



**CENUR
NORESTE**

Universidad de la República
Licenciatura en Biología Humana

Informe de Pasantía de Grado
2024

**Inversión de los intrones 1 y 22 del gen *F8*
en familias con Hemofilia A severa de Rivera, Uruguay**

Autor: Valentina Rodríguez Benavides

Tutor: Yasser Vega Requena

Orientador de Pasantía: Yasser Vega Requena

Lugar de realización: PDU Diversidad Genética Humana, CENUR Noreste, sede Tacuarembó.

RESUMEN

La hemofilia A (HA) es una enfermedad hemorrágica hereditaria causada por mutaciones en el gen del factor VIII de coagulación. Se clasifica en severa, moderada y leve según la actividad residual del factor VIII. Las hemorragias en las articulaciones son comunes en pacientes con hemofilia A severa y pueden causar discapacidad permanente. Como causa genética de esta enfermedad, se han descrito más de 3000 mutaciones en el gen *F8*, sin embargo, la inversión en los intrones 1 (INV1) y 22 (INV22) se han reportado en el 40 al 50 % de los casos con HA severa. En América Latina, se han realizado diversos estudios para analizar la prevalencia de las inversiones en los intrones 1 y 22 del gen *F8* en pacientes con hemofilia A severa. Estos estudios han encontrado frecuencias variables de estas inversiones en diferentes países de la región. El objetivo de este estudio fue investigar la presencia de la INV1 y la INV22 del gen *F8* en familias con HA severa del departamento de Rivera, Uruguay. Para ello, se realizó un muestreo de dos familias diagnosticadas con HA severa y se aplicaron la técnica Inverse Shifting PCR (IS-PCR) para identificar tanto INV1 como la INV22 (tipo 1 y 2). En una familia compuesta por 2 varones con hemofilia A severa, y una portadora, se encontró el patrón de bandas en la IS-PCR correspondiente a la ausencia de la INV22 e INV1. En otra familia con un varón con hemofilia A severa y una mujer portadora, se observó el mismo patrón de ausencia de INV22 e INV11 en la amplificación de fragmentos específicos de las pruebas realizadas. En resumen, la identificación de inversiones en los intrones 1 y 22 del gen *F8* es esencial para el manejo y tratamiento adecuado de la hemofilia A severa. Los estudios en América Latina y Uruguay han contribuido a comprender la prevalencia de estas inversiones en la región y a mejorar la atención de los pacientes. Es crucial continuar investigando y colaborando en la identificación de mutaciones genéticas para mejorar la calidad de vida de las personas con hemofilia A.

Palabras clave: Hemofilia A, Factor VIII, Inversiones, Portadoras, Asesoramiento genético

INTRODUCCIÓN

Reseña histórica

Los textos judíos del siglo II después de Cristo serían las referencias más tempranas de una enfermedad que podría tratarse de hemofilia. Existe evidencia sobre una reglamentación del patriarca judío Rabbi Judah eximiendo a ciertos niños varones de la circuncisión, si dos de sus hermanos habían muerto previamente por sangrado después de este procedimiento. También existe evidencia que el Rabino Simón ben Gamaliel exceptuó de este procedimiento a un niño porque los hijos de sus tres tías maternas habían muerto después de efectuada la misma. Esta misma reglamentación también fue aplicada por el médico judío Moses Maimónides (1135-1204) para el caso de los hijos de una mujer que se había casado por segunda vez, ya que supuestamente, habría percibido la naturaleza hereditaria de la enfermedad. El médico árabe Albucasis (1013-1106) fue el primer médico en describir el carácter hereditario de la hemofilia después de apreciar que los varones de una familia morían después de heridas triviales. Conociéndose también otras referencias históricas similares y estos relatos de hemorragias fatales después de cirugías menores en hermanos o primos maternos son característicos de lo que hoy denominamos hemofilia (De Brasi, 2001).

Las primeras descripciones científicas que hacen referencia probable a la hemofilia son del siglo XIX. En el año 1803 el Dr. John Conrad Otto publicó el siguiente informe: "An account of an haemorrhagic disposition existing in certain families" (traducido como: Informe de la disposición hemorrágica existente en ciertas familias) donde se distingue: la tendencia hereditaria de ciertos varones a sangrar, característica típica de la hemofilia. No se puede hablar de la historia de la hemofilia sin destacar que la misma es en ocasiones descrita como la enfermedad real. La Reina Victoria, quien a los doce años fue nombrada reina de Inglaterra a pesar de que ninguno de sus ancestros haya sido afectado, en 1853 dio a luz a su octavo hijo, Leopoldo Duque de Albania, el cual padecía de hemofilia. Siendo este un ejemplo de que la hemofilia puede aparecer por mutación *de novo*. Antes de morir a los 31 años por una hemorragia cerebral luego de una caída, Leopoldo se casó y tuvo una hija llamada Alice, la cual era portadora y tuvo un hijo hemofílico, Rupert quien también falleció a causa de una hemorragia cerebral a los 21 años. Más adelante se logró comprobar que dos de las hijas de la Reina Victoria, Alice y Beatrice, fueron portadoras de hemofilia.

Como era evidente en esa época, los matrimonios se daban entre personas de la realeza y fue así como la enfermedad fue transmitida a través de ellas a muchas familias reales de Europa, incluyendo las de España y Rusia. Como es el ejemplo del matrimonio de Alexandra nieta de la Reina Victoria la cual contrajo matrimonio con Nicolas II, Zar de Rusia, y tuvieron a Tsarevich Alexis, posiblemente el niño con hemofilia más famoso y con la historia más trágica del mundo ya que se han hecho conjeturas que debido a esta enfermedad existieron severas tensiones en la familia Real rusa, desencadenando que Alexis y su familia fueran asesinados por la revolución bolchevique en 1917 (De Brasi, 2001).

Según De Brasi (2001) el gen responsable de la hemofilia en los descendientes de la Reina Victoria se ha perdido, por lo tanto, hoy en día, las familias Reales europeas no se verían afectadas por el mismo. Sin embargo, en el año 2009 fue realizada una investigación la cual combinó técnicas de genética forense a través de la extracción de ADN de los restos óseos de todos los miembros de la familia de Nicolás II Romanov, asesinados en 1918, incluidos los restos de Alexei. Mediante técnicas de biología molecular, lograron concluir que la enfermedad real es una forma grave de hemofilia B, también conocida como “enfermedad de Christmas”, causada por una mutación que crea un sitio de empalme anormal justo antes del exón 4 en el gen *F9* (Rogalev et al., 2009).

No obstante, a la temprana descripción del patrón de herencia y de los síntomas de la hemofilia, en lo que respecta a las bases bioquímicas de la enfermedad no fueron aclaradas sino hasta recién inicios de la década de 1950. En 1937, Patek y Taylor en Harvard, observaron que se podía corregir el defecto en la coagulación de la sangre en hemofílicos en una fracción de la precipitación de plasma normal con ácido débil. En 1944, el Dr. Alfredo Pavlovsky del Instituto de Investigaciones Hematológicas Mariano Castex de la Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires, observó una mutua corrección en un experimento in vitro de las pruebas de coagulación cuando se mezclaba el plasma de dos hemofílicos. En el año 1952 Macfarlane y Biggs en Oxford, describieron el primer caso de hemofilia B, a la cual decidieron llamar enfermedad de Christmas, por ser este el apellido del paciente con deficiencia en el factor IX. Posteriormente, se descubrieron numerosos factores proteicos los cuales actúan funcionalmente en el fenómeno de coagulación. En 1962, se le asigna el nombre de factor VIII, al factor deficiente en la hemofilia A por un Comité Internacional. Y ya para el año 1964 Macfarlane y Ratnoff, desarrollaron de forma independiente el esquema de eventos que desencadena la coagulación sanguínea

nombrándola cascada o catarata de coagulación (De Brasi, 2001).

Características clínicas y genéticas de la Hemofilia

La hemofilia A es un trastorno hereditario recesivo ligado al cromosoma X causada por mutaciones en el gen del factor VIII de coagulación lo que produce una actividad deficiente o defectuosa (hemofilia A) y que afecta 1-2 de 10000 varones en todas las poblaciones humanas (Antonarakis, S. E et al. 1995).

La gravedad de las manifestaciones clínico-hemorrágicas se puede clasificar según el porcentaje residual de actividad de coagulación del factor VIII: grave menor a 1 % (FVIII: C < 1 IU/dL), moderada cuando los valores son de 2 % a 5 % (FVIII: C: 2 - 5 UI/dL) y leve con valores de 6 % a 30 % (FVIII: C: 6 - 30 IU/dL) (Hoyer L. W. 1994).

En consecuencia, aproximadamente el 50 % de los casos de hemofilia A (HA) son severos, 10 % moderados y alrededor de un 40 % son leves. Como resultado del patrón de herencia cromosómico X recesivo, la enfermedad se va a manifestar en el varón, mientras que la mujer heterocigota para la mutación o portadora es generalmente no afectada (ver Figura 1). Ahora bien, cuando una mujer es portadora, en su descendencia resultará que cada uno de sus hijos varones tendrá el 50 % de riesgo de resultar hemofílico y en el caso de tener hijas mujeres el 50 % tendrá la chance de ser portadora. Cuando hablamos de la descendencia de un varón hemofílico, si este tiene hijas mujeres todas ellas resultarán portadoras ya que heredarán de su padre su cromosoma X con el gen del FVIII afectado, pero en el caso de tener hijos varones los mismos no resultan afectados debido a que heredan su cromosoma Y (Plug et al., 2006).

