

Las bases moleculares de la hemofilia A

Eduardo F. Tizzano

Unitat de Genètica Molecular

Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona.

La hemofilia A (HA) es una enfermedad hemorrágica debido al déficit o a la ausencia del factor VIII de la coagulación (FcVIII). Se transmite con un patrón de herencia ligado al cromosoma X y presenta una incidencia de 1 de cada 5000 varones. El gen que codifica para el Fc VIII, localizado en la región q28 del cromosoma X, es uno de los genes de mayor tamaño (186 kb) caracterizado en humanos. Contiene 26 exones con tamaños comprendidos entre 69 y 3106 pares de bases que se transcriben en un ARNm de 9 kb. Las secuencias correspondientes a los intrones ocupan 177 kb del gen, y el intrón 22 es el de mayor tamaño (1).

La gravedad de las manifestaciones clínico-hemorrágicas de los pacientes hemofílicos está en relación con los valores plasmáticos del Fc VIII. Así, una actividad menor del 1%, entre un 1 y un 4% y un 5 a 25% de dicho factor se reflejan, en general, con un curso grave, moderado y leve, respectivamente (2).

Los primeros trabajos centrados en el estudio de la patología molecular del gen del Fc VIII se efectuaron en el año 1985 (3,4) y en ellos se describió la existencia de algunas mutaciones puntuales y de deleciones de distinto tamaño y localización como causa de la expresión fenotípica de la HA. El gran tamaño del gen del factor VIII ha dificultado la caracterización sistemá-

tica de mutaciones puntuales en el mismo. La mayoría de los métodos utilizados a lo largo de estos últimos años se han limitado a analizar únicamente algunas regiones del gen y, en consecuencia, el tanto por ciento de mutaciones identificadas era bajo. Análisis de Southern blot utilizando el cADN del gen como sonda y ADN de pacientes afectados digerido con la enzima de restricción TaqI, demostraron deleciones y mutaciones específicas de sitio TaqI en aproximadamente un 10% de los pacientes (4). La enzima TaqI (cuya secuencia de reconocimiento es TCGA) puede detectar mutaciones en las zonas codificantes de los afectados dado que la transición C®T puede ocurrir en el codón CGA (que codifica para el aminoácido arginina) a TGA (codón stop). De los 12 codones CGA del gen del factor VIII, 5 ocurren en sitios TaqI. Por otra parte el dinucleótido CpG es hipermutable por la deaminación espontánea de su citosina metilada (5-metilcitosina) a timina. En las 9 kilobases de zona codificante del gen existen 70 sitios CpG de los que se pueden detectar por Southern blot, 8 ubicados en los exones 1,7,13,18,22,23,24 y 26.

Con la introducción de la reacción en cadena de la polimerasa la proporción de mutaciones detectadas aumentó considerablemente. Así, con la amplificación de los 26 exones del gen y la aplicación posterior de la electroforesis en gradientes desnaturalizantes (DGGE) se detectaron mutaciones en la mayoría de los pacientes con hemofilia leve o moderada, pero la mitad de los casos graves no presentaban mutación en los exones (5,6). En los datos recientes recolectados por el consorcio internacional de las mutaciones del gen del Fc VIII se han observado 174 mutaciones puntuales, 10 inserciones, 39 deleciones menores (menos de 100 pares de bases) y 78 deleciones mayores (7). En publicaciones recientes, se ha descrito la identificación de la casi totalidad de mutaciones con el desarrollo de la técnica de rotura química de zonas no apareadas (en inglés "chemical cleavage of mismatch" o CCM), analizando el promotor, las regiones codificantes y la zona de poliadenilación del gen del Fc VIII. Esta metodología combina la transcripción de ARNm de los pacientes a cADN por transcriptasa inversa, su posterior amplificación por PCR, hibridación y detección de zonas no apareadas por tratamiento químico con hidroxilamina, tetróxido de osmio y finalmente piperidina. Esta metodología ha permitido detectar la totalidad de las mutaciones en un grupo de 30 hemofílicos, la mayoría de ellos con enfermedad grave. En los casos de hemofilia A grave con un ARNm anormal, la mutación se localizó en el interior del intrón 22 en el 40% de los casos (8). El intrón 22 es el mas largo del gen del FVIII, tiene aproximadamente 40 kb de extensión y contiene una isla CpG a partir de la cual, se originan dos transcritos adicionales con una extensión de 2.5 y 1.8 kb cuya función es aún desconocida. De estos genes, el denominado F8A, además de estar presente en el

