

Importancia del diagnóstico genético en hemofilia

Lavaut-Sánchez K, Castillo-García D
Instituto de Hematología e Inmunología, La Habana. Cuba.
Email: klavaut@infomed.sld.cu

RESUMEN

Las hemofilias son enfermedades hemorrágicas hereditarias, ligadas al cromosoma X que se presentan debido a mutaciones en los genes del factor VIII (hemofilia A) y factor IX (hemofilia B), se localizan en los locus Xq28 y Xq27, respectivamente. Producen una disminución o deficiencia funcional de estas proteínas en el plasma. El diagnóstico genético se basa en dos tipos de estudios, directos en el cual se produce la identificación de la mutación responsable y los indirectos en que se estudian marcadores genéticos del gen implicado que permiten un seguimiento del cromosoma X afectado, mediante el análisis de ligamiento. Este diagnóstico permite el conocimiento de las bases moleculares de los pacientes afectados, facilita la identificación de las mujeres portadoras en la familia y su aplicación en el diagnóstico prenatal; así como conocer el valor predictivo sobre el riesgo de desarrollo de inhibidores en el varón afectado. Lo que posibilita un adecuado asesoramiento genético a las familias como parte fundamental en la asistencia integral a la hemofilia.

Palabras clave: hemofilia A, hemofilia B, diagnóstico molecular

INTRODUCCIÓN

La hemofilia es una enfermedad genética con patrón recesivo ligado al cromosoma X, se debe al déficit o ausencia de actividad del factor VIII de la coagulación (Hemofilia A)(OMIM # 306700)

y en el caso de la hemofilia B, se caracteriza por el déficit del factor IX de la coagulación (OMIM # 306900).

La enfermedad es heredada en el 70 % de los casos, en el 30 % restante aparece un primer paciente en una familia sin antecedentes. Estos casos esporádicos pudieran deberse a que la mutación se originó recientemente en el individuo afectado, sin que la madre sea portadora (mutación de *novo*). También puede ocurrir que la afectación se generó en los gametos de la madre de manera que uno o varios óvulos tengan la mutación (mosaicismo germinal). Sin embargo, en la mayoría de los pacientes la madre sí es portadora, ya que las mutaciones se generan con mayor frecuencia en los gametos masculinos. Esto implica que la mutación pudo haberse generado en los gametos del abuelo materno y la madre lo ha heredado, aunque él no sea hemofílico, ya que es portador de este cambio en sus gametos únicamente y por ello no lo manifiesta; pero ya su hija como portadora, lo transmite a su hijo, quien lo manifiesta por primera vez en la familia.

Hemofilia A. Alteraciones genéticas.

Existe una gran heterogeneidad de defectos moleculares, que incluyen mutaciones puntuales: de sentido erróneo (sustitución de aminoácidos), sin sentido que generan un codón de terminación, mutaciones en el sitio del empalme; grandes deleciones (causadas por recombinación homóloga entre secuencias repetidas), pequeñas deleciones e inserciones que generan cambios en el marco de lectura, así como inversiones.¹

Estas alteraciones moleculares presentan una correlación con la severidad del fenotipo (leve, moderado y grave), siendo unas más frecuentes en un fenotipo que en otros.

Aproximadamente en el 40-45 % de los pacientes con hemofilia A grave se debe a una inversión cromosómica entre la región homóloga en el intrón 22 y una de las copias extragénicas del gen *F8A*. Producto de esta recombinación homóloga, se produce la traslocación de los exones 1 al 22 a la región cercana al telómero en forma invertida, lo que da origen a ausencia completa de expresión del factor VIII y un fenotipo grave. Se ha descrito una inversión similar en el intrón 1, responsable del 5 % de los pacientes con hemofilia A grave.²

La caracterización de las mutaciones permite establecer relación entre el defecto molecular y el desarrollo de inhibidores (anticuerpos que neutralizan el factor VII administrado). Es más frecuentes en aquellas mutaciones que se asocian con ausencia del producto génico como las inversiones, grandes deleciones y mutaciones sin sentido. Existen otros factores genéticos como la etnicidad, inmunofenotipo HLA, defecto molecular de genes de citoquinas e historia familiar, así como factores no genéticos que pueden estar relacionados con la formación de inhibidores.^{1,3}

Hemofilia B. Alteraciones genéticas

Las mutaciones de sentido erróneo son los cambios moleculares más frecuentes en estos pacientes (65 %), además se describen mutaciones sin sentido y en el sitio de empalme. Otras variaciones corresponden con deleciones, inserciones y duplicaciones.