La mayoría de las mujeres portadoras de hemofilia, pueden ver disminuida la actividad del FVIII y mostrar valores del 50 % y menos, asociándose en la mayoría de los casos con un fenotipo de hemofilia leve, debido a esta condición habitualmente sucede que mujeres portadoras luego de ciertas intervenciones médicas, sangran con más frecuencia que mujeres no portadoras (Plug et al., 2006).

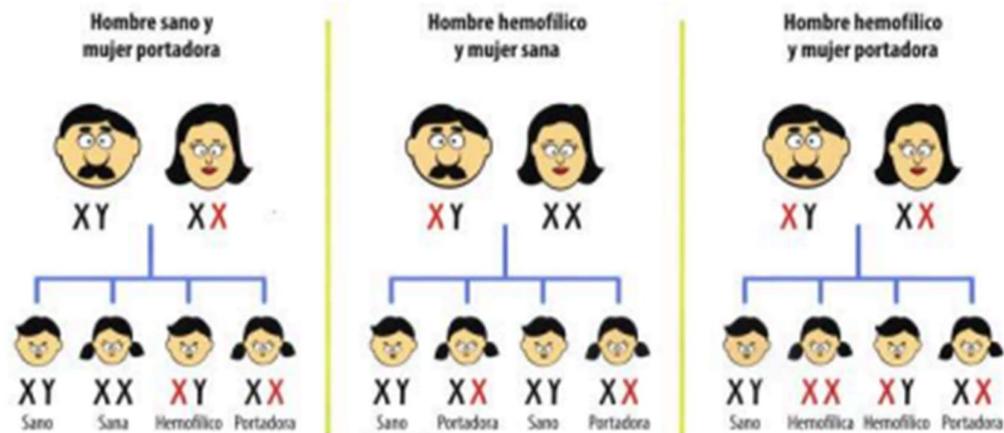


Figura 1: *Modelo de herencia de la Hemofilia A.*
 Tomado de Fedhemo: <https://fedhemo.com/que-es-la-hemofilia/>

En lo que respecta a la sintomatología, se ha observado que las articulaciones (rodillas, codos, tobillos, hombros y caderas) son las regiones del cuerpo afectadas más comúnmente, produciéndose inflamación, dolor, disminución de la función y artritis degenerativa. “La artropatía hemofílica puede producir una afección inflamatoria progresiva que genera limitación del movimiento y discapacidad permanente; las hemorragias musculares pueden causar necrosis y neuropatía; por otra parte, la hemorragia intracraneal muestra ser poco común, pero puede ocurrir luego de algún trauma leve en la cabeza y conlleva severas complicaciones. La hematuria suele ser ocasional y generalmente es indolora, el sangrado de la lengua o laceraciones de los labios es a menudo persistente. Los pacientes con HA severa experimentan sus primeros sangrados articulares, en promedio, entre los 13,8 - 16,1 meses de vida y sangrados generales entre los 9,7 - 10,9 meses” (Carcao et al., 2013).

Como fue mencionado anteriormente los pacientes con hemofilia A manifiestan sangrados espontáneos o postraumáticos en diversas localizaciones del organismo, siendo las más características y frecuentes las de articulaciones (hemartrosis) y músculos, siendo las más afectadas las articulaciones de los tobillos, codos y rodillas, la repetición de dichas hemartrosis determinan en gran parte el deterioro de la calidad de vida, ya que la evolución natural es hacia la artropatía hemofílica de curso crónico e invalidante (Fondo Nacional de Recursos, 2021).

En cuanto al diagnóstico, el análisis genealógico y los niveles de factor VIII de coagulación,

se han usado para diagnosticar a la portadora de hemofilia. A principios de la década de 1980, fue posible determinar el estado de portador por medio del análisis de ADN, que ha evolucionado desde el haplotipado al análisis de mutaciones que ofrece certeza sobre el estado de portador. Se espera que las mujeres portadoras presenten una concentración plasmática de factor VIII correspondiente a la mitad de la concentración encontrada en individuos sanos, lo que generalmente es suficiente para una hemostasia normal. Sin embargo, en las portadoras se observa una amplia gama de niveles de factores de coagulación, desde muy bajos, parecidos a los varones afectados, hasta el límite superior de lo normal. El hecho de presentar en el caso de las mujeres portadoras de hemofilia A una actividad del FVIII de 50 % con respecto a la de un individuo con coagulación sanguínea normal se lo asocia con el fenómeno de Lyonización o de inactivación aleatoria del cromosoma X que tiene lugar en la vida embrionaria temprana. Durante las últimas tres décadas, el asesoramiento genético, las pruebas de portadores y el diagnóstico prenatal de hemofilia se han convertido en una parte importante de la atención integral de la hemofilia (Plug et al. 2019).

Avances e innovaciones en el tratamiento de la Hemofilia A

La hemofilia es una enfermedad rara para la cual los tratamientos terapéuticos aprobados se han mantenido prácticamente sin cambios durante 50 años. Sin embargo, en la última década ha habido una explosión de innovación en las opciones de tratamiento que están en desarrollo o han sido aprobados para la hemofilia, incluidos factores de coagulación diseñados y una amplia gama de nuevos enfoques y modalidades como la terapia génica. Dichos avances en combinación con mejores diagnósticos ahora permiten a los médicos mejorar la calidad de atención para personas con hemofilia (Peters & Harris., 2018).

La primera línea de tratamiento para la hemofilia A severa es la terapia de reemplazo con FVIII i/v y el mismo puede ser administrado bajo dos modalidades, la primera a demanda con la administración de los concentrados sólo ante la aparición de un evento hemorrágico. Y la segunda bajo un uso profiláctico, con la administración de concentrados para disminuir o evitar la presencia de hemorragias articulares. (Fondo Nacional de Recursos, 2021).

El uso de FVIII i/v puede traer complicaciones, dentro de ellas una de las complicaciones más graves, es el desarrollo de aloanticuerpos o inhibidores dirigidos contra el FVIII

exógeno. A pesar de que no conlleva mayor frecuencia de episodios hemorrágicos, si dificulta el manejo de estos y su aparición repercute severamente en la calidad de vida del paciente y aumenta considerablemente el costo del tratamiento de esta enfermedad. Alrededor de un tercio de los pacientes con hemofilia A severa desarrollarán un inhibidor. Los inhibidores se clasifican en inhibidores de baja respuesta (< 5 Unidades Bethesda) y de alta respuesta (igual o > 5 Unidades Bethesda). (*Fondo Nacional de Recursos*, 2021). Cuando un paciente desarrolla un inhibidor, el tratamiento terapéutico consiste en la realización de la Terapia de Inducción a la Inmunotolerancia (ITI) que se basa en la administración de infusiones diarias repetidas de FVIII hasta la erradicación del inhibidor, con una tasa de respuesta de 60-80 %. Por otra parte, el Emicizumab es un anticuerpo monoclonal que imita la función de cofactor del FVIII, promoviendo así la activación del FX, lo que permite el desarrollo de un coágulo estable de fibrina. Los inhibidores del FVIII, no tienen la capacidad de unirse al Emicizumab, por lo tanto, no pueden neutralizar la actividad de esta molécula y su uso se encuentra aprobado para prevenir hemorragias en Hemofilia A con inhibidores del factor VIII y Hemofilia A severa (FVIII $< 1\%$) sin inhibidores del FVIII. Se ha demostrado a través de ensayos clínicos que el uso de Emicizumab en pacientes con hemofilia A, con y sin inhibidores son seguros y ofrecen protección contra hemorragias que ofrece este agente. (FNR, 2021).

El papel del factor VIII en la coagulación de la sangre

La coagulación sanguínea normalmente se produce a través de una serie de reacciones enzimáticas secuenciales en las que los cofactores de proteínas (factor V y factor VIII) tienen una función esencial. El factor VIII circula en el plasma en un complejo no covalente con el factor Von Willebrand (FVW), esta propiedad mejora la síntesis del factor VIII, lo protege de la proteólisis, y lo concentra en sitios de hemostasia activa.

Esta asociación del factor VIII con el FVW, causó confusión durante muchos años, y la distinción entre los dos factores no se apreció en general hasta mediados de la década de 1970 (Hoyer, 1994).

El papel del factor VIII en la coagulación es actuar como co-factor esencial para la activación del factor X (FX), que produce el FIX activado (FIXa) sobre una superficie fosfolipídica, amplificando el estímulo de coagulación (van Dieijen et al., 1981). El factor VIII plasmático hasta no ser liberado del complejo no covalente que forma con el FVW

dado que la interacción con el factor von Willebrand inhibe su unión a las superficies de fosfolípidos. Sin embargo, la formación del complejo no covalente permite concentrar el factor VIII en los sitios de lesión vascular a través de la unión del factor de von Willebrand a las proteínas de la matriz subendotelial. Sin embargo, la posterior separación del FVW permite que el factor VIII se una a las superficies de fosfolípidos de las células dañadas y a las plaquetas activadas adherentes (Hoyer, 1994).