intrón 22, posee dos copias adicionales en posición distal al gen del factor VIII (9). El otro transcrito se origina a partir de un gen denominado F8B (10).

Estos hallazgos han servido de base para demostrar que una inversión por recombinación homóloga entre las copias intra y extragénica del gen F8A divide en dos partes al gen del Fc VIII (Figura 1). La hibridación de ADN genómico de pacientes hemofílicos con una sonda de ADN del intrón 22 demostró la presencia de reordenamientos observables por un patrón de bandas diferente a los controles en aproximadamente la mitad de los pacientes con hemofilia grave (11). Las mujeres portadoras tienen un patrón combinado de bandas, incluyendo el correspondiente al X normal y al portador de la inversión ya sea distal o proximal (Figura 2).

En nuestro laboratorio hemos estudiado más de 200 afectados con hemofilia A y sus familiares a riesgo de ser portadoras. Los resultados de este trabajo confirman que un 25% de la población de hemofílicos y un 43% de los hemofílicos graves, el déficit o ausencia de factor VIII es debido a una inversión que involucra al intrón 22. No se halló ningún caso de inversión en pacientes con fenotipo moderado o leve. Los pacientes con inversión no pueden sintetizar un factor VIII funcional dado que el gen está partido en dos y orientado en direcciones opuestas, por lo tanto es de esperar que todos los pacientes que presenten la misma expresen un fenotipo grave (Tabla I).

TABLA I.

Número y tipo de inversiones detectadas en los pacientes hemofílicos.

	Total	Con inversión	Distal	Proximal
Total hemofílicos	195			
Hemofílicos graves	114	49 (43%)	38 (78%)	11 (22%)
Hemofílicos moderados y leves	81			
Casos familiares	123	34 (28%)	30 (88%)	4 (12%)
Casos Aislados	72	15 (21%)	8 (53%)	7 (47%)

En la población española estudiada, se han identificado dos patrones de inversión. El reordenamiento distal es el más frecuente y ocurre en el 78% de los casos analizados mientras que el reordenamiento proximal ocurre en el 22% restante. Estos resultados coinciden con los publicados por otros autores (12,13) que hallan un porcentaje de inversiones distales que oscila entre el 70 y el 80% de los casos.

Las razones de la alta frecuencia de inversión distal aún están siendo investigadas. Se postula que el gen distal, más telomérico, sería más inesta-

