Reisner, H.M., Price, W.A., Blatt, P.M., Barrow, E.S., Graham, J.B.:Factor VIII coagulant antigen in hemophilic plasma: A comparison of five alloantibodies. *Blood*. 1980;56:615-620
- 129.Fulcher, C. A., Mahonery, S. G., Roberts, J.R., Kasper, C.K., Zimmerman, T.S.:Localization of human factor VIII inhibitor epitopes to two polypeptide fragments. *P.N.S.A.* 1985;82:7728-7730
- 130.Gitschier, J., Wood, W.I., Tuddenham, E. G. D., Shuma, M. A., Goralka, T.M., Chen,E. Y., Lawn, R.M: Detection and sequence of mutations in the factor VIII gene of haemophiliacs. *Nature*. 1985;315:425-427
- 131.Antorakis, S. E., Waber, P. G., Kittur, S. D., Patel, A. S.,Kazazian, Jr. H. H., Mellis, M. A., Counts, R. B., Stamatoyannopoulos, G., Bowie, E. J. W., Fass, D. N., Pittman, D. D., Wozney, J. M., Toole, J. J.,:Hemophilia A. Detetion of molecular defects and of carriers by DNA analysis. *N. Engl. J. Med.* 1985; 313:842-845
- 132.Gitschier, J., Wood, W. Y., Shuma, M. A., Lawn, R. M.: Identification of a missense mutation in the factor VIII gene of a mild hemophiliac. *Science* 1986;232:1415-1418
- 133.Youssoufian, H., Kazazian, Jr. H. H., Phillips, D. G., Aronis, S., Tsiftis, G., Brown, V. A., Antorakis, S. E.: Recurrent mutations in haemophilia A give evidence for CpG mutation hotspots. *Nature*.1986;324: 380-384
- 134.Youssoufian , H., Antorakis, S. E., Aronis, S., Tsiftis, G., Phillipps, D. G., Kazazian, Jr. H. H.: Characterization of five partial deletions of the factor VIII gene. *PNSA*.1987; 84: 3772-2774
- 135.Youssoufian, H., Antorakis, S. E., Bell, W., Griffin, A. M., Kazazian, Jr. H. H.:Nosense and missiense mutations in hemophilia A:Estimation of the relative mutations rate at CG dinucleotides. *Am. J. Hum. Genet.* 1988;42:718-724
- 136.Higuchi, M., Kochhan, L., Schwab, R., Brackmann, H. H., Egli, H., Oleck, K.:Detection of mutation of hemophilia A.*Thromb. Haemost.*1987; 58:336-339

137. Levinson, B., Jancvo, R. L., Phillips III, J., Gitschier, J.: A novel missense mutation in the factor VIII gene identified by analysis of amplified hemophilia DNA sequences. *Nucleic Ac. Res.* 1987;15:9797-9798
138. Antorakis, S. E.: Hemophilia A persistence and gene mutational vulnerability. *Hosp. Pract.* 1987;22:93-99
139. Youssoufian, S. E., Wang, C., Aronis, S., Platokoukis, H., Kazazian Jr., H. H., Antorakis, S. E.: Moderately severe hemophilia A resulting from Glu→Gly substitution in exón 7 of the factor VIII gene. *Am. J. Hum. Genet.* 1990;42:867-872
140. Millar, D. S., Steinbrecher, R.A., Wieland, K. The molecular genetic analysis of haemophilia A; characterization of six partial deletions in the factor VIII gene. *Human Genet.* 1990;86:219-227
141. Tuddenham, E. G. D., Cooper, D. N., Gitschier, J., Higuchi, M., Hoyer, L. W., Yoshioka, A., Peake, Y. R., Schwaab, R., Olek, K., Kazazian, H. H., Lavergne, J. M., Giannelli, F. & Antorakis, S. E.: Haemophilia A: database of nucleotide substitutions, deletions, insertions and rearrangements of the factor VIII gene. *Nucleic Acids Res.* 1991;19:401-410
142. Youusufian, H., Antorakis, S. E., Aronis, S., y cols. Characterization of five partial deletion of the factor VIII gene. *P.N.S.A. USA.* 1987;84:3772-3776
143. Dombroski, B. A., Mathiss, S. L., Nathakimar, E., Scott, A. F., Kazazian, H. H. Jr.: Isolation of a human transposable element. *Science.* 1991;254:1808-1811
144. Pattinson, J. , Millar, D. S., McVey, J., et als.: The molecular genetic analysis of haemophilia A; a directed-search strategy for the detection of point mutations in the human factor VIII gene. *Blood.* 1990;76: 2242-2248
145. Gitschier, J.: Maternal duplication associated with gene deletion in sporadic hemophilia. *A. J. Hum. Genets.* 1988;43:274-279
146. Higuchi, M., Kazazian, Jr., Kassch, L., Warren, T. C., McGinniss, M. J., Phillips III, J. A., Kasper, C., Janco, R., Antorakis, S. E. 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. *P.N.S.A. USA.* 1991;88:7405-7409
147. Naylor, J. A., Green, P. M., Rizza, C. R., Giannelli, F.: Factor VIII gene explains all cases of haemophilia A. *Lancet.* 1992; 340:1066-1068