Ubicación y estructura del gen del factor VIII de coagulación

El gen que codifica para el factor VIII, se encuentra localizado en el extremo distal del brazo largo del cromosoma X en la región Xq28, siendo uno de los genes de mayor tamaño caracterizado en humanos hasta el momento, comprendiendo cerca de 186 kilobases (Kb). El ADN codificante está distribuido en 26 exones con tamaños comprendidos entre 69 y 3106 pares de bases, las cuales se transcriben en un ARN mensajero de aproximadamente 9 Kb en total. Los intrones ocupan aproximadamente 177 Kb y entre los cuales el intrón 22 es el de mayor tamaño (Gitschier et al, 1984).

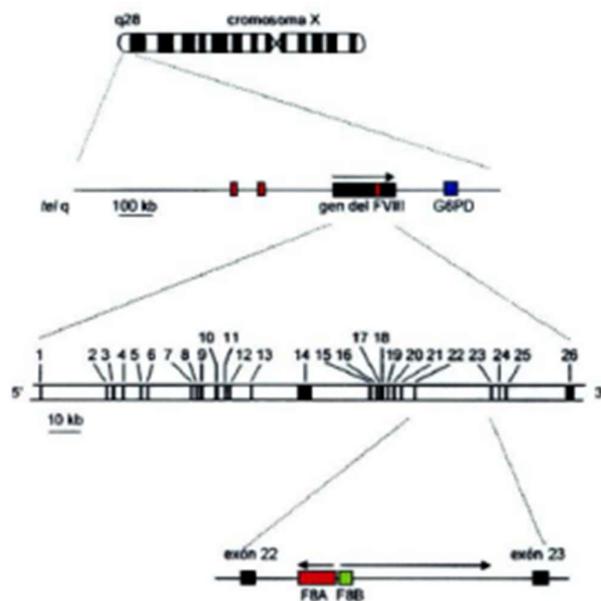


Figura 2. Localización y estructura del gen F8

Tomado de: De Brasi, 2021

Mutaciones en el gen *F8*

Desde el año 1966, el sitio web HAMSTeRS (sitio de mutación, búsqueda, prueba y recursos de la hemofilia A) ha proporcionado un recurso en línea para acceder a los datos sobre la patología molecular de la hemofilia A. En el mismo se pueden observar las diferentes mutaciones que causan Hemofilia A severa, moderada y leve, incluyendo casi todo tipo de mutaciones: deleciones grandes y deleciones pequeñas, inserciones duplicaciones que producen un cambio del marco de lectura (frameshift), mutaciones puntuales que causan falso sentido (missense), o aparición prematura de codones de terminación. Llamadas mutaciones de no-sentido (nonsense), o mutaciones que afectan secuencias clave como por ejemplo en la región promotora (De Brassi, 2001). Actualmente la base de datos HAMSTeRS migró a las bases de datos del Centre for Disease Control and Prevention (CDC), denominada CHAMP mutation list y la base de datos de The European Association for Haemophilia and Allied Disorders (EAHAD) (McVey JH et al., 2020).

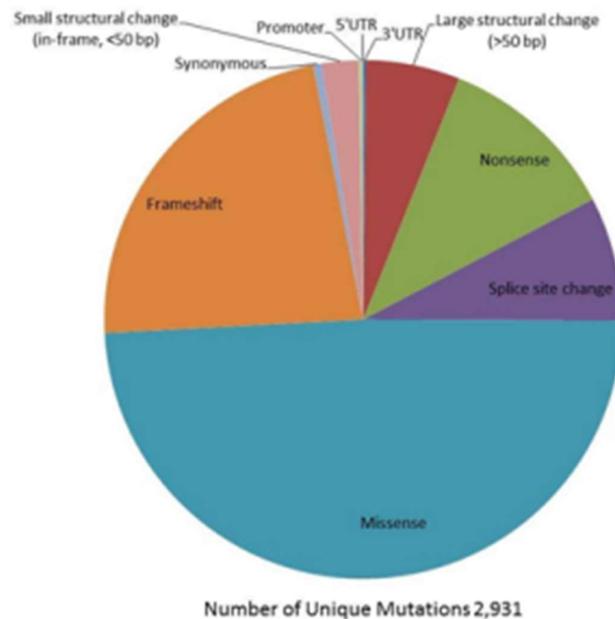


Figura 3. *Frecuencia de diferentes mutaciones en el gen *F8**
Tomado de: CHAMP mutation list.

Tipo de mutación	Severa ¹ FVIII:C < 1%	Moderada ¹ 1 < FVIII:C < 5%	Leve ¹ 5% < FVIII:C < 25%
Inversiones Inv22	distal 7% proximal 35% raros < 0.5% Total 42% ²		
Mutaciones Puntuales	falso sentido 19% no-sentido 7% sitio splicing 4% Total 30%	falso sentido > 95% sitio splicing	falso sentido > 98%
Deleciones	grandes (> 0,2kb) 16% pequeñas (< 0,2kb) 4% Total 20%	grandes (> 0,2kb)	
Inserciones	de una bp 2% LINE-1 < 1% Total 3%		

TABLA 1. *Mutaciones que causan Hemofilia A severa, moderada y leve*
Tomado de: De Brasi, 2001

En la Tabla 1 el autor menciona la particularidad de que las familias afectadas poseen su propia alteración, debido al hecho que las mutaciones heterogéneas se aprecian raramente en individuos no emparentados. Otro punto para destacar en la tabla 1 es el hecho de que, de todas las mutaciones descritas, se observa que casi la mitad de los casos de hemofilia A severa en el mundo se ve causada por inversiones en el intrón 1 (INV1) y en el intrón 22 (INV22), apareciendo con más frecuencia la llamada inversión del intrón 22 (De Brasi, 2001).

Mecanismo de las inversiones

Como fue mencionado anteriormente casi la mitad de las HA severas en el mundo están asociadas a inversiones del F8, la inversión del intrón 22 y del intrón 1.

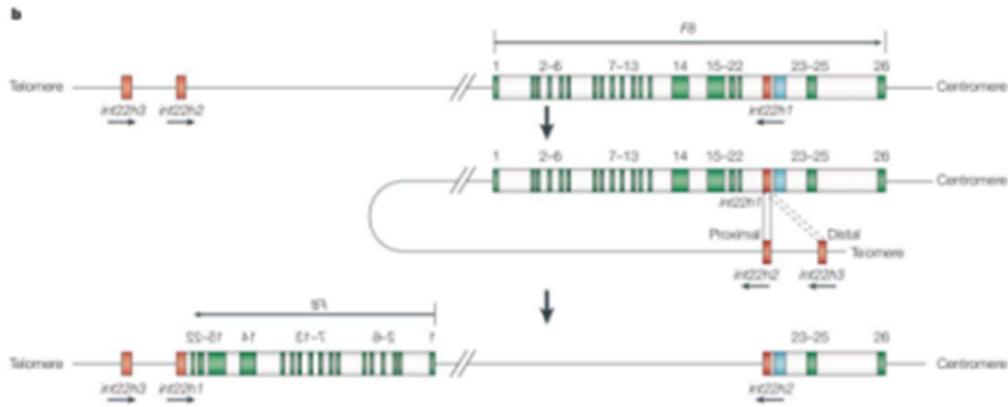


Figura 4. Mecanismo de la inversión 22 tipo 1 y tipo 2

Tomado de Graw, 2005

Como se muestra en la figura 4, en el intrón 22 del gen del factor VIII de coagulación lo que sucede es que se encuentra una secuencia de 9,5 kb (int22h-1) la cual posee dos copias extra génicas (int22h-2 y -3) a una distancia de alrededor de 500 kb a 600 kb del gen *F8*. Estas copias promueven la recombinación intracromosómica. La inversión 22 posee dos tipos de inversión, siendo inv22 de tipo 1 cuando existe recombinación con el (int22-3), es decir cuando existe recombinación con el extremo más distal, y puede ser inv22 tipo 2 cuando la recombinación se da con el extremo más proximal, es decir con el homólogo (int22-2) (Rossiter et al., 1994).

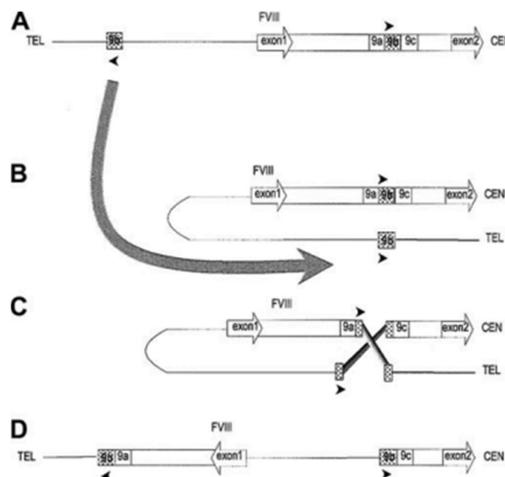


Figura 5. Mecanismo de la inversión 1 (Inv1)

Tomado de Bagnal, et al., 2002

En lo que refiere a la inversión del intrón 1 (INV1) dicho intrón posee una secuencia (int1h-1) de aproximadamente 1041 pb, con una copia extragénica (int1h-2) alrededor de 140 kb más teloméricamente, las cuales recombinan generando la inversión 1 (Bagnall et al., 2002).