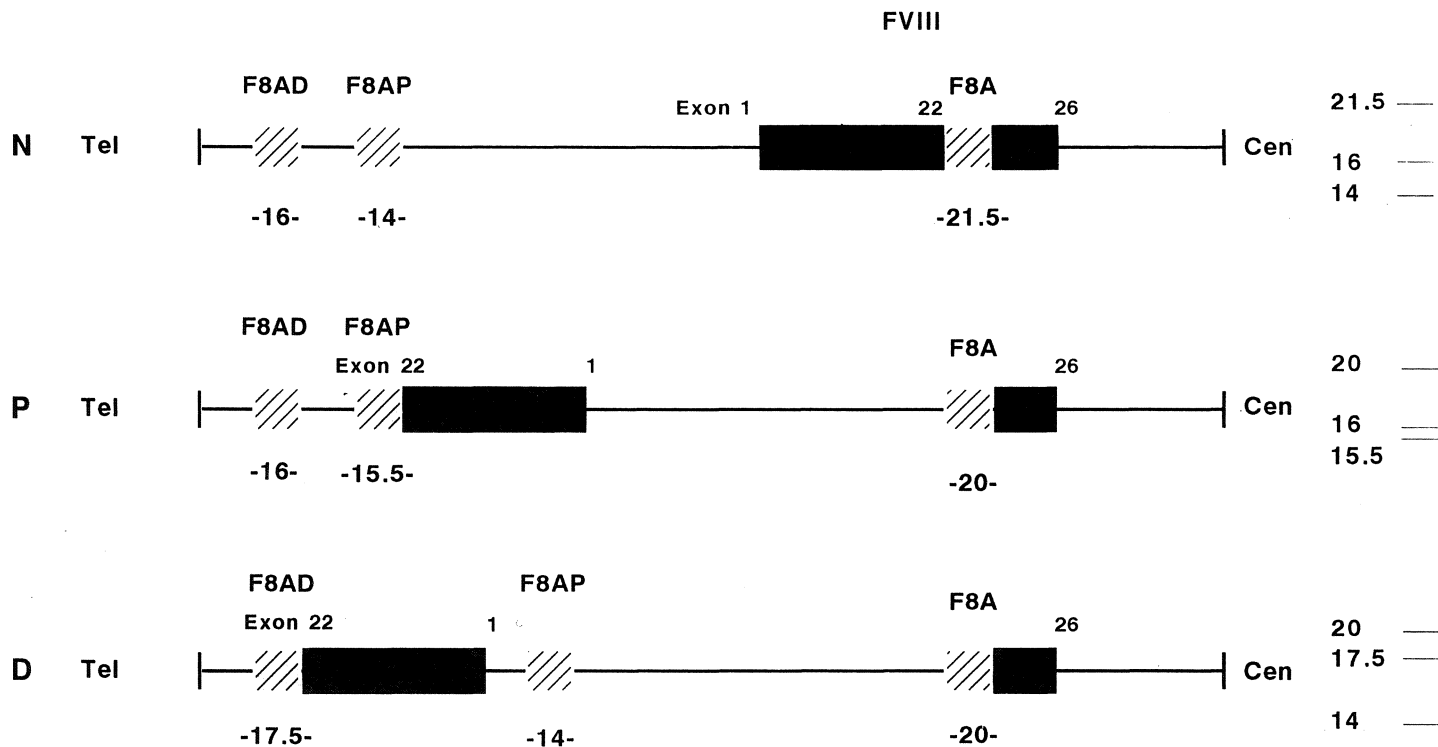
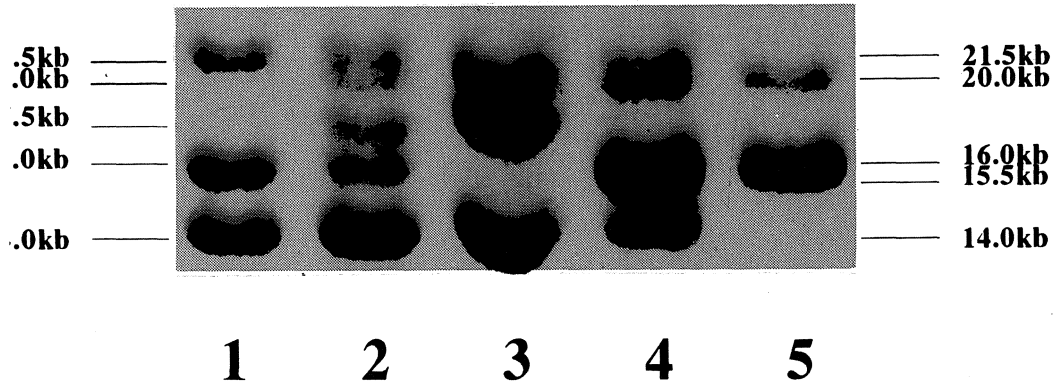


Figura 1: Esquema del gen del factor VIII y de la ubicación de los genes F8A en relación al primero. El mecanismo postulado de inversión implica la formación de un asa en el cromosoma X sobre sí mismo ocurriendo el apareamiento homólogo entre la copia intragénica y una de las copias extragénicas del gen F8A. Como resultado, el gen del factor VIII queda dividido en dos partes separado por más de 500 kb y orientado en direcciones opuestas. N=normal; D=inversión distal; P=inversión proximal. A la derecha de la figura se muestra un esquema del patrón de bandas de cada una de esas alternativas.

