RIDAA
Repositorio Institucional
Digital de Acceso Abierto de la
Universidad Nacional de Quilmes

Universidad
Nacional
de Quilmes

Abelleyro, Miguel Martín

Grandes rearreglos del cromosoma X : el modelo de hemofilia

Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.
Atribución - No Comercial - Sin Obra Derivada 2.5
https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/ar/

Documento descargado de RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes de la Universidad Nacional de Quilmes

Cita recomendada:
Abelleyro, M. M. (2016). Grandes rearreglos del cromosoma X: el modelo de hemofilia. (Tesis de doctorado). Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Argentina. Disponible en RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes
http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/2161

Puede encontrar éste y otros documentos en: https://ridaa.unq.edu.ar

Universidad Nacional de Quilmes
Roque Sáenz Peña 352 // Bernal
Buenos Aires // Argentina
t.: (+41 11) 4365 7100
f.: (+54 11) 4365 7101
info@unq.edu.ar

Miguel Martín Abelleyro, Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto,
Marzo del 2016, pp. 136,
http://ridaa.unq.edu.ar,
Universidad Nacional de Quilmes, Secretaría de Posgrado,
Doctorado en Ciencias Básicas y Aplicadas

Grandes rearreglos del cromosoma X: el modelo de hemofilia

TESIS DOCTORAL

Miguel Martín Abelleyro

martinabelleyro@gmail.com

Resumen

Después de la revolución científica y tecnológica que atravesó la genética médica en los últimos años, el gran desafío que hoy enfrenta es hacer llegar sus beneficios a todos los estratos de la sociedad. La hemofilia, coagulopatía hereditaria ligada al cromosoma X (X), afecta a uno de cada 5000 varones hemicigotas en todas las poblaciones humanas y muy raramente a las mujeres portadoras. Mutaciones deletéreas en el gen del *F8* (187kb, 26 exones) causan hemofilia A (HA) que es cinco veces más frecuente que la hemofilia B (HB) causada por defectos en el *F9* (33kb, 8 exones). Esta diversidad de tamaño y complejidad del *F8* y *F9*, y la heterogeneidad de defectos genéticos que los afectan, determinaron que la hemofilia sea una enfermedad modelo para el diagnóstico molecular, para los desarrollos terapéuticos y para los estudios de correlación genotipo-fenotipo. La mutación más importante en hemofilia es la inversión del intrón 22 (Inv22), la causa del 42% de las HA severas (actividad del FVIII:C<1%). La Inv22, se origina por recombinación homóloga no alélica (NAHR) entre un segmento de 9,5kb ubicado en el intrón 22 del *F8* (*int22h*-1) y una copia de orientación invertida ubicada cerca del telómero Xq. La recombinación de *int22h*-1 con una tercera copia de *int22h* extra-*F8* y orientada igual podría generar deleciones (Del22) y duplicaciones (Dup22). Las grandes deleciones (GD) del *F8*/*F9* afectan el 8-15% y 3-6% de las HA y HB severas, respectivamente, y se asocian con muy alto riesgo a desarrollar inhibidor, complicación que encarece la terapia antihemofílica.

Con objetivos focalizados en el estudio de los grandes rearreglos genómicos tomando a la hemofilia como modelo, este trabajo incluye análisis epidemiológico-moleculares de los rearreglos de *int22h*, el desarrollo de un nuevo abordaje costo-efectivo para el diagnóstico de portadoras de GD en enfermedades ligadas al X y la caracterización de los mecanismos involucrados en el origen de las GD parciales del *F8*.

En 267 pacientes Argentinos con HA severa, la prevalencia de la Inv22 fue estimada en 44% (n=126, 109 correspondientes a la Inv22 tipo I, Inv22-I, (38%) y 17 (6%) al tipo-II, Inv22-II). La Dup22 y la Del22 no fue encontrada en un total 703 X de familias Argentinas con HA

severa e individuos de la población general estimando un q<1/476≈0,2% en la Dup22 (475 resulta de 540 X con posibilidades de presentar la Dup22 de los cuales 65 X quedaron indeterminados) y un q<1/185≈0,5% en la Del22 (184 fueron los X excluidos). Dos nuevas variantes (v) de la Inv22 derivadas de la Inv22-I e Inv22-II fueron identificadas en cuatro pacientes con HA severa asociadas independientemente al alelo G del SNP rs73563631 modificando los patrones restricción *Bcl*I y el abordaje de *inverse shifting*-PCR versión 2008 (IS-PCR/2008), el más usado internacionalmente para el diagnóstico de la Inv22. La prevalencia de la Inv22v fue estimada en 1,3% de los pacientes con HA severas (4/306) (3 con Inv22-Iv, 1,0%; y 1 con la Inv22-IIv, 0,30%) y en 2,7% de los pacientes con la Inv22 (4/149). Fue desarrollada y validada una modificación del abordaje IS-PCR/2008 haciendo posible el diagnóstico certero de las Inv22v en hemicigosis y heterocigosis (las tres madres de los pacientes informativos y una tía resultaron portadoras y una tía materna resultó no portadora). El monitoreo de 404 X de la población Argentina general resultó negativo para el alelo rs73563631*G estimando una frecuencia q<0,24%. El diagnóstico portadoras de GD en mujeres *en-riesgo* en familias informativas está asociado a técnicas muy costosas como los microarreglos (SNP-CGH) o MLPA, muy trabajosas como *gap*-PCR (identificando una señal específica de la GD), o no validadas como PCR cuantitativa en tiempo-real (qPCR). Se diseñó y desarrolló un sistema de medición relativa de dosis génica (T/R, blanco/referencia, X/autosoma) basado en qPCR para el diagnóstico de GD en cuatro regiones del X (i.e., *F8* exón 1, 6 y 26; y *F9* exón 8) para mujeres en riesgo de familias informativas con HA/HB severa. El abordaje fue validado en dos instancias: (a) verificando la capacidad del método para diferenciar entre simple (T/R, 1:2) y doble dosis (2:2) en 15 varones y 15 mujeres de la población general, respectivamente sin solapar ninguno de los valores T/R de varones con las mujeres control, y (b) comparando los resultados qPCR en las cuatro regiones analizadas con los obtenidos por otros abordajes validados (MLPA, *gap*-PCR). La distribución de los valores T/R en las dos poblaciones control permitieron calcular la probabilidad de portadora de una GD (Pc) aportando límites de confiabilidad diagnóstica sobre base experimental. La aplicación del método de qPCR en 14 mujeres en riesgo de siete familias con HA o HB severa permitió diagnosticar nueve de ellas como portadoras (Pc>99%) y cinco como no portadoras (Pc<1%) de GD: en el *F8,* siete portadoras de HA y dos no portadoras; y en el *F9*, dos portadoras de HB y tres no portadoras. La caracterización de GD genómicas es escasa en la literatura médica incluyendo a la hemofilia. La amplificación de 38 productos PCR en el *F8* en nuestra serie de pacientes con HA severa permitió identificar 10 familias con GD. Cada una de estas GD se caracterizaron aplicando primero abordajes de amplificación de mojones con acercamiento a las rupturas por bipartición, y con estos resultados, diseñando y obteniendo una señal específica de cada GD en el probando hemicigota y secuenciación de Sanger. Si bien el análisis de los puntos de ruptura reveló patrones asociados a inestabilidad cromosómica, secuencias

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

estimuladoras de rupturas de doble o simple cadena y secuencias generadoras de estructuras secundarias en el ADN no se detectaron patrones comunes específicos que se repitieran en todos los casos. El 80% de los casos mostró elementos repetitivos interdispersos (e.g., LINE, Alu, LTR) en por lo menos uno de los puntos de ruptura confirmando la inestabilidad que representa su presencia en el genoma humano. Aplicando el principio de máxima parsimonia fue posible estimar el mecanismo involucrado en el origen de cada una de las 10 GD caracterizadas (notación HGSV, archivo del *F8* NM_000132.3). Un caso asociado a MMBIR (*microhomology-mediated break induced repair*): Ex7_12del c.[787+9445_1903+1662del23013; 787+9454insTGTATCCCA]. Un caso asociado a FoSTeS (*fork stalling template switching*): Ex1del compleja c.[-3058_143+12715del15914{-3058_-3059insGTCTCG}; 143+12761_143+14363del1602; 143+14363_143+14425inv; 143+14425_143+20543del6118]. Dos casos asociados a NHEJ (*non-homologous end joining*): Ex3_26del c.[265+1220_*4636del165297;265+1220_265+1221insAG]; y Ex1del-parcial c.[-2047*_16del2067]. Seis casos asociados a MMBIR o secundariamente a NHEJ: Ex24_26del c.[6620_*13083del39118]; Ex10del c.[1443+3589_1537+1841del3147]; Ex6del c.[669+605_787+2590del4535]; Ex7_18del c.[1443+1010_5998+1279del62333]; Ex5_7del c.[601+2979_1009+745del21380]; y Ex1del-68kbdel c.[-66732*_271+11409del78145]. Esta serie de 10 GD del *F8* representa la más grande descripta en HA hasta el presente.

Los resultados y desarrollos metodológicos presentados en este trabajo demuestran que los beneficios de la genética molecular humana pueden ser aplicados a todos los segmentos sociales en forma costo-efectiva aún en países con restricciones económicas.

Palabras clave: Hemofilia A, Hemofilia B, rearreglos de *int22h*, rearreglos de *int1h*, *inverse shifting*-PCR, grandes rearreglos complejos.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Departamento de Ciencia y Tecnología

GRANDES REARREGLOS DEL CROMOSOMA X: EL MODELO DE HEMOFILIA.

Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la Universidad Nacional de Quilmes en el área Ciencias Básicas y Aplicadas.

Autor: Martín Miguel Abelleyro.

Director: Carlos Daniel De Brasi.

Co-Director: Mariano Gabri.

Consejero Academíco: Gustavo Pierdominici Sottile

Lugar de trabajo: Instituto de Medicina Experimental (IMEX), CONICET-Academia Nacional de Medicina, Laboratorio de Genética Molecular de la Hemofilia.

Dedicado a Lua y Francisco, a mi madre y la memoria de mi abuelo

AGRADECIMIENTOS.

Al Dr. Carlos De Brasi, la Dra. Irene Larripa, la Dra. Liliana Rossetti y la Dra. Pamela Radic por darme la posibilidad de formar parte del grupo de trabajo durante todos estos años. En especial al Dr. Carlos De Brasi, por su valiosa guía y consejos tanto en el trabajo desarrollado como así también en lo personal, su paciencia, sus conocimientos y la confianza depositada en mí. A la Lic. Vanina Marchione por su ayuda en los momentos de apuro. A la Dra. Liliana Rossetti y a la Dra. Pamela Radic por brindarme sus conocimientos, colaboración en cada etapa desarrollada y cada dificultad encontrada en el trabajo pero sobre todo por el apoyo que me brindaron durante todos estos años.

Al Dr. Miguel Candela y la Dra. Daniela Neme por su constante aporte de muestras y datos tan necesarios.

A todos los compañeros de laboratorio por hacerme sentir parte del grupo en todo momento con cada discusión en el almuerzo de trascendental importancia para la vida.

A mi madre María Sivanto porque sin su apoyo y paciencia no hubiera llegado hasta aquí.

A la Universidad Nacional de Quilmes y sus profesores por enseñarme todo lo que aprendí.

A los siguientes organismos e instituciones que brindaron el lugar físico y los subsidios de investigación: Instituto de Medicina Experimental (IMEX), CONICET-Academia Nacional de Medicina, a la Fundación René Barón, al Consejo Nacional de Investigaciones CONICET y a la Agencia Nacional de Ciencia y Tecnología ANPCyT.

Declaración de publicaciones.

Los resultados del presente trabajo de tesis han sido parcialmente publicados en los siguientes artículos:

1. Are int22h mediated deletions a common cause of hemophilia?. Miguel Martín Abelleyro**,** Liliana Carmen Rossetti, Claudia Pamela Radic, Miguel Candela, Irene Beatriz Larripa, Carlos Daniel De Brasi. *Ann Hematol* 2012, 91: 633-6.

2. Reliable and cost-effective approach for diagnosis of heterozygous F8/F9 large deletions by quantitative real-time PCR. Miguel Martín Abelleyro**,** Claudia Pamela Radic, Tomas Tetzlaff, Vanina Daniela Marchione, Ariela Fundia, Irene Beatriz Larripa, Liliana Carmen Rossetti, Carlos Daniel De Brasi. *Haemophilia* 2015, 21: 247-51.

3. F8 intron 22 inversions and SNP rs73563631 in unrelated families with severe haemophilia A: clinical features and gene testing implications. Miguel Martín Abelleyro; Liliana Carmen Rossetti; María de los Ángeles Curto; Claudia Pamela Radic; Vanina Daniela Marchione; Carlos Daniel De Brasi. *Thromb Haemost* 2016, 115(3). 2015 Oct 22 [Epub ahead of print].

El material publicado constituye menos de la mitad del material presentado en este trabajo de Tesis.

Lic. Miguel Martin Abelleyro.

INDICE

INTRODUCCIÓN 1

Hemofilia 1

Hemofilia A y B 3

Características moleculares del F8 y el F9: el gen, el transcripto y la proteína 3

Mutaciones causales de hemofilia A y B 5

Grandes inversiones del F8 6

Análisis moleculares: caracterización de las mutaciones causales de hemofilia 11

Pequeñas deleciones/inserciones y sustituciones nucleotídicas 11

Grandes deleciones parciales y rearreglos complejos 11

Grandes Inversiones 12

Grandes rearreglos asociados a grandes pérdidas de secuencias 13

Secuencias asociadas a inestabilidad genómica 13

Elementos repetidos 14

Modelos de los mecanismos asociados al origen de grandes rearreglos 14

OBJETIVOS 19

MATERIALES Y MÉTODOS 21

Muestras y población estudiada 21

Detección de inversiones, deleciones y duplicaciones 21

Análisis de las muestras que presentaron resultados IS-PCR anómalos 25

Análisis de haplotipos de las muestras que presentaron resultados IS-PCR anómalos 27

Análisis de grandes deleciones en heterocigosis (medición de dosis génica) 28

Detección primaria de grandes rearreglos 30

Acercamiento a las rupturas de ubicación incierta por bipartición de las distancias 32

Análisis de grandes deleciones por LD-PCR 35

Análisis de grandes deleciones por I-LD-PCR 35

Análisis por mapeo de restricción de los productos PCR (PCR-RFLP) 36

Amplificación y secuenciación de Sanger específica de los puntos de ruptura de cada deleción 37

Procedimientos bioinformáticos 39

CAPÍTULO I 42

Genotipificación de grandes rearreglos asociados a las copias de int22h (Inv22, Del22 y Dup22) e int1h (Inv1). 42

RESULTADOS I 42

DISCUSIÓN I 47

CAPÍTULO II 52

Variantes de la inversión del intrón 22 del F8 tipo I y tipo II en familias no relacionadas con HA severa 52

RESULTADOS II 52

Estudios Previos 52

Buscando las causas moleculares de los patrones IS-PCR/2008 no convencionales detectados en familias con HA severa 53

Análisis haplotípico 55

Análisis de frecuencias del alelo rs73563631*G en nuestra población general 56

Frecuencias del alelo rs73563631*G en poblaciones internacionales 57

Modificación del abordaje IS-PCR/2008 para incluir la detección de las variantes asociadas a rs73563631*G 57

DISCUSIÓN II 59

CAPÍTULO III 62

Desarrollo de un nuevo abordaje para medición relativa de dosis génica para análisis de portadoras de grandes deleciones ligadas al X. Aplicación en hemofilia 62

RESULTADOS III 62

Desarrollo y puesta a punto de las reacciones de amplificación qPCR: curvas de calibración y análisis de productos 63

Desarrollo, puesta a punto y validación del método para detectar grandes deleciones en heterocigosis y diagnóstico de mujeres en riesgo de ser portadoras 64

Promotor-exón 1 del F8 (F8P1AB) 65

Validación primaria: 65

Aplicación a mujeres en riesgo y validación secundaria por otro método: 65

Exón 6 del F8 (F8e6) 66

Validación primaria: 66

Aplicación a mujeres en riesgo y validación secundaria por otro método: 67

Exón 26 del F8 (F8e26) 68

Validación primaria: 68

Aplicación a mujeres en riesgo y validación secundaria por otro método: 68

Exón 8 del F9 (F9e8). 69

Validación primaria: 69

Aplicación a mujeres en riesgo y validación secundaria por otro método: 69

DISCUSIÓN III 71

CAPÍTULO IV 75

Caracterización molecular de grandes rearreglos del F8. Puntos de ruptura y mecanismos involucrados 75

RESULTADOS IV 75

Ajuste de los productos de amplificación de blancos genómicos específicos 75

Acercamiento a las rupturas extragénicas sobre los terminales 5' y 3' del F8 . 76

Análisis de la extensión de las deleciones que involucran el intrón 1 y no al exón 2 del F8 por IS-PCR de la inversión del intrón 1 78

Acercamiento a las rupturas intragénicas en los intrones del F8 79

Obtención de una señal específica asociada al alelo con la deleción familiar . 80

Caracterización de cada deleción o rearreglo específico 81

Deleción del exón 3 al 26 del F8. Paciente #121 81

Deleción del exón 24 al 26 del F8. Paciente #467. 83

Deleción del exón 10 del F8. Paciente #570 84

Deleción del exón 6 del F8. Paciente #U2 86

Deleción del exón 7 al 12 del F8. Pacientes #572 y #575 88

Deleción del exón 10 al 18 del F8. Paciente #132 90

Deleción del exón 5 al 7 del F8. Paciente #617 91

Deleción compleja del exón 1 del F8. Pacientes #326 y #327 93

Deleción parcial del exón 1 del F8. Paciente #945 95

Gran deleción del exón 1 del F8. Paciente #949 96

DISCUSIÓN IV 98

DISCUSIÓN GENERAL 103

CONCLUSIONES 107

BIBLIOGRAFÍA 111

ANEXO 119

CAPÍTULO IV: ***Ajuste de amplificación de blancos genómicos específicos*** 119

CAPÍTULO IV: Análisis de restricción de rearreglos genómicos. 119

Caso #121, Ex3_26del 119

Caso #570, Ex10del 120

Casos #572/#575, Ex7_12del. 120

Caso #132, Ex10_18del 121

Caso #617, Ex5_7del 121

Caso #327, Ex1del compleja 122

Caso #945, Ex1del-parcial 122

Caso #949, Ex1del-68kb 123

ABREVIATURAS

ADN_{dig}: ADN digerido.

ADN_g: ADN genómico.

BIR: *Break-Induced Replication*.

CGH: *Comparative genome hybridization*.

CNV: *copy number variants*.

CSGE: *Conformation-sensitive gel electrophoresis*.

CT: *Crossing threshold*.

CTLA4: *Citotoxic T-lymphocyte associated protein 4*.

Del22: Deleción del intrón 22.

Del22-I: Deleción del intrón 22 del tipo I.

Del22-II: Deleción del intrón 22 del tipo II.

Dup22: Duplicación del intrón 22.

EDTA: Etilen Diamin Tetra-Acetato.

FoSTeS: *Fork Stalling and Template Switching*.

GD: Gran deleción.

GH: Genoma Humano.

HA: Hemofilia A.

HB: Hemofilia B.

int1h: *Intron 1 homologous regions*.

int22h: *Intron 22 homologous regions*.

Inv1: Inversión del intrón 1.

Inv22: Inversión del intrón 22.

Inv22-I: Inversión del intrón 22 del tipo I.

Inv22-II: Inversión del intrón 22 del tipo II.

Inv22-IIv: Inversión del intrón 22 del tipo II variante.

Inv22-Iv: Inversión del intrón 22 del tipo I variante.

I-PCR: *Inverse* PCR.

IS-PCR: *Inverse shifting*-PCR.

IVS: *Interveining sequence*.

kb: Kilobases.

LCR: Low copy repeat.

LD-PCR: PCR de larga distancia

LINE: *Long interspersed nuclear elements*.

Mb: Megabases.

MLPA: *Multiple ligation-dependent probe amplification*.

MMBIR: *Microhomology-Mediated Break-Induced Replication*.

MPS: *Massive parallel sequencing*.

NAHR: *Nonalelic homologous recombination*.

NHEJ: *Nonhomologous end joining*.

pb: Pares de bases.

Pc: *Carrier probability*.

PCR: *Polymerase chain reaction*.

PK: Proteinasa K.

Px-: Probabilidades de deleción heterocigota.

Pxx: Probabilidades no-deleción.

qPCR: PCR cuantitativa en tiempo real.

RFLP: *Restriction fragment length polymorphism*.

SINE: *Short interspersed nuclear elements*.

SNP: *Single nucleotide polymorphism*.

SNV: *Single nucleotide variants*.

STR: *Short tandem repeat.*

STSs: *Sequence tagged sites*.

SV: *Structural variants*.

WFH: *World Federation of Hemophilia*.

INTRODUCCIÓN

Una de las consecuencias de los años de evolución molecular del genoma humano (GH) se ve reflejada en la variabilidad genética existente en la especie humana, diferencias que pueden ir desde los pequeños cambios de nucleótido (*single nucleotide variants*, SNV) hasta las variantes estructurales (*structural variants*, SV) que abarcan desde unas pocas kilobases (kb) a varios cientos de kb, y hasta megabases (Mb) (Gonzaga-Jauregui et al, 2012; Zhang et al, 2009). Las SV son reordenamientos del ADN en el genoma que representan diferentes versiones de la estructura del cromosoma y pueden ser neutrales en el número de copias, sin perdida ni ganancia de material (e.g., una inversión o translocación equilibrada), o resultar en variaciones en el número de copias (*copy number variants*, CNV) presentando pérdida (i.e., gran deleción) o ganancia de material genético (i.e., gran inserción: duplicación, triplicación o multiplicación) (Lupski, 2015). Las condiciones patológicas asociadas a las SV (e.g., interrupción o variaciones en la dosis de un gen) se definen colectivamente como trastornos genómicos (Lupski, 1998).

Entre todos los trastornos genómicos presentes en la literatura la hemofilia has sido repetidamente utilizada como modelo de estudio tanto por sus características asociadas al tamaño y complejidad de los genes involucrados (*F8* y *F9*), la heterogeneidad de los defectos genéticos que la causan (desde SVs hasta mutaciones puntuales) como por la interacción directa del genotipo con el fenotipo en el paciente hemicigota por ser una enfermedad ligada al cromosoma X.

Hemofilia

La hemofilia es una coagulopatía hereditaria ligada al cromosoma X con 2537 casos reportados en 43.024.374 habitantes de la población Argentina, de acuerdo a datos del 2014 reportados por WFH (*Annual global survey 2014*) (*World Federation of Hemophilia,* 2015). Los pacientes afectados por hemofilia presentan hemorragias en las articulaciones, músculos y sangrados prolongados en el tiempo.

Las primeras referencias históricas que se registran en la literatura, son textos rabínicos del siglo II d.C., en los que se eximió de ser circuncidado al tercer hijo varón de una mujer cuyos dos hijos anteriores habían muerto a causa de hemorragias posteriores a la circuncisión. John C. Otto (1803), un médico de Filadelfia, publicó un tratado titulado “Informe de la disposición hemorrágica en ciertas familias” donde describió tempranamente los tres factores típicos de la hemofilia, la propensión *hereditaria* de ciertos *varones* a *sangrar*. Más conocida es la historia de la Reina *Victoria* de Inglaterra quién dejó evidente su condición de portadora de hemofilia

severa con el nacimiento de su octavo hijo varón, *Leopold*, quien murió de una hemorragia cerebral a la edad de 33 años (Ingram, 1976).

A finales del siglo 19 se estableció que la responsable de la hemofilia era una deficiencia en la coagulación de la sangre y en el transcurso del siguiente siglo, luego de varios años de estudio y diversas discusiones, se llegó a la conclusión de que eran factores del plasma sanguíneo, los responsables de este fenotipo (Ingram, 1976). El Dr Alfredo Pavlovsky de la Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires (Instituto de Investigaciones Hematológicas *Mariano R. Castex*) descubrió que el plasma sanguíneo de un grupo de pacientes con hemofilia corregía los tiempos de coagulación sanguínea de otro grupo de pacientes de igual fenotipo. De esta manera Alfredo Pavlovsky describía al fenómeno clave que diferenciaría a la hemofilia A (HA) de la coagulopatía que más adelante Biggs y colaboradores describirían como la enfermedad de Christmas o hemofilia B (HB) (Pavlovsky, 1947; Biggs et al, 1952).

Para evitar confusiones de nomenclatura entre los factores intervinientes en la coagulación sanguínea, el Comité Internacional para la Nomenclatura de los Factores de Coagulación Sanguínea recomendó, en 1962, asignar números romanos a cada uno de los factores de la cascada de coagulación conocidos hasta el momento. De esta manera se distinguen dos tipos de hemofilia: la HA debida a mutaciones en el gen del FVIII de coagulación (*F8*) y la HB, a mutaciones en el gen del FIX (*F9*) (Wright, 1962).

La HA y HB no solo se presenta en humanos, sino también en animales (e.g., perros, caballos, ratones, cerdos, etc.) con una tasa de mutación combinada global en nuestra especie estimada en $1\text{-}4\times10^{-5}$ por cromosoma X por generación (Strauss, 1967; Vogel, 1977). Las mutaciones causales de hemofilia severa están asociadas, como se indicó, a una alta tasa de aparición *de novo* y recambio (Haldane, 1935) que resulta consecuencia de la baja eficacia reproductiva (*fitness*) del paciente hemicigota con HA o HB severas, debido a que sólo una fracción de las personas que padecen hemofilia severa viven lo suficiente para dejar descendencia. Aunque actualmente la expectativa de vida de los pacientes con hemofilia se ha extendido gracias a los tratamientos sustitutivos del factor defectuoso o ausente, el alcance de estos cambios no se ha extendido lo suficiente para contradecir las conclusiones descriptas.