Antecedentes

Los estudios realizados en pacientes con hemofilia A en el mundo son numerosos, un estudio realizado en el Sur de Brasil en pacientes con hemofilia A severa no emparentados, donde la muestra analizada en cuanto a la presencia de inversión en el intrón 1 fue de 77 individuos y de la inversión en el intrón 22 fue de 39 individuos, con el objetivo de establecer la prevalencia de las inversiones en los intrones 1 y 22 del gen del factor VIII en pacientes con hemofilia A severa, relacionándola con el desarrollo de inhibidores, así como comparar los resultados encontrados con datos de la literatura en el mundo (Correa et al., 2020).

Determinando que la prevalencia de estas fue de 2,6% en el caso de la inversión 1 y 41% en el caso de la inversión 22. Los autores lograron determinar que ningún paciente con la inversión en el intrón 1 presentó inhibidores, aunque concluyen que el pequeño número de casos de estos no permitió un análisis estadístico para la correlación con el riesgo a desarrollar inhibidores, mientras 26,3% de los pacientes con la inversión en el intrón 22 desarrollaron anticuerpos (Correa et al., 2020).

Se estudiaron un total de 30 pacientes con el objetivo de determinar la frecuencia de la inversión de los intrones 1 y 22 del gen del factor VIII de la coagulación en menores de 18 años con hemofilia A severa en Bogotá (Colombia). Los resultados arrojaron que 12 pacientes (40%) poseían la inversión 22 y 3 pacientes la inversión 1, por lo que se encontraron las inversiones de los intrones 1 y 22 en la mitad de los pacientes evaluados. Los resultados son reproducibles, por lo que constituyen una herramienta útil para la identificación de las dos mutaciones más frecuentes en hemofilia A severa (Garcés et al., 2017).

En lo que respecta a Argentina un estudio realizado con el fin de analizar la presencia de Inv1 en un grupo de 64 familias argentinas afectadas por HA severa, obtuvo como resultado el encontrar solo un caso positivo para la misma (Rossetti, et al. 2004). En cuanto a la

inversión 22 se estudiaron 34 individuos (15 afectados y 19 familiares) pertenecientes a 13 familias afectadas por HAS, en 7 de ellas (53%) se detectó la Inv22 de tipo 1 como mutación causal de la enfermedad, no se detectaron familias con la Inv22 de tipo 2. Por lo que los autores destacan que dichos datos permiten determinar que la incidencia hallada en dicha población de familias con HAS para la inversión del intrón 22 del gen del FVIII se encuentra dentro de los valores promedio reportados en la literatura internacional (De Brassi et al., 2000).

Para el caso de México un análisis con el fin de determinar las frecuencias de ambas inversiones en pacientes con HA severa y comparar estos datos con otras poblaciones de HA. Donde la muestra comprendió 44 pacientes de 31 familias de HA grave para la detección de inv22 y 94 pacientes de 65 familias para detectar inv1 se encontró una frecuencia del 45% para los pacientes con inv22 y ningún inv1 positivo (0%). Estas frecuencias no fueron estadísticamente diferentes de otras poblaciones (Mantilla, et al. 2007).

En nuestro país se estudiaron un total de 14 individuos (ocho pacientes con HA severa, cuatro madres y dos hermanas) de un total de cinco familias no emparentadas del noreste de Uruguay, de las ciudades de Tacuarembó, Rivera y Melo. Donde se encontró que, en una familia perteneciente de la ciudad de Rivera, un paciente resultó positivo para la inv22 de tipo 1 y su madre resultó positiva para dicha inversión confirmando su estado de portadora. Y a su vez en el departamento de Tacuarembó dos pacientes (hermanos entre ellos) resultaron positivos para la inv1 y su madre y hermana resultaron también positivas para dicha inversión por lo cual confirmaron su estado de portadoras. Por lo tanto, dichos resultados permiten exponer de forma preliminar que la estimación de las frecuencias para ambas inversiones fue de un 40%, 20% para la inv22 (1/5 de las familias estudiadas) y 20% para la inv1 (1/5 de las familias estudiadas) (Vega et al., 2020).

Los autores destacan que si bien estos resultados resultan preliminares ya que son un primer reporte de 5 familias estudiadas, pero teniendo en cuenta la baja densidad de la población en el área de estudio y el número de individuos estudiados en dicha región es pequeño en comparación con series similares de países como Argentina y Brasil y que por las razones mencionadas no resultan extrapolables sin embargo, consideran que es interesante observar que un estudio realizado en Argentina en 80 familias con HA severa, se muestra una frecuencia de 46% para ambas inversiones. Y en lo que respecta a Brasil, mencionan que

en tres estudios realizados que incluyeron a 189 familias, se observó también una frecuencia en promedio de 46%, lo cual dista en apenas un 6% de esta primera aproximación obtenida en el noreste de Uruguay (Vega et al., 2020).

Por otro lado, cabe resaltar que en el estudio mencionado anteriormente fue detectada una portadora para la INV1 cuya actividad del factor VIII de coagulación era del 97%, por lo que se sospechaba la ausencia de dicha inversión y sin embargo el estudio molecular permitió la detección de esta. Los investigadores destacan que la correcta caracterización de las portadoras resulta fundamental en el correcto manejo de la hemofilia permitiendo el adecuado asesoramiento genético de las familias.

Justificación y planteamiento del problema

Luego de la revisión bibliográfica se puede concluir que resulta sumamente importante la caracterización genética de la hemofilia A ya que permite un seguimiento adecuado del paciente, además permite la identificación de las portadoras, lo cual posibilita el asesoramiento genético de las familias. Esta investigación aporta conocimiento sobre la distribución de los tipos de mutaciones que causan hemofilia A en la población de Uruguay. Esto resulta beneficioso, ya que permite un incremento del conocimiento sobre esta patología en el país y en la región.

Objetivos:

General:

Detectar la presencia de las Inversiones 1 y 22 (tipo 1 y 2) del gen *F8* en familias con Hemofilia A severa del departamento de Rivera, Uruguay.

Específicos:

Estudiar la presencia de la inversión de los intrones 1 y 22 (tipo 1 y 2) del gen del factor VIII de la coagulación en los casos índice con hemofilia A severa en dichas familias.

Identificar la presencia de portadoras de la inversión de los intrones 1 y 22 (tipo 1 y 2) del

gen F8 en las familias estudiadas.

Describir la proporción de familias con las Inversiones 1 y 22 (tipo 1 y 2) del gen F8 del departamento de Rivera como causa de la hemofilia.

METODOLOGÍA

Se realizó una encuesta a los individuos y se recabó información de las historias clínicas para obtener datos bioquímicos y genealógicos, posteriormente, se obtuvieron muestras de sangre periférica de 5 individuos pertenecientes a 2 familias no relacionadas oriundas de Rivera. Dichos individuos son atendidos en el Hospital Departamental de Rivera. Fueron estudiados, en la familia 1: 2 varones diagnosticados con hemofilia A severa (tío y sobrino) y 1 mujer portadora. En la familia 2: 1 varón y 1 mujer portadora.

Aspectos bioéticos

La obtención de la información de las familias se obtuvo bajo consentimiento informado aprobado por el Comité de Ética de la Investigación Científica de la Facultad de Humanidades y Ciencias de la Educación con número de expediente 121900-000602-19 (anexos 1 y 2). El procedimiento de muestreo se realizó bajo la autorización y supervisión del médico tratante y la obtención de las muestras de sangre fue realizada por el personal de hemoterapia del Hospital Departamental de Rivera.

Se garantizó la confidencialidad de los datos asignando una numeración a las muestras de las familias por lo que no se manejan datos personales durante el trabajo, Asimismo, los individuos fueron debidamente informados de que sus datos serían resguardados de manera segura en el PDU de Diversidad Genética Humana, del Centro Universitario de Tacuarembó, UdelaR y solo se utilizarían con fines de investigación. En el caso de los menores que participaron en el estudio, el consentimiento informado fue otorgado por sus padres o tutores legales, quienes son los responsables de autorizar su participación en la investigación. Todo este procedimiento también se realizó bajo la autorización del médico tratante.

Extracción y verificación de la calidad del ADN:

Se realizó la extracción del ADN de leucocitos de sangre periférica utilizando el método de salting-out y precipitación alcohólica (Ver anexo3) (Lahiri & Nürnberg, 1991). Se cuantificó el ADN con un método fluorométrico (Qubit) y se verificaron los parámetros de calidad como lo son las relaciones 260/280 y 260/230 con un método espectrofotométrico (Nanodrop).

Para verificar la integridad del ADN se realizó una corrida de electroforesis en gel de agarosa al 1 % y se analizaron las bandas con el marcador de peso molecular (Ladder) Lambda/Hind III, como se muestra en la figura 6.

La detección de las inversiones se realizó utilizando las pruebas de inverse shifting - PCR (Rossetti et al 2004), cuyo protocolo se explica en el anexo 4. Todos los protocolos moleculares se realizaron en el PDU de Diversidad Genética Humana del CENUR Noreste - sede Tacuarembó.

La aproximación a la proporción de familias con las Inversiones 1 y 22 (tipo 1 y 2) del gen F8 del departamento de Rivera, se realizó con los datos de los 3 pacientes con hemofilia A severa estudiados en este trabajo y con información de una investigación previa (Vega et al., 2020) donde se estudió a una familia de la ciudad de Tranqueras, Rivera. De esta manera, se incluyó información de 4 pacientes, lo que representa el 80 % (4/5) de los pacientes con hemofilia A severa esperados para la población del departamento de Rivera.