Figura 2: Patrón de bandas que se obtiene al hibridar la sonda F8A con ADN genómico digerido con BclI. 1=paciente hemofílico sin inversión; 2=mujer portadora de inversión distal; 3=paciente hemofílico con inversión distal; 4=mujer portadora de inversión proximal; 5=paciente hemofílico con inversión proximal.



ble y proclive a la recombinación homóloga o que en las regiones adyacentes existirían secuencias que facilitarían el mecanismo de recombinación (14,15).

La proporción de casos familiares y aislados de hemofilia que presentan inversión es estadísticamente similar (28% frente a 21% respectivamente) indicando que no sería un evento “de novo” muy frecuente. En los casos aislados, la proporción de inversiones distal y proximal es similar (53% frente a 47%) en comparación con la tendencia muy significativa de los casos familiares a presentar inversiones distales (88%). Las causas de esta diferencia aún requieren investigaciones adicionales.

En el tratamiento de la hemofilia la aparición de inhibidores es la complicación mas importante. Estos son mas frecuentes en los pacientes con hemofilia grave. Un estudio previo de nuestro laboratorio sugiere una importante tendencia en los pacientes con inversión a desarrollar inhibidores, en comparación con otros hemofílicos graves sin inversión (16).

El diagnóstico de portadoras de hemofilia no ya probabilístico, sino directo ha sido posible en todas las mujeres en riesgo estudiadas. El hallazgo de la inversión ha resultado útil para confirmar el estado de portadora obligada en aquellas que genealógicamente lo eran así como para diagnosticar o descartar esa condición en todas las mujeres en riesgo estudiadas. Todas las madres de los casos aislados han sido portadoras de la inversión. Un caso aislado de hemofilia puede resultar:

1) de la transmisión del gen hemofílico a través de mujeres, habiendo permanecido sin detectar en la familia;

2) de una mutación de novo en la madre, siendo ella una portadora o 3) de una nueva mutación en el hemofílico.

En trastornos debidos a mutaciones en genes recesivos ligados al X letales, cuya eficacia biológica (f) es cero, todos los alelos para esa enfermedad se pierden en cada generación. Haldane (17) demostró que en una población en equilibrio entre selección y mutación, la pérdida de los genes deletéreos ligados al cromosoma X, es compensada por una proporción equivalente de nuevas mutaciones. En la hemofilia se acepta que la f no es cero sino está situada entre 0.3 y 0.7. La proporción real de neomutaciones dependerá, además, de la tasa de mutación en esperma (v) y óvulo (u). Si es mayor en esperma ($v > u$), una gran proporción de madres de casos esporádicos será portadora. Si es igual en ambos ($v = u$), dos tercios de las mismas serán portadoras. Por último si es mayor en óvulo que en esperma ($v < u$), aproximadamente un 50% de las madres serán portadoras (17). Estudios realizados tanto en hemofilia A como en hemofilia B, muestran una mayor tasa de mutación en esperma que

en óvulo (18,19). Los resultados en las madres de los casos aislados del presente estudio, al ser todas portadoras de la inversión sugiere, de acuerdo a lo señalado anteriormente, que la inversión debe producirse en los gametos paternos.