En una enfermedad recesiva ligada al cromosoma X como la hemofilia, el varón hemicigota (46,XY) expresa el fenotipo completo y la mujer heterocigota o portadora (46,XX) no expresa síntomas de hemofilia en la mayoría de los casos.

Hemofilia A y B

La HA (OMIM, 306700) y HB (OMIM, 306900) tienen una prevalencia de 1-2 cada 10.000 y 1-2 cada 30.000 varones nacidos vivos sin diferencias étnicas o geográficas, respectivamente.

La gravedad de las manifestaciones hemorrágicas está asociada a los valores de actividad del FVIII o FIX en el plasma del paciente, comparado con valores promedio de individuos de la población general (plasmas patrón). Los niveles normales de FVIII:C son de 100IU/dl en plasma (100% de actividad pro-coagulante). En pacientes que padecen hemofilia, se clasifica en severa cuando el FVIII:C, es menor a 1UI/dl (i.e., 1% de la actividad promedio del factor en la población general), moderada, entre 1 y 5UI/dl y leve, entre 5 y 20UI/dl (Hoyer, 1994; White et al, 2001).

El clonado y caracterización del *F8* (Gitschier et al, 1984; Vehar et al, 1984; Wood et al, 1984) y *F9* (Kurachi y Davie, 1982; Yoshitake et al, 1985) permitieron la producción *in vitro* del FVIII y FIX con fines terapéuticos y allanaron el camino para el diagnóstico molecular directo de las mutaciones causales de hemofilia y el asesoramiento genético de las familias afectadas. Es así que los pacientes con hemofilia pueden ser tratados satisfactoriamente por sustitución intravenosa del factor de coagulación defectuoso, mejorando significativamente su calidad de vida. Sin embargo, el desarrollo de anticuerpo inhibidor constituye una severa complicación médica que torna inefectiva la terapia convencional y compromete aproximadamente a 20-30% de los pacientes con HA severa y al 3,7-24% de los pacientes con HB severa (Rossetti et al, 2013; Radic et al, 2013). Los pacientes que desarrollan anticuerpo inhibidor son tratados con agentes distintos del factor deficiente como por ejemplo FVII activo o Complejo protrombínico activado (*bypassing agents*) que encarecen la terapia significativamente.

Características moleculares del F8 y el F9: el gen, el transcripto y la proteína

El *F8* está orientado con transcripción hacia el centrómero y ubicado sobre Xq28 a una distancia de una Mb del telómero Xq mientras que el *F9* presenta una dirección de transcripción hacia el telómero Xq y está ubicado sobre Xq27.1-q27.2 (Figura IN.1).

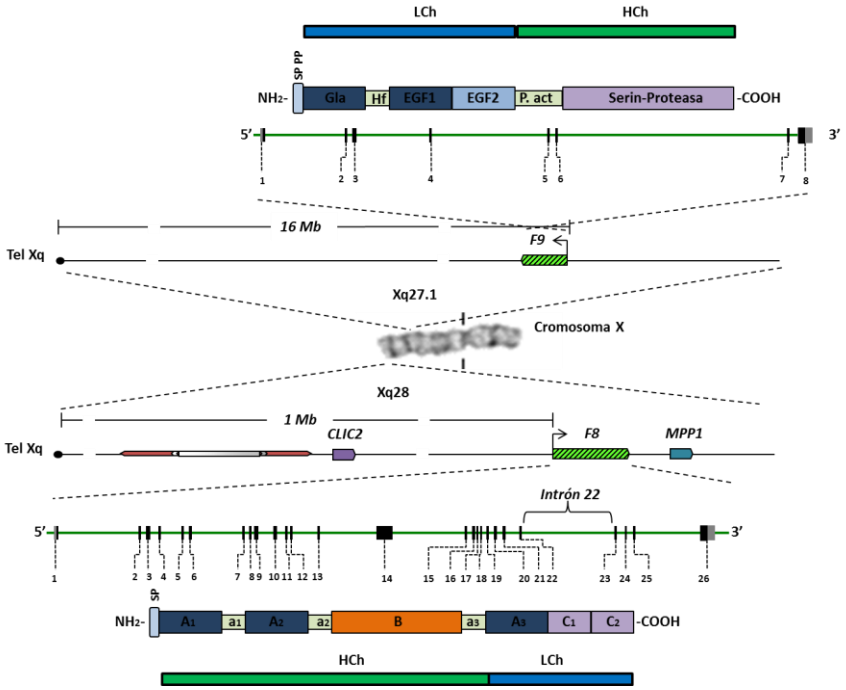


Figura IN.1. Cromosoma X humano con detalle esquematizado del *F9* y *F8* y los factores de coagulación FIX y FVIII. En el centro se muestra una micrografía citogenética del cromosoma X (bandeo G). En el panel superior el segundo esquema muestra el *F9* con su orientación, el tercer esquema los tamaños relativos y su estructura exónica (exón 1 al 8, rectángulos negros) y más arriba la proteína primaria inmadura con los dominios incluyendo el péptido señal (SP), el propéptido (PP), el dominio gama-carboxi-glutámico (Gla), el dominio hidrofóbico (Hf) los dominios homólogos al factor de crecimiento epidérmico (EGF-1 y -2), el péptido de activación (P.act.) y el dominio catalítico Serín-proteasa ordenados estructuralmente. En el panel inferior el segundo esquema muestra el *F8* con su orientación, *CLIC2* (*Chloride intracelular chanel 2*) y *MPP1* (*Membrane protein, palmitoylated 1*), genes vecinos involucrados en rearreglos que también afectan al *F8* (e.g., Bagnall et al, 2006). Se esquematiza el *F8* con sus tamaños relativos y su estructura exónica (exón 1 al 26, rectángulos negros). Abajo se muestra la proteína primaria inmadura con los dominios A_1, a_1, A_2, a_2, B, a_3, A_3, C_1 y C_2 y el péptido señal (SP) ordenados estructuralmente. En ambos esquemas se muestran con un rectángulo verde las correspondientes cadenas pesadas (HCh) y en azul las livianas (LCh).

El *F8* abarca 187kb de ADN genómico y está formado por 26 exones con tamaños que varían desde 69 a 3.106 pares de bases (pb). Entre los intrones del *F8*, se destacan por su tamaño el intrón 1, el 13, el 14, el 22 y el 25, siendo el intrón 22 con 32kb, el mayor (Gitschier et al, 1984) (Figura IN.1). El gen completo incluye 9kb correspondientes a los exones (ARN mensajero) y 178kb correspondientes a los intrones (Gitschier et al, 1984). La secuencia nucleotídica del ARN mensajero (ARNm) maduro del *F8* codifica para un polipéptido de 2.332 aminoácidos que presenta un péptido señal de 19 aminoácidos, que lidera la exportación de la proteína y es removido en el factor secretado (Vehar et al, 1984). La estructura primaria del FVIII inmaduro muestra tres tipos distintos de dominios en el orden NH2.A1-a1-A2-a2-B-a3-A3-C1-C2.COOH (Figura IN.1). El FVIII es secretado como un heterodímero formado por la unión no covalente de una cadena pesada (HCh) y una cadena liviana (LCh)

(Figura IN.1) (Vehar et al, 1984) y circula unido de manera no covalente al factor von Willebrand (vWF) que lo estabiliza y regula su actividad.

El *F9* abarca 33kb de ADN genómico y está formado por 8 exones que codifican para un ARNm de 2,8kb (Yoshitake et al, 1985) (Figura IN.1). La secuencia nucleotídica del ARNm maduro codifica para un polipéptido de 415 aminoácidos, el propéptido y el péptido señal de 46 aminoácidos. En la estructura del FIX se pueden distinguir principalmente cuatro grandes dominios estructurales NH2.Gla-Hf-EGF1-EGF2-P.act-Serin-proteasa.COOH, los tres primeros dominios conforman la LCh y el dominio catalítico serín-proteasa la HCh que se mantienen unidas a través de un puente disulfuro (Di Scipio et al, 1978; Anson et al, 1984) (Figura IN.1).

Mutaciones causales de hemofilia A y B

Hasta el presente, se han identificado una gran diversidad de mutaciones en el *F8* y *F9*, asociadas a HA y HB, respectivamente. En HA y HB las primeras mutaciones detectadas fueron las deleciones e inserciones grandes o pequeñas, sustituciones nucleotídicas (Tuddenham et al, 1994; Oldenburg et al, 2004). Mientras que solo en HA existen grandes inversiones que son las únicas mutaciones netamente recurrentes dando cuenta de aproximadamente la mitad de las HA severas (Tuddenham et al, 1994) (Tabla IN.1).

Las sustituciones nucleotídicas (mutaciones puntuales), pueden clasificarse en *missense* (mutaciones de falso sentido), *nonsense* (mutaciones a no sentido) y mutaciones que afectan el sitio de *splicing* (maduración a ARNm) (Tabla IN.1).

La severidad de la HA y HB asociada a defectos tipo *missense* dependerá tanto de la naturaleza del cambio de residuo como del sitio afectado en la macromolécula. En este sentido, cuando los cambios *missense* no afectan a la estructura secundaria ni terciaria del FVIII o FIX y ocurren sustituciones semiconservativas entre aminoácidos, a menudo obtenemos un fenotipo de HA y HB moderada o leve, o incluso cambios quizás neutros. Mientras que cuando las sustituciones entre aminoácidos son no conservativas, determinando una mayor perturbación estructural, esperamos un fenotipo de HA y HB moderada o severa (Bowen, 2002) (Tabla IN.1).

Las mutaciones *nonsense* asociadas a la aparición de un codón de terminación prematuro, son menos frecuentes que las anteriores y generalmente están asociadas a HA y HB severas (Tabla IN.1).

Otro tipo de mutación detectada en pacientes con HA o HB son las deleciones o las inserciones (Ins/Del) asociadas a una pérdida y/o ganancia de material genético, respectivamente. Existen grandes deleciones parciales (uno o más exones) o totales del *F8* y *F9* y micro-deleciones/inserciones con pérdida o ganancia de una a varias pb.

Tabla IN.1: Mutaciones involucradas en hemofilia A y B severa, moderada y leve.

Hemofilia A				
Tipo de Mutación		Severa[1] FVIII: C ≤ 1%	Moderada[1] 1% < FVIII: C ≤ 5%	Leve[1] 5% < FVIII: C ≤ 40%
Inversiones				
Inv22[2]	Tipo 1	35%		
	Tipo 2	7%		
	Raros	< 0,5%		
	Inv22 total	42%		
Inv1[3]		5%		
	Total	**47%**		
Mutaciones Puntuales	Falso Sentido	17%	73%	89,4%
	Sin Sentido	8,2%	*5,7%	*0,2%
	Splicing	4,3%	6,7%	5,5%
	Total	**29,5%**	**85,4%**	**95,1%**
Ins/Del		1%	0,5%	0,4%
Inserciones, Duplicaciones y Deleciones	Grandes (> 0,3kb)	5,1%	1,6% (Del)	0,4%
	Pequeñas (< 0,3kb)	17,4%	12,5%	4,1%
	Total	**22,5%**	**14,1%**	**4,5%**
Hemofilia B				
Mutaciones Puntuales	Falso Sentido	53,7%	69,6%	88,7%
	Sin Sentido	12,3%	*5,5%	*2,2%
	Splicing	10,4%	12,2%	5,9%
	Total	**76,4%**	**87,3%**	**96,8%**
Ins/Del		1,5%	1,2%	
Inserciones, Duplicaciones y Deleciones	Grandes (> 0,3kb)	1,6%		
	Pequeñas (< 0,3kb)	20,5%	11,5%	3,2%
	Total	**22,1%**	**11,5%**	**3,2%**

[1]Estimada desde la información publicada en las bases de datos de HA (http://www.factorviii-db.org/, Rallapalli PM et al, 2013) y HB (http://www.factorix.org, Rallapalli PM et al, 2014). [2]Información publicada por Antonarakis y un Consorcio Internacional (Antonarakis et al, 1995). [3]Información publicada por Bagnall (Bagnall et al, 2002). *La aparición de mutaciones severas (i.e., *nonsense*) en fenotipos no severos puede asociarse a una asignación bioquímica errónea de la severidad (medición de actividad relativa del factor).

La severidad asociada a este tipo de mutación dependerá del tipo de modificación que genere la Ins/Del en la macromolécula, originando fenotipos más severos aquellas Ins/Del que modifiquen una parte funcional o estructuralmente importante de la proteína y que introduzcan un cambio en el marco de lectura (*frameshift*), a menudo condicionando la aparición de codones *stop* prematuros (Bowen, 2002) (Tabla IN.1).

Grandes inversiones del F8

La inversión del intrón 1 (Inv1) (Bagnall et al, 2002) y la inversión del intrón 22 (Inv22) (Naylor et al, 1993; Lakich et al, 1993) son dos grandes rearreglos causales de HA severa que generan una disrupción del *F8* asociados a una total ausencia de actividad del FVIII residual en el paciente.

La Inv1 es una mutación detectada en el 5% de los pacientes con HA severa (Bagnall et al, 2002), aunque en una revisión más reciente de los casos reportados de HA severa con la Inv1, más una serie de pacientes de la población Argentina, se encontró una frecuencia algo menor al 3% (Rossetti et al, 2004). La Inv1, se origina por

recombinación homóloga recíproca entre dos secuencias con orientación opuesta, que comparten una identidad de secuencia del 99,9% y tienen un tamaño de 1.041pb (*int1h*). Una de estas copias está ubicada dentro del intrón uno del *F8* (*int1h*-1), mientras que la otra *int1h*-2 extra-génica, está ubicada 140kb rio arriba del *F8* hacia el telómero Xq (Bagnall et al, 2002) (Figura IN.2).

La Inv22 es el defecto genético más importante en hemofilia y está presente en el 42% de los pacientes con HA severa según series internacionales y de Argentina (Antonarakis et al, 1995; De Brasi et al, 2000). La Inv22 es originada a partir de un evento de recombinación homóloga recíproca no alélica entre una región de 9,5kb del intrón 22 del *F8*, *int22h*-1 (h1), y una de las dos secuencias ubicadas aproximadamente a 500kb y 600kb hacia el telómero Xq, llamadas *int22h*-2 (h2) e *int22h*-3 (h3).

La Inv22 ocurre casi exclusivamente en células germinales masculinas. Tizzano et al (1994) observó que todas las madres de pacientes con la Inv22 resultaban portadoras; y en estudios del origen familiar de la Inv22 en casos esporádicos se estimó una relación entre el origen meiótico masculino y el femenino de 302:1 (Rossiter et al, 1994).

Dependiendo de cuál copia extragénica de *int22h* esté involucrada en el evento de recombinación que resulta en la Inv22, se clasifica como Inv22 del tipo I (Inv22-I) si el evento de recombinación es con h3, o alternativamente, Inv22 del tipo II (Inv22-II), si involucra a h2. Antonarakis et al (1995) reportaron datos del análisis de la Inv22 en 22 laboratorios de Europa, Asia y Norteamérica, con un total de 2.093 pacientes no relacionados con HA severa. Mediante el análisis de *Southern blot* desarrollado por Lakich et al, (1993) se investigó la Inv22 en HA severa y se determinó que el 35% de los pacientes tenían la Inv22-I mientras que el 7%, la Inv22-II. Asimismo, observaron que el 1% de los pacientes severos configuraban tipos raros, tipos IIIa y IIIb, causadas por un evento de recombinación homóloga recíproca entre h1 con una copia adicional de alguna de las copias extra-génicas (i.e., h2 e h3, respectivamente). Este patrón se encontraba solo en algunos de los pacientes, debido a que esta variante estructural que da origen a Inv22-IIIa y -IIIb existiría en una población reducida de cromosomas X (Windsor et al, 1994).

Hasta el año 2005, se creía que las copias extragénicas de *int22h* (i.e., h2 y h3), estaban ambas orientadas inversamente respecto a la intragénica h1 (h1 cabeza-cabeza tanto con h2 como con h3) y se especulaba que las frecuencias relativas entre las Inv22-I e Inv22-II de 4:1 estaría relacionada a las posiciones cromosómicas relativas de las copias en interacción (Naylor et al, 1995; Lakich et al, 1993) (Figura IN.2).

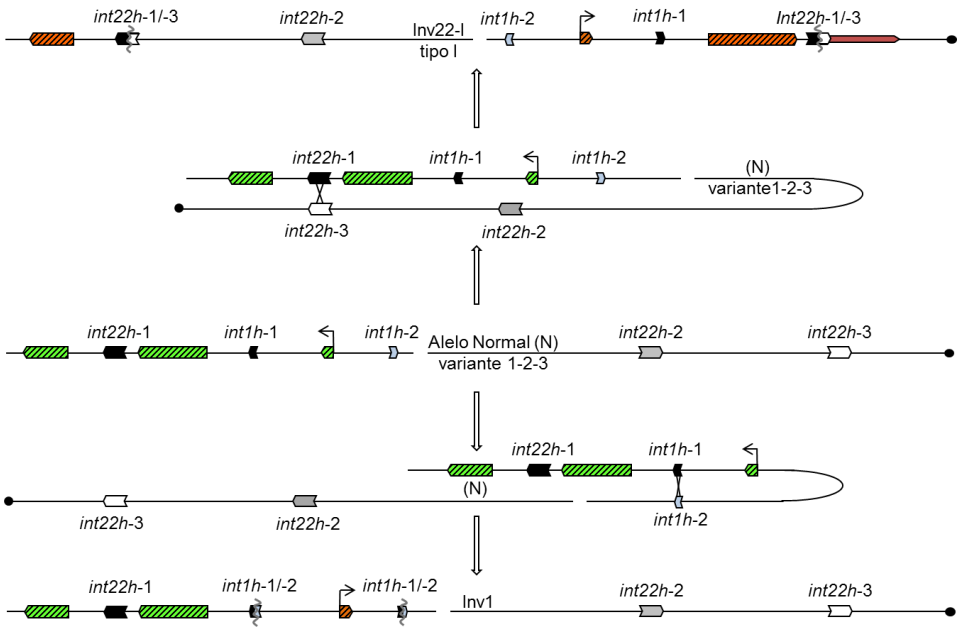


Figura IN.2: Eventos de recombinación homóloga de la inversión del intrón 22 tipo I (Inv22-I) y la inversión del intrón 1 (Inv1). Esquema de 0,7Mb cercanas al telómero Xq (círculo cerrado). *F8* (flechas rayadas) (los segmentos largos representan los exones del 2-22 y los cortos los exones 23-26 y el exón 1), el *F8* funcional está indicado en verde; las secuencias no funcionales de *F8* están indicadas en naranja; h1 e *int1h-1* (flechas negras pequeñas), h2 (gris), h3 (blanca) e *int1h-2* (celeste). Los puntos de ruptura producto de eventos de recombinación homóloga entre copias de *int22h* e *int1h* están indicados con líneas grises en zigzag. Se esquematiza la estructura del cromosoma X (sin considerar la evidencia de Ross et al, 2005), con igual orientación de las copias extragénicas de *int22h*, en el centro se esquematiza el cromosoma X antes del evento de recombinación, hacia abajo el evento de recombinación homóloga de la Inv22-I y hacia arriba, la Inv1 del *F8*.

Cuando se liberó la secuencia terminada del cromosoma X en el contexto del Proyecto Genoma Humano (Ross et al, 2005) se determinó que las copias h2 y h3, están orientadas inversamente y son parte integrante de los brazos de un gran palíndromo imperfecto con la estructura, un brazo centromérico de 50kb, una región central de copia única de 67kb y un brazo telomérico invertido de 50kb, (Figura IN.3). Las copias extragénicas de *int22h* (i.e., h2 y h3) se ubican a una distancia de 666pb del comienzo de cada brazo del palíndromo y comparten una identidad de secuencia del 99,93%; mientras que h1 y h3 comparten 99,24% y las copias h1 y h2, el 99,18% (De Brasi y Bowen, 2008).

Con la estructura, ubicación y orientación de las copias de *int22h* se pudo determinar que sólo la copia de *int22h* ubicada sobre el brazo telomérico del palíndromo estaba orientada inversamente respecto de h1, y por lo tanto, era la única que podía recombinar con h1 resultando en inversiones, y no así la copia ubicada en el brazo centromérico que al estar orientada en igual dirección que h1 podría originar duplicaciones y deleciones, pero no inversiones (Bagnall et al, 2005).

Bagnall et al (2005) proponen una hipótesis para explicar la ocurrencia de las Inv22-I y -II y sus frecuencias relativas (i.e., 4:1) planteando que los brazos del gran palíndromo pueden interactuar por recombinación homóloga recíproca intracromosómica originando una inversión del segmento central (67kb) que resulta en un polimorfismo estructural presente en los cromosomas X de la población general no afectada con frecuencias hipotéticas del 80% y 20% (4:1) para las dos variantes, i.e., variante h123 y h132; e indicaron que cada una de estas variantes constituyen la estructura base para la Inv22-I (80%) y la Inv22-II (20%), respectivamente (Figura IN.3 e IN.4).

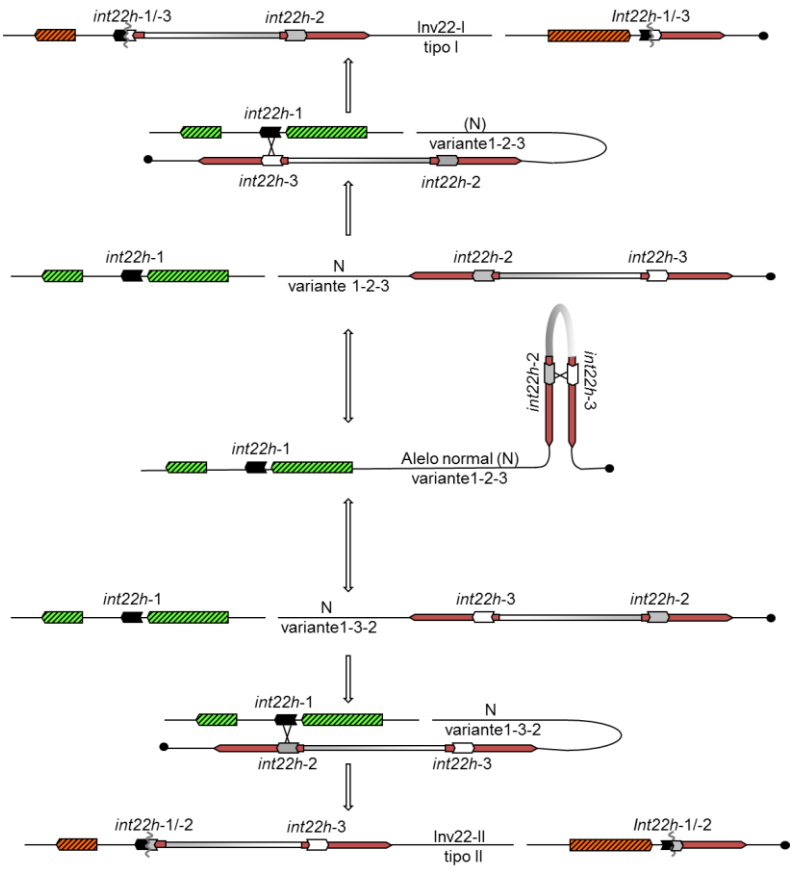


Figura IN.3: Hipótesis de Bagnall (Bagnall et al, 2005): frecuencias relativas de la Inv22-I e Inv22-II y las dos variantes estructurales del cromosoma X. Esquema estructural de secuencias cercanas al telómero Xq. Las referencias de formas y colores son iguales a las anteriores. Los brazos centroméricos y teloméricos del gran palíndromo imperfecto están indicados en marrón; la secuencia espaciadora entre los brazos del palíndromo se indica por un rectángulo con un gradiente gris-blanco para denotar su orientación. Se muestran los alelos Normales (N) correspondientes a la variantes 1-2-3: h123 y 1-3-2: h132. Se esquematiza el evento de recombinación homóloga entre los brazos del gran palíndromo imperfecto. A partir de estas variantes se representan los eventos de recombinación homóloga que originan la inversión del Inv22-I e Inv22-II.

Cuando se analiza cada potencial rearreglo mediado por *int22h* (Figura IN.4), se observa que las deleciones (Del22), asociadas a eventos de recombinación homóloga no-alélica entre h1 y la copia extragénica de *int22h* más centromérica del

palíndromo imperfecto, pueden ocurrir tanto en meiosis femeninas como en meiosis masculinas. Esto podría explicarse por modelos de apareamiento y recombinación desigual intercromosómica, o intracromosómica (Figura IN.4). En cambio, las eventuales duplicaciones (Dup22), son posibles sólo en presencia del cromosoma homólogo. Así, las Dup22 ocurrirían en el contexto de una meiosis femenina como resultado de apareamiento y recombinación desigual entre h1 y la copia extragénica más centromérica de *int22h* determinando la duplicación del intervalo de 5Mb en uno de los cromosomas y la deleción reciproca de igual tamaño en el homólogo (De Brasi y Bowen, 2008) (Figura IN.4).