RESULTADOS

Análisis de la calidad del ADN

Las concentraciones del ADN obtenidas van desde 106,86 ng/ul a 340,7 ng/ul, teniendo en cuenta que uno de los requerimientos del protocolo es una concentración de por lo menos 100 ng/ul dichos valores fueron óptimos.

Muestra	Concentración (ng/uL)
125	106.86
108	340.70
107	168.10
103	130.53
102	180,20

Tabla 2. *Concentración de ADN genómico obtenida por método fluorométrico*

La integridad del ADN mostró estar en un estado óptimo en todas las muestras, dada su observación en el gel de agarosa al 1 % (Figura 6) donde se observa que la mayor parte de ADN genómico extraído se encuentra sobre el tamaño de 23.130 kb, representado por la banda de mayor peso molecular del marcador de peso molecular. Este es un requerimiento fundamental ya que para la IS-PCR se requieren fragmentos > 21 kb.

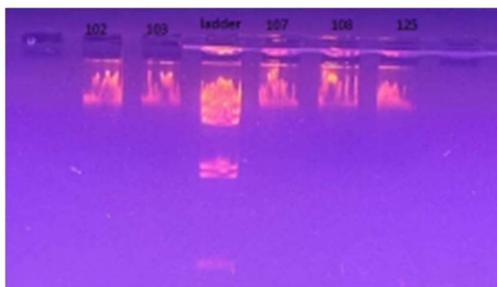


Figura 6. *ADNg en gel de agarosa al 1 %*

Leyenda: Familia 1: 102, 103 y 125. Familia 2: 107 y 108

La pureza del ADNg, representada por las relaciones de absorbancia 260/280 nm y 260/230 nm mostraron valores óptimos, como se observa en la siguiente tabla y en la figura 7.

Muestra	A260/280	A 260/230
125	1,9924	6,5746
108	1,9027	2,5550
107	1,9441	3,6383
103	1,9598	4,9327
102	1,9260	3,3839

Tabla 3. *Relaciones de Absorbancia*

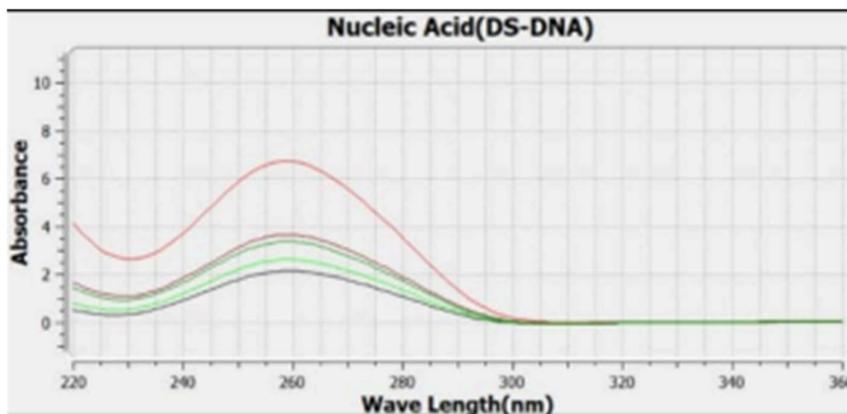


Figura 7. *Gráfico de Absorbancia del ADNg a 260 nm*

Leyenda: Las líneas de colores representan las 5 muestras, 102, 103, 107, 108 y 125 donde se observa el pico de absorbancia a 260 nm indicando la pureza del ADN en la muestra.

Pruebas Inverse Shifting - PCR (IS-PCR)

En la familia 1, en la cual se estudió a dos varones (tío y sobrino) y a una portadora, no se observó la presencia de la INV22 y la INV1, encontrándose las señales de amplificación de los fragmentos de 487 pares de bases (pb) (Figura 10) en la prueba diagnóstica de INV22, las señales de 405/457 pb en la prueba complementaria de la INV22 (Figura 11) y la señal de 304 pb de INV1 (Figura 12).

En la familia 2, conformada por 1 varón con hemofilia A severa y una mujer portadora, siendo su parentesco el de padre e hija se observó la ausencia de INV22 e INV1, representados por los patrones de bandas en el gel de poliacrilamida que mostraron los fragmentos de 487 pares de bases (pb) en la prueba diagnóstica de INV22 (Figura 7), las señales de 405/457 pb en la prueba complementaria de INV22 (Figura 12) y la señal de 304 pb de INV1(Figura 11).

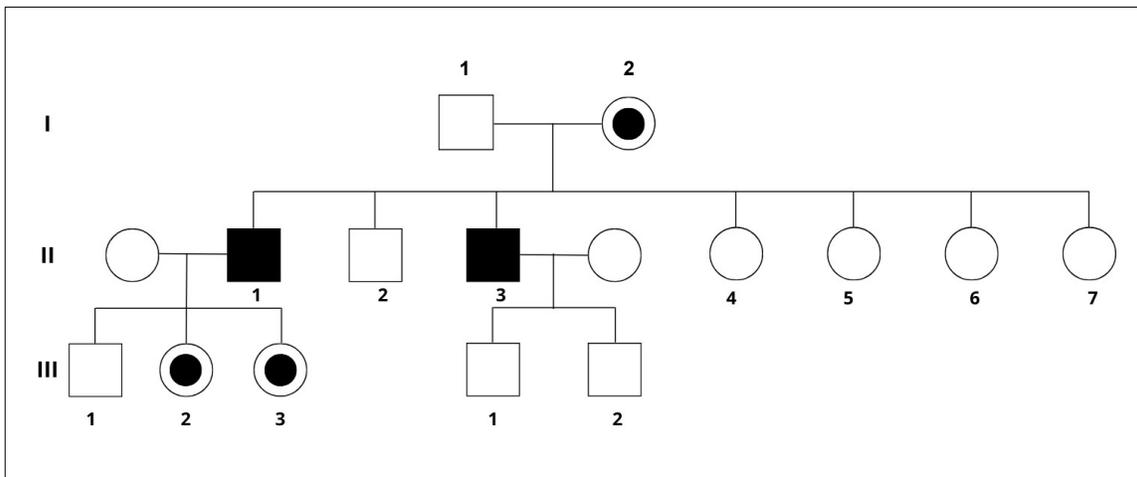


Figura 8: Genealogía de la familia 1

Leyenda: En la figura se muestra la genealogía de la familia 1. En la primera generación, el individuo número 2 es una portadora obligada de la mutación, aunque no se tuvo acceso a su información directa. Esta conclusión se basa en el hecho de que dos de sus hijos varones en la segunda generación son hemofílicos: el paciente afectado **II-1** (muestra 107 HAS) y el individuo número 3, quien no fue incluido. En la tercera generación, hay dos portadoras obligadas, ya que el cromosoma X heredado de su padre contiene la mutación, una es la muestra estudiada 108 (**III-2**)

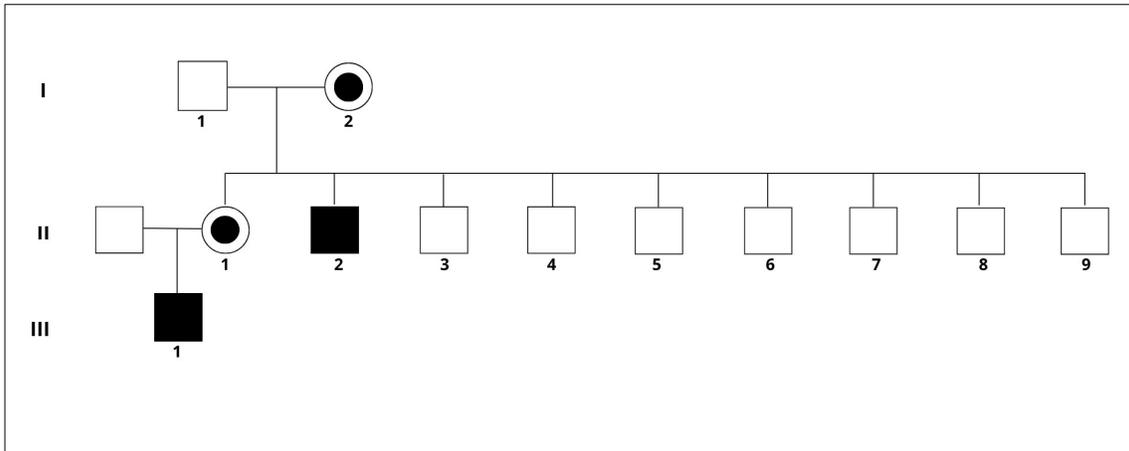


Figura 9. *Genealogía de la familia 2*

Leyenda: En la figura se observa en la generación 1 a una portadora obligada, dado que su descendencia incluye un hijo hemofílico (muestra 103 HAS), representado con el **II-2** en la segunda generación, y una hija portadora (muestra 125 HAPP), representada con el número **II-1**. Esta hija, a su vez, tuvo un hijo hemofílico en la tercera generación **III-1** (muestra 102), como se muestra en la imagen.