148. Murru, S., Casula, L., Pecoratra, M., Mori, P., Cao, A., Pirastu, M. Illegitimate recombination produced a duplication within the FVIII gene in a patient with mild hemophilia. *Genomics*.1990;7:115-118
149. Inaba, H., Fujimaki, M., Kazazian, H. H., Antorakis, S. E.: Mild hemophilia A resulting from Arg-to-Leu substitution in exón 26 of the facotr VIII gene. *Human genets*.1989;81:335-338
150. Higuchi, M., Antorakis, S. E., Kasch, y cols.: Towards complete characterization of mild-to-moderate hemophilia A: Detection of the molecular defect in 25 of 29 patients by denaturing gradient gel electrophoresis. *P.N.A.S.USA*. 1991;88:8307-8311
151. Higuchi, M., Kazazian, H. H., Kasch, L., y cols. Molecular characterization of severe haemophilia A: Detection of the molecular defects in 25 or 29 patiens by denaturing gradient gel electrophoresis. *P.N.A.S.,USA*. 1991;88:7405-7409
152. Cooper, D. N., Youssofian, H.: The CpG dinucleotide and human genetic disease. *Human Genetics*.1988;78:151-155
153. Arai, M., Inaba, H., Antorakis, S.E E., y cols. Characterization of a thrombin cleavage site mutation (Arg 1689 to Cys) in the factor VIII gene of two unrelated patients with cross-reacting material-positive hemophilia A. *Blood*.1990; 75:384-389
154. O'Brien, D. P., Tuddenham, E. G. D.: Purification and characterization of factor VIII 1689 Cys: A non-funtional cofactor occurring in a patient with severe haemophilia A. *Blood*.1989;73:2117-2122
155. O'Brien, D. P., Pattinson, J. K., Tuddenham, E. G. D., Purification and characterization of factor VIII 373-Cys: A hypofuntional cofactor from a patient with moderately severe haemophilia A. *Blood*.1990;75:1664-1672
156. Leyte, A., van-Schijndel, H. B., Niehrs, C.: Sulfation of Tyr 1680 of human blood coagulation factor VIII is essential for the interaction of factor VIII with von Willebrand factor. *J.Biol.Chem*. 1991;266:740-746
157. Kaufman, R. J., Wasley, L. C., Dorner, A. J., Synthesis, processing and secretion of recombinant human factor VIII expressed in mammalian cells. *J.Biol.Chem*. 1988;263:6352-6362
158. Copper, D. M., Krawczak, M.: The mutational spectrum of single base-pair substitutions causintg human genetic disease: Patterns and predictions. *Human Genets*.1990;85:55-74

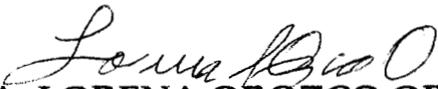
- 159.Higuchi, M., Wong, C., Kochhan, L., Characterization of mutations in the Factor VIII gene by direct sequencing of amplified genomic DNA. *Genomics* 1990;6:65-71
- 160.Krawczak, M., Cooper, D. N., Gene deletions causing human genetic disease: Mechanisms of mutagenesis and the role of the local DNA sequence environment. *Human Genetics*.1991; 86:425-441
- 161.Cooper, D. N., Krawczak, M.:Mechanism of insertional mutagenesis in human genes causing genetic disease.*Human Genetics*.1991;87:409-415
- 162.Graham, J. B., Barrow, E. S., Roberts, H. R.: Dominant inheritance of hemophilia A in three generations of women.*Blood*.1975;46:175-188
- 163.Graham, J. B., Rizza, C.R., Chediak, J.:Carrier detection in hemophilia A: A cooperative international study I. The carrier phenotype.*Blood*.1986;67:1554-1559
- 164.Fillipi, G., Mannucci, P. M., Coppola, R., Farris, A., Rinaldi, A., Siniscalco, M.: Studies on hemophilia A in Sardinia bearing on the problems of multiple allelism, carrier detection and differential mutaton rate in the two sexes. *A.J.Hum. Genetics*.1984;36:44-71
- 165.Barrai, Y., Cann, H. M., Cavalli-Sforza, L. L., Barbujan, G., De Nicola, P.:Segregation analysisof hemophilia A and B. *A. J. Human. Genetics*. 1985;37:680-699
- 166.Winter, R. M., Tuddenham, E. G. D., Goldman, E., Matthews, K. B.:A maximum likelihood estimate of the sex ratio of mutation rates in haemophilia A. *Human Genetics*. 1983;64:156-159
- 167.Thompson, M. W., McInnes, R. R., Willard, H. F. *Genetics in Medicine*.W.B. Saunders Company. 1991;Cap 6-8:115-201
- 168.Saiki, R., Gelfand, D., Stoffel, S., Scharf, S., Higuchi, R., Horn, G., Mullis, K., H., Erlich.:Primer-directed Enzymatic Amplification of DNA with thermoestable DNA polymerase. *Science*. 1988;239:487-491
- 169.Jefferies, A. J., Wilson, V., Thein, S. L.,:Hypervariable minisatellite regions in human DNA. *Nature*.1985;314:67-69
- 170.Lalloz, M. R. A. McVey H. H., Pattinson, J. K., Tuddenham, E. G. D.: Hemophilia A dianosis by analysis of a hypervariable dinucleotide repeat within the human factor VIII gene. *Lancet*:1991; ii:207-211

- 171.Kogan, S.C., Gitschier, J. Detection of hemophilia A mutations near the acidic region of factor VIII by DNA amplification and denaturing gel electrophoresis. *Blood*. 1988;72:300a
- 172.Peake, Y. R., Bowed, D., Bignell, P. Family studies and prenatal diagnosis in severe von Willebrand's disease by polymerase chain reaction amplification of a variable number tandem repeat region of the von Willebrand factor gene. *Blood*. 1990;76:555-561
- 173.Richards, B., heilig, R., Oberle, Y., Storjohann, L., Horn, G.T. Rapid PCR analysis of the ST14 (DXS52) VNTR. *Nucl. Acids Res.*1991;91:1944-1947
- 174.Graham, J. B., Kunkel, G.R., Fowlkes, D. N., Lord, S. T.: The utility of a Hind III polymorphism of factor VIII examined by rapid DNA analysis. *British J. Haemat.* 1990;76:75-59
- 175.Samprieto, M., Yang, Y. Y., Sacchi, E., Mannucci, P. M., Restriction of polymerase chain reaction products for carrier detection and prenatal diagnosis of haemophilia A: description of an internal control.*Thrombosis and Haemostasis* 1990;63:527-528
- 176.Gitschier, J., Drayna, D., Tuddenham, E. D., White, R. L., Lawn, R. L. A Bcl-1 polymorphism in the factor VIII gene enables genetic mapping diagnosis of haemophilia A. *Nature*.1985;314:730-734
- 177.Graham, J. B., Kunkel, G. R., Fowlkes, D.N., Lord, S. T. The utility of a Hind III polymorphism of factor VIII examined by rapid DNA analysis. *Br. J. Haematol.* 1990;76:127-128
- 178.Pattinson, J. K., Millar, D. S., McVery, J. H., Grundy, C. B., Wieland, K., Mibshan, R. S., Martinowitz, U., Tan-Un, K., Vidaud, M., Goossens, M., Smpietro, M., Mannucci, P. M., Krawczak, M., Reiss, J., Zoll, B., Whitmore, D., Bowcock,S., Wensley, R., Ajani, A, Mitchell, V., Rizza, C., Maia, R. Winter, P. Mayne, E. E., Schwartz, M., Green, P. J., Kakkar, V. V. Tuddemhamn, E. G. D. and Cooper, D. N. The molecular genetic analysis of Hemophilia A: A directed search strategy for the detection of point mutationsin the Human Factor VIII. Green, P. M., Bently, D. R., Mibashan, R.S., Nilsson, J. M., Gianelli, F. Molecular pathology of Hemophilia B. *EMBO Journal*.1989;18:1067-1072
- 179.Peake, Y. Linkage analysis in the diagnosis of hemostatic disorders. In *Hae-mostasis and Thrombosis by Bloom, A.L., Forbes, C. L., Thomas, D. P., Tuddenham, E. G. D.*Churchill Livingsstone Company. 1994;Cap. 37: 887-895