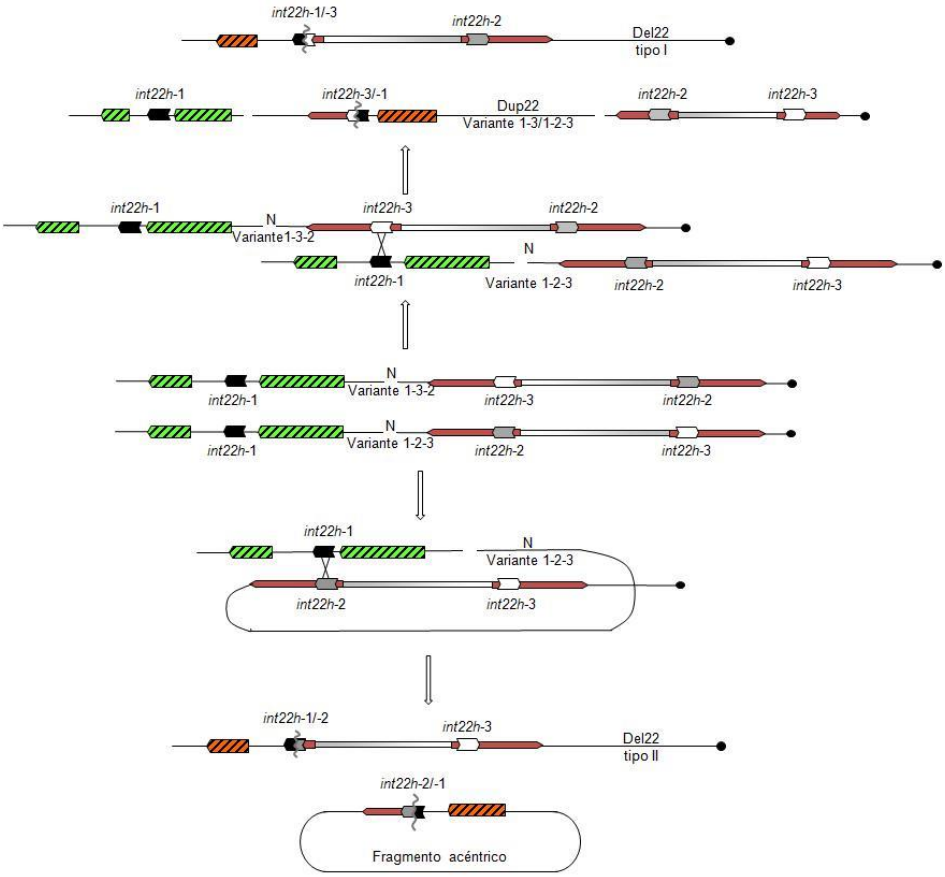


Figura IN.4: Origen de las Dup22 y Del22. Esquema de regiones Xq28 cercanas al telómero Xq. Las referencias y códigos son iguales a los anteriores. Se muestran ambas variantes del alelo N. Hacia arriba, la recombinación homóloga intercromosómica que origina la Dup22 que abarca desde h1 hasta, en este caso (variante h132), la copia centromérica de *int22h* h3 en uno de los alelos y la deleción correspondiente al mismo intervalo, Del22-I, en cromosoma recíproco. Hacia abajo, la recombinación intracromosómica entre h1 y en este caso (variante h123) con la copia centromérica h2 generando la Del22-II y un segmento acéntrico que se pierde, en la copia del recíproco.

Dada la estructura genómica de estas duplicaciones, sería posible encontrar las Dup22 en varones y mujeres de la población general, sin presentar hemofilia. Por otra parte, se especula que si existieran las Del22 en casos clínicos reales, sólo sería

posible encontrarla en mujeres heterocigotas y no en varones hemicigotas, pues ellos sufrirían una severa pérdida de muchos genes además del *F8* (e.g., *CLICK*, *RAB39B*), importantes para la fisiología celular y podrían asociarse a abortos espontáneos de embriones no viables hemicigotas para esta deleción (Green et al, 2007; Bagnall et al, 2006).

Análisis moleculares: caracterización de las mutaciones causales de hemofilia

Pequeñas deleciones/inserciones y sustituciones nucleotídicas

Con la técnica de PCR y *Conformation-sensitive gel electrophoresis* (CSGE) se pueden detectar casi la totalidad de las mutaciones que dan origen a HB y HA leve y moderada (dando cuenta así de mutaciones puntuales y pequeñas deleciones o inserciones) pero sólo el 53% de las mutaciones causales de HA severa (Ganguly et al, 1993). Una vez detectado el segmento CSGE anómalo, la mutación es caracterizada por secuenciación de Sanger y analizada críticamente en cuanto a la asignación del fenotipo asociado.

Grandes deleciones parciales y rearreglos complejos

Las grandes deleciones, definidas como pérdidas de más de 100bp aunque en la práctica se trata de deleciones de uno o más exones completos, y los rearreglos complejos (combinaciones de distintas mutaciones, por ejemplo la combinación de inserciones y deleciones) determinan la causa de aproximadamente 10% de las HA severas (Rossetti et al, 2007) y 5% de las HB severas (Radic et al, 2013), pudiendo ser parciales o totales del *F8* y *F9*, respectivamente.

La detección molecular de las grandes deleciones ligadas al X, en el probando con HA o HB, queda en evidencia por la ausencia consistente de producto de amplificación de uno o más exones vecinos involucrados. En contraste, el diagnóstico heterocigota (eventuales mujeres portadoras) se ve dificultado debido a que el producto de amplificación del alelo no mutado *enmascara* la deleción. Si bien la técnica de referencia para la caracterización y estudio molecular tanto en el paciente hemicigota como para la detección heterocigota para diagnóstico de portadoras de hemofilia sigue siendo la obtención de una señal específica de la mutación (e.g., por PCR de larga distancia, LD-PCR) distinta de la señal referencia no mutada (*gap*-PCR), por su laboriosidad no suele aplicarse rutinariamente en el diagnóstico molecular de la hemofilia, salvo en estudios de genética básica. Por esta razón, la detección homo- hemi- y heterocigota de CNVs en HA y HB se realiza con otros abordajes como los basados en qPCR (PCR cuantitativa en tiempo real) (Costa et al, 2004; Tizzano et al, 2005; Casaña et al, 2009), MLPA (*Multiple ligation-dependent probe amplification*)

(Lannoy et al, 2009; Chen et al, 2012) o CGH *microarrays* (*comparative genome hibridization*, densos de alta resolución, SNP-*Arrays*) (Chan et al, 2005).

Grandes Inversiones

Actualmente el análisis de *Southern blot* original (Lakich et al, 1993) sigue siendo la técnica de referencia para la detección de la Inv22. Este abordaje revela los patrones de restricción del ADN obtenidos con la enzima *Bcl*I mediante la hibridación con una sonda específica de *int22h* (Lakich et al, 1993). La técnica hace posible discriminar la Inv22-I, la Inv22-II, el alelo sin la Inv22 y las combinaciones presentes en las portadoras heterocigotas (Lakich et al, 1993). Si bien esta técnica es eficiente y permitió el diagnóstico directo y preciso en el 42% de familias con HA severa en todo el mundo (Antonarakis et al, 1995), es muy laboriosa y utiliza material radioactivo lo que requiere involucrar personal habilitado. En 1998 se desarrolló un método de diagnóstico basado en LD-PCR tipo *multiplex* con dos pares de *primers* (Liu et al, 1998). Si bien esta técnica es rápida y permite diferenciar la señal de la Inv22, las portadoras de la Inv22 y el alelo sin la Inv22, presenta problemas prácticos asociadas a la amplificación de larga distancia de regiones muy ricas en GC y al análisis electroforético de señales con intensidades desbalanceadas y tamaños moleculares similares (Liu et al, 1998). Rossetti et al (2005) diseñaron un nuevo abordaje para el análisis de la Inv22 basado en IS-PCR (*inverse shifting*-PCR), una modificación de la técnica de PCR inversa (Ochman et al, 1988). Este método rápido para detectar la Inv22 evita la amplificación de *int22h* incluyendo análisis por PCR *multiplex* de fragmentos estándar (Rossetti et al, 2005). El inconveniente que presentan los dos últimos métodos descriptos (i.e, Liu et al; 1998, Rossetti et al, 2005) es que no permiten diferenciar los patrones que corresponden a la Inv22-I de los pacientes con la Inv22-II ni las Dup22 y las Del22.

Para diagnosticar todas las posibles variantes y rearreglos de *int22h* Bagnall et al (2006) y Rossetti et al (2008) desarrollaron nuevos abordajes basados en LD-PCR e IS-PCR, respectivamente que permiten discriminar la Inv22-I e Inv22-II, las Del22-I y Del22-II y las Dup22.

En resumen, en el presente los tres abordajes que permiten detectar las Inv22-I e Inv22-II, las Del22-I y Del22-II, y las Dup22 son el análisis de *Southern blot* (Lakich et al, 1993), el de LD-PCR/2006 (Bagnall et al, 2006) y el de IS-PCR/2008 (Rossetti et al, 2008).

Grandes rearreglos asociados a grandes pérdidas de secuencias

En hemofilia, quizás debido a dificultades experimentales, son escasos los trabajos que presentan la caracterización detallada de las secuencias involucradas y los puntos de ruptura de los grandes rearreglos que involucran deleciones del *F8 y F9*.

Secuencias asociadas a inestabilidad genómica

La presencia de motivos en la secuencia del ADN asociados en la literatura a eventos de recombinación, podría ser un indicio del inicio de la ruptura que originó el rearreglo que se detecta en el paciente con hemofilia. La búsqueda de las secuencias descriptas en la literatura como recombinogénicas permite realizar un mejor análisis teórico de cada uno de estos eventos. Se describen así motivos asociados a rupturas del ADN (e.g., *Vertebrate/plant topoisomerase I consensus cleavage sites*, *Alu core sequences*) (Been et al, 1984; Rudiger et al, 1995), motivos asociados a la detención o pausa de la ADN polimerasa (e.g., *DNA polymerase pause site core sequence*, *DNA polymerase arrest site*) (Weaver et al, 1982) y motivos que originan estructuras secundarias en el ADN (*non-B DNA conformation*) debido a repeticiones invertidas (*cruciform DNA*), repeticiones en espejo (*triplex DNA*), repeticiones directas (*Hairpin DNA*), regiones ricas en oligos $(G)_n$ (*tetraplex DNA*) o $(YRNYR)_n$ (*left-handed Z-DNA*) (Bacolla y Wells, 2004) (Tabla IN.2).

Tabla IN.2: Motivos de ADN asociados a eventos de recombinación

Nombre del Motivo	Secuencia Asociada	**Referencia
Ade6-M26	ATGACGT	Ponticelli et al,(1988)
Alu Core	CCTGTAATCCCAGCACTTTGGGAGGC	Rüdiger et al,(1995)
ARS consensus S. cerevisiae	WTTTATRTTTW	Montiel et al, (1984)
ARS consensus Schizosaccharomyces pombe	WRTTTATTTAW	Johnston y Barker,(1987)
Consensus SAR 1	AATAAAYAAA	Gale et al,(1992)
Consensus SAR 2	TTWTWTTWTT	Gale et al,(1992)
Consensus SAR 3	WADAWAYAWW	Gale et al,(1992)
Consensus SAR 4	TWWTDTTWWW	Gale et al,(1992)
Deletion hotspot consensus	TGRRKM	Krawczak y Cooper, (1991)
DNA polymerase alpha frameshift hotspot 1	TCCCCC	Kunkel,(1985b)
DNA polymerase alpha frameshift hotspot 2	CTGGCG	Kunkel,(1985b)
DNA polymerase alpha pause site core sequence	GAG	Weaver et al,(1982)
DNA polymerase alpha pause site core sequence	ACG	Weaver et al,(1982)
DNA polymerase alpha pause site core sequence	GCS	Weaver et al,(1982)
DNA polymerase alpha/betha frameshift hotspot 1	ACCCCA	Kunkel,(1985a y b)
DNA polymerase alpha/betha frameshift hotspot 2	TGGNGT	Kunkel,(1985a y b)
DNA polymerase arrest site	WGGAG	Weaver et al,(1982)
DNA polymerase betha frameshift hotspot 1	ACCCWR	Kunkel,(1985a)
Drosophila topoisomerase 2 consensus clevage	GTNWAYATTNATNNR	Syer y Hsieh,(1983)
Duplication motif 1	CTSAGYTTTT	Vissers et al, (2009)
Duplication motif 2	WSCAGGNAYWWTTCC	Vissers et al, (2009)
Duplication motif 3	ATTTCTYCAGYNYTGGATHT	Vissers et al, (2009)
**Flanking retrotrasposon sequences*	TTAAAA, TTAAGA, TTAGAA, TTGAAA, TTAAAG, CTAAAA, TCAAGA, AAAAAA, TTTAAA, TAAAAA, GTAAGA	Jurka, (1994)
Heptamer recombination signal	CACAGTG	Early et al, (1980)
Human hypervariable minisatellites sequence 1	GGAGGTGGGCAGGARG	Wahls et al, (1990)
Human hypervariable minisatellites sequence 2	AGAGGTGGGCAGGTGG	Wahls et al, (1990)
Human minisatellites conserved sequence/X-like element	GCWGGWGG	Krowczynska et al, (1990)
Human minisatellites core sequence	GGGCAGGARG	Jeffreys et al, (1985)
Human replication origin consensus	WAWTTDDWWWDHWGWHMAWTTDHWGWHMAWTT	Dobbs et al, (1994)
Ig heavy chain class switch repeat 1	GAGCT	Rabbitts et al, (1981)
Ig heavy chain class switch repeat 2	GGGCT	Rabbitts et al, (1981)
Ig heavy chain class switch repeat 3	GGGGT	Rabbitts et al, (1981)
Ig heavy chain class switch repeat 4	TGGGG	Rabbitts et al, (1981)
Ig heavy chain class switch repeat 5	TGAG	Rabbitts et al, (1981)
LTR-IS motif	TGGAAATCCCC	Edelmann et al, (1989)
Mariner transposon-like element	GAAAATGAAGCTATTTACCCAGGA	Reiter et al, (1996)
Murine MHC deletion hotspot	(CAGR)n	Steinmetz et al,(1987)
Murine MHC recombination hotspot	CAGRCAGR	Steinmetz et al,(1987)
Murine parvovirus recombination hotspot	CTWTTY	Hogan y Faust, (1986)
Nonamer recombination signal	ACAAAAACC	Early et al, (1980)
Pur-binding site	GGNNGAGGGAGARRRR	Bergemann y Johnson,(1992)
Recombination hotspot PRDM9	CCNCCNTNNCCNC	Vissers et al, (2009)
Retrotransposon	TCATACACCACGCAGGGGTAGAGGACT	Zimmerer y Passmore, (1991)
Translin-binding site 1	ATGCAG	Aoki et al,(1995)
Translin-binding site 2	GCCCWSSW	Aoki et al,(1995)
Vaccinia topoisomerase I consensus	YCCTT	Shuman, (1991)
Vertebrate topoisomerase II consensus	RNYNNCNNGYNGKTNYNY	Spitzner y Muller,(1988)
Vertebrate/plant topoisomerase I consensus cleavage sites	CAT	Been et al, (1984)
Vertebrate/plant topoisomerase I consensus cleavage sites	CTY	Been et al, (1984)
Vertebrate/plant topoisomerase I consensus cleavage sites	GTY	Been et al, (1984),
Vertebrate/plant topoisomerase I consensus cleavage sites	RAT	Been et al, (1984)
X-element Escherichia coli	GCTGGTGG	Dewyse y Bradley, (1991)
XY32 homopurine-pyrimidine H-palindrome motif	AAGGGAGAARGGGTATAGGGRAAGAGGGAA	Rooney y Moore,(1995)

*Sólo se presentan las 11 secuencias más frecuentes descriptas en Jurka (1994). **En Abeysinghe et al (2003) se compilan cada una de las secuencias recombinogénicas mostradas en estas Tabla y se citan sus referencias específicas. Código de nucleótidos: W=A o T; R=A o G; Y= C o T; K= G o T; M= A o C; S= G o C; D= A o G o T; B=G o T o C; H=A o C o T; V= C o G o A; N= G o T o A o C.

Elementos repetidos

Los elementos móviles y sus secuencias remanentes no funcionales representan un gran porcentaje del genoma humano (Kazazian, 2004) y constituyen una fuente de inestabilidad genómica asociada en algunos casos al origen de mutaciones causales de enfermedad (Deininger y Batzer, 1999). El origen de algunos rearreglos del *F8* causales de HA ha sido asociado a la presencia de retrotransposones tipo SINE (*short interspersed nuclear elements*) como Alu, y segmentos parciales de LINE (*long interspersed nuclear elements*) (Van der Water et al, 1998; Vidal et al, 2002; Rossetti et al, 2004b). Asimismo, también participan en la estabilización de regiones genómicas involucradas en la generación de grandes rearreglos (sinapsis ectópica) (Liu et al, 2011; Figura IN.5).

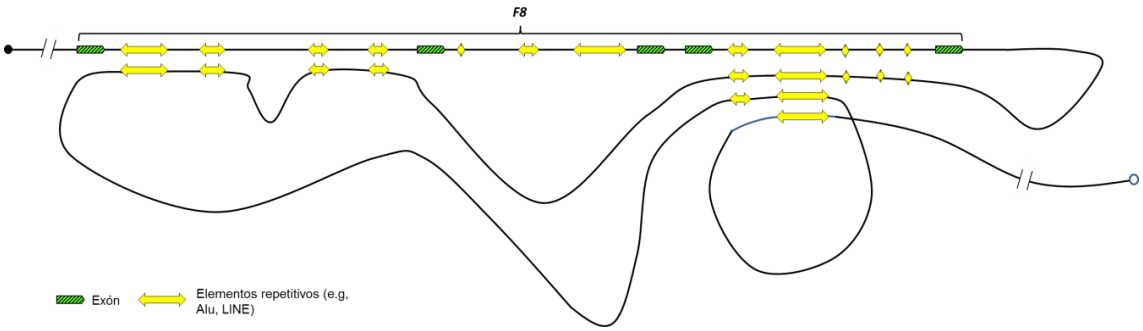


Figura IN.5: Esquema del modelo de sinapsis ectópica. Exones del *F8* funcional (en verde), telómero Xq (círculo cerrado) y centrómero (circulo abierto). En los intrones se muestran como ejemplo algunos elementos repetidos (e.g., SINEs, LINEs) participando en la estabilización de de las regiones intragénica y extragénica río abajo del *F8*.

Modelos de los mecanismos asociados al origen de grandes rearreglos

Los modelos teóricos actuales para explicar el origen de los rearreglos genómicos pueden dividirse en dos grandes grupos, los asociados a la reparación de rupturas del ADN y los asociados a la síntesis del ADN.

Dentro del primer grupo se encuentra la reparación de ruptura de doble cadena del ADN por recombinación homóloga no alélica (NAHR) (Szostak et al, 1983) y la reparación de rupturas en el ADN por la unión de extremos no homólogos (NHEJ) (Moore y Harber, 1996). El mecanismo de reparación asociado a NAHR utiliza una secuencia homóloga para reparar la ruptura generada en la hebra de ADN mientras que la reparación por NHEJ no requiere molde o *templado* homólogo (salvo, a veces microhomologias de 2-10pb) y la unión de los extremos que presentan la ruptura es directa. Ambos mecanismos de reparación están presentes durante todo el ciclo celular, sin embargo, NAHR es predominante al final de la fase de síntesis (S) del ADN y la fase GAP 2 (G2) del ciclo celular mientras que NHEJ es predominante en la fase GAP 1 (G1) del ciclo celular (Rothkamm et al, 2003) (Figura IN.6).

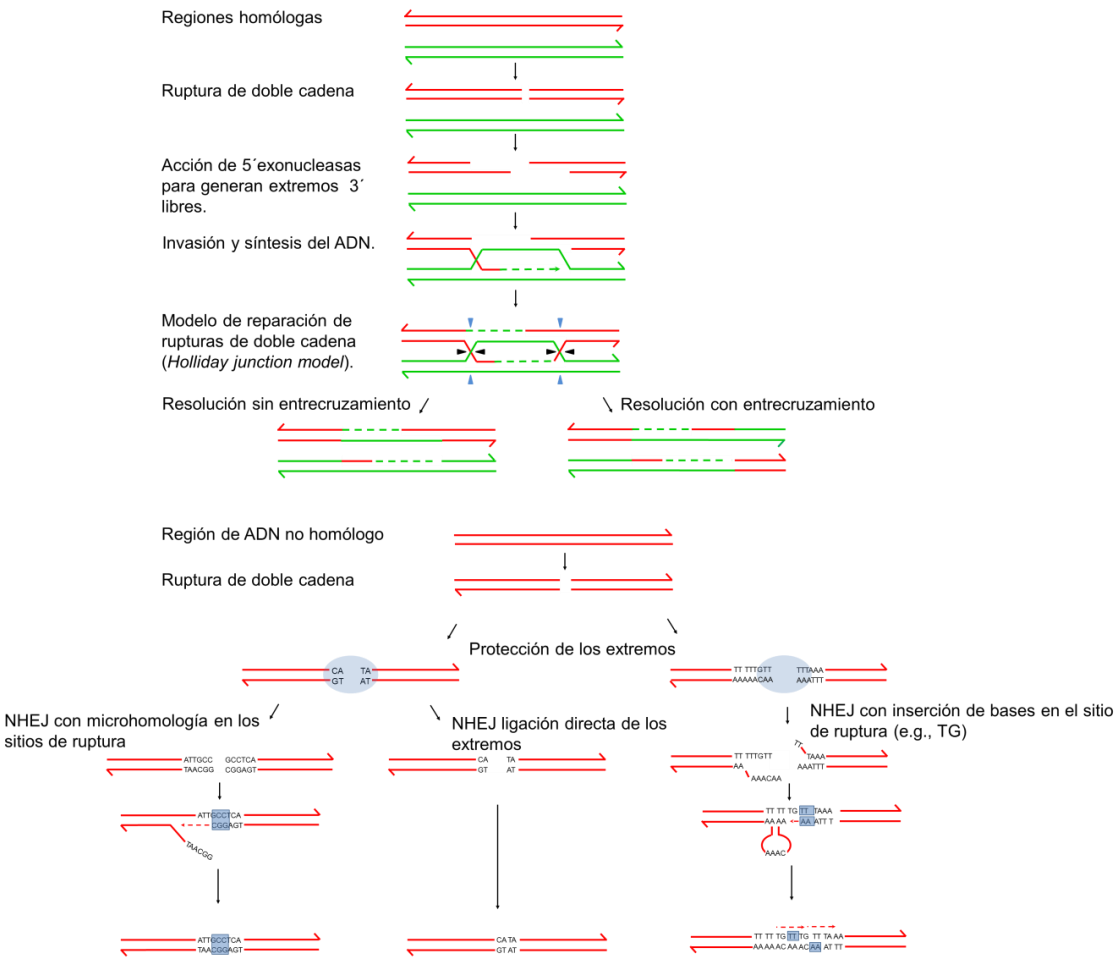


Figura IN.6: Esquema de los modelos asociados a reparación de rupturas en el ADN. Arriba se esquematiza el modelo de NAHR con dos posibles resoluciones (con y sin entrecruzamiento reciproco) y abajo tres posibles casos de NHEJ. En rojo se esquematiza una región genómica y en verde la secuencia homóloga. Las líneas punteadas muestran la síntesis de la nueva cadena de ADN y la flecha la dirección de síntesis. Arriba, los triángulos celestes y negros indican los sitios de resolución del intermediario de Holliday. Abajo, el círculo celeste muestra la proteína protectora de los extremos y el recuadro gris las regiones que presentan microhomología.

El segundo grupo de mecanismos que originan los grandes rearreglos, los asociados a la síntesis del ADN, son *Break-Induced Replication* (BIR) (Smith et al, 2007), *Microhomology-Mediated Break-Induced Replication* (MMBIR) (Hastings et al, 2009) y *Fork Stalling and Template Switching* (FoSTeS) (Lee et al, 2007). Los tres predominan durante la fase S del ciclo celular y son consecuencia del colapso de la horquilla de replicación, por ejemplo debido a una ruptura o la formación de una estructura secundaria en el ADN, y la invasión de otra región genómica de la nueva hebra sintetizada con el objetivo de continuar la síntesis. La diferencia teórica que existe entre los modelos está basada en el número de veces que la hebra nueva sintetizada invade otra región genómica (saltos en la síntesis del ADN) y la longitud de homología requerida entre las distintas regiones involucradas. Los modelos de BIR y MMBIR

requieren homología extensa (10-50pb) o microhomologías (2-10pb), respectivamente, y en general los saltos en la síntesis del ADN son simples, generando duplicaciones o inserciones si el salto es rio arriba y deleciones si el salto es río abajo de la horquilla de replicación colapsada. El modelo FoSTeS puede presentar desde uno a varios saltos en la síntesis del ADN y no requiere homología entre las regiones genómicas involucradas, siendo el modelo elegido en los trabajos para explicar los rearreglos complejos que presentan deleciones e inserciones (directas o invertidas) combinadas (Liu et al, 2012) (Figura IN.7).