Se ha descrito que la mayor prevalencia de mutaciones de sentido erróneo en la hemofilia B comparado con la hemofilia A, puede ser uno de los posibles factores que contribuye a que el fenotipo clínico sea más moderado en los pacientes con hemofilia B grave.⁴

El desarrollo de inhibidores de la terapia de reemplazo en la hemofilia B es infrecuente, presentándose en el 3 % de los individuos con hemofilia B grave.

Diagnóstico genético

El desarrollo y aplicación de las técnicas de biología molecular ha permitido una mejor caracterización de los genes codificantes de los factores de coagulación VIII y IX.

El diagnóstico molecular de la hemofilia se realiza a través de estudios directos en los cuales se identifica la mutación causante de la enfermedad o métodos indirectos que se basan en el estudio de polimorfismos del gen, para tratar de identificar cual es el cromosoma X portador de la mutación.

En la mayoría de los laboratorios de biología molecular que realizan el diagnóstico de la hemofilia utilizan la secuenciación como un método directo y sensible para la identificación de

las mutaciones. Se utilizan múltiples técnicas como PCR invertido, secuenciación directa, MLPA, secuenciación de nueva generación.⁵

En el algoritmo diagnóstico en el caso particular de la hemofilia A severa, se comienza por la determinación de la inversión del intrón 22 debido a su elevada recurrencia. Para el resto de las mutaciones tanto en la hemofilia A como de la hemofilia B se realiza el diagnóstico mediante el cribado de mutaciones o secuenciación.

Una alternativa que puede ayudar a optimizar los costos, fundamentalmente en la hemofilia A por el tamaño del gen, es realizar la secuenciación por diferentes etapas de acuerdo a la frecuencia con que se presenten las alteraciones en cada población y también al fenotipo.

Las técnicas de diagnóstico indirecto o análisis de ligamiento se fundamentan en la característica del que el ADN genómico contiene marcadores polimórficos que permiten el seguimiento del cromosoma X portador del gen defectuoso sin conocer la mutación exacta.

Este diagnóstico se realiza mediante la conformación de haplotipos a través de la utilización de diversos marcadores moleculares polimórficos que pueden estar dentro o fuera del gen y que se heredan en conjunto.

Tiene el inconveniente que se necesita un varón enfermo vivo para identificar el haplotipo de riesgo con el conjunto de los marcadores, analizar varios miembros de la familia y varias generaciones para hacer estudios comparativos de haplotipos, la informatividad depende de la heterocigosidad de los marcadores que varía entre las poblaciones.

Con este método puede existir falta de informatividad de los marcadores de ADN utilizados en algunas familias (por lo que es imposible determinar cuál es el cromosoma X de riesgo), así como la posibilidad de recombinación entre la mutación y él o los polimorfismos estudiados, lo que hace que los resultados sean de tipo probabilístico.

El diagnóstico genético y la caracterización molecular de las familias con hemofilia resulta importante, pues nos permite brindar un adecuado asesoramiento genético para el diagnóstico de portadoras y prenatal, así como la individualización terapéutica de cada paciente para prevenir el

desarrollo de inhibidores y predecir severidad de la enfermedad de acuerdo a la mutación detectada.

BIBLIOGRAFÍA

1. Rossetti LC. Alteraciones genéticas en hemofilia A. Implicancias en el desarrollo de inhibidores. *Hematología* 2016 Sept; 20: 180-4.
2. Shekari Khaniani M, Ebrahimi A, Daraei S, Derakhshan SM. Genotyping of intron inversions and point mutations in exon 14 of the FVIII gene in Iranian Azeri Turkish families with hemophilia A. *Indian J Hematol Blood Transfus* 2016 Dec; 32(4): 475-80.
3. Castillo D. Hemofilia: aspectos históricos y genéticos. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* 2012 Ene-mar; 28 (1):22-33
4. Melchiorre D, Linari S, Castaman G. The higher prevalence of missense mutations in hemophilia B compared to hemophilia A could be important in determining a milder clinical phenotype in patients with severe hemophilia B. *Haematologica*. 2016 Oct; 101(10): e429.
5. Bastida JM, González –Porrás JR, Jiménez C, Benito R, Ordoñez GR, Álvarez – Román MT et al. Application of a molecular diagnostic algorithm for haemophilia A and B using next-generation sequencing of entire F8, F9 and VWF genes. *Thromb Haemost* 2017 Jan 5; 117(1): 66-74.