Con el estudio de los haplotipos se ha podido determinar el origen de la inversión. Para ello es menester disponer de tres generaciones para estudio a fin de determinar el cromosoma con la mutación de dónde proviene. En mas del 80% de los 11 casos disponibles para estudio se ha demostrado que proviene del abuelo materno y dado que el mismo no presenta enfermedad, la inversión se ha producido de novo en sus células germinales. En dos casos, la abuela era portadora de la inversión, aunque este hecho no invalida la alternativa de que la mutación ocurriera en las células germinales masculinas de generaciones precedentes. Dado que no había otros hemofílicos en esas familias, estos dos últimos casos pueden ser el resultado de la transmisión del gen hemofílico a través de mujeres, habiendo permanecido sin detectar en la familia (opción 1). Siguiendo el razonamiento anterior, es muy probable que la mutación ocurriera en alguna generación anterior en las células germinales masculinas del padre de alguna de las mujeres. Un trabajo reciente analizando 26 casos aislados mostró en 20 (77%) de ellos el origen en el abuelo materno. Los 6 restantes fueron abuelas portadoras (5 casos) y madre no portadora (1 caso). Este último caso representa la única excepción publicada hasta el momento de una madre no portadora de la inversión (13).

Cabe la posibilidad de que alguno de los casos aislados o de mas de un afectado en la misma **fratría sin antecedentes en previas generaciones pudiera tratarse de un mosaicismo germinal. El mismo se ha postulado para explicar algunos casos de hemofilia A (20,21) y se define como la mutación de un determinado gen durante el desarrollo de las células germinales. Como consecuencia el individuo puede tener una población de gametos con la mutación. La detección de dos hermanos con inversión y su madre no portadora indicaría la presencia de un mosaicismo germinal en la madre. La detección de inversión en una hermana de una portadora de la inversión cuyo origen fuera de las células germinales del padre de ambas, indicaría la presencia de mosaicismo germinal en él. En el presente trabajo no se halló evidencia de que el mismo pudiera ocurrir en algunas familias que por genealogía podrían ser candidatas al mismo.

La inversión se ha detectado asociada a varios haplotipos de polimorfismos del gen del factor VIII, indicando que cada mutación ocurre como un evento independiente.

La detección de inversiones adquiere especial importancia en circunstancias en las que el asesoramiento genético resulta complejo como:

1) los casos aislados, donde se puede determinar con certeza el estado de portadora en la madre, las mujeres a riesgo y establecer el origen de la mutación.

2) Aquellas familias con mas de un hermano afectado pero sin otros hemofílicos en generaciones anteriores o posteriores, que son sugestivas de que podría haber ocurrido mosaicismismo germinal

3) Cuando no es posible estudiar el hemofílico, la detección de un patrón mixto de bandas (normal y alterado) (Figura 2) en la madre u otra mujer a riesgo, indicará que la inversión es la causante de la hemofilia en esa familia. Empleando la misma metodología, la detección de copias del gen F8A, permite la identificación de otras mutaciones alrededor del intrón 22 aunque estas no sean inversiones. La identificación de otros patrones anormales de bandas se han descrito asociados, por ejemplo, a deleciones que involucraban el intrón 22 (12,13).

La detección de inversiones en el intrón 22 representa el evento mutacional mas frecuente de la hemofilia A. Esto unido a la posibilidad de estudiarlas con una metodología sencilla y accesible hacen que sea el primer paso a realizar en el estudio molecular de los pacientes hemofílicos A. Su identificación permite el análisis directo de la mutación para diagnóstico de portadoras y diagnóstico prenatal. A su vez es posible aplicarlo a una importante proporción de familias en las que el asesoramiento genético es difícil de realizar.

Aquellos casos que no presenten inversión pueden ser estudiados por medio del cDNA, con lo que detectará deleciones o mutaciones del sitio TaqI. Finalmente, aquellos individuos hemofílicos que no tengan mutación detectable por estos métodos pueden ser estudiados por métodos mas complejos como análisis por DGGE o CCM y posterior secuenciación.

Agradecimientos: El presente trabajo ha sido posible gracias al proyecto FIS 95-1225, a la Fundació Privada Catalana de l'Hemofilia y a la colaboración prestada por los distintos Servicios hospitalarios españoles en el envío de muestras de pacientes.