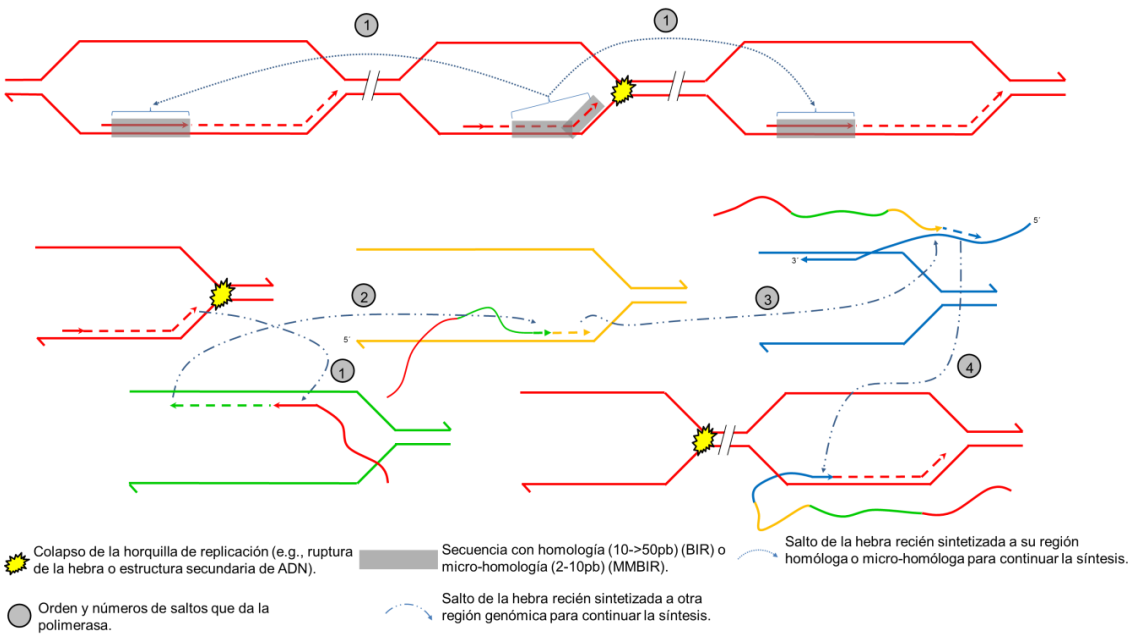


Figura IN.7: Esquema de los modelos asociados a la síntesis del ADN. Arriba se muestran los modelos de BIR y MMBIR, y abajo, el modelo FoSTeS. En ambos esquemas se muestran las horquillas de replicación y las regiones genómicas involucradas en distintos colores. Se indican el, o los saltos a otra región genómica de las hebras recién sintetizadas. Los círculos grises muestran el orden y número de saltos de invasión genómica y síntesis. Se indica la dirección y síntesis de las nuevas moléculas de ADN con flechas y líneas punteadas, respectivamente. Arriba y en el medio se muestra la horquilla de replicación colapsada, a la izquierda el salto de la nueva hebra recién sintetizada río arriba (duplicaciones) y a la derecha río abajo (deleciones).

Cada uno de los modelos presentados suelen dejar firmas moleculares particulares en los sitios de recombinación que permiten su reconocimiento (Weckselblatt et al, 2015) (Figura IN.8).

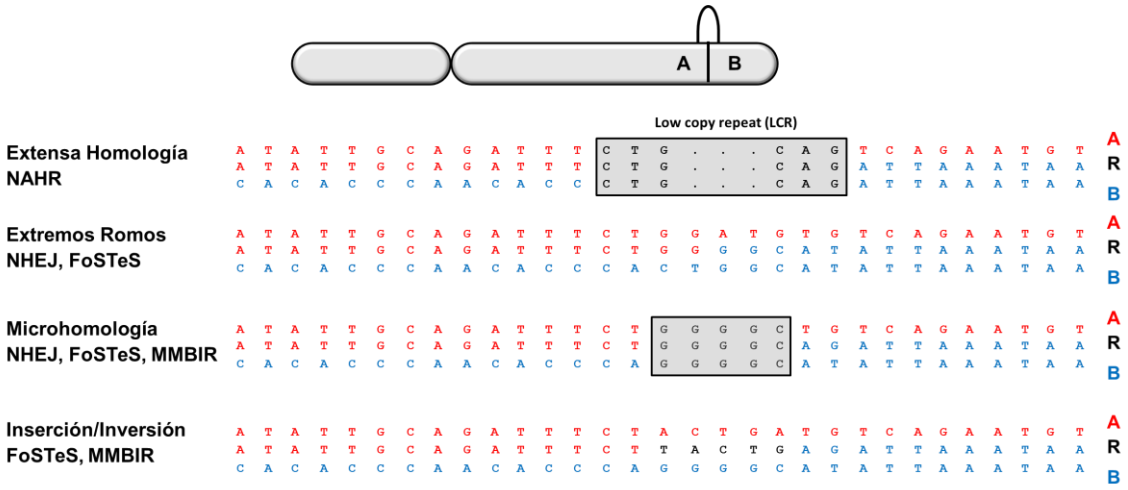


Figura IN.8: Firmas moleculares asociadas a los modelos de generación de grandes rearreglos. Arriba se esquematiza un cromosoma en donde se marcan dos regiones (A) y (B) involucradas en el rearreglo (R). Abajo, se muestran las secuencias involucradas, en rojo la región A y en celeste la región B, y la secuencia del evento R mostrando la firma molecular característica. Los recuadros grises indican regiones de homología extensa o de microhomología. Las bases en negro, sin recuadro, muestran una inserción en el sitio de recombinación.

En este escenario, este trabajo de Tesis y sus objetivos se centran en el estudio de los grandes rearreglos causales de hemofilia abarcando aspectos teóricos y prácticos aplicados al diagnóstico molecular.

OBJETIVOS

I. i. Estimar la prevalencia de la Inv22 del tipo I y del tipo II en familias Argentinas con HA severa.

I. ii. Investigar la presencia de las Dup22 y Del22 mediadas por recombinación entre secuencias *int22h* ubicadas cabeza-cola en familias Argentinas con HA severa (en pacientes y mujeres familiares) y en varones y mujeres de la población Argentina general no afectada.

II. i. Investigar en profundidad eventuales resultados anómalos obtenidos por aplicación de la técnica de IS-PCR versión 2008 (*test* diagnóstico y complementario) en ambas poblaciones Argentinas (i.e., varones y mujeres de familias con HA severa y de la población general no afectada).

III. i. Diseñar, desarrollar y validar un abordaje costo-efectivo y de alta confiabilidad diagnóstica para el análisis de portadoras (heterocigotas) de grandes deleciones causales de hemofilia basado en medición relativa de dosis génica (X/autosoma) usando la tecnología de qPCR para integrarlo al algoritmo de análisis molecular del *F8*/*F9*.

IV. i. Detectar pacientes con HA severa causada por grandes deleciones parciales del *F8* en nuestra población.

IV. ii. Diseñar y desarrollar abordajes costo-efectivos para amplificar específicamente y caracterizar las secuencias de los puntos de ruptura involucrados en cada deleción o rearreglo complejo del *F8* detectado en el punto anterior.

IV. iii. Estimar el potencial mecanismo involucrado en el origen de cada una de estas grandes deleciones y rearreglos complejos del *F8* por aplicación de métodos bioinformáticos y el uso de bases de datos libremente accesibles.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras y población estudiada

El Comité de Ética de los Institutos de la Academia Nacional de Medicina (CEIANM) aprobó todos los Proyectos relacionados a este trabajo de Tesis, y en todos los casos (pacientes y controles) se obtuvo el consentimiento informado correspondiente.

La población estudiada consistió en 287 varones con HA severa, 218 mujeres familiares y 122 varones y 141 mujeres de la población general, resultando en un total de 768 individuos estudiados.

Los estudios moleculares fueron realizados sobre muestras de ADN genómico (ADN_g), extraído a partir de leucocitos separados desde 5ml de sangre periférica anticoagulada con EDTA (Etilen Diamin Tetra-Acetato) 5% y congelada, por el método de *salting-out* y precipitación alcohólica (Lahiri y Nuremberg, 1991). Brevemente, se realizaron tres lavados con una solución hipotónica Tris/EDTA 10 mM (Tris-HCl 10mM, EDTA 10mM) para lisis de eritrocitos, se incubó durante toda la noche con 50µl de solución de Proteinasa K (PK) 20µg/µl y 4,5ml de buffer PK (Tris-HCl 10mM pH 8, EDTA 5mM y SDS 0,5%) a 37ºC para lisis de proteínas. Finalmente, se adicionó una solución sobresaturada de NaCl (1,6M) y para precipitar las proteínas degradadas se incubó a 5°C, por 60 minutos, se centrifugó a 2.500g por 20 minutos y el sobrenadante conteniendo el ADN_g se precipitó con dos volúmenes de etanol absoluto frío. El ADN_g obtenido se lavó en etanol 70% en frío dos veces, se dejó secar y se hidrató (resuspendió) en 50-300µl de agua bidestilada estéril (según el volumen del pellet de ADN_g obtenido) o, alternativamente, Tris/EDTA 10:1mM pH 8. La pureza, concentración e integridad (peso molecular >50kb) del ADN_g se evaluó por electroforesis en gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio y espectrofotometría UV a 260 y 280nm (el criterio de pureza de ADN/Proteínas es una relación de absorbancias 260/280nm mayor a 1,8).

Detección de inversiones, deleciones y duplicaciones

Para llevar a cabo el análisis de los rearreglos que involucran a las copias de *inth1 e int22h* se utilizó la técnica de IS-PCR *test* diagnóstico y complementario (Rossetti et al, 2008). Dos microgramos de ADNg fueron digeridos con 10U de la enzima de restricción *Bcl*I (Thermo Scientific, USA) en 50µl de reacción durante dos horas a 55ºC en el buffer de digestión recomendado por el fabricante de la enzima (10mM Tris-HCl pH 7,5, 50mM NaCl, 10mM $MgCl_2$, 0,1mg/ml seroalbúmina bovina, BSA). Al ADN digerido (ADN_{dig}), se agregaron 100µl de agua deionizada y fue extraído en un volumen (150µl) de fenol (saturado en Tris/HCl pH 8) y IAC (cloroformo:alcohol

isoamílico (IAC), 24:1 vol.:vol.) (1:1 vol.:vol.) y centrifugados a 11.300g durante cinco minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante con ADN_{dig} fue extraído en un volumen (150µl) de IAC y centrifugado a 11.300g durante cinco minutos a temperatura ambiente, finalmente el sobrenadante fue precipitado con una solución 0,3M de NaCl y dos volúmenes de etanol absoluto frío y centrifugados durante 15 minutos a 11.300g, descartado el sobrenadante, secado al aire y resuspendido en 50µl de agua deionizada. La autoligación de los fragmentos de digestión (círculos-B), fue realizada en un volumen de 400µl, con 3U de T4 ADN ligasa (Invitrogen, Argentina) a 15ºC en termociclador por 16 horas (durante toda la noche, ON) y buffer de ligación provisto por el fabricante de la enzima (40mM Tris-HCl, 10mM $MgCl_2$, 10mM di-tio-treitol, DTT, 0,5mM ATP, pH 7,8). Los círculos-B fueron extraídos en un volumen (400µl) de fenol-cloroformo, un volumen (400µl) de IAC y precipitados con dos volúmenes de etanol absoluto frío y NaCl, como se describió más arriba.

El análisis de los círculos-B fue realizado por PCR *multiplex*, utilizando 5µl de ADN sustrato (200-400ng según su calidad), en un volumen de reacción de 25µl, usando 0,5U de Taq ADN Polimerasa (Promega, USA), 0,6µM de cada *primer* (Tabla MM.1 y MM.2); 200µM de dNTPs, 1,5mM de $MgCl_2$ y buffer de Taq polimerasa (Tris/HCl 50mM pH 9,0, 50mM NaCl, 0,1mg/ml BSA). El termociclado consistió de un ciclo inicial de desnaturalización de 2 minutos a 94°C, seguido de 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 60 seg. a 56°C y 90 seg. a 72°C; con un paso de extensión final de 5 min. a 72°C.

Tabla MM.1: Oligonucleótidos utilizados para el análisis de la Inv22-I y -II, Dup22, Del22-I y -II.

Test	**Nombre**	**Secuencia 5' > 3'**	**Coordenadas GRCh38.p2 ***	**Distancia al sitio *BclI* ****
Diagnóstico	**ID**	ACATACGGTTTAGTCACAAGT	154.877.137-17	27
Complementario	**ED**	TCCAGTCACTTAGGCTCAG	155.466.227-09 155.374.504-485	99 99
Diagnóstico y Complementario	**IU**	CCTTTCAACTCCATCTCCAT	154.898.278-59	462
	2U	ACGTGTCTTTTGGAGAAGTC	155.387.949-30	358
	3U	CTCACATTGTGTTCTTGTAGTC	155.450.591-570	306

*Secuencia de nucleótidos del ChrX: NC_000023.11 con fecha del 07/04/2015. ** en pb.

A continuación (Figura MM.1) se esquematizan los tamaños de los círculos-B de cada rearreglo que involucra a *int22h*, la ubicación de cada uno de los *primers* descriptos en la Tabla MM.1 y los productos de amplificación indicativos de cada rearreglo en la estrategia de IS-PCR/2008 (Tabla MM.3).

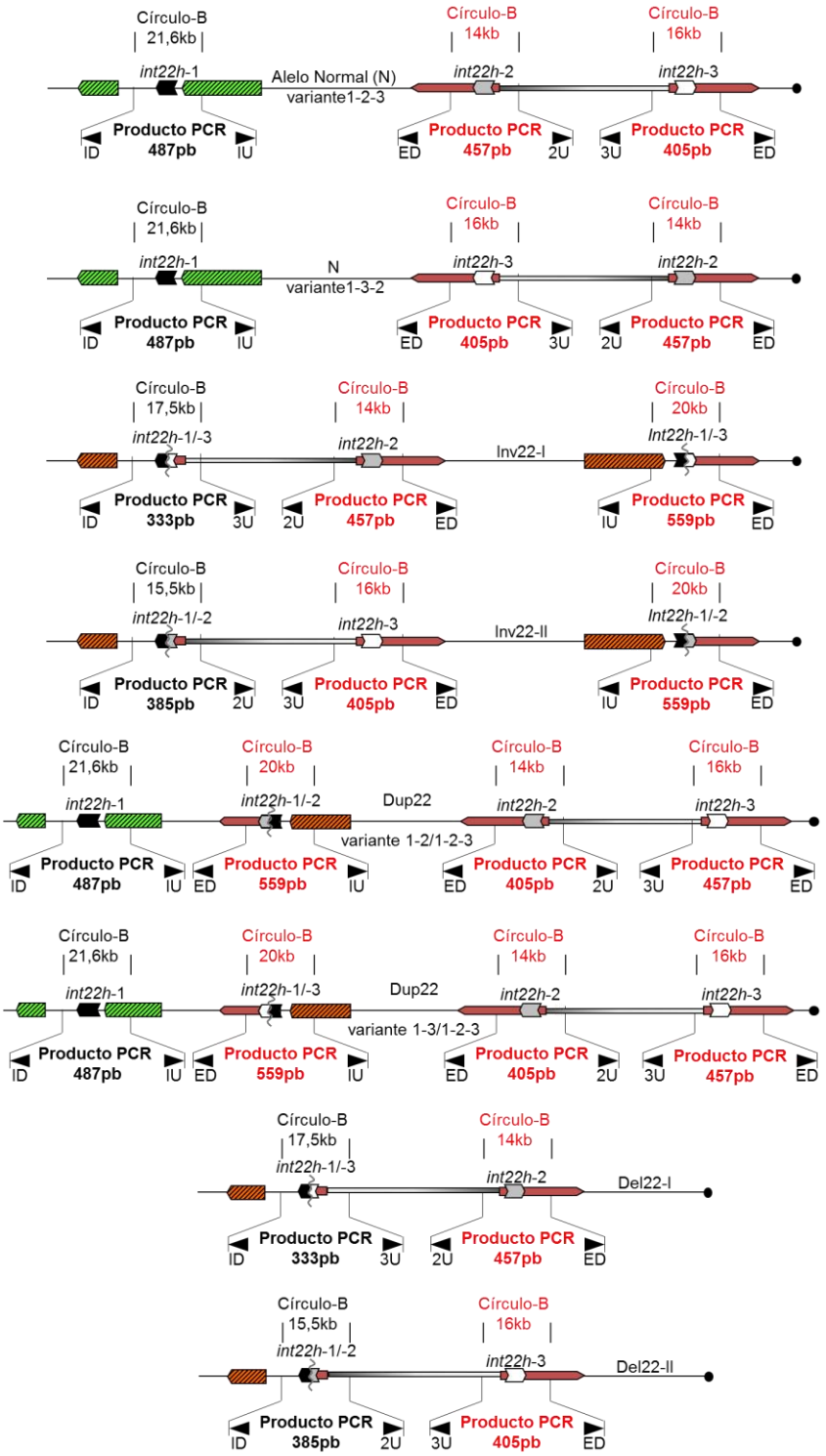


Figura MM.1: Esquema detallado de la estrategia de diagnóstico molecular de la Inv22, Del22 y Dup22 por IS-PCR según Rossetti *et al* (2008). Se indican el tamaño de los círculos-B, los productos de amplificación y la posición especifica de *primers* del *test* diagnóstico y complementario. Las referencias de la Figura son las mismas que en la Figura IN.4. En el esquema se pueden observar las variantes de los rearreglos posibles que involucran a *int22h*. En rojo se muestran los círculos-B y el tamaño de los productos de la amplificación que están comprometidos en el *test* complementario respecto del *test* diagnóstico, en negro.

Tabla MM.2: Oligonucleótidos utilizados para el análisis de la Inv1.

Test	Nombre	Secuencia 5' > 3'	Coordenadas en GRCh38.p2 *	Distancia al sitio *BclI* **
Diagnóstico	**1-ID**	TCTGCAACTGGTACTCATC	155.005.506-488	276
	1-IU	GCCTTTACAATCCAACACT	155.018.183-64 155.136.761-42	36 36
	1-ED	GCCTTTACAATCCAACACT	155.149.000-48.982	190

*Secuencia de nucleótidos del ChrX: NC_000023.11 con fecha del 07/04/2015. ** pb.

A continuación (Figura MM.6) se esquematizan los tamaños de los círculos-B del rearreglo que involucra a *int1h*, la ubicación de cada uno de los *primers* descriptos en la Tabla MM.2 y los productos de amplificación indicativos de cada rearreglo en la estrategia de IS-PCR/2008 (Tabla MM.4).

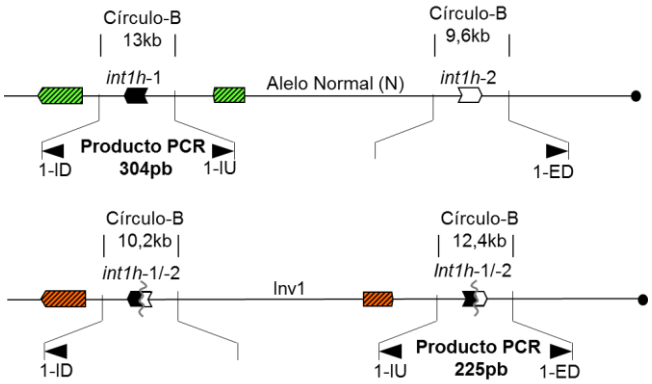


Figura MM.6: Esquema detallado de la estrategia de diagnóstico molecular de la Inv1, por IS-PCR según Rossetti *et al* (2008). Se indican el tamaño de los círculos-B, los productos de amplificación y la posición específica de los *primers*. Las referencias de la Figura son las mismas que en la Figura IN.4. En el esquema se pueden observar las variantes de los rearreglos posibles que involucran a *int1h*.

Los productos de amplificación IS-PCR/2008 (Tabla MM.3 y MM.4) fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa 1,5% durante 45-50 min. en buffer TBE 0,5X (1X, 45mM Tris-Borato y 1mM de EDTA) a 4V/cm, teñidos con bromuro de etidio y analizados bajo transiluminador UV y documentados por fotografía digital. Para los análisis moleculares por electroforesis fueron usados marcadores de tamaño molecular para el rango 100-1.000pb (*ladder* de ADN de 100-pb, PB-L, Argentina).

Tabla MM.3: Tamaños de los productos IS-PCR/2008, Inv22 *test* diagnóstico y complementario.

	Alelo	*Test* diagnóstico (pb)	*Test* complementario (pb)
Varones Hemicigotas	Alelo normal (N)	487	457; 405
	Inv22-I	333	559; 457
	Inv22-II	385	559; 405
	Dup22	487	559; 457; 405
	Del22-I	333	457
	Del22-II	385	405
Mujeres heterocigotas	N/N	487	457; 405
	N/Inv22-I	487; 333	559; 457; 405
	N/Inv22-II	487; 385	559; 457; 405
	N/Dup22	487	559; 457; 405
	N/Del22-I	487; 333	457; 405
	N/Del22-II	487; 385	457; 405

Tabla MM.4: Tamaños de los productos IS-PCR/2008, Inv1 *test* diagnóstico.

	Alelo	*Test* diagnóstico (pb)
Varones Hemicigotas	Alelo normal (N)	304
	Inv1	225
Mujeres Hemicigotas	N/N	304
	N/Inv1	304; 225

Análisis de las muestras que presentaron resultados IS-PCR anómalos

Se utilizó la técnica de análisis de PCR-RFLP (RFLP, *restriction fragment length polymorphism*) para confirmar la presencia de un nuevo sitio de restricción *Bcl*I (BN) generado por un polimorfismo de nucleótido simple (SNP, *single nucleotide polymorphism* (SNP: rs73563631)).

La reacción PCR se realizó con 5µl de ADN sustrato (200-400ng), en un volumen de 25µl, usando 0,5U de Taq ADN Polimerasa (Promega, USA), 0,6µM de los *primers* Bcl_N-up y Bcl_N-lo (Tabla MM.5); 200µM de dNTPs, 1,5mM de $MgCl_2$ y buffer de Taq

polimerasa (Tris-HCl 50mM pH 9,0, 50mM NaCl, 0,1mg/ml BSA). El ciclado incluyó una desnaturalización inicial de 2 min. a 94°C, seguida de 30 ciclos de 30 seg. a 94°C, 60 seg. a 53°C y 60 seg. a 72°C; con una extensión final de 5 min. a 72°C. Para el análisis del RFLP, 5µl del producto de amplificación fueron digeridos con 10U de la enzima *Bcl*I (Thermo Scientifics, USA) en 15µl de reacción durante dos horas a 55°C, en las condiciones recomendadas por el proveedor de la enzima (10mM Tris-HCl pH 7,5, 50mM NaCl, 10mM $MgCl_2$ y 0,1mg/ml BSA).

Tabla MM.5: Oligonucleótidos utilizados para analizar los resultados anómalos en la técnica de IS-PCR.

Nombre	Secuencia 5' > 3'	Coordenadas en GRCh38.p2*	Sitios *Bcl*I	Tamaño **	Distancia *Bcl*I **
Bcl_N-up	GAGCGTTCATGGCAGCACTAT	154.880.193-73	BN	570	415
Bcl_N-lo	ATGGCAGGGGAGGTAAATGTT	154.880.742-22			155

*Secuencia de nucleótidos del ChrX: NC_000023.11, fecha del 07/04/2015. BN: nuevo sitio *Bcl*I. ** en pb

Se diseñó un abordaje basado en la técnica de IS-PCR para genotipificar la Inv22-I y Inv22-II variantes (Inv22-Iv e Inv22-IIv), utilizando una concentración de 0,6µM de los *primers* IU, 2U, 3U y BclI_N-lo (remplazando la función del *primer* ID en el test diagnóstico) (Tabla MM.1 y MM.5) bajo los mismos protocolos de digestión, circularización (formación de círculos-B) y amplificación ya descriptos para la técnica de IS-PCR.

El *primer* BclI_N-lo fue incorporado al *test* diagnóstico de la técnica de IS-PCR permitiendo la discriminación de todos los patrones y variantes de la Inv22 (i.e., las canónicas, Inv22-I e Inv22-II y sus variantes, Inv22-Iv e Inv22-IIv), detectando así todos los rearreglos asociados a *int22h* y la Inv22v en un solo ensayo IS-PCR (Tabla MM.6).

Todos productos de amplificación y digestión (de la técnica PCR-RFLP e IS-PCR modificada), fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa 1,5%, en las mismas condiciones descriptas arriba (Materiales y Métodos, Página 22).

Tabla MM.6: Productos de amplificación IS-PCR modificada, *test* diagnóstico y complementario.

	Alelo	**Test diagnóstico** (pb)	**Test complementario** (pb)
Varones hemicigotas	**Alelo normal (N)**	487	457; 405
	Inv22-I	333	559; 457
	Inv22-II	385	559; 405
	Inv22-IIv	461	559; 457; 405
	Inv22-IIv	513	457
Mujeres homo/heterocigotas	**N/N**	487	457; 405
	N/Inv22-I	487; 333	559; 457; 405
	N/Inv22-II	487; 385	559; 457; 405
	N/Inv22-Iv	487; 461	559; 457; 405
	N/Inv22-IIv	487; 513	457; 405

Análisis de haplotipos de las muestras que presentaron resultados IS-PCR anómalos

Para el análisis de haplotipos de ambas familias con HA severa asociada a las Inv22v, se utilizaron siete STRs (*short tandem repeats* o microsatélites) polimórficos localizados en la región distal del cromosoma Xq28 humano, cuatro marcadores dentro de los intrones 13, 21, 22 y 25 (STR13, STR21, STR22 y STR25, respectivamente) del *F8* y tres marcadores extragénicos (dos río arriba del *F8*, DXS7423, DXS1073, y uno río abajo, DXS1108) (Tabla MM.7).

La amplificación se realizó sobre 10-50ng de ADN_g para PCR *dúplex* y 100-150ng para las PCR *multiplex*, en un volumen de reacción de 20µl, usando 0,5U de Taq ADN polimerasa (Promega, USA), 0,5µM de cada *primers*; 200µM de dNTPs, 1,5mM de $MgCl_2$ y buffer de Taq polimerasa (50mM Tris-HCl pH 9,0, 50mM NaCl, 0,1mg/ml BSA).

El ciclado incluyó una desnaturalización inicial de 3 min. a 94°C, seguido de 30 ciclos de 30 seg. a 94°C; 60 seg. a 54°C (STR13, STR22 y DXS1073) o 58°C (STR25, DXS1108 y DXS7473); 30 seg. a 72°C; y una extensión final de 6 min. a 72°C, en un termociclador con sistema de gradiente PCR Bioer 9600 (Techne, China). El análisis alélico se determinó en un equipo de electroforesis capilar en condiciones desnaturalizantes (ABI 3130xl *Genetic Analyzer,* Applied Biosystems, USA).

Tabla MM.7: Oligonucleótidos utilizados para análisis de STRs.