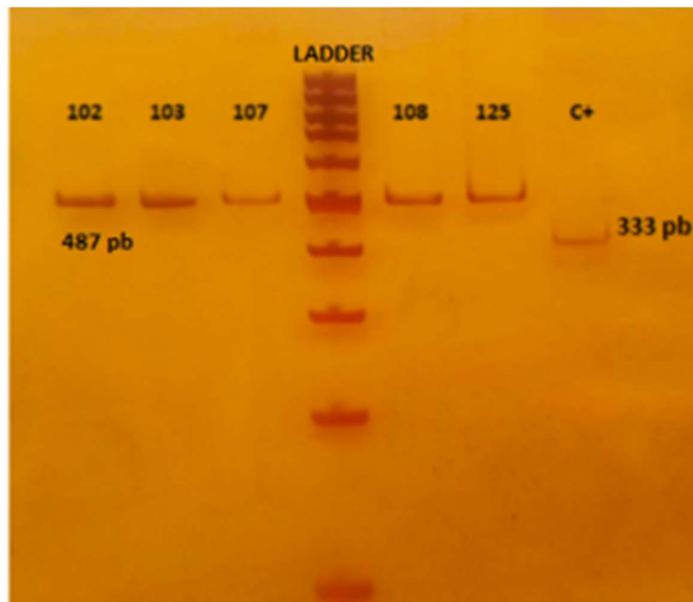


Figura 10. *Gel de poliacrilamida al 8%. Prueba Diagnóstica de la INV22*

Leyenda: **Familia 1:** 102, 103 y 125. **Familia 2:** 107 y 108. C+: Control positivo INV22.

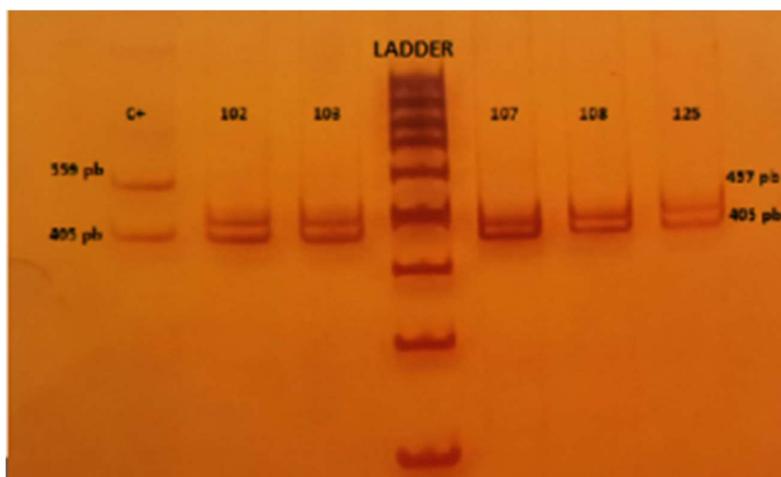


Figura 11. *Gel de poliacrilamida para Prueba Complementaria de la INV22*
 Leyenda: **Familia 1:** 102, 103 y 125. **Familia 2:** 107 y 108. C+: Control positivo INV22.

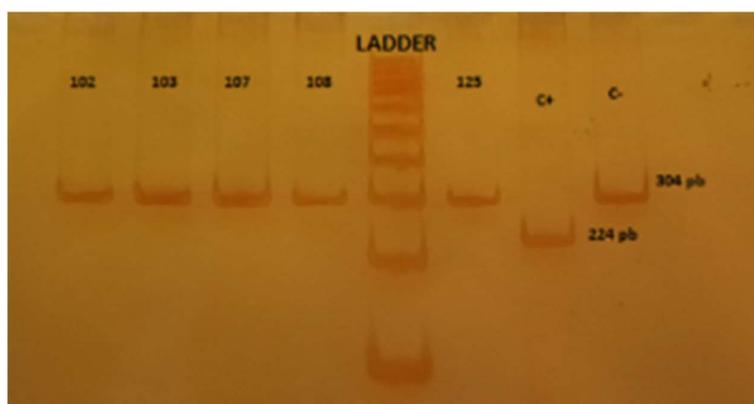


Figura 12. *Gel de poliacrilamida para interpretación de la INV1*
 Leyenda: **Familia 1:** 102, 103 y 125. **Familia 2:** 107 y 108. C+: Control positivo INV1

DISCUSIÓN

Diversos países de América Latina han realizado estudios para determinar la frecuencia de las inversiones en los intrones 1 y 22 del gen *F8* en pacientes con hemofilia A severa, siendo importante para el diagnóstico y manejo de la enfermedad. En este contexto, este estudio se enfocó en investigar la presencia de inversiones en el gen *F8* en pacientes con hemofilia A severa y sus portadoras en el departamento de Rivera, Uruguay, donde se pudo encontrar que en las familias estudiadas no se detectó la presencia de la INV22 ni la INV1. Sin embargo, resultados preliminares muestran una frecuencia de un 40% para la región noreste de Uruguay para ambas inversiones. Es importante destacar que ya se había detectado la presencia de la INV22 tipo 1 en una familia del departamento de Rivera, específicamente de la ciudad de Tranqueras (Vega, et al. 2020), y este estudio agrega nuevos datos de dos familias del mismo departamento. Si se analizan los resultados de este estudio, junto a la investigación previa, observamos que existe una proporción de 1 de 3 familias no relacionadas (1 de 4 pacientes) con la inversión 22 tipo 1. Dada la prevalencia de la hemofilia A severa a nivel mundial (Iorio A et al., 2019) este análisis incluye al 80 % (4 de 5) de los pacientes con hemofilia A severa esperados para la población del departamento de Rivera.

En Uruguay, según datos no publicados del PDU de Diversidad Genética Humana, se han estudiado 49 pacientes pertenecientes a 36 familias observándose una frecuencia estimada en conjunto de la INV1 y la INV22 del 42%. De ellas, la INV22 tipo 1 es del 30 % (10/33), INV22 tipo 2 del 3 % (1/33) y la INV1 del 9 % (3/33). En contraste con los estudios realizados en América Latina sobre las inversiones en los intrones 1 y 22 del gen del factor VIII en pacientes con hemofilia A severa, podemos observar ciertas tendencias que se repiten en diferentes países de la región. Por ejemplo, en Brasil (Correa *et al.*, 2020) encontraron una prevalencia del 2,6% para la inversión en el intrón 1 y del 41% para la inversión en el intrón 22, con un desarrollo de inhibidores del 26,3% en los pacientes con la inversión en el intrón 22.

Estos resultados son similares a los encontrados en estudios realizados en Argentina, donde, un estudio encontró que solo un caso de la inversión 1 (Inv1) estaba presente en un grupo de 64 familias afectadas por hemofilia A severa (Rossetti *et al.*, 2004). En cuanto a la inversión 22 (INV22), se detectó en 7 de 13 familias estudiadas (53%), con la variante tipo

1 como mutación causal de la enfermedad. Los autores concluyen que la incidencia de la INV22 en esta población de familias con hemofilia A severa se encuentra dentro de los valores promedio reportados internacionalmente (De Brassi, et al 2000).

Por otro lado, en Colombia (Garcés, et al. 2017) analizaron que el 40% de los pacientes evaluados presentaban la inversión en el intrón 22, mientras que en México se obtuvo una frecuencia del 45% para esta misma inversión. Estos resultados sugieren que la inversión en el intrón 22 es más común en la población latinoamericana que la inversión en el intrón 1, la cual no se detectó en ninguno de los pacientes mexicanos estudiados.

Es relevante resaltar la importancia de detectar a las portadoras de las inversiones, como se observó en el estudio realizado en Uruguay donde una portadora con actividad de factor VIII del 97% fue identificada a través del estudio molecular. Esto posibilita el adecuado asesoramiento genético en el manejo de la hemofilia y permite mostrar impacto que puede tener en las familias afectadas.

En comparación con los estudios previamente mencionados en la región, los resultados obtenidos en esta investigación junto a los datos no publicados para Uruguay, se observa una prevalencia de las inversiones en los intrones 1 y 22 del gen del factor VIII en pacientes con hemofilia A severa, similar a la de los estudios realizados en Brasil, Argentina, México y Uruguay. En definitiva, los estudios realizados en diferentes países de América Latina permiten observar patrones similares en cuanto a la prevalencia y el impacto de las inversiones en los intrones 1 y 22 del gen del factor VIII en pacientes con hemofilia A severa.

En este sentido, es fundamental continuar investigando y comparando los resultados obtenidos en diferentes estudios en la región, con el fin de identificar posibles variaciones en la prevalencia de las inversiones genéticas en pacientes con hemofilia A severa. Estos hallazgos pueden contribuir a una mejor comprensión de la enfermedad y a la implementación de estrategias de diagnóstico, seguimiento y asesoramiento genético para las familias afectadas.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este estudio muestran la ausencia de las inversiones 1 y 22 del gen F8 en las familias con hemofilia A severa en el departamento de Rivera - Uruguay. Esto sugiere que otras mutaciones genéticas pueden estar presentes en esta población, lo que resalta la importancia de continuar investigando y caracterizando las mutaciones responsables de la hemofilia A en la región.

A pesar de no haber encontrado las inversiones esperadas, este estudio contribuye al conocimiento de la distribución genética de la hemofilia A en la población uruguaya y brinda información sobre la necesidad de seguir investigando para identificar adecuadamente las mutaciones causantes de esta enfermedad. Además, resalta la importancia del asesoramiento genético y el seguimiento adecuado de los pacientes con hemofilia A y sus familiares.