Referencias

1. Gitschier J, Wood WI, Tuddenham E *et al.* Detection and sequence of mutations in the factor VIII gene of hemophiliacs. Nature 1985; 315:427-430.
2. Hoyer LW. Medical Progress: Hemophilia A. N Engl J of Med 1994; 330:38-47.

3. Antonarakis S, Waber P, Kittur S *et al.* Hemophilia A, detection of molecular defects and of carriers by DNA analysis. *N Engl J Med* 1985; 313:842-848.
4. Antonarakis SE, Kazazian HH The molecular basis of hemophilia A in man. *Trends Genet* 1988; 4:233-237
5. Higuchi M, Antonarakis SE, Kasch L, *et al.* Molecular characterization of mild-to-moderate hemophilia A: detection of the mutation in 25 of 29 patients by denaturing gradient gel electrophoresis. *Proc. Natl Acad Sci USA* 1991; 88:8307-8311.
6. Higuchi M, Kazazian HH jr, Kasch L *et al.* 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.
7. Tuddenham EGD, Schwaab R, Seehafer J *et al.* Haemophilia A: database of nucleotide substitutions, deletions, insertions and rearrangements of the factor VIII gene, second edition. *Nucleic Acids Res* 1994; 22:3511-3533.
8. Naylor JA, Green PM, Rizza CR, Gianelli F Analysis of factor VIII mRNA reveals defects in everyone of 28 haemophilia A patients. *Human Molecular Genetics* 1993; 2:11-17.
9. Freije D, Schlessinger DA A 1.6-Mb contig of yeast artificial chromosomes around the human factor VIII gene reveals three regions homologous to probes for the DXS115 and two for the DXYS64 locus. *Am J Hum Genet* 1992; 51:66-80.
10. Levinson B, Kenwrick S, Lakich D, Hammonds G, Gitschier J A transcribed gene in an intron of the human factor VIII gene. *Genomics* 1990; 7:1-11.
11. Lakich D, Kazazian H, Antonarakis S, Gitschier J Inversions disrupting the factor VIII gene are a common cause of severe haemophilia A. *Nature Genetics* 1993; 5:236-241.
12. Rossiter JP, Young M, Kimberland ML *et al.* Factor VIII gene inversions causing severe hemophilia A originate almost exclusively in male germ cells. *Hum Mol Genet*, 1994; 3:1035-1039.
13. Lung R Intron 22 inversions and haemophilia. *Lancet* 1994; 343: 791.
14. Naylor J, Brinke A, Hassock S, Green P, Gianelli F Characteristic mRNA abnormality found in half the patients with severe haemophilia A is due to large DNA inversions. *Human Molecular Genetics* 1993; 2:1773-1778.

15. Tizzano EF, Domènech M, Altisent C, Tusell J, Baiget M Inversions of the intron 22 of the factor VIII gene in Spanish hemophilia A patients. *Blood*, 1994; 83:3826.
16. Tizzano EF, Altisent C, Tusell J, Domènech M, Baiget M Intron 22 inversions and haemophilia. *Lancet* 1994; 343:792.
17. Haldane JBS The rate of spontaneous mutation in a human gene. *J. Genet*, 1935; 31:317-326.
18. Brocker-Vriends AHJT, Rosendaal JC, van Houwelingen JC *et al.* Sex ratio of the mutation frequencies in haemophilia A: coagulation assays and RFLP analysis. *J Med Genet* 1991; 28:672-680.
19. Montandon AJ, Green PM, Bentley DR *et al.* Direct estimate of the haemophilia B (factor IX deficiency) mutation rate and of the ratio of the sex-specific mutation rates in Sweden. *Hum Genet* 1992; 89:319-322.
20. Gitschier J, Levinson B, Lehesjoski AE, de la Chapelle A Mosaicism and isolated haemophilia: implications for carrier detection. *Lancet* 1989; i:273-274.
21. Lebo R, Koerper M, Hwa Kim J, Chueh J, Golbus M Prenatal diagnosis of hemophilia involving grandpaternal mosaicism. *Am J Med Genet* 1993; 47:401-404.