Nombre (Repetición)	Secuencia 5' > 3'	Coordenadas en GRCh38.p2*	Tamaño (pb)	Referencia
DXS7423 (TCCA)	FAM-GTCTTCCTGTCATCTCCCAAC TAGCTTAGCGCCTGGCACATA	150.542.640-21 150.542.475-54	187	Edelmann et al, 2002
DXS1073 (TG)	HEX-ATGCCCTCTCCGAGTTATTAC GATTGGTGGCCTTTGAAACAC	154.600.637-57 154.600.759-79	143	Fimiani et al, 2006
***F8*Int25.3 (TG)**	AAATTTTCACACGCACACCTG HEX-GCCTGGACTACAGAGGGAGAC	154.849.985-850.005 154.850.154-74	190	Machado et al, 2009
***F8*Int22 (GT)**	GTACTGGGAATGCACAGCCTA FAM-CCAGACATGTCAAGGTGTCAA	154.875.676-96 154.875.862-82	207	Liang et al, 2009
***F8*Int21 (AC)**	FAM-AGGTGTGGGCAAAGCATTAG AGCCTGCTTCTTGACAAACC	154.896.596-615 154.896.452-71	126	Machado et al, 2011
***F8*Int13 (AC)**	FAM-GCATTCAACTGTACATAATGTATC CCAAATTACAGATTGAATAAGCC	154.936.069-92 154.935.941-63	107	Machado et al, 2009
DXS1108 (CA)	FAM-GTGAATTCATCATATGTGATTTCC ACTAGGCGACTAATACAGTGGTGC	155.632.212-188 155.632.351-29	118	Edelmann et al, 2002

*Secuencia de nucleótidos del ChrX: NC_000023.11 con fecha del 07/04/2015.

Análisis de grandes deleciones en heterocigosis (medición de dosis génica)

El análisis heterocigota de grandes deleciones se realizó por medición de dosis génica por qPCR, en el equipo RotorGene (Qiagen, Países Bajos) usando el sistema comercial *Mezcla Real* que incluye Taq DNA Polimerasa, dNTPs, Mg^{2+}, conservantes, buffer y fluorocromo verde (Biodynamics, Argentina). Se eligió una región sobre la secuencia genómica del gen *CTLA4* (*citotoxic T-lymphocyte associated protein 4*) localizado en 2q33, para la amplificación cuantitativa de referencia (R); y tres regiones blanco de amplificación específicas (T) en el *F8* (i.e., Promotor (F8p1), Exón 6 (F8e6), Exón 26 (F8e26)) en Xq28 y una en el *F9* (i.e., Exón 8 (F9e8)) en Xq27.1-q27.2. Para la puesta a punto y validación de los protocolos qPCR, dos microgramos de ADN_g de un varón control de la población general (CN85) fueron digeridos con 20U la enzima de restricción *Eco*RI (LifeTechnologies, USA) en 50µl de reacción, ON a una temperatura de 37ºC con 5µl del buffer de digestión recomendado por el proveedor (500mM Tris-HCl, pH 7,5, 100mM MgCl2 10mM DTT, 1mM NaCl) y 0,1mg/ml de BSA.

El ADN_{dig} fue llevado a una concentración de trabajo de 10ng/µl, a partir de esta solución de trabajo se realizaron diluciones seriadas al 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 y 1/32.

Con ocho microlitros de cada dilución (que corresponden a 40, 20, 10, 5 y 2,5ng de ADN_{dig}, respectivamente) se construyó una curva de calibración (CT (*crossing threshold*) *versus* cantidad conocida de ADN_g o *input*) para cada segmento o región R (dos copias, 2c) y para cada segmento T (una copia, 1c) por triplicado. Ocho microlitros de la dilución 1/8 (10ng de ADN_{dig}) por duplicado de 30 individuos control de la población general, 15 varones 46;XY como control de simple dosis (T/R~1/2) y 15

mujeres 46;XX como control de doble dosis (T/R~2/2) mostraron valores R y T que fueron interpolados en las curvas de calibración correspondientes. Los valores promedio de los duplicados de T y R que se encontraron dentro de los rangos dinámicos de CT de las curvas de calibración (rango en el que los valores de CT de la curva de calibración responde eficientemente a la concentración de ADN_g conocida) fueron considerados, mientras que aquellas muestras cuyas diluciones no entraron dentro del rango dinámico fueron repetidas utilizando un *input* de ADN_{dig} de acuerdo a los rangos qPCR óptimos para realizar el análisis. Los valores T/R obtenidos de los 15 varones y 15 mujeres de la población general pasaron una prueba de Normalidad (test de Shapiro-Wilk, $p<0,05$) y fueron utilizados para la construcción de las curvas Normales (curvas de Gauss) de 1c y de 2c, respectivamente. Estas curvas Normales T/R de varones y mujeres, obtenida a partir de los estimadores de posición media o promedio (*mean*) y desvío estándar (*sd*) representan la distribución más probable de simple y doble dosis de los segmentos qPCR ligados al cromosoma X, respectivamente. La fórmula de las curvas Gaussianas Normalizadas (con área bajo la curva, AUC, igual a la unidad) es:

$$f(T/R) = \frac{1}{sd \times \sqrt{2\pi}} \times e^{-0.5 \times ((T/R - mean)/sd)^2}$$

Los valores CT provenientes de ocho microlitros de la dilución 1/8 (10ng de ADN_{dig}) por duplicado, de cada mujer familiar en riesgo de ser portadora de una gran deleción involucrando la región T específica estudiada, fueron interpolados en cada una de las curvas de calibración correspondientes y a partir de los valores T y R obtenidos, se calcularon las relaciones T/R. El valor de T/R obtenido en cada una de las mujeres en riesgo fue ingresado en las ecuaciones Normales específicas (i.e., de varones control de simple dosis (1c) y de mujeres control de doble dosis (2c)) se calcularon las Probabilidades de deleción heterocigota (Px-) y de no-deleción (Pxx). Finalmente el riesgo de ser portadora (*carrier probability*) "Pc" se estimó mediante la fórmula: Px- / (Pxx + Px-).

La reacción de PCR se realizó en un volumen total de reacción de 25µl, usando 14µl de Mezcla Real (Biodynamics, Argentina), 0,6µM de los *primers* P1A, P1B, 6A, 6B, E26-qRT-up, E26-qRT-lo, 9H2A, 9H2B, CTLA-F, CTLA-R según el caso (Tabla MM.8). El termociclado para F8-P1, F8-E6, F9H2 y $CTLA4_a$ incluyó un ciclo inicial de desnaturalización de 2 min. a 94°C, seguido de 45 ciclos de 15 seg. a 95°C, 60 seg. a 55°C y 60 seg. a 72°C con detección de fluorescencia en este segmento. El termociclado para F8-E26, $CTLA4_b$ fue diferente, incluyó un ciclo inicial de

desnaturalización de 2 min. a 94°C, seguido de 45 ciclos bifásicos de 15 seg. a 95°C y 60 seg. a 60°C con detección de fluorescencia en este segmento. Cada amplificación qPCR fue seguida de un análisis por curva de *melting* para explorar la especificidad de cada producto PCR.

Para estimar la especificidad y unicidad de los productos qPCR (F8-P1, F8-E6, F9H2, $CTLA4_a$, E26 y $CTLA4_b$), éstos fueron analizados mediante una electroforesis en gel de agarosa 1,5%, en las condiciones mencionadas arriba (Materiales y Métodos, Página 22).

Tabla MM.8: Oligonucleótidos utilizados para el análisis heterocigota de grandes deleciones.

Nombre	Secuencia 5' > 3'	Coordenadas en GRCh38.p2*	Función	Tamaño (pb)	Gen
P1A	GAGCTCACCATGGCTACATTC	156.430.162-42	T	539	*F8*
P1B	TCCTGTCACTCCTCTTCTCAG	156.430.680-60			
6A	TCCCACTTATTGTCATGGAC	156.468.822-41	T	422	*F8*
6B	TACAGAACTCTGGTGCTGAA	156.469.224-43			
E26-qRT-up	AACACAACAAAAATGTAACAGGG	156.617.297-319	T	215	*F8*
E26-qRT-lo	AGGCAGATGGAAGGAGCAGTA	156.617.491-511			
9H2A	TTTGGATCTGGCTATGTAAGT	139.561.728-48	T	488	*F9*
9H2B	GAAATTCTCCCCTGTAAAG	139.562.197-215			
CTLA4-F	AAATGAATTGGACTGGATGGT	203.867.510-30	R	247	*CTLA4*
CTLA4-R	TTACGAGAAAGGAAGCCGTG	203.867.737-56			

*Secuencia de nucleótidos del ChrX: NC_000023.11 con fecha del 07/04/2015.

Detección primaria de grandes rearreglos

Para la detección primaria de grandes rearreglos del *F8* se aplicó un esquema de amplificación de 38 productos de amplificación (cuyos tamaños, 260-547pb y *primers*, Tabla MM.9, están diseñados para aplicar la técnica de *screening* (monitoreo) de mutaciones pequeñas por análisis de heterodúplex por CSGE) que incluyen todas las secuencias exónicas codificantes (26 exones), el promotor y las secuencias intrónicas vecinas a los exones y asociadas al *splicing*. Con este esquema las deleciones grandes son definidas como la ausencia repetida y consistente de uno o más productos de amplificación contiguos en el gen.

El termociclado para estos 38 productos de amplificación consistió de un ciclo inicial de desnaturalización de 2 min. a 94°C, seguido de 30 ciclos de 30 seg. a 94°C, 60 seg. a 50-58°C (se aplicaron tres temperaturas de hibridación, 50, 55 y 58°C según el caso, Tabla MM.9) y 60 seg. a 72°C; con un paso de extensión final de 5 min. a 72°C.

Tabla MM.9: Oligonucleótidos y condiciones de amplificación PCR para detección de mutaciones por CSGE.

#	Región *F8*-exón	Secuencia 5' -> 3'	Coordenadas GRCh38.p2*	Tamaño (pb)	T. hibrid. (°C)
1	Prom1A	TGTAAACAGCCTGGAAAAG	155.023.670-52	435	55
	Prom1B	CAGGGTAAAACCCTACATC	155.023.254-36		
2	Prom2A	CCAGTATAACCAGAGTGAG	155.023.345-27	438	50
	Prom2B	TTTAATTTGTGCTCCTATTC	155.022.927-08		
3	Prom3A	AGGGCAAAAGCAGAGAGAC	155.023.055-37	450	55
	Prom3B	AATATCTTTAGCTCCCAGG	155.022.624-06		
4	1A	ACTGCTCTCAGAAGTGAATG	155.022.831-12	524	55
	1B	GTAGCATCACAACCATCCTA	155.022.325-06		
5	2A	CCTCCTTGCTAATAGTAGAA	154.999.700-681	331	55
	2B	ATTCTCTTTGGCAGCTGCAC	154.999.388-69		
6	3A	TGCTTCTCCACTGTGACCT	154.997.191-73	335	50
	3B	ATCTAGTAAATGTTAAGAAAT	154.996.856-36		
7	4A	GTACAGTGGATATAGAAAGGAC	154.993.192-71	319	55
	4B	GATTCAGTTGTTTGTACTTCTC	154.992.895-74		
8	5A	TTCTTACTGTCAAGTAACTG	154.987.407-388	247	50
	5B	CTGAACAGTAATGTAATTTA	154.987.153-34		
9	6A	TCCCACTTATTGTCATGGAC	154.985.046-27	423	55
	6B	TACAGAACTCTGGTGCTGAA	154.984.644-25		
10	7A	GGCAAGAGCTGTTGGTTTG	154.969.719-01	450	55
	7B	TGTCCAGTAAATTTTATTAAAAGT	154.969.283-60		
11	8A	CCATATAGCCTGCAGAACAT	154.966.809-789	547	55
	8B	CTGATGCTCAGCTATGTTAG	154.966.280-61		
12	9A	CTAACATAGCTGAGCATCAG	154.966.280-61	416	55
	9B	AGATATGTCCATTGGAGACAA	154.965.884-63		
13	10A	CTAGCCTCAAATTACTATAATG	154.961.289-68	347	55
	10B	ACTTTAGACTGGAGCTTGAG	154.960.962-43		
14	11A	TGCGACTTTAGCTTCCACTT	154.957.307-288	445	50
	11B	ACTGACCTATATTGCAAACCA	154.956.882-62		
15	12A	TGCCATCGCTTTCATCATAG	154.954.128-09	320	58
	12B	CATTCATTATCTGGACATCAC	154.953.829-09		
16	13A	AACAATCTACTTTTTTGGAAGA	154.948.059-38	474	50
	13B	CCTCAAGCAAGAGAATGCTA	154.947.602-583		
17	14A	GACCTGTGATATAATGATAC	154.931.800-781	518	55
	$14A_2$	GAAAAAGTCTCATATTTGGC	154.931.301-282		
18	$14B_1$	CCTTGGTTTGCAGACAGAAC	154.931.421-02	392	58
	14B	TGTATTATCAGTACCTGCTG	154.931.048-29		
19	14C	AGCAACAGAGTTGAAGAAAC	154.931.131-12	499	55
	$14C_2$	CTAATATATTTTGCCAGACT	154.930.651-32		
20	$14D_1$	AACAAAACTTCCAATAATTC	154.930.731-12	350	55
	14D	AGAGTTCTTTCCATGAGTCC	154.930.400-381		
21	14E	CCCCATTCCACCAGATGCAC	154.930.483-64	501	58
	$14E_2$	ATCTTGAAGTACTGGAGCAT	154.930.001-29.982		
22	$14F_1$	TACATACAGTGACTGGCACT	154.930.001-29.982	381	58

	14F	GACCACTGGGTTGAGGTGTC	154.929.729-10		
23	14G	CACGCAACGTAGTAAGAGAG	154.929.811-792	440	55
	$14G_2$	GCCAACCTCTCTTTGATCAC	154.929.371-52		
24	$14H_1$	TATAGAAAGAAAGATTCTGG	154.929.371-52	345	50
	14H	CAGGTCTGTTTGCTTCATTC	154.929.127-08		
25	14J	CCCTACGGAAACTAGCAATG	154.929.214-195	483	55
	$14J_2$	TCTTCATTTCAACTGATATG	154.928.731-12		
26	$14K_1$	AGGACTGAAAGGCTGTGCTC	154.928.841-22	347	58
	14K	AAGAGTTTCAAGACACCTTG	154.928.475-56		
27	15A	AGATGAAGTGGTTAACTATGC	154.906.690-70	348	55
	15B	GTGGGAATACATTATAGTCAG	154.906.362-42		
28	16Anew	TTTTTTGTCGTTATTGTTCTAC	154.905.046-25	397	55
	16B	TCAGTAGATTCCAGAATGACA	154.904.670-50		
29	17A	TGTCATTCTGGAATCTACTGA	154.904.670-50	491	55
	17B	CACTCCCACAGATATACTCT	154.904.198-79		
30	18A	AGAGTATATCTGTGGGAGTG	154.904.198-79	412	55
	18B	CTTAAGAGCATGGAGCTTGT	154.903.805-786		
31	19A	GCAAGCACTTTGCATTTGAG	154.902.311-292	341	55
	19B	AGCAACCATTCCAGAAAGGA	154.901.989-70		
32	20A	ACGTTGAGTACAGTTCTTGG	154.901.578-59	311	55
	20B	ACTAATAGAAGCATGGAGATG	154.901.284-64		
33	21N	CAGCTTAGATTAACCTTTCTC	154.900.047-27	260	50
	21B	GAGTGAATGTGATACATTTCC	154.899.841-21		
34	22A	AAATAGGTTAAAATAAAGTGTTAT	154.896.267-44	280	50
	22B	TGGAAGCTAAGAGTGTTGTC	154.896.007-5.987		
35	23A	GTCTTATGTAGATGTTGGATG	154.863.353-33	349	55
	23B	AGTCTCAGGATAACTAGAACA	154.863.024-04		
36	24A	CAGTGGAAGCTGCTCAGTAT	154.861.938-19	350	55
	24B	CCCATAACCAAACTTCCTTG	154.861.595-76		
37	25B	AGTGCTGTGGTATGGTTAAG	154.860.695-76	373	55
	25B	TTGCTCTGAAAATTTGGTCATA	154.860.354-24		
38	26A	GGTTTAATCCTGGACTACTG	154.837.860-41	356	55
	$26A_2$	GCACAAAGGTAGAAGGCAAG	154.837.523-04		

*Secuencia de nucleótidos del ChrX: NC_000023.11 con fecha del 07/04/2015.

Acercamiento a las rupturas de ubicación incierta por bipartición de las distancias

Según su ubicación, el análisis de las deleciones parciales del *F8* se dividió en dos categorías: las deleciones que incluyen extremos del gen (i); y aquellas intersticiales que no incluyen extremos (ii). Para el análisis de las deleciones tipo (i) se diseñó un abordaje de acercamiento por bipartición con productos de amplificación extragénicos usados como mojones (*tags*) utilizando los siguientes pares de *primers*: F8-100kb-up/-lo, F8-75kb-up/-lo, F8-68kb-up/-lo, 2F8-68kb-up, F8-62.5-up/-lo, F8-56.2kb-up/-lo, F8-50kb-up/-lo, F8-12.5kb-up/-lo, F8-6.5kb-up/-lo y F8-3.8kb-up/-lo; para las deleciones que involucraron secuencias de la región río arriba del *F8* (secuencias regulatorias,

Promotor y secuencias vecinas, F8-); y F8+100kb-up/-lo, F8+50kb-up/-lo, F8+25kb-up/-lo, F8+18.5kb-up/-lo, F8+12.5kb-up/-lo, F8+6.5kb-up/-lo y F8+3.5kb-up/-lo para las deleciones que involucran al exón 26 y regiones río abajo del *F8* (F8+) (Tabla MM.10).

El análisis (ii) se separó en dos categorías: (a) aquellos casos donde se cuenta con productos de amplificación del *F8* (Tabla MM.9) positivos a ambos lados de la deleción y que debido a las distancias físicas entre ellos es posible amplificarlos por LD-PCR directamente y (b) aquellos casos en los que hubo que diseñar un abordaje por bipartición en las regiones intrónicas involucradas debido a que los tamaños de los intrones y regiones de incerteza superaban los límites superiores para su amplificación sensible por LD-PCR. Para estos últimos casos (ii.b) se utilizaron los siguientes mojones de amplificación con los pares de *primers*: IVS1-up/-lo, IVS1IU-up/-lo, IVS1ID-up/-lo, IVS2-up/-lo, IVS6F-up/-lo, IVS6M-up/-lo, IVS6S-up/-lo, IVS9-up/-lo, IVS12-up/-lo, IVS13-up/-lo, IVS22-up/-lo, IVS25F-up/-lo, IVS25F_new-up/-lo, IVS25M-up/-lo, IVS25S-up/-lo y U2_Del-up/-lo (Tabla MM.10).

La puesta a punto de los productos de amplificación para el análisis por bipartición se realizó con un varón de la población Argentina general, como control normal (CN81). Con el objetivo de eliminar cualquier inespecífico que pudiera causar una mala interpretación de los resultados en los pacientes, se evaluaron concentraciones crecientes de los *primers* (0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 y 1,0µM) para cada producto de amplificación y en los casos en que no se pudieron eliminar los inespecíficos por este método se evaluó la concentración óptima a diferentes temperaturas. La puesta a punto y análisis por bipartición (i.e., (i) y (iib)) se realizó en condiciones de PCR estándar, sobre 300ng de ADN_g sustrato, en un volumen de 25µl, usando 0,5U de Taq ADN polimerasa (Promega. USA), 0,2-0,6µM de los *primers* (Tabla MM.10); 200µM de dNTPs, 1,5mM de $MgCl_2$ y buffer de Taq polimerasa (50mM Tris-HCl pH 9,0, 50mM NaCl, 0,1mg/ml BSA). El ciclado incluyó una desnaturalización inicial de 2 min. a 94°C, seguido de 30 ciclos de: 30 seg. a 94°C, 60 seg. a 50-58°C (según corresponda, Tabla MM.9) y 60 seg. a 72°C; con una extensión final de 5 min. a 72°C.

Tabla MM.10: Oligonucleótidos utilizados para el análisis por bipartición de las grandes deleciones del *F8*.

Nombre	Secuencia 5' -> 3'	Coordenadas GRCh38.p2*	Tamaño (pb)	T. hibrid. (° C)
Primers Extra-génicos				
F8+100kb-up	CAGGGGCAGGGAGAATAAGC	154.736.688-69	403	55
F8+100kb-lo	GAAGTGTGGCAGTGGAAGAGAAA	154.737.071-49		
F8+50kb-up	AACCCTCCCCCACCCATTA	154.786.077-59	470	55
F8+50kb-lo	GCTCCCCCACCATTCTTACCT	154.786.528-08		
F8+25kb-up	AATGTTAAGCTGACACCCGAGACA	154.817.292-71	472	55
F8+25kb-lo	AAAAAGGCAGCAGCGAAGGATA	154.816.844-21		

F8+18.5kb-up	TATACACCCTGGGGTTCGTTGT	154.820.393-72	1262	55
F8+18.5kb-lo	CGTGAGCAGCTGGAGTCGT	154.819.150-32		
F8+12.5kb-up	CCCCTCGCTTAATCTGGTTTCT	154.822.572-51	572	53
F8+12.5kb-lo	AGGTATTTCTATTTATTGACTATT	154.823.122-099		
F8+6.5kb-up	AGGGCCACTGGAAGAAGGAC	154.830.120-01	812	56
F8+6.5kb-lo	TTGGCAGAGTGAGCTAGGATTACC	154.830.911-888		
F8+3.5kb-up	GCATGGCAAAGGGCTCACAC	154.832.987-68	379	55
F8+3.5kb-lo	CCAGTGGAATTAGGCCTTAGTCTT	154.832.632-09		
F8-100kb-up	CACATGCAGGCAGACCAATAGA	155.120.245-25	400	50
F8-100kb-lo	TCAGTGAGGGCATAGAGGTG	155.120.624-05		
F8-75kb-up	CCTAGAACAGGGGTCCACAAA	155.098.508-488	612	55
F8-75kb-lo	AGAGAGAAAGAATTCAAGGCATAAA	155.099.099-75		
F8-68kb-up	AGCTTCCTAGGTCCCCAGTATC	155.091.028-07	588	55
F8-68kb-lo	AATGCTTTCAACCTTGTCATCA	155.090.462-41		
F8-62.5kb-up	CCTTGGGGCGGTTTACA	155.085.809-793	462	57
F8-62.5kb-lo	CTCTCGGACATGCCTTCTGA	155.086.255-36		
F8-56.2kb-up	GCTCTGATTTATATTCCTTTGTGC	155.076.877-54	395	51
F8-56.2kb-lo	ATTTCTACTCGGTCCTTCCTCTTA	155.077.248-25		
F8-50kb-up	GGGCTCCCTTAATGATACAACCTT	155.072.488-65	498	55
F8-50kb-lo	ATCAATGGGGAAATGCCTCTAAA	155.072.962-40		
F8-25kb-up	TGTCTTCCCTCCTCCTCTCCTTAT	155.047.723-00	416	55
F8-25kb-lo	GGGCCCCAAAACGAAACA	155.048.115-098		
F8-12.5kb-up	TCCAAAATTGCAACTTAGAA	155.033.274-55	493	53
F8-12.5kb-lo	CTGGCATATAGGAAACAATCA	155.033.747-27		
F8-6.5kb-up	GATGACTCTGGGAAGGTG	155.028.005-988	310	55
F8-6.5kb-lo	GTCATTGGTCAAACACTGCT	155.028.297-78		
F8-3.8kb-up	GTACAATCCAACATGTTTGAGGTTC	155.025.151-27	1355	55
F8-3.8kb-lo	CTTTTGAATTTTACATGCGAGTTA	155.026.481-58		
Primers Intersticiales (intra-*F8*)				
IVS1-up	ATGGTATGGCTTTGTTTCTT	155.014.803-784	1026	53
IVS1-lo	TGCCAGCACGGTCAGTTT	155.013.794-77		
IVS1ID-up	CCAAGGGCAGGAGAAGACAG	155.002.547-28	1342	55
IVS1ID-lo	CTAAAAATGGTGAAAATGGCTAAA	155.001.229-06		
IVS1IU-up	TAGAGGCCCAGGTTGTCAGTAG	155.010.808-787	2724	55
IVS1IU-lo	TGTACAGCAAAAGAGATGAGGG	155.008.106-085		
IVS2-up	AGCAGTGGGGTGTCTCCTTGTT	154.998.569-48	479	55
IVS2-lo	CTCCCTTTTCTTGCACTTTGGTTG	154.998.114-091		
IVS6S-up	TAAAAATAAGGTAACAATAGGAT	154.983.237-15	655	50
IVS6S-lo	ACTTACATACTTACAACCATACAT	154.982.606-583		
IVS6M-up	CTGCAAAGACGAGTAAAACCATA	154.981.236-14	1033	55
IVS6M-lo	TCCTGAAGCCCCTCCTGATT	154.980.223-04		
IVS6F-up	ATTCCTGGACACATACAACCTACC	154.974.836-13	965	55
IVS6F-lo	CACAAGCTCCGCCTCTGG	154.973.889-72		
IVS9-up	GGGTTTTAAGACAAGAGCAGAAGT	154.963.046-23	773	55
IVS9-lo	GAGGGCTGACAGTACTTAGGTTTC	154.962.297-74		
IVS12-up	CAAGAGACACAGGGGAAGG	154.951.769-51	1301	55
IVS12-lo	TATCTGAAATCACTGGAATGTAAG	154.950.492-69		
IVS22-up	ATTAATTTACACTCCCATCAACAG	154.872.113-090	1157	57

IVS22-lo	GAAAATAAAATACCTACGAATACA	154.870.980-57

*Secuencia de nucleótidos del ChrX: NC_000023.11 con fecha del 07/04/2015. IVS: *interveining sequence*, intrón.

Análisis de grandes deleciones por LD-PCR

Todas las deleciones (i, iia/b) fueron amplificadas por LD-PCR con *primers* ubicados lo más cerca posible de los sitios de ruptura todavía no caracterizados (Tabla MM.11).