Por lo tanto, este estudio representa un paso inicial en la caracterización genética de la hemofilia A en el departamento de Rivera - Uruguay, y sienta las bases para futuras investigaciones que puedan contribuir al diagnóstico, tratamiento y al asesoramiento genético de esta enfermedad hereditaria en la región.

ANEXOS

Anexo 1. *Aval del Comité de Ética de la Investigación Científica*



de
Mónica

Montevideo, 7 de noviembre de 2019
Exp. 121900-000602-19

La Comisión de Ética de la Investigación Científica de la Facultad de Humanidades y Ciencias de la Educación, reunida en el día de la fecha, consideró la solicitud de aval al proyecto de investigación "Caracterización Genético Molecular de las Hemofilias y de la enfermedad de Von Willebrand en la región Noreste del Uruguay", presentado por el Asist. MSc. Yasser Vega del PDU "Diversidad Genética Humana" del Centro Universitario de Tacuarembó, en el marco de su doctorado, dirigido por el Dr. Pedro Hidalgo y con la codirección de la Dra. Eliane Bandinelli.

La Comisión no encuentra objeciones ética para su aval.



Prof. Mónica Sans



Asist. Mariana Viera



Prof. Gustavo Pereira

Anexo 2. Consentimiento informado y encuesta



Polo de desarrollo Universitario
Diversidad Genética Humana



CONSENTIMIENTO INFORMADO

Por el presente certifico que:

- 1) Consiento en participar en el estudio: **Caracterización Genético Molecular de las Hemofilias y de la enfermedad de Von Willebrand en la región nordeste del Uruguay.** El objetivo de este estudio es encontrar las mutaciones causales de las Hemofilias y de la enfermedad de Von Willebrand en el noreste del país, así como conocer si el grado de mestizaje de los pacientes está relacionado con las causas genéticas y con la variabilidad en la aparición y severidad de los sangrados.
- 2) Por lo antes expuesto consiento la extracción muestras de sangre venosa, bajo supervisión médica.
- 3) Entiendo que mi participación no será compensada económicamente.
- 4) Me consta que la información obtenida de este estudio no tiene fines comerciales, y podrá ser empleada en publicaciones y/o presentaciones científicas.
- 5) Tuve la oportunidad de formular todas las preguntas necesarias para mi entendimiento, las cuales fueron respondidas con claridad y profundidad. No obstante, en caso de requerir información adicional podré contactar a las personas responsables de la investigación.
- 6) Me consta que el estudio no implica ningún tipo de riesgo biológico y que la información sobre mi identidad será mantenida en resguardo confidencial. En caso de requerirse la presentación de información personal en alguno de los trabajos científicos mencionados en el punto 4, se me pedirá autorización para ello.
- 7) He recibido una copia firmada de este consentimiento.

Dejo constancia de que mi participación es voluntaria, que tendré acceso a los resultados del análisis de la(s) muestra(s) que cedi voluntariamente y puedo retirarme del estudio cuando lo considere.

Apellidos y nombres del participante

Documento de identidad _____

Firma _____

Responsable del estudio:

Yasser Vega Requena. C.I. 6.254.882-2. Tlf: 099083203. Email: yassve2@gmail.com

Cualquier información adicional no dude en contactarse.

Fecha _____

Firma del responsable _____

Tiene antecedentes de algún trastorno de la coagulación: Si ____ No ____ En caso de ser Si, explique: _____

Fallecida: ____ Causa: _____
Edad: _____

PADRE DEL ENCUESTADO

Nombre: _____ Apellido Paterno _____

Apellido Materno _____ Lugar de Nacimiento _____

Tiene antecedentes de algún trastorno de la coagulación: Si ____ No ____ En caso de ser Si, explique: _____

Fallecido: ____ Causa: _____

Edad: _____

ABUELOS MATERNOS

Abuela Materna. Nombre _____ Apellido Paterno: _____

Apellido Materno _____ Lugar de Nacimiento _____

Fallecida: ____ Causa: _____

Edad: _____

Abuelo Materno. Nombre _____ Apellido Paterno: _____

Apellido Materno _____ Lugar de Nacimiento _____

Fallecido: ____ Causa: _____

Edad: _____

Sus abuelos maternos eran familiares: Si ____ No ____

Tienen o tenían antecedentes de algún trastorno de la coagulación: Si ____ No ____ En caso de ser Si, explique _____

ABUELOS PATERNOS

Abuela Paterna. Nombre _____ Apellido Paterno: _____

Apellido Materno _____ Lugar de Nacimiento _____

Fallecidos: ____ Causa: _____

Edad: _____

Abuelo Paterno. Nombre _____ Apellido Paterno: _____

Apellido Materno _____ Lugar de Nacimiento _____

Fallecidos: ____ Causa: _____

Edad: _____

Tienen o tenían antecedentes de algún trastorno de la coagulación: Si ____ No ____ En caso de ser Si, explique _____

Anexo 3. Protocolo de extracción de ADN "Salting out"

- 5- 10 ml de sangre entera congelada, anticoagulada con EDTA 0.5%
- Realizar tres lavados con T10E10, hasta que el pellet quede blanco.
- Agregar T10E10 hasta el enrase del tubo, y homogeneizar durante 20 - 30 minutos suavemente.
- Centrifugar durante 10 minutos a 200 rpm, descartar el sobrenadante.
Repetir tres veces

Lisis celular:

- Resuspender el pellet en 3-5 ml de buffer PK (10 mM Tris; 5 ml EDTA; 0.5% SDS), y 30 - 50 ul de PK) 20 mg/ml.
- Dispersar muy bien el pellet.
- Incubar 3 horas a 55°C, u ON a 37 °C.

Desproteización:

- Agregar 1,6 ml de NaCl (6M) cada 4,5 ml de pellet, incubado con PK y agitar durante 15 segundos.
- Incubar 15 minutos o más en heladera (4°C).

Precipitación del DNA:

- Centrifugar 15 minutos a máxima velocidad.
- Recuperar el sobrenadante.
- Agregar dos volúmenes de etanol absoluto frío.
- Invertir varias veces suavemente.

Lavado del DNA:

- Lavar el DNA en etanol 70%
- Pasar a un tubo de 1,5 ml
- Resuspender el DNA en H₂O destilada (ampolla) en el volumen adecuado (300 ul aproximadamente)

Anexo 4: *Protocolo de Inverse shifting PCR (IS-PCR)*

1- **Fase de restricción**, se realizó mediante el tratamiento del ADN genómico con la enzima de restricción Bcl-I.

El protocolo de restricción consta de los siguientes pasos:

1.1. Por muestra:

- 10 ul de ADN (100 ng/ul).
- 3 ul de Buffer 10X FastDigest.
- 1 ul de enzima Bcl-1 Fast.
- 16 ul de agua ultrapura.

1.2. Incubación en termociclador a 37°C durante 30 minutos.

1.3. Luego, inactivación de la enzima Bcl-1 Fast, incubando a 80°C durante 20 minutos.

2- **Fase de ligación**, en esta fase se empleó una enzima ADN ligasa para unir fragmentos de restricción, mediante los siguientes pasos.

2.1. Por muestra:

- 20 ul de buffer 10 Ligasa
- 0.6 ul de enzima ligasa
- 149.4 ul de agua.
- Agregar los 30 ul del volumen de la restricción a la mezcla.

2.2 Incubación en termociclador durante 60 minutos a 22°C.

2.3 **Fase de purificación de los anillos:**

- Agregar el volumen de la ligación a un tubo de 1,5 ul.
- Añadir 20 ul de NaCl 3M y 2 volúmenes de etanol absoluto frío. - Incubar 30 minutos a - 20°C.
- Centrifugar a máxima velocidad por 15 segundos.
- Descartar el sobrenadante
- Dejar secar invertido.
- Resuspender en 30 microlitros de agua ultrapura.

3 **Fase de amplificación**, se amplificaron los anillos formados en las fases anteriores mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), por la técnica Inverse Shifting PCR (IS-PCR).

Programa del termociclador:

94 °C: 2 minutos
94°C : 30 segundos
56°C: 1 minuto
72 °C: 90 segundos
72 °C: 5 minutos

} 30 ciclos

Protocolo PCR Test Diagnóstico para la inversión 22, por muestra:

- PCR Buffer 10x: 3 ul
- DNTP's (2.5mM): 2 ul
- Primer IU (10mM): 1,5 ul
- Primer ID (10 mM): 1,5 ul
- Primer 2U (10mM): 1,5 ul
- Primer 3U (10mM): 1,5 ul
- MgCl₂ (50mM): 0,9 ul
- TAQ (NZY): 0,08 ul
- H₂O: 8,02 ul

Teniendo en cada tubo 20 ul del mix de PCR + 5 ul de los anillos de ADN formados previamente, para un volumen final de 25 ul.

Protocolo PCR Test Complementario Inversión 22, por muestra:

- PCR Buffer 10x: 3ul
- DNTP's (2.5mM): 2 ul
- Primer IU (10mM): 1,5 ul
- Primer ED (10 mM): 1,5 ul
- Primer 2U (10mM): 1,5 ul
- Primer 3U (10mM): 1,5 ul
- MgCl₂ (50mM): 0,9 ul
- TAQ (NZY): 0,09 ul
- H₂O: 8,01 ul

Teniendo en cada tubo 20 ul del mix de PCR + 5 ul de los anillos de ADN formados previamente, para un volumen final de 25 ul.