180. Tuddenham, E. G. D.; Giannelli, F. Molecular genetics of haemophilia A and B. In *Haemostasis and Thrombosis* by Bloom, A. L., Forbes, C. L., Thomas, D. P., Tuddenham, E. G. D. Churchill Livingstone Company. 1994; Cap 36:859-886
181. Harper, K., Pembrey, M. E., Winter, R. M., Hartley, D., Tuddenham, E. G. D. A clinically useful DNA probe closely linked to haemophilia A. *Lancet*. 1984; ii:6-8
182. Oberle, Y., Camerino, G., Heilig, R. Genetic screening for hemophilia A (classic hemophilia) with a polymorphic probe. *N. Engl. J. Med.* 1985; 312: 682-686
183. Ambriz, F. R., Reyna, M. P., Cruz, M. L., Garcia, M. A., Morales, M. R., Pizzuto, J. Utilidad de los Factores VIII:C y VIII:Ag en la búsqueda de portadoras en Hemofilia clásica. *Rev. Invest. Clin (Mex)*. 1984; 36:257-264
184. Chen, S-H., Yoshitake, S., Chance, P. F., Bray, G. L., Thompson, A. R., Scott, C. R., Kurachi, K. An intragenic deletion of the factor IX gene in a family with hemophilia B. *J. Clin. Invest.* 1985; 76:2161-2164
185. Maniatis, T. Sambrook, J. *Molecular Cloning, a laboratory manual*. 2^a ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA. 1989
186. Lin, S-W., Lin, S-R., Shen, M. Characterization of Genetic Defects of Hemophilia A in patients of Chinese origin. *Genomics*. 1993; 18:496-504
187. Orita, M., Susuki, Y., Sekiya, T., Hayashi, K. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics*. 1989; 5:874-879
188. Orita, M., Iwahana, H., Kanazawa, H., Hayashi, K., Sekiya, T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single strand conformation polymorphisms. *P.N.A.S. USA*. 1989; 86:2766-2770
189. Hoeben, R. C., Einerhand, P. M. W., Briet, E., Von Ormondt, H., Valerio, D., Vander Erb, A. J.: Towards gene therapy in haemophilia A: Retrovirus-mediated transfer of a factor VIII gene into murine haematopoietic progenitor cell. *Thromb. Haemost.* 1992; 67:341-347.
190. Akhmeteli, M.A., Aledort, L.N., Alexiades, S.: Methods for the detection of haemophilia carriers: a memorandum. *Bulletin of the World Health Organization*. 1977; 55:675-702.
191. Graham, J. B., Rizza, C.R., Chediak, J., Mannucci, P.M., Brët, E., Ljung, R., Kasper, C.K., Essien, E.M., Green, P.P.: Carrier detection in hemophilia A. A cooperative international study. I. The carrier phenotype. *Blood* 1986; 67:1554-1559.

- 192.Green. P.P., Mannucci, P.M., Brët, E.,Ljung, R., Kasper, C.K., Essien, E.M., Chediak, J., Rizza, C.R., Graham, J.B: Carrier detection in hemophilia A. A cooperative international study. II. The efficiency of linear discriminants. *Blood*.1986;67:1560-1565.
- 193.Peake, I.R., Newcome, R.G., Davies, B.L., Furlong, R.A., Ludlam, C.A., Bloom, A.L. Carrier detection in haemophilia A by immunological measurement of factor VIII related antigen (VIII:R:Ag) and factor VIII clotting antigen (VIII:C:Ag). *Br.J. Haematol*.1981;48:651-660.
- 194.Miller, C.H., Hilgartner, M.W., Harris, M.B., Bussel, J.B., Aledort, I.M. Concurrence of von Willebrand's disease and hemophilia A: Implications for carrier detection and prevalence. *Am.J. Med.Genet*. 1986;245:83-94.
- 195.Miller, C.H., Aledort, L.M. Discriminant analysis for probability of hemophilia A carriership. *Blood*, 1987;69:704-705.
- 196.Giannelli, F., Anson, D. S., Choo, K. H., Characterisation and use of an intragenic polymorphic marker for detection of carriers of haemophilia B (factor IX deficiency). *Lancet*.1984;i:239-241.
- 197.Tuddenham,E.G.D., Goldman, E., McGraw, A., Kernoff, P.B.A: Haemophilia A: carrier detection and prenatal diagnosis by linkage analysis using DNA polymorphism.*J.Clin.Pathol*.1987;40:971-977.
- 198.Rivera-Perez, J.A., Rojas-Martinez, A., Charles-Garcia, F., Barrera-Saldaña, H.A. Análisis molecular de la hemofilia A en familias del noreste de México. *Rev. Invest.Clin.(Méx.)*.1993;45(1):23-28.
- 199.Carrillo-Perez, M.D., Fragoso-Herrera, R., Cisneros-Vega, B., Amparo-Esparza, M., Cantu, J.M., Montañez-Ojeda, C. Carrier detection of hemophilia A in a Mexican population by two Bcl-I polymorphisms. *Arch. Med.Res. (México)*. 1993;24(2):139-142

El jurado aprobó la presente tesis el día 7 de febrero de 1997


DRA. LORENA OROZCO OROZCO


DRA. SARA FRIAS VAZQUEZ


DR. MIGUEL BETANCOURT RULE