Tabla MM.11: Oligonucleótidos utilizados para el análisis de las grandes rearreglos por LD-PCR.

Nombre	Secuencia 5' -> 3'	Coordenadas en GRCh38.p2*	Caso #	Tamaño aprox. (pb)
9A	CTAACATAGCTGAGCATCAG	154.966.280-61	#570	6700
11B	ACTGACCTATATTGCAAACCA	154.956.882-62		
2A	CCTCCTTGCTAATAGTAGAA	154.999.700-681	#121	4300
F8+6.5kb-lo	TTGGCAGAGTGAGCTAGGATTACC	154.830.911-888		
IVS6M-up	CTGCAAAGACGAGTAAAACCATA	154.981.236-14	#572	6800
IVS12-lo	TATCTGAAATCACTGGAATGTAAG	154.950.492-69		
F8-3.8kb-up	GTACAATCCAACATGTTTGAGGTTC	155.025.151-27	#327	1600
IVS1ID-lo	CTAAAAATGGTGAAAATGGCTAAA	155.008.106-085		
F8-3.8kb-up	CTTTTGAATTTTACATGCGAGTTA	155.026.481-58	#945	6300
1-IU	GCCGATTGCTTATTTATATC	155.018.183-64		
F8-2kb945N	TATAAGAGAAGCACTGGGAAAGAAAG	155.025.084-59		4500
1-IU	GCCGATTGCTTATTTATATC	155.018.183-64		
F8-68kb-up	AGCTTCCTAGGTCCCCAGTATC	155.091.028-07	#949	4500
IVS1IU-lo	TGTACAGCAAAAGAGATGAGGG	155.008.106-085		
4A	GTACAGTGGATATAGAAAGGAC	154.993.192-71	#617	4500
8B	CTGATGCTCAGCTATGTTAG	154.966.280-61		
5A	TTCTTACTGTCAAGTAACTG	154.987.407-388	U2	2300
IVS6M-lo	TCCTGAAGCCCCTCCTGATT	154.980.223-04		
9A	CTAACATAGCTGAGCATCAG	154.966.280-61	#132	2300
19B	AGCAACCATTCCAGAAAGGA	154.901.989-70		

*Secuencia de nucleótidos del ChrX: NC_000023.11 con fecha del 07/04/2015.

El análisis se realizó en condiciones LD-PCR sobre 500-700ng de ADN_g sustrato, en un volumen de 25µl, usando 0,75U de KAPA *LongRange DNA Polymerase* (KAPABiosystem, USA), 0,2-0,6µM de los *primers* (según el caso, Tabla MM.10), 500µM de dNTPs, 1,75mM de $MgCl_2$ y buffer de KAPA LD. El termociclado incluyó una desnaturalización inicial de 2 min. a 94°C, seguido de 35 ciclos divididos en 10 ciclos de 15 seg. a 94°C, 15 seg. a 55°C según las temperaturas de hibridación (Tabla MM.9 y MM.10), 180-540 seg. a 72°C de extensión (estimando 60 seg. de extensión por cada 1.000pb de producto a amplificar), y 25 ciclos de 15 seg. a 94°C, 15 seg. a 55°C y 180-540 seg. de extensión a 68°C pero sumando 60 seg. adicionales por cada uno de los 25 ciclos; y una extensión final de 540 seg. a 72°C.

Análisis de grandes deleciones por I-LD-PCR

La caracterización molecular de la muestra #467 se realizó por el abordaje de I-PCR (*inverse* PCR) (Ochman et al, 1988) utilizando la enzima *Bcl*I bajo los mismos protocolos de digestión, circularización (formación de círculos-B) ya descriptos más arriba para la técnica de IS-PCR. Con los *primers* (IVS22-lo y 24A), el análisis se realizó en condiciones LD-PCR sobre 500-700ng (10µl) de ADN_g sustrato, en un volumen de reacción de 25µl, usando 0,75U de KAPA *LongRange DNA Polymerase* (KAPABiosystem, USA), 0,6µM de los *primers* (Tabla MM.12), 500µM de dNTPs, 1,75mM de $MgCl_2$ y buffer de KAPA LD. El termociclado incluyó una desnaturalización inicial de 2 min. a 94°C, seguido de 35 ciclos divididos en 10 ciclos de 15 seg. a 94°C, 15 seg. a 55°C según las temperaturas de hibridación (Tabla MM.9 y MM.10), 180-540 seg. a 72°C de extensión, y 25 ciclos de 15 seg. a 94°C, 15 seg. a 55°C y 180-540 seg. de extensión (idem anterior) a 68°C (sumando 60 seg. adicionales por cada uno de los 25 ciclos); y una extensión final de 540 seg. a 72°C.

Todos productos de amplificación (LD-PCR e I-LD-PCR) (Tabla MM.11 y MM.12) fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa 0,8-1,5% durante 45-90 min. en buffer TBE 0,5X a 4V/cm, teñidos con bromuro de etidio y analizados bajo transilumindor UV, y documentados por fotografía digital. Para los análisis electroforéticos en gel de agarosa de los productos de LD-PCR fueron usados marcadores de tamaño molecular para el rango 500-23.000pb (Marcador λ ADN/*Hind* III, Promega, USA).

Análisis por mapeo de restricción de los productos PCR (PCR-RFLP)

Para determinar con mayor resolución los sitios de ruptura involucrados en el evento de recombinación que dio origen a cada deleción, se realizaron experimentos de análisis por LD-PCR-RFLP o mapeos de restricción de los productos LD-PCR deleción específicos. Para los análisis de RFLP 5µl de los productos de amplificación obtenidos en cada caso, fueron digeridos con diferentes enzimas: (*Bcl*I, T↓GATCA), 10U de la enzima *Bcl*I (Thermo Scientific, USA) en 15µl de reacción durante dos horas a 55°C, en el buffer recomendado por el fabricante (10mM Tris-HCl pH 7,5, 50mM NaCl, 10mM $MgCl_2$ y 0.1mg/ml BSA); (*Eco*RI, G↓AATTC), 20U de *Eco*RI (LifeTechnologies, USA) en 15µl de reacción, ON a una temperatura de 37ºC con el buffer recomendado por el fabricante (50mM Tris-HCl, pH 8, 10mM $MgCl_2$, 100mM NaCl) y 0,1mg/ml BSA; (*Nco*I, C↓CATGG), 20U de *Nco*I (Thermo Scientific, USA) en 15µl de reacción, ON a 37ºC en el buffer provisto por el fabricante (33mM Tris-acetato pH 7,9, 10mM acetato de Mg, 66mM acetato de K, y 0,1mg/ml de BSA); (*Taq*I, T↓CGA), 20U de *Taq*I (Thermo Scientific, USA) en 15µl de reacción durante tres horas a 65ºC en el buffer recomendado por el proveedor (10mM Tris-HCl, pH 8,5, 10mM $MgCl_2$, 100mM NaCl);

(*Bam*HI, G↓GATCC), 20U de *Bam*HI (LifeTechnologies, USA) en 15µl de reacción incubando durante tres horas a 30ºC con el buffer recomendado por el fabricante (20mM Tris-HCl, pH 8,5, 10mM $MgCl_2$, 10mM DTT 100mM KCl); (*Smi*I (*Swa*I), ATTT↓AAAT), 20U la enzima de restricción *Swa*I (Thermo Scientific, USA) en 30µl de reacción durante una hora a una temperatura de 30ºC con el buffer recomendado por el proveedor (50mM Tris-HCl, pH 7,5, 10mM $MgCl_2$, 10mM NaCl, 0,1mg/ml de BSA); (*Sma*I, CCC↓GGG) 10U de la enzima de restricción *Sma*I (Promega, USA) en 10µl de reacción durante tres horas a una temperatura de 37ºC en el buffer de digestión recomendado por el proveedor (100mM Tris-HCl, pH 7,5, 7mM $MgCl_2$, 1mM DTT, 50mM KCl) y 0,1mg/ml BSA; (*Kpn*I, GGTAC↓C): 20U de *Kpn*I (Thermo Scientific, USA) en 15µl incubando ON a una temperatura de 37ºC en el buffer de digestión recomendado por el proveedor (10mM Tris-HCl, pH 7,5 10mM $MgCl_2$ 0,02%mM Triton X-100mM, 0,1mg/ml de BSA). La enzimas de restricción no *Swa*I, *Nco*I, *Eco*RI y *Sma*I fueron inactivadas por incubación a 65ºC durante 20 min., mientras que *Kpn*I y *Bcl*I por incubación a 80°C durante 20 min., solo *Taq*I fue inactivada con la incorporación de EDTA, pH 8,0 (20mM) dado que no se inactiva con alta temperatura.

Los productos LD-PCR digeridos fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa 1,5% durante 45-50 min., como se mencionó arriba (Materiales y Métodos, Página 22).

Amplificación y secuenciación de Sanger específica de los puntos de ruptura de cada deleción

El análisis de restricción, permitió diseñar *primers* para amplificar de manera diferencial y específica el sitio de ruptura del evento de recombinación que dio origen a la deleción en cada familia (Tabla MM.12).

Este análisis se realizó en condiciones de PCR estándar, sobre 300ng de ADN_g sustrato, en un volumen de 25µl, usando 0,5U de Taq ADN polimerasa (Promega, USA), 0,6µM de *primers* (Tabla MM.10 y MM.9); 200µM de dNTPs, 1,5mM de $MgCl_2$ y buffer de Taq polimerasa provisto por el fabricante (50mM Tris-HCl pH 9,0, 50mM NaCl, 0,1mg/ml BSA). Los termociclados incluyeron una desnaturalización inicial de 2 min. a 94°C, seguido de 30 ciclos con 30 seg. a 94°C, 15 seg. a 55°C (Tabla MM.11), 60-180 seg. de extensión (estimando 60 seg./kb de producto) a 72° C; y con una extensión final de 5 min. a 72°C.

Los productos de amplificación PCR deleción-específicos (Tabla MM.12) fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa 1,5% durante 45-50 min. en las condiciones mencionadas para la técnica de IS-PCR (Materiales y Métodos, Página 22).

Tabla MM.12: Oligonucleótidos utilizados para amplificar y secuenciar los puntos de ruptura.

Nombre	Secuencia 5' -> 3'	Coordenadas en GRCh38.p2*	Caso #	Tamaño (pb)
Del10_IVS9-up	AAAAGTAAGGGCAAAAACTACAAT	154.975.770-47	#570	987
Del10_IVS10-lo	CGGGAAAATTTTTATAACCAGTC	154.958.935-13		
IVS6new-up	TGAAAGCGAAGGGATAGAAACAG	154.976.313-291	#572	1448
IVS12new-lo	CTCCACCAAAAGCTATATTAGAAATC	154.951.880-55		
F8-68kb_N-up	CAAATAAAGAATGGCAAGACTG	155.090.207-187	#949	1274
IVS1IU_N-lo	TACTGACAACCTGGGCCTCTACTT	155.010.811-788		
I9-F1	GTTAGATACTGCCAAACTGAC	154.965.281-61	#132	650
I18-R1	TGAGGGCTGAGAAATGAGTC	154.902.624-05		
IVS2-up	CTCCCTTTTCTTGCACTTTGGTTG	154.832.987-68	#121	661
F8+3.5kb-lo	GCATGGCAAAGGGCTCACAC	154.998.114-091		
F8-3.8kb-new	CATGAAAATTTGGTAATGGGGTC	155.025.151-27	#326	363
IVS1ID-new	CAAGCATGTTTAAATATACAGTTC	155.001.612-589		
24A	GTCTTATGTAGATGTTGGATG	154.863.353-33	#467	4208
IVS22-lo	AGGTATTTCTATTTATTGACTATT	154.823.122-099		
H617_Del-up	CATCTGAAACTAACGCCCACAG	154.990.606-585	#617	1500
H700_Del7-lo	CAGTCTGCATCGAAAAACAAAGTG	154.967.580-57		
F8-2kb945N	TATAAGAGAAGCACTGGGAAAGAAAG	155.025.084-59	#945	712
1B	GTAGCATCACAACCATCCTA	155.022.325-06		
U2_Del-up	ATAGTGTTAGTACCTCCGCCTCTT	154.986.795-72	U2	668
U2_Del-lo	TTCTTATCATTTTTCTATCATTTCTTG	154.981.684-58		

*Secuencia de nucleótidos del ChrX: NC_000023.11 con fecha del 07/04/2015.

Procedimientos bioinformáticos

Todos los análisis, mapas de restricción, anotación de secuencias específicas, etc. fueron realizados *in silico* sobre la secuencia genómica de Xq28 o Xq27 incluyendo el gen del *F8* o *F9* respectivamente, GenBank GRCh38.p2*: NC_000023.11 del 07-ABR-2015, descargada desde la página web de NCBI (URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/).

La búsqueda, selección y análisis de frecuencia de los SNP para el estudio de casos con resultados IS-PCR anómalos se realizaron en las bases de datos de SNP de acceso público, *International* HapMap *Project* (http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov), dbSNP *short genetic variations* (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP), Ensemble *variation* (http://www.ensembl.org/info/genome/variation/index.html).

El análisis y anotación de sitios de restricción, el modelado *in silico* de los alelos con la Inv22, Dup22 y Del22, y de las Inv22 variantes, la selección de las enzimas de restricción para las PCR-RFLP, el modelado de los polimorfismos que pudieran dar origen a nuevos sitios *Bcl*I y los modelados para el análisis de los grandes rearreglos y los alineamientos de secuencias para determinar los sitios de ruptura asociados a los rearreglos genómicos investigados se realizaron utilizando los programas SeqBuilder y MegAlign (LaserGene, DNA Star). El diseño de productos de amplificación PCR y los

primers para cada uno de los objetivos del presente trabajo de Tesis se realizó usando los programas SeqBuilder y PrimerSelect (LaserGene, DNA Star), el algoritmo BLAST (*Basic Local Aligmment Serch Tool*) (Altschul *et al*. 1990) accedido en línea (URL: http//:www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) y el programa Repeat Masker para investigación de secuencias repetidas accedido en línea (URL http://www.repeatmasker.org).

Los haplotipos compuestos por el grupo de STRs del *F8* indicados en las familias que presentaron las variantes de la Inv22 fueron analizados con el programa GeneMarker Versión 2.2.0 (SoftGenetics-LLC).

Los alineamientos realizados sobre el *F8* para la identificación de las secuencias descriptas en la literatura como recombinogénicas (estimuladoras de recombinación); para la detección de elementos repetitivos interdispersos (e.g., Alu, LINE1, etc.) o del tipo LCR (*low copy repeat*) eventuales participantes en el origen del rearreglo por recombinación homóloga u homeóloga (con identidades de secuencia nucleotídica entre duplicones menores al 95% y mayores de 85%), potenciales estimuladoras de la generación de rupturas en el ADN (e.g., secuencias Jurka, etc.), o secuencias estabilizadoras del acercamiento físico entre las rupturas involucradas en un evento por *sinapsis ectópica* necesaria para los mecanismos asociados a la replicación del ADN; se realizaron utilizando los programas SeqBuilder y MegAlign (LaserGene, DNA Star), el algoritmo ClustalW accedido en línea en la página web de EMBL-EBI (URL: http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/), el algoritmo BLAST accedido en línea, el algoritmo Repeat Masker y Dfam accedido en línea (URL: http://www.dfam.org/).

Finalmente, la investigación de las secuencias en ambos extremos de la deleción en busca de posibles motivos estructurales descriptos en la literatura como motivos estimuladores de rupturas de simple o doble cadena del ADN, se realizó utilizando los siguientes programas en línea Fuzznuc (URL: http://emboss.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/fuzznuc), RepeatAround (URL, http://portugene.com/repeataround.html) y QGRS mapper (URL: http://bioinformatics.ramapo.edu/QGRS/analyze.php).

CAPÍTULO I

Genotipificación de grandes rearreglos asociados a las copias de int22h (Inv22, Del22 y Dup22) e int1h (Inv1).

En este Capítulo I se investigó la presencia en nuestra población de los rearreglos genómicos asociados a eventos de recombinación homóloga entre LCR, asociados a las copias de *int22h* e *int1h* del *F8*, tanto los causales de HA severa como la Inv22 e Inv1 y las Del22 o aquellos no causales de hemofilia como las Dup22 (De Brasi y Bowen, 2008). Se presenta el análisis de un grupo de pacientes con HA severa y mujeres familiares, como así también mujeres y varones de la población Argentina general o no afectados, para investigar la Inv22-I e Inv22-II y las Dup22 y deleciones Del22-I y Del22-II, usando el sistema de IS-PCR/2008 *tests* diagnóstico y complementario (Rossetti et al, 2008). El objetivo final de este capítulo fue obtener datos experimentales que permitan discutir la existencia de estos grandes rearreglos en nuestra población y contrastar con lo descripto en la literatura hasta este momento.

RESULTADOS I

Se genotipificaron varones con HA severa y mujeres familiares en riesgo, como así también varones y mujeres de la población Argentina general usando el sistema de IS-PCR/2008 *test* diagnóstico y complementario para caracterizar la Inv1, Inv22-I e Inv22-II, la Del22-I y Del22-II, la Dup22 y las variantes normales (alelo N).

Las señales del *test* diagnóstico del sistema de IS-PCR/2008 para caracterizar la Inv1 se clasifican en alelo N, 304pb e Inv1, 225pb y para caracterizar la Inv22 se clasifican en alelo N o Dup22, 487pb; Inv22-I o Del22-I, 333pb e Inv22-II o Del22-II 385pb. Mientras que para el *test* complementario las señales del alelo N son 457 y 405pb, de la Dup22, 559, 457 y 405pb, de la Inv22-I, 559 y 457pb, de la Inv22-II, 559 y 405pb, de la Del22-I, 457pb, y de la Del22-II, 405pb (Figura C1.1), (Tabla MM.3 y MM.4).

Con los resultados obtenidos de la aplicación de la técnica de IS-PCR/2008 *test* diagnóstico y complementario fue posible discriminar, en las muestras estudiadas, los rearreglos genómicos asociados a las copias de *int22h* existentes en nuestra población. En la Figura C1.2 se muestran ejemplos de los casos analizados en este Capítulo.

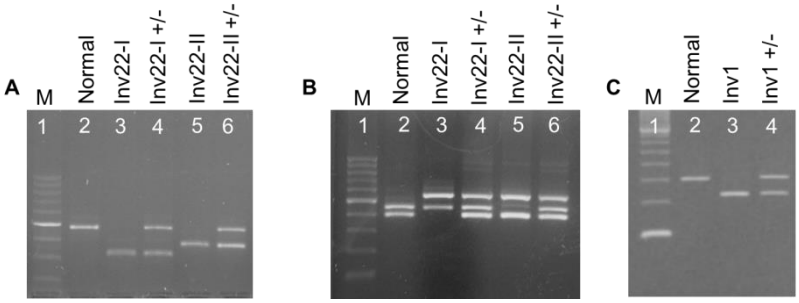


Figura C1.1. IS-PCR/2008, señales específicas de la Inv22 e Inv1. Electroforesis en gel de agarosa (1,5%) que muestra toda la variedad de señales obtenidas por aplicación del abordaje IS-PCR/2008, Inv22 *test* diagnóstico (**A**) o complementario (**B**) e Inv1 (**C**) en casos y controles de nuestra población. En ambos paneles el orden de siembra: calle 1 (M), marcador de peso molecular (escalera de 100 pb, PB-L Argentina). **A y B**. Calle 2, varón de la población general (sin rearreglo asociado a *int22h*) (A, 487pb y B, 457 y 405pb); calle 3, paciente con HA severa y la Inv22-I (A, 333pb y B, 559 y 457pb); calle 4, mujer portadora de la Inv22-I (A, 333 y 487pb y B, 559, 457 y 405pb); calle 5, paciente con HA severa y la INV22-II (A, 385pb y B, 385 y487pb); calle 6, mujer portadora de la INV22-II (A, 385 y 487pb y B, 559, 457 y 405pb). **C**. Calle 2, varón de la población general (sin rearreglo asociado a *int1h*) (304pb); calle 3, paciente con HA severa y la Inv1 (225pb); calle 4, mujer portadora de la Inv1 (304 y 225pb).

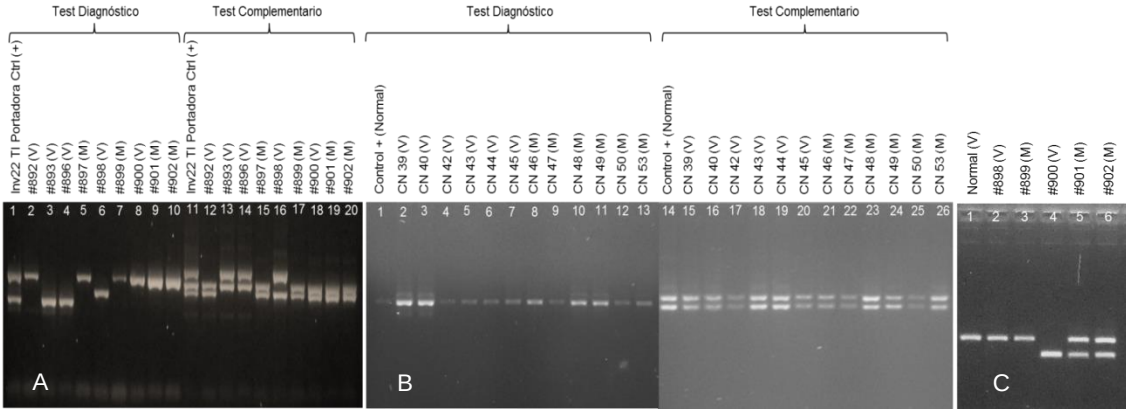


Figura C1.2. Análisis de rearreglos asociados a las copias de *int22h* por IS-PCR. Electroforesis en gel de agarosa (1,5%) analizando los resultados IS-PCR/2008 en pacientes con HA severa y mujeres familiares en riesgo. (**A**) y en muestras de la población Argentina general (CN) (**B**). Varones (V), Mujeres (M). **A y B:** Inv22. **C.** Inv1. **A** (Resultados)**:** caso #892 (N), #893 (Inv22-I), #896 (Inv22-I), #897 (N/N), #898 (Inv22-II), #899 (N/N), #900 (N), #901 (N/N), #902 (N/N). **B:** controles de la población Argentina general varones CN 39-40 y 42-45 (N), y mujeres CN 46-53 (N/N). **C.** (Resultados) #898 (N), #899 (N/N), #900 (Inv1), #901 (Inv1/N), #902 (Inv1/N)

Se analizaron 505 muestras de familias aparentemente no relacionadas, 287 varones (267 pacientes con HA severa y 20 varones de la población argentina general) y 218 mujeres (127 mujeres familiares portadoras, 58 no portadoras, 13 en estudio para conocer su condición y 20 mujeres de la población Argentina general) (Tabla C1.1 y C1.2).

Aquellas muestras que presentaron el patrón de señales correspondientes al alelo normal en el *test* diagnóstico y complementario de la técnica de IS-PCR/2008 y correspondían a pacientes o muestras de familiares, fueron subsecuentemente

sometidas al algoritmo de trabajo para la caracterización de mutaciones utilizado en el laboratorio (i.e., caracterización de la inversión del intrón 1 (Inv1), *screening* con la técnica de CSGE y secuenciación de Sanger).

La caracterización de mutaciones en los 267 varones con HA severa mostró que 101 presentaron los patrones correspondientes a la Inv22-I (38% del total de pacientes con HA severa y a un 83% de pacientes con la Inv22), 17 pacientes presentaron los patrones de la Inv22-II (6% de los pacientes con HA severa y 14% de pacientes con la Inv22), los 169 pacientes restantes presentaron los patrones correspondientes al alelo normal (N), 20 de ellos de la población Argentina general (virtualmente libre de mutaciones causales de hemofilia), 3 presentaron la Inv1 (que corresponde al 1% de los pacientes con HA severa y a un 2% de los pacientes con inversiones), de los 144 varones restantes (55% de los pacientes con HA severa) 12 aún están bajo análisis molecular para determinar la mutación causal de HA severa, y 134 presentaron defectos pequeños tipo *missense*, *nonsense*, defectos de *splicing* y distintas pequeñas deleciones o inserciones (Ins/Del), todas ellas detectadas por CSGE, y caracterizados por secuenciación de Sanger del producto de amplificación CSGE anómalo. Como conclusión se determinó la Inv22-I e Inv22-II en 118 de 267 varones con HA severa, que corresponde a un 44% de los pacientes con HA severa y un 98% de los pacientes con inversiones (i.e., Inv22 e Inv1) (Tabla C1.1).

Tabla C1.1: Resultados IS-PCR/2008 obtenidos en varones.

		Varones analizados			
		Pacientes con HA severa			**Población General**
		Muestras [n]	**HA sev. [%]**	**Inv22/1 [%]**	**Muestras [n]**
Genotipo	Inv22-I	101	38	83	0
	Inv22-2	17	6	14	0
	Inv22-1 + Inv22-2	118	44	98	0
	Del22-1 + Del22-2	0	0	-	0
	Dup22	0	0	-	0
	Inv1	3	1	2	0
	Otras Mutaciones	134	55	-	0
	Aún en estudio	12		-	0
	Sin mutaciones en *F8*	0	-	-	20
	Tot. de varones analizados	287			
	Tot. cromosomas X analizados	287			

De las 218 mujeres analizadas, 53 presentaron los patrones combinados del alelo N y la Inv22-I, y 12, del alelo N y la Inv22-II (resultando portadoras heterocigotas de la Inv22-I e Inv22-II, respectivamente), cuatro presentaron los patrones correspondientes al alelo N y la Inv1 (confirmando su condición de portadoras de la Inv1).

Tabla C1.2: Resultados IS-PCR/2008 obtenidos en mujeres.

		Mujeres analizadas	
		Familiares en riesgo	Población General
		Muestras [n]	Muestras [n]
Genotipo	Portadoras Inv22-I	53	0
	Portadoras Inv22-II	12	0
	Inv22-I + Inv22-II	65	0
	Portadoras Del22-I + Del22-II	0	0
	Portadoras Dup22	0	0
	Portadoras Inv1	4	0
	Portadoras de otras mutaciones	58	0
	Aún en estudio	13	0
	Sin mutaciones en el *F8*	58	20
	Tot. Mujeres analizadas	218	
	Tot. cromosomas X analizados	436	

Finalmente, de las 149 mujeres restantes que mostraron sólo el patrón correspondiente al alelo N, 78 resultaron no portadoras de HA severa (58 mujeres familiares en riesgo de ser portadoras de HA severa y 20 de la población general), 58 presentaron mutaciones tipo *missense*, *nonsense*, defectos de *splicing* o pequeñas inserciones o deleciones y 13 de ellas aún están bajo estudio para determinar la mutación causal de HA severa familiar (Tabla C1.2).

El *test* diagnóstico IS-PCR/2008 para el análisis de los rearreglos de *int22h* permitió clasificar 287 cromosomas X de la población de varones en 118 con la Inv22 o Del22, y 169 con el alelo N o Dup22. Con el *test* complementario IS-PCR/2008 fue posible confirmar que de los 118 cromosomas X todos presentaban el alelo asociado a la Inv22 y ninguno presentaba la Del22, mientras que en los 169 cromosomas X restantes (20 de los cuales pertenecían a la población general no afectada) sólo se caracterizó el alelo N y no la Dup22 (Tabla C1.3).

En las 218 mujeres estudiadas, el análisis de los 436 cromosomas X con el *test* diagnóstico permitió dividir el lote en dos grupos: uno de 130 cromosomas X (65 familiares en riesgo de ser portadoras de la Inv22 o Del22) que mostraron el patrón combinado de la Inv22 o Del22 y el alelo N o la Dup22 (Tabla C1.3); y otro grupo con los 306 cromosomas X restantes (20 mujeres de la población general y 133 familiares en riesgo pero no portadoras de la Inv22 o la Del22) que presentaron el patrón correspondiente al alelo N o Dup22 (Tabla C1.3). El *test* complementario permitió indicar que de los 306 cromosomas X con el alelo N o Dup22 sólo se observó el alelo N (Tabla C1.3); y los 130 cromosomas X de las 65 portadoras de la Inv22 (o Del22) sólo mostraron las señales de 559, 457 y 405pb, que si bien es el patrón compatible con el resultado más probable (i.e., portadora convencional Inv22/N), no es posible

determinar con este resultado por separado los otros genotipos con las variantes alélicas alternativas posibles (i.e., Inv22/Dup22, Del22/Dup22). Sin embargo, contando con la información diagnóstica precisa del probando familiar hemicigota con HA severa, se pudo identificar la Inv22 descartando la Del22 en las 65 portadoras, pero no se pudo confirmar el alelo N (descartando el alelo Dup22 alternativo) en los 65 cromosomas X homólogos debido a que la combinación cromosómica de la Inv22/Dup22 o N genera el mismo patrón indicado arriba (i.e., 559, 457 y 405pb) (Tabla C1.3). Si el análisis hubiera sido hecho sin la información del probando hemicigota familiar con la Inv22 confirmada, los patrones observados en ambos *test* IS-PCR/2008 en estas 65 portadoras no hubieran permitido discriminar entre los cuatro genotipos posibles Inv22/N, Inv22/Dup22, Del22/N y Del22/Dup22 (listados en orden de probabilidad) (Tabla C1.3).

Tabla C1.3: Detalle de los cromosomas X analizados.

<table>
<tr><th colspan="2" rowspan="2"></th><th colspan="4">Varones Analizados</th></tr>
<tr><th colspan="2">Pacientes con HA severa</th><th>Población General</th><th>Pacientes con HA severa</th><th>Población General</th></tr>
<tr><td colspan="2"></td><td colspan="2">IS-PCR test Diag.</td><td colspan="2">IS-PCR test Comp.</td></tr>
<tr><td colspan="2">N</td><td colspan="2" rowspan="2">149</td><td rowspan="2">20</td><td>149</td><td>20</td></tr>
<tr><td colspan="2">Dup22</td><td>0</td><td>0</td></tr>
<tr><td colspan="2">Inv22</td><td colspan="2" rowspan="2">118</td><td rowspan="2">-</td><td>118</td><td rowspan="2">-</td></tr>
<tr><td colspan="2">Del22</td><td>0</td></tr>
<tr><th rowspan="2"></th><th colspan="6">Mujeres Analizadas</th></tr>
<tr><th>Port. HA severa</th><th>No Port. HA severa</th><th>Población General</th><th>Port. HA severa</th><th>No Port. HA severa</th><th>Población General</th></tr>
<tr><td></td><td colspan="3">IS-PCR test Diag.</td><td colspan="3">IS-PCR test Comp.</td></tr>
<tr><td>Inv22/N o Dup22</td><td rowspan="3">130</td><td rowspan="3">-</td><td rowspan="3">-</td><td>65/Indet.</td><td rowspan="3">-</td><td rowspan="3">-</td></tr>
<tr><td>Del22/Dup22</td><td>0/Indet.</td></tr>
<tr><td>Del22/N</td><td>0</td></tr>
<tr><td>N/N</td><td rowspan="2">124</td><td rowspan="2">142</td><td rowspan="2">40</td><td>124</td><td>142</td><td>40</td></tr>
<tr><td>N o Dup22/Dup22</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td></tr>
</table>

En conclusión, en los 723 cromosomas X analizados pudo descartarse la presencia de la Dup22 en 475 (q<1/476≈0,2%), también se descartó la presencia de la Del22 en 183 de los 248 cromosomas X con patrones compatibles (q<1/184≈0,5%), mientras que al cabo de este estudio los restantes 65 cromosomas X quedaron indeterminados entre el alelo N y Dup22 (Tabla C1.3).

DISCUSIÓN I

En este Capítulo se investigó la presencia de los rearreglos asociados recombinación entre las copias de *int22h,* mediante la técnica de IS-PCR versión 2008 (Rossetti et al, 2008), incluyendo aquellos cuya existencia se conoce y se han estudiado ampliamente como la Inv22 (Inv22 tipo I y II), y también las raras Dup22 y Del22 (Del22 tipo I y II).

En el año 2005 cuando fue liberada la secuencia completa del cromosoma X en el contexto del Proyecto Genoma Humano (Ross et al*,* 2005) y frente a la evidencia que las copias extragénicas de *int22h* (i.e., h2 e h3) se encontraban orientadas inversamente (cabeza-cabeza) y que la copia intragénica de *int22h* (i.e., h1) estaba orientada igual (cabeza-cola) respecto a la copia extragénica de posición más cercana al centrómero X (Figura IN.3). Se despertaron nuevas preguntas sobre los posibles rearreglos que involucran a las copias de *int22h* que llevaron a generar nuevas hipótesis para explicar la ocurrencia de las inversiones del tipo I y del tipo II y sus frecuencias relativas, como así también otros eventos de recombinación posibles entre las copias igualmente orientadas de *int22h* que podrían originar confusiones en el diagnóstico molecular de la hemofilia (Bagnall et al, 2005).

Sobre una base teórica, los pacientes que tuvieran la Del22 o la Dup22 en hemicigosis presentarían pérdida o duplicación de varios genes además de la pérdida parcial del *F8* (exones 1-22). Cinco de estos genes están bien caracterizados en la base de datos Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/): *MTCP1* (*300116), *BRCC3* (*300617), *VBP1* (*300133), *RAB39B* (*300774), *CLIC2* (*300138) y *MECP2* (*300005). Existen algunos reportes (Miskinyte et al, 2012; Janczar et al, 2014) que presentan las variadas consecuencias de la pérdida (por deleción) o aumento de dosis (por duplicación) en algunos de estos genes, como por ejemplo, cambios en la proliferación clonal benigna o leucémica de células T (*MTCP1*); variaciones a la sensibilidad celular a las radiaciones ionizantes y un defecto en el arresto en el *check point* de G2/M (*BRCC3*). Hemangiomas en la retina, el cerebro, la médula espinal, las glándulas suprarrenales, etc. (i.e., el síndrome de von Hippel-Lindau (VHL), debido a que *VPB1* es un acompañante de la proteína VHL, un supresor de tumores asociados con la enfermedad de von Hippel-Lindau) (VPB1). Retraso mental ligado al X asociada con el autismo, la epilepsia, macrocefalia y la obesidad (*RAB39B*).

También se revelaron aumentos de la liberación de Ca^{++} en las células del músculo cardíaco y esquelético, y en el hígado fetal (*CLIC2*), así como alteración en la activación o represión de la transcripción, necesario para la maduración de las neuronas en su desarrollo normal (causando síndrome de Rett, retraso mental, o

encefalopatía, e implicado en la susceptibilidad al autismo) (*MECP2*) (Andersen et al, 2014).

La Dup22 involucra la duplicación de una región genómica de 0,5Mb bien definida (De Brasi y Bowen, 2008), que generaría bialelismos en varones hemicigotas (46;XY) y trialelismos en mujeres heterocigotas (46;XX) (Green et al, 2007). Dado que la Dup22 sólo surge de un evento de recombinación homóloga desigual entre dos cromosomas X en las mujeres podría esperarse que la tasa de mutación de la Dup22 sea menor que la de las Inv22s (aproximadamente $5x10^{-5}$ por cromosoma X por generación, Vogel y Motulsky, 1996) que podría darse en varones y mujeres por recombinación homóloga intracromosómica, sin embargo dado que el fenotipo asociado a la Dup22 no sería causal de hemofilia (Rossetti et al, 2008) es posible que la frecuencia efectiva de las Dup22 en la población sea mayor que en el caso de las Inv22 (Bagnall et al, 2006). En el año 1994 se reportó el caso de una mujer portadora de una duplicación (yuxtaponiendo una copia del *F8* de estructura normal con una copia de la Inv22 en el mismo cromosoma X) (Peretz et al, 1994), sin embargo debido a la escasa evidencia experimental a partir de la técnica de *Southern blot*, es poco probable que la duplicación reportada en esta familia sea la Dup22 investigada en este trabajo.

Hasta el presente solo dos laboratorios no relacionados reportaron la presencia de la Dup22: un laboratorio en Bélgica presentó una familia con un paciente varón hemicigota y su madre heterocigota (Lannoy et al, 2013) y un laboratorio de Estados Unidos presentó en el año 2011 tres familias no relacionadas con cuatro pacientes varones hemicigotas y sus madres, y en el 2015 siete familias no relacionadas, cuatro pacientes varones con sus madres y tres mujeres con sus madres (El-Hattab et al, 2011; El-Hattab et al, 2015). En todos los casos los pacientes hemicigotas no presentaron síntomas de HA y se presentan clínicamente con algunos signos de retraso madurativo, características faciales especificas (e.g., frente ancha, orejas grandes), problemas respiratorios, mientras que las madres portadoras eran asintomáticas aunque presentaban inactivación sesgada extrema del cromosoma X contra el alelo con la Dup22 (El-Hattab et al, 2011). La Dup22 no fue encontrada en nuestra población Argentina. Sin embargo, dado que a nuestro laboratorio llegan muestras de pacientes con hemofilia y no pacientes referidos desde Clínicas de Genética Médica donde sí pudieran detectarse las características clínicas descriptas asociadas a la Dup22, nuestro tamizaje negativo de la Dup22 no descarta su presencia en nuestra población.

La Del22 implica la deleción de la misma región genómica de 0,5Mb duplicada en la Dup22 (De Brasi y Bowen, 2008). La deleción de esta región genómica en mujeres heterocigotas, estaría asociada a una inactivación sesgada extrema del cromosoma X

mutado y un exceso de abortos espontáneos en fetos varones asociado a la posibilidad de que esta mutación resultara letal en hemicigosis (Pegoraro et al, 1997), tal como fue confirmado por el grupo de El-Hattab et al (2015) presentando dos familias (dos mujeres y una de sus hijas) con la Del22 heterocigota asociada a abortos espontáneos de fetos varones e inactivación sesgada extrema del cromosoma X en los tres casos.

Abou-Elew et al (2011) utilizando el sistema de IS-PCR/2008, presentaron tres casos con señales compatibles con el diagnóstico de la Del22 (dos con la Del22-II y uno con la Del22-I) en un grupo de 13 pacientes egipcios con HA severa pero sin otras características clínicas. Frente a estos resultados variados, es importante remarcar que la Del22 en hemicigosis debe presentar una falta de regiones para la amplificación PCR dentro del intervalo de 0,5Mb que abarca los exones 1 al 22 del *F8*, y seis genes completos, involucrando un número de *sequence tagged sites* (STSs) y SNPs, algunos de los cuales se presentan en la Figura C1.3.

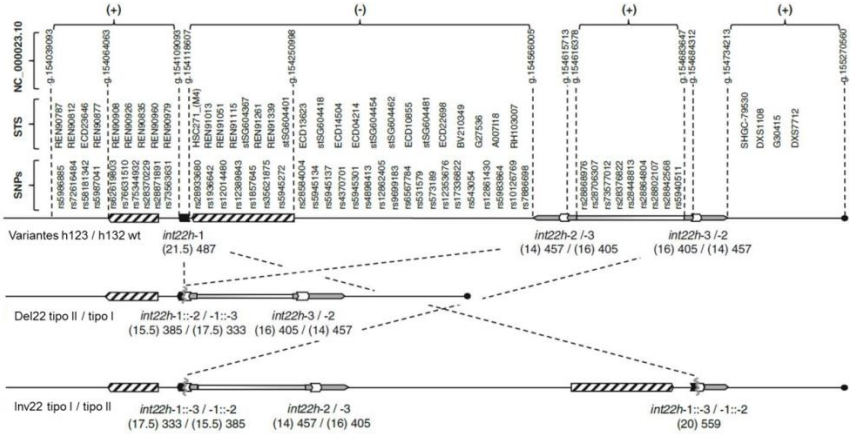


Figura C1.3. Vista esquemática de los reordenamientos asociados a las copias de *int22h* causales de HA y los marcadores genéticos implicados. Variantes normales o de tipo salvaje (wt), alelos h123 y h132 (h123/h132). Las referencias de la figura son las mismas que las de la Figura IN.3. Arriba, ubicación aproximada de marcadores STSs y SNPs involucrados en la Del22 y que deberían estar presentes (+) o ausentes (-) en pacientes hemicigotas con HA severa causada por la Del22-I o Del22-II, indistintamente. Se muestran algunas coordenadas nucleotídicas relevantes en el cromosoma X (GRCh37.1: NC_000023.10).

Por lo expuesto y en primer plano, por la reportada letalidad de la Del22 en fetos varones (hemicigotas), la evidencia molecular en los pacientes con resultados compatibles con la Del22 deberían incluir la caracterización completa de la extensión de la deleción (que es la característica que determina en definitiva la profundidad del fenotipo) con la genotipificación por amplificación PCR *multiplex* de, por lo menos, cuatro o cinco marcadores STSs o SNPs seleccionados dentro del segmento de 0,5Mb involucrado.

Finalmente, si la Del22 canónica fuera letal en fetos varones como se indica en los casos de El-Hattab et al (2011), podría encontrarse sólo en mujeres heterocigotas con inactivación sesgada extrema sobre el cromosoma X ligado a la Del22 y debido a esta expresión desbalanceada, no debiera estar asociada ni al fenotipo hemofílico ni al causado por el grupo de los cinco genes específicos involucrados (Pegoraro et al, 1997; Green et al, 2007). Aunque no se reportaron datos sobre la frecuencias esperadas de aparición de las deleciones, es razonable asumir que la tasa de mutación para la deleción no debe ser menor que la de las inversiones, debido a que las deleciones podrían ocurrir tanto por recombinación intracromosómica como por recombinación intercromosómica (Bagnall et al, 2006).

En este escenario sería importante unir esfuerzos para realizar la genotipificación en gran escala de la Del22 y la Dup22 en series internacionales dado que se cuenta con tres métodos específicos para clasificarlos correctamente, por análisis de *Southern blot* (Lakich et al*,* 1993), LD-PCR/2006 (Bagnall et al, 2006) o IS-PCR/2008 (Rossetti et al, 2008) utilizada en este trabajo, con el objetivo último de determinar fehacientemente si la Del22 y la Dup22 deben ser o no objeto de preocupación en el diagnóstico molecular de la hemofilia.

CAPÍTULO II

Variantes de la inversión del intrón 22 del F8 tipo I y tipo II en familias no relacionadas con HA severa

El análisis de los rearreglos mediados por recombinación de las copias de *int22h* en la población Argentina general y en familias de pacientes con HA severa por la técnica de IS-PCR/2008 permitió la detección de dos familias con patrones no convencionales de la Inv22-I y tipo Inv22-II, caracterizados por ausencia de señales en el *test* diagnóstico y los patrones convencionales de la Inv22-I o Inv22-II, en el *test* complementario.

RESULTADOS II

Los objetivos de este Capítulo II están centrados en la elucidación completa de los cambios moleculares asociados al desarrollo de HA severa en los probandos de las familias donde se detectaron los patrones IS-PCR/2008 anómalos (Familia 1 y Familia 2 con los pacientes #502, #507 y #762, y #816, respectivamente, Figura C2.1).

Antes de analizar la existencia de rearreglos de naturaleza compleja, nos propusimos investigar si se trataba del rearreglo básico convencional de la Inv22 típicamente asociado al desarrollo de HA severa en hemicigosis, sea tipo I o tipo II, sumado a otro cambio genético que justificara los patrones IS-PCR/2008 anómalos.

Estudios Previos

Como parte de un Proyecto de Investigación ya completado (asociado al desarrollo de la Tesis de Licenciatura en Biotecnología de MM Abelleyro, Universidad Nacional de Quilmes, año 2010) se comenzaron a investigar las causas de la obtención de estos patrones IS-PCR/2008 no convencionales. En este contexto, se investigaron tres hipótesis que podrían explicar la ausencia de señales en el *test* diagnóstico del ensayo IS-PCR en los probandos de la Familia 1 (la única familia detectada con patrones IS-PCR anómalos hasta ese momento): (i) se analizó la existencia potencial de alguna mutación que afecte a alguno de los sitios *Bcl*I terminales que definen el fragmento de 17,5kb por medio del abordaje de PCR-RFLP; (ii) se evaluaron las regiones de hibridación de los oligonucleótidos *primers* involucrados en el *test* diagnóstico (i.e., ID y 3U) por medio de amplificación PCR de los sitios *Bcl*I terminales usando *primers* alternativos vecinos de igual función; y (iii) se estudió la presencia de eventuales inversiones que involucren a las regiones terminales del fragmento 17,5kb por el abordaje de IS-PCR aplicando combinaciones pares de *primers* de igual orientación.

Los resultados negativos (Ho hipótesis nula) de estos tres experimentos nos condujo a descartar estos eventos (i.e., hipótesis (i), (ii) y (iii)) como posibles causas de la ausencia de señal observada en el *test* diagnóstico IS-PCR/2008.

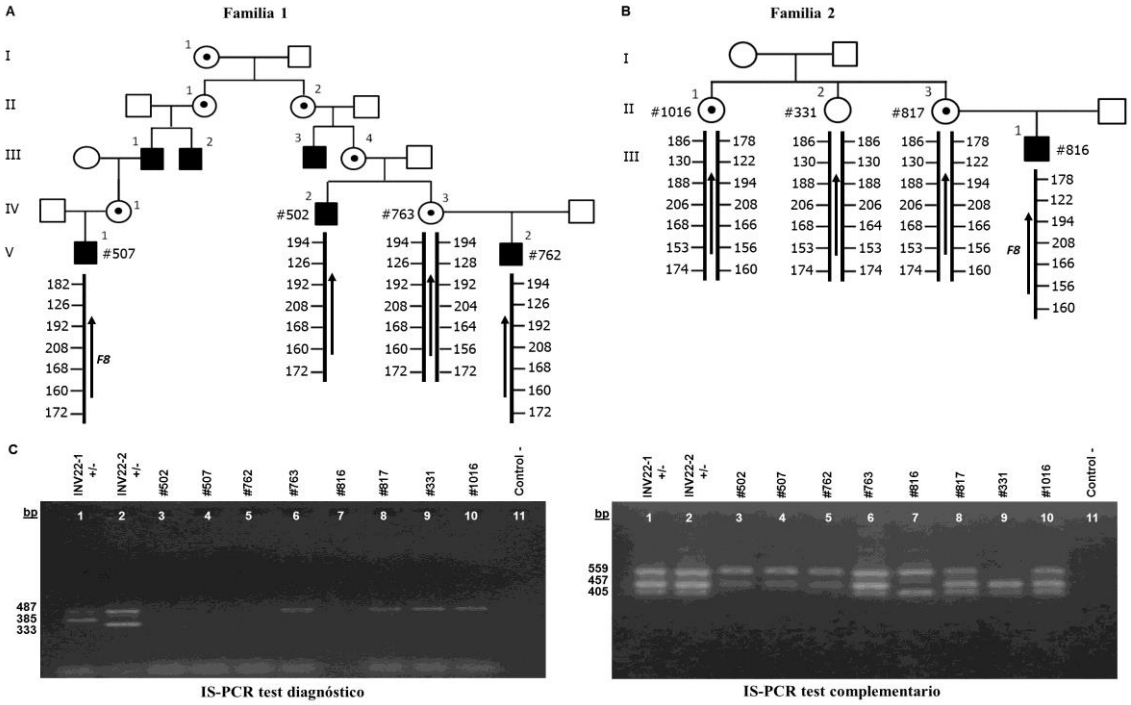


Figura C2.1. Árbol familiar y análisis IS-PCR/2008 de las familias con patrones no convencionales. **A**, Familia 1. **B**, Familia 2. Las muestras se designan por el número de identificación del laboratorio (#). Las líneas verticales indican los haplotipos deducidos utilizando STRs de Xq28: *F8* extragénico 3', DXS7423 (Edelmann et al, 2002), DXS1073 (Fimiani et al, 2006); *F8* intragénico, Int25.3 (Machado et al, 2009), Int22 (Liang et al, 2009), Int21 (Machado et al, 2011), Int13 (Machado et al, 2009); *F8* extragénico 5', DSX1108 (Edelmann et al, 2002). La flecha negra indica la ubicación y dirección de transcripción del *F8*. **C**, Electroforesis en gel de agarosa con los análisis IS-PCR/2008 y productos del *test* diagnóstico (panel izquierdo) y *test* complementario (panel derecho), el orden de siembra de productos en ambos casos es, calles 1 a 11: Inv22-II [+/-] e Inv22-I [+/-] como controles positivos; #502; #507; #762; #763; #816; #817; #331; #1016 y el control negativo (sin ADN). Los patrones inusuales de los pacientes hemicigotas de las Familias 1 y 2 se caracterizan por la falta de señales en el *test* diagnóstico y con patrones Inv22-I e Inv22-II convencionales en el *test* complementario, respectivamente. Todas las mujeres en riesgo muestran el patrón de no portadora en el *test* diagnóstico y los patrones discriminantes de la Inv22-I (#763) y de la Inv22-II (#1016, #817) en heterocigosis, y el patrón homocigota de no portadora (#331) en el *test* complementario.

En este Capítulo II se presenta la caracterización molecular de los patrones IS-PCR no convencionales.

Buscando las causas moleculares de los patrones IS-PCR/2008 no convencionales detectados en familias con HA severa

Los resultados negativos a las tres hipótesis planteadas, llevaron a desarrollar una cuarta hipótesis: consistente en un eventual sitio de reconocimiento de la enzima de restricción *Bcl*I que rompiera la integridad de los fragmentos de 17,5 y 15,5kb, que

corresponden a los círculos que generan las señales que están ausentes en el *test* diagnóstico en los probandos de las Familias 1 y 2 (i.e., 333 y 385pb, respectivamente) (Figura C2.1).

La investigación de este eventual RFLP *Bcl*I se realizó *in silico* elaborando mapas de restricción *Bcl*I teóricos sobre los fragmentos/círculos de 17,5 y 15,5kb incluyendo los alelos variante de los 85 SNPs informados en la bases de datos de SNPs de acceso público (HapMap Project, dbSNP NCBI, dbSNP Ensembl, ver Materiales y Métodos). Este análisis teórico-bioinformático reveló un solo sitio como potencial secuencia de reconocimiento de *Bcl*I, asociado al SNP (rs73563631) [A/G] ubicado 228pb río abajo de h1 (Figura C2.2).

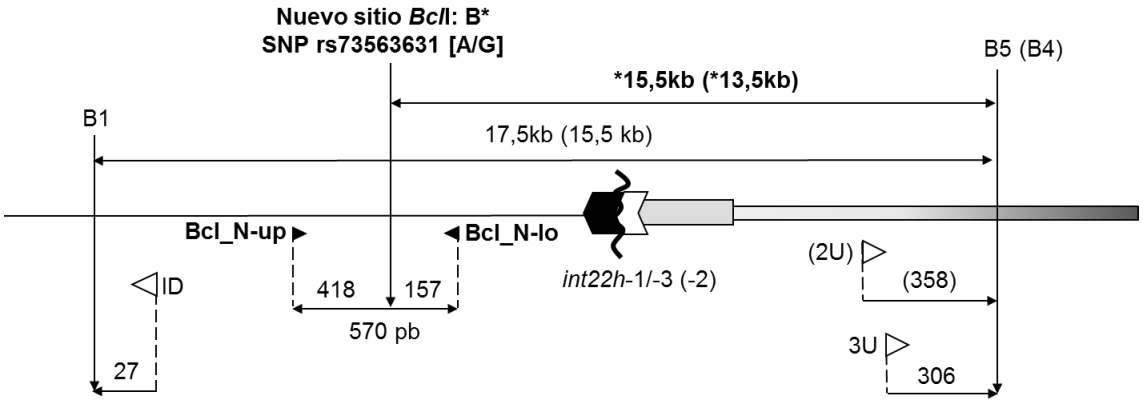


Figura C2.2. Esquema de los fragmentos de resctricción *Bcl*I involucrados en los patrones IS-PCR/2008 no convencionales de la Inv22 tipo I y tipo II. En el esquema se muestra con un *chrevron* negro y blanco el rearreglo asociado a la Inv22-I (h1/h3) y entre paréntesis todo lo asociado a la Inv22-II (h1/h2), el fragmento de restricción de 17,5kb (B1-B5) y el de 15,5kb (B1-B4) asociado a los productos de amplificación de 333pb (*primers* ID y 3U) y de 385pb (*primers* ID y 2U), respectivamente. Se muestran también el nuevo sitio de restricción *Bcl*I generado por el SNP rs73563631 (B*), los *primers* diseñados para su investigación (Bcl_N-up y Bcl_N-lo) y los nuevos fragmentos de restricción generados por B*, de 15,5 y 13,5kb asociados a las Inv22-Iv e Inv22-IIv, respectivamente. Debajo de cada *primer* se muestra la distancia a cada sitio *Bcl*I en pb (tamaño que aporta a cada producto de amplificación IS-PCR/2008 específico donde ese *primer* actúa).

Sorpresivamente, el análisis directo del alelo variante rs73563631*G asociado al sitio de restricción *Bcl*I por PCR-RFLP resultó positivo en ambas familias: indicando su presencia en todos los pacientes con HA severa (i.e., #502, #507, #762 y #816) y en tres de las cuatro mujeres en riesgo (i.e., #763, #817 y #1016) mientras que en una de las mujeres no fue informativa (i.e., #331). La secuenciación de Sanger de los productos PCR Bcl_N-up-Bcl_N-lo confirmó la presencia del alelo rs73563631*G en ambas familias indicando así que la misma variante de secuencia (TGATCA) está asociada a la Inv22-I e Inv22-II destruyendo la integridad de los fragmentos/círculos de 17,5kb y 15,5kb, respectivamente, probando por vías independientes coincidentes que

el alelo rs73563631*G es el causal de la ausencia de amplificación IS-PCR/2008 en el *test* diagnóstico (Figuras C2.2 y C2.3).

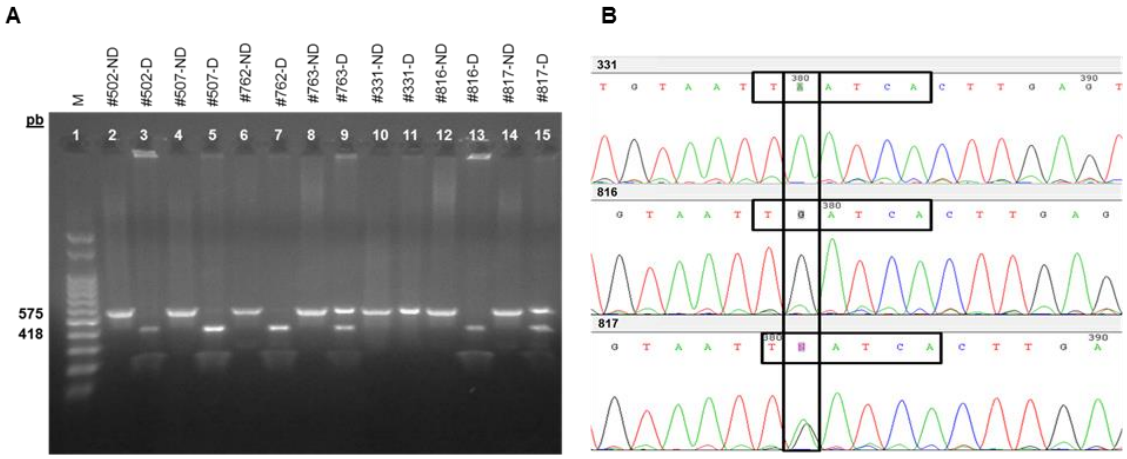


Figura C2.3. Análisis del alelo rs73563631*G asociado al nuevo sitio de restricción *Bcl*I. A. Gel de agarosa 1,5% que muestra los resultados de la técnica PCR-RFLP en la Familia 1 (calle 2 a 9) y en la Familia 2 (calle 10 a 15), producto digerido con *Bcl*I (D) y no digerido o *mock digested* (ND); calle 1 (M), marcador de peso molecular (escalera de 100 pb). Resultados panel (A), caso #502 [+] (rs73563631*G alelo [+] hemicigota), #507 [+], #762 [+], #763 [+/-] (rs73563631*G alelo [+] heterocigota), #331 [-] o [-/-], #816 [+], #817 [+/-]. Panel (B), secuenciación de Sanger (electroferograma) confirmando la presencia del alelo rs73563631*G en el probando de la Familia 1 (#816) panel intermedio, su madre portadora (#817) panel inferior, y su tía no portadora (#331) panel superior.

Análisis haplotípico

El análisis de haplotipos en ambas familias con HA severa, utilizando siete marcadores STR polimórficos confirmó la ausencia de relación familiar entre las familias 1 y 2, y confirmó la relación familiar dentro de cada una de las familias, la Figura C2.4 muestra ejemplos de los resultados obtenidos en cada marcador y familia; mientras que los resultados de los análisis de ligamiento familiar, con todos los STR integrados en haplotipos del *F8* y sus secuencias vecinas extragénicas 5' y 3', se muestran debajo de cada individuo en ambos árboles familiares (Figura C2.1A).

Estos estudios también permitieron confirmar el origen independiente de la asociación del alelo rs73563631*G, y el RFLP *Bcl*I correspondiente, con la Inv22, lo que indica y predice cierto grado de recurrencia.

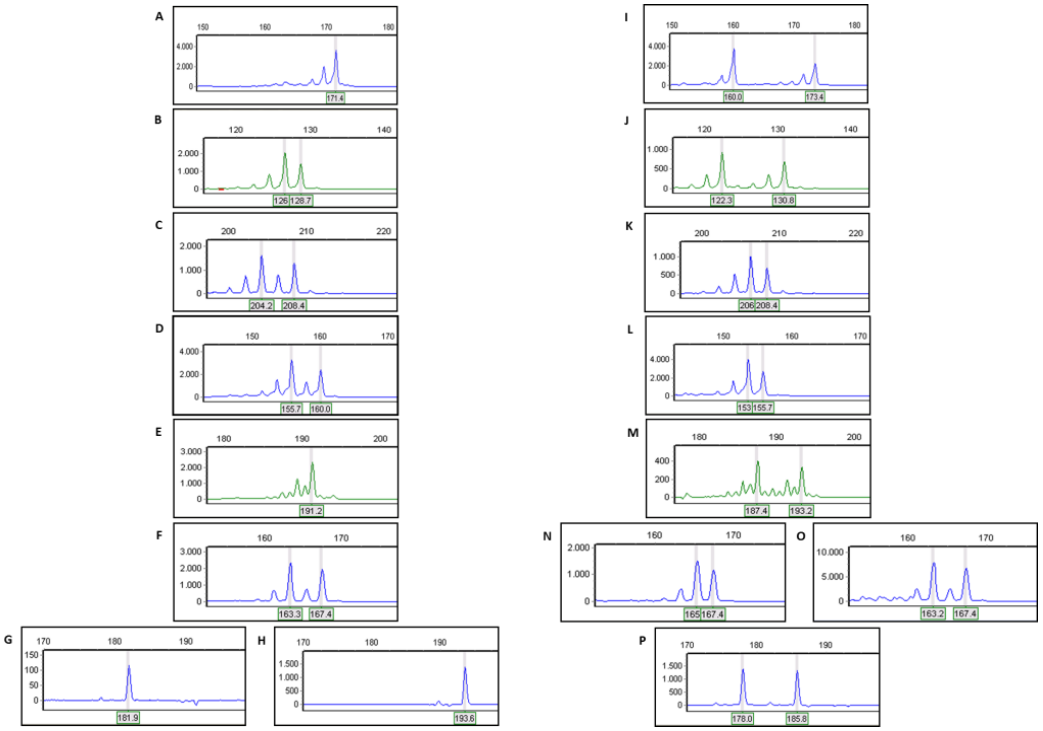


Figura C2.4. **Análisis de haplotipos en las Familia 1 y 2 con siete marcadores STRs ligados al *F8***. Se analizaron siete repeticiones cortas en tándem (STR) ligadas al *F8* (i.e., DXS7423, DXS1073, *F8*Int25.3, *F8*Int22, *F8*Int21, *F8*Int13 y DXS1108) por electroforesis capilar fluorescente. Se muestran ejemplos de cada marcador STR analizado para realizar los haplotipos en cada familia. Panel izquierdo: Inv22-Iv (Familia 1), muestras #762 (A), #763 (B, C, D, H, M), #507 (E, G). Panel derecho: Inv22-IIv (Familia 2), las muestras #817 (I, J, K), #1016 (L, M, N, P), #331 (O). Cada fila corresponde a un marcador STR específico, de arriba hacia abajo: DXS1108 (A, I), DXS1073 (B, J), STR22 (C, K), STR13 (D, L), STR25.3 (E, M), STR21 (F, N, O), DXS7423 (G, H, P).

*Análisis de frecuencias del alelo rs73563631*G en nuestra población general*

En la Figura C2.5 se presentan algunos ejemplos del análisis PCR-RFLP de varones y mujeres de la población Argentina general analizada resultando siempre hemi- u homocigota para el alelo *Bcl*I [-] (rs73563631*A), respectivamente.

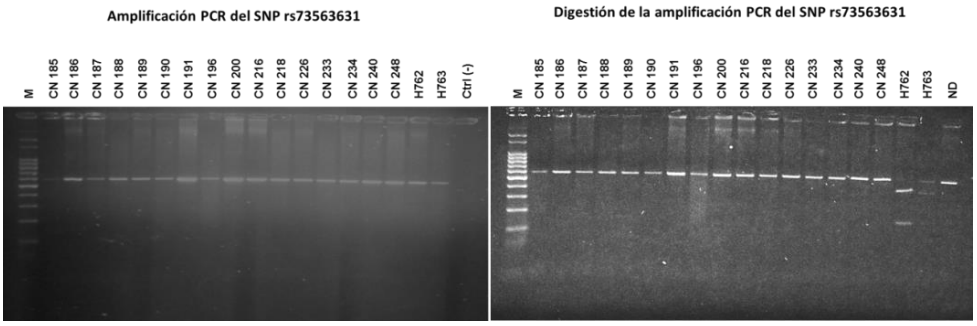


Figura C2.5. **Análisis del alelo rs73563631*G en la población Argentina general.** Panel izquierdo, se muestra como ejemplo la amplificación PCR (*primers* Bcl_N-up y Bcl_N-lo) en siete mujeres (CN: 187, 188, 191, 196, 200, 233, 240) y nueve varones de la población argentina general (CN: 185, 186, 189, 190, 216, 218, 226, 234, 248) y dos miembros de la Familia 1 (el paciente #762 con INV22-1v y su madre portadora #763). Panel derecho, se muestra el análisis de restricción *Bcl*I de los productos PCR. Ctrl (-) indica control negativo (sin ADN); ND, no digerido y M (marcador de tamaño molecular, escalera de 100pb).

El monitoreo del alelo rs73563631*G en 404 cromosomas X correspondientes a 122 varones y 141 mujeres de nuestra población resultó siempre negativo, lo que permite estimar una frecuencia del alelo variante (q) menor al 0,24%.

*Frecuencias del alelo rs73563631*G en poblaciones internacionales*

Para estimar las eventuales frecuencias de las Inv22-Iv, Inv22-IIv en diferentes poblaciones internacionales de pacientes con HA severa, se estudiaron las frecuencias del alelo rs73563631*G en los datos publicados por el Proyecto 1000 Genomas (Tabla C2.1) (Abecasis et al, 2012).

Tabla C2.1: Frecuencia del alelo rs73563631*G (*1000 Genomes-Project*).

Population/ Samples	Population Description	rs73563631*G Frequency	%
World	World allele frecuancy	G: 0,0127	1,27
BEB	Bengali from Bangladesh	G: 0	0
CDX	Chinese Dai Xishungbanna, China	G: 0	0
CEU	Utha Resident (CEPH) with Northern and Wstern European ancestry	G: 0	0
CHB	Han Chinese in Benjing, China	G: 0	0
CHS	Southern Han Chinese	G: 0	0
FIN	Finnish in Finland	G: 0	0
GRB	British in England and Scotland	G: 0	0
GIH	Gujarati Indian from Houston, Texas	G: 0	0
IBS	Iberian Population in Spain	G: 0	0
ITU	Indian Telugu from the UK	G: 0	0
JPT	Japanese in Tokyo, Japan	G: 0	0
KHV	Kinh in Ho Chi Minh City, Vietnam	G: 0	0
MXL	Mexican Ancestry from Los Angeles USA	G: 0	0
PEL	Peruvians from Lima	G: 0	0
PJL	Punjabi from Lahore, Pakistan	G: 0	0
STU	Sri Lankan Tamil from the UK	G: 0	0
TSI	Toscani in Italia	G: 0	0
PUR	Puerto Ricans from Puerto Rico	G: 0,0065	0,65
CLM	Colombians from Medellin, Colombia	G: 0,0069	0,69
ACB	African Carribeans in Barbados	G: 0,0138	1,38
ESN	Esan in Nigeria	G: 0,0207	2,07
LWK	Luhya in Webuye, Kenia	G: 0,0325	3,25
GWD	Gambian in Wastern Divisions in the Gambia	G: 0,0351	3,51
ASW	American of African Ancestry in SW USA	G: 0,0417	4,17
YRI	Yoruba in Ibadan, Nigeria	G: 0,0488	4,88
MSL	Mende in Sierra Leone	G: 0,1406	14,06

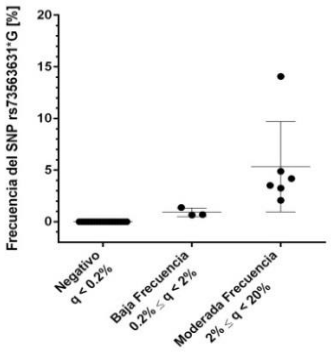


Figura C2.6. **Frecuencias del alelo rs73563631*G en el mundo. Se muestran los q promedio, y desvíos en tres grupos definidos según frecuencias de la Tabla C2.1:** Negativo (desde BEB hasta TSI), Baja Frec. (PUR hasta ACB) y Moderada Frec. (ESN hasta MSL).

El SNP rs73563631 mostró un q promedio global de 1,27% (n=3775) y se clasificó como polimórfico de frecuencia moderada en las poblaciones africana y afroamericana (2,07-14,06%); como raramente polimórfico de baja frecuencia en las poblaciones colombianas, portorriqueñas y afrocaribeñas (0,69-1,38%), y como no polimórfico (sin frecuencia) (q<0,2%) en las poblaciones asiáticas (habitantes de India, China y Japón), en habitantes estadounidenses con ascendencia europea, en europeos (británicos, finlandeses, italianos, ibéricos, etc.), en nativos americanos e hispanos de América del Sur (peruanos y mexicanos) (Figura C2.6).

*Modificación del abordaje IS-PCR/2008 para incluir la detección de las variantes asociadas a rs73563631*G*

Por sus características y especificidad, la técnica de IS-PCR/2008 es actualmente el ensayo de elección para estudiar los rearreglos asociados a *int22h* en muchos Laboratorios del mundo (Rossetti et al, 2011). Con el objetivo de abarcar la caracterización de todas las posibles variantes, se realizaron experimentos de análisis

IS-PCR utilizando los *primers* 2U o 3U y Bcl_N-lo (en sustitución de la función de ID para identificar el extremo del tipo de fragmento *Bcl*I-restricción específica, BN-B5 o B4, Figura C2.2). Este abordaje permitió genotipificar la Inv22-Iv e Inv22-IIv, en los pacientes hemicigotas y las mujeres familiares portadoras, en ambas familias informativas para rs73563631*G. Las señales específicas fueron de 463pb para la Inv22-Iv y 515pb para la Inv22-IIv (Figura C2.7A).

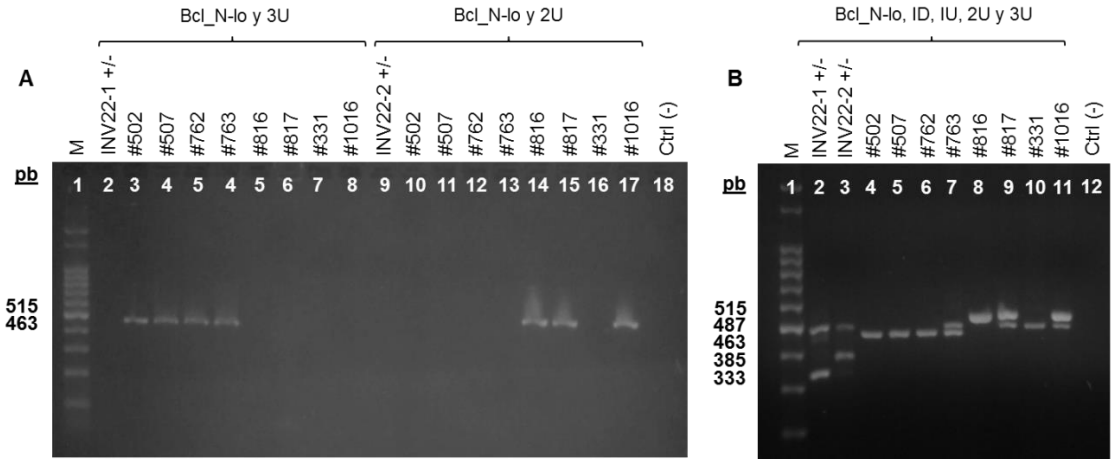


Figura C2.7. Abordaje IS-PCR/2008 modificado para genotipificar las Inv22-Iv, Inv22-IIv y otros rearreglos de *int22h*. A. Electroforesis en gel de agarosa 1,5% mostrando el resultado del análisis de las Inv22 variantes: calle 1, marcador de tamaño escalera de 100 pb (M), calles 2-8, productos IS-PCR (*primers* Bcl_N-lo y 3U) detección de Inv22-Iv, calles 9-17: productos IS-PCR (*primers* Bcl_N-lo y 2U), de Inv22-IIv, calle 18: Ctrl (-) control negativo, sin ADN. **B.** Electroforesis en gel de agarosa 2% mostrando los productos del abordaje IS-PCR/2008 *test* diagnóstico modificado, incluyendo el *primer* Bcl_N-lo al *set* convencional (i.e., ID, IU, 2U y 3U). Calle 1, M; calle 2, control positivo (portadora Inv22-I); calle 3, Ctrl. positivo, portadora Inv22-II; calle 4-6, pacientes con la Inv22-Iv (Familia 1); calle 7, portadora de la Inv22-Iv (Familia 1); calle 8, paciente con la Inv22-IIv (Familia 2); calle 9-11, mujeres en riesgo de la Familia 2, resultaron dos portadoras de Inv22-IIv y una no portadora; calle 12, Ctrl. Neg.

Con esta evidencia, la inclusión del *primer* Bcl_N-lo al *set* de *primers* original del *test* diagnóstico de IS-PCR/2008 (i.e., ID, IU, 2U y 3U), permitió la identificación de todos los rearreglos asociados a las copias de *int22h,* los canónicos de Inv22 (i.e., Inv22-I e Inv22-II) y las nuevas variantes (i.e., Inv22-Iv e Inv22-IIv) con señales específicas de 463pb y 515pb, respectivamente (Figura C2.7B), permitiendo distinguir también la variante Normal asociada a rs73563631*G con una señal de 619pb (Figura C2.2).

En resumen, se identificó al SNP rs73563631 [A/G] como causante de los patrones anómalos encontrados en el *test* diagnóstico, el alelo [G] crea un sitio de restricción *Bcl*I asociado a una variante de la Inv22-I (Inv22-Iv) en la Familia 1 y de la Inv22-II (Inv22-IIv) en la Familia 2. La versión IS-PCR/2008 modificada permite genotipificar la Inv22-Iv en Familia 1 (pacientes #502, #507 y #762, y portadora #763), y la Inv22-IIv

en Familia 2 (paciente #816, portadoras #817 y #1016, y no portadora #331) así como todos los patrones convencionales ya conocidos (Figura C2.7B).

DISCUSIÓN II

En este Capítulo II se detectaron cuatro pacientes de dos familias no relacionadas (Familia 1 y Familia 2) con patrones de señal inusuales en el *test* diagnóstico del abordaje IS-PCR/2008 en la genotipificación de la Inv22 en la serie histórica de pacientes Argentinos con HA severa. Los pacientes con HA severa de ambas familias no presentaron señales en el *test* diagnóstico pero mostraron las señales asociadas a la Inv22-I/-II en el *test* complementario, 559+457pb/559+405pb, respectivamente.

La causa de estos patrones fue investigada y se determinó que el alelo variante del SNP rs73563631 [A/G] asociado a un nuevo sitio de restricción *Bcl*I es responsable de la disrupción de los fragmentos/círculos de 17,5 y 15,5kb generando dos nuevos patrones de la Inv22, Inv22-Iv e INV22-IIv.

Las variantes de la Inv22 fueron detectadas en cuatro de los 118 pacientes con la Inv22 (3,4%) y de los 287 pacientes con HA severa (1,4%): tres pacientes con la Inv22-Iv (Familia 1) y uno con la Inv22-IIv (Familia 2).

Este grupo de pacientes con Inv22-I/-II variante no presentó diferencias en la severidad clínica o bioquímica (FVIII:C<1UI/dl) resultando los cuatro con HA severa de fenotipo indistinguible, como tampoco en los riesgos a desarrollar inhibidor (anticuerpos neutralizantes del FVIII administrado terapéuticamente que hace inefectivo el tratamiento), dado que sólo uno de los cuatro pacientes mostró inhibidores permanentes (con nivel de anticuerpos estables en el tiempo, más de seis meses) que es virtualmente igual al riesgo a desarrollar inhibidor asociado a la Inv22 que fuera estimado a partir de la serie de pacientes Argentinos con HA severa (n=267, prevalencia inhibidor del 24% IC95%(18-29%)) (Rossetti et al, 2013).

La inestabilidad genómica en Xq28 asociada a las copias de *int22h* e *int1h* en el *F8* ha sido demostrada por la publicación de numerosos trabajos caracterizando eventos de recombinación asociados a reordenamientos genómicos causales de HA severa aunque ninguno de ellos ha resultado consistente con la Inv22-Iv o la Inv22-IIv presentadas aquí. Por ejemplo, Andrikoviks et al (2003) presentó una revisión de la bibliografía y resultados propios mostrando todos los patrones de *Southern blot* no canónicos (falta de señales, la presencia de nuevas señales y/o variaciones de tamaño en la señal) en pacientes con HA severa con reordenamientos mediados por *int22h*. Mühle et al (2007) presentaron rearreglos complejos caracterizados por la Inv22 asociada a duplicaciones y deleciones. Zimmermann et al (2011) presentaron casos

de la Inv22 o Inv1 asociado a duplicaciones. Asimismo, Pezeshkpoor et al (2012) mostraron la Inv1 asociada a una deleción y Lanoy et al (2013), la caracterización de la Inv22 más una duplicación intra-*F8.*

En el contexto de Congresos de la especialidad, la caracterización molecular de las Inv22-I/-II variantes causada por la presencia del alelo rs73563631*G fue presentada por nosotros en el grupo de pacientes con HA severa de la población Argentina (Abelleyro et al, 2011 y 2012); y por Lewis et al (2012) en pacientes Afroamericanos donde mostraron los resultados de un varón con la Inv22 variante y una mujer portadora de la Inv22 convencional pero en hemi/homocigosis causado por el alelo rs73563631*G asociado al alelo normal.

Aunque los eventos de recombinación presentados son independientes presentando diferentes orígenes moleculares, confirmado por el hecho de asociarse a la Inv22-Iv e Inv22-IIv y a diferentes haplotipos del *F8*, ambos presentan el alelo rs73563631*G y por lo tanto un nuevo *Bcl*I-RFLP que modifica tanto los patrones de *Southern blot* (Lakich et al, 1993) como los de IS-PCR (Rossetti et al, 2008) en pacientes, portadoras y aún en individuos no afectados. El análisis *in silico* de los mapas de restricción *Bcl*I predice cambios en los patrones de *Southern blot* cuando el alelo rs73563631*G está presente: el alelo Normal de 21.5-16-14kb a Normal variante de 19.5-16-14kb, la Inv22-I de 20-17.5-14kb a Inv22-Iv de 20-15.5-14kb, y la Inv22-II de 20-16-15.5kb a Inv22-IIv de 20-16-13.5kb. Los dos últimos patrones de señal, de las Inv22-Iv e Inv22-IIv, son perturbadoramente similares al patrón Normal y difíciles de diferenciar cuando la resolución de técnica de *Southern blot* no es óptima y por lo tanto podría llevar a errores diagnósticos y también, aunque menos preocupante, a una mala valoración de la proporción de pacientes con la Inv22 en los laboratorios que utilizan esta técnica (aún hoy considerada técnica de referencia o *gold standard*) para la genotipificación de la Inv22. La inspección *in silico* de los abordajes basados en LD-PCR (Liu et al, 2005; Bagnall et al, 2006) y la técnica de IS-PCR publicada en el año 2005 (Rossetti et al, 2005) indica que ninguna de ellas presenta problemas para la genotipificación de la Inv22 aunque no detecta las variantes sino sus alelos asociados al fenotipo hemofílico.

Con el objetivo de solucionar los problemas de genotipado del abordaje IS-PCR/2008 (Rossetti et al, 2008) asociado a los casos presentados en este Capítulo II se diseñó y desarrolló una versión modificada de la técnica (incluyendo Bcl_N-lo al conjunto de *primers* originalmente diseñados para el *test* diagnóstico) permitiendo una clasificación precisa de