Protocolo PCR Inversión 1, por muestra:

- PCR Buffer 10x: 3ul
- DNTP's (2.5mM): 2 ul
- Primer 1-IU (10mM): 1,5 ul
- Primer 1-ID (10 mM): 1,5 ul
- Primer 1-ED (10mM): 1,5 ul
- MgCl₂ (50mM): 0,9 ul
- TAQ (NZY): 0,08 ul
- H₂O: 9,52 ul

Teniendo en cada tubo 20 ul del mix de PCR + 5 ul de los anillos de ADN formados previamente, para un volumen final de 25 ul.

Test Diagnóstico Inversión del intrón 22	
PRIMER	Dirección 5´a 3´
ID	ACATACGGTTTAGTCACAAGT
IU	CCTTTCAACTCCATCTCCAT
2U	ACGTGTCTTTGGAGAAGTC
3U	CTCACAATTGTGTTCTTGTAGTC
Test Complementario Inversión del intrón 22	
PRIMER	Dirección 5´a 3´
ED	TCCAGTCACTTAGGCTCAG
IU	CCTTTCAACTCCATCTCCAT
2U	ACGTGTCTTTGGAGAAGTC
3U	CTCACAATTGTGTTCTTGTAGTC
Inversión del intrón 1	
PRIMER	Dirección 5´a 3´
1- IU	GCCGATTGCTTATTTATATC
1- ID	TCTGCAACTGGTACTCATC
1- ED	GCCTTTACAATCCAACACT

Tabla 4. Secuencia de los primers de la IS- PCR

4- Visualización y análisis de los fragmentos amplificados: Se realizó en corridas de electroforesis en geles de poliacrilamida al 8 % con tinción con Nitrato de Plata, para la observación del producto de la PCR y se usó un marcador de peso molecular de 50 a 1000 pb, bajo el siguiente protocolo:

4.1a Preparación del gel de poliacrilamida al 8 %

- 4 ml de Acrilamida/bisacrilamida 29:1 al 30 %
- 3 ml buffer TBE (Tris Borato EDTA) 5X
- 8 ml Agua
- 19 ul TEMED
- 190 ul Persulfato de Amonio 10 %

4.1b Electroforesis:

- Buffer TBE 1%
- 90 voltios
- 90 minutos.

4.2 Revelado con Nitrato de Plata:

- 30 ml de fijador de geles (Ácido acético glacial + etanol absoluto) - Incubación en mezclador a temperatura ambiente por 20 minutos - 30 ml de nitrato de plata al 1%
- Incubación en mezclador a temperatura ambiente por 20 minutos - Revelado con 30 ml NaOH 0,3 M y 1,5 ml de formaldehído al 37%. - Incubación en mezclador a temperatura ambiente por 10 minutos.

5- Interpretación:

5.1- En el test diagnóstico, la identificación de la inversión 22 se observa mediante la presencia de una banda de 333 pares de bases (pb), y la ausencia de la misma por la banda de 487 pb.

5.2- En test complementario nos permite discernir si es la Inversión 22 es de tipo 1, apareciendo los fragmentos 457/559 pb, o si es la Inversión 22 de tipo 2 donde aparecerán los fragmentos 405/559 pb y en caso de ser negativa la Inversión 22 aparecerán los fragmentos 405/457 pb.

5.3- En el gel de poliacrilamida donde realizamos la electroforesis para estudiar la Inversión 1 se observan dos posibles resultados, la presencia de los fragmentos de 304 o de 224 pb. Siendo el fragmento de 224 pares de bases positivo para la Inversión de tipo 1 y el de 304 pb negativo para la misma.

BIBLIOGRAFÍA

Antonarakis, S. E., Kazazian, H. H., & Tuddenham, E. G. (1995). Molecular etiology of factor VIII deficiency in hemophilia A. *Human mutation*, 5(1), 1–22. <https://doi.org/10.1002/humu.1380050102>.

Bagnall, R. D., Waseem, N., Green, P. M., & Giannelli, F. (2002). Recurrent inversion breaking intron 1 of the factor VIII gene is a frequent cause of severe hemophilia A. *Blood*, 99(1), 168–174. <https://doi.org/10.1182/blood.v99.1.168>

Carcao M, van den Berg H, Ljung R, Mancuso M. Correlation between phenotype and genotype in a large unselected cohort of children with severe hemophilia A. *Blood* 2013;121(19):3946-52.

Corrêa, MCS, Ferreira, E., Veiga, MT, Bandinelli, E., & Rosset, C. (2020). Prevalencia de inversiones en los intrones 1 y 22 del gen del factor VIII e inhibidores en pacientes del Brasi, D. (2000). Inversiones del gen del factor VIII del intrón 22 en familias argentinas con hemofilia A severa. *Haemophilia*, 6 (1), 21-22.

De Brasi, C. D. (2001). Marcadores genéticos ligados al gen del factor VIII de coagulación: Su utilidad diagnóstica en hemofilia y en el estudio del mecanismo molecular de la recombinación homóloga en meiosis humanas (Doctoral dissertation, Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales).

F.O.N.D.O.N.A.C.I.O.N.A.L.D.E.R.E.C.U.R.S.O.S. (2021, septiembre). TRATAMIENTO DE LA HEMOFILIA A normativa de cobertura. http://www.fnr.gub.uy/sites/default/files/normativas/medicamentos/n_trat_hemofilia_a.pdf. Recuperado 15 de diciembre de 2021, de http://www.fnr.gub.uy/sites/default/files/normativas/medicamentos/n_trat_hemofilia_a.pdf

Garcés, M. F., Linares, A., Sarmiento, I. C., & Caminos, J. E. (2017). Estudio molecular de la inversión de los intrones 1 y 22 del factor VIII de la coagulación en niños con hemofilia A severa utilizando técnica de PCR de larga distancia. *Revista de la Facultad de Medicina*, 65(2), 245-251.

Hoyer L. W. (1994). Hemophilia A. *The New England journal of medicine*, 330(1), 38–47. <https://doi.org/10.1056/NEJM199401063300108>

Mantilla-Capacho, J. M., Beltrán-Miranda, C. P., Luna-Záizar, H., Aguilar-López, L., Esparza-Flores, M. A., López-Guido, B., Troyo-Sanromán, R., & Jaloma-Cruz, A. R. (2007). Frequency of intron 1 and 22 inversions of Factor VIII gene in Mexican patients

with severe hemophilia A. *American journal of hematology*, 82(4), 283–287. <https://doi.org/10.1002/ajh.20865>.

Peters, R., & Harris, T. (2018). Advances and innovations in haemophilia treatment. *Nature reviews. Drug discovery*, 17(7), 493–508. <https://doi.org/10.1038/nrd.2018.70>.

Plug, I., Mauser-Bunschoten, E. P., Bröcker-Vriends, A. H., van Amstel, H. K. P., van der Bom, J. G., van Diemen-Homan, J. E., ... & Rosendaal, F. R. (2006). Bleeding in carriers of hemophilia. *Blood*, 108(1), 52-56.

Rogaev, EI, Grigorenko, AP, Faskhutdinova, G., Kittler, EL y Moliaka, YK (2009). El análisis del genotipo identifica la causa de la "enfermedad real". *Ciencia*, 326 (5954), 817-817.

Rossetti, Liliana & Candela, Miguel & Bianco, Raúl & Pinto, Miguel & Western, Andrea & Goodeve, Anne & Larripa, Irene & De Brasi, Carlos. (2004). Analysis of factor VIII gene intron 1 inversion in Argentinian families with severe hemophilia A and review of the literature. *Blood coagulation & fibrinolysis : an international journal in haemostasis and thrombosis*. 15. 569-72. 10.1097/00001721-200409000-00006

Rossetti, L. C., Radic, C. P., Larripa, I. B., & De Brasi, C. D. (2008). Developing a new generation of tests for genotyping hemophilia-causative rearrangements involving int22h and int1h hotspots in the factor VIII gene. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*, 6(5), 830–836. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2008.02926>.

Rosser, J. P., Young, M., Kimberland, M. L., Hutter, P., Ketterling, R. P., Gitschier, J., Horst, J., Morris, M. A., Schaid, D. J., & de Moerloose, P. (1994). Factor VIII gene inversions causing severe hemophilia A originate almost exclusively in male germ cells. *Human molecular genetics*, 3(7), 1035–1039. <https://doi.org/10.1093/hmg/3.7.1035>

Lorio A, Stonebraker JS, Chambost H, *et al*. Establishing the prevalence and prevalence at birth of hemophilia in males. *Ann Intern Med* 2019; 171: 540-546.

G. van Dieijen, G. Tans, J. Rosing, H.C. Hemker, The role of phospholipid and factor VIIIa in the activation of bovine factor X., *Journal of Biological Chemistry*, Volume 256, Issue 7, 1981, Pages 3433-3442, ISSN 0021-9258, [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)69627-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)69627-4).

Vega, Y., Faguaga, M., Abelleiro, M., Brasi, C. D., Bandinelli, E., Sans, M., & Hidalgo, P. (2020). Inversión de los intrones 1 y 22 del F8 en pacientes con hemofilia A severa y portadoras del noreste de Uruguay. *Archivos de Pediatría del Uruguay*, 91(2), 84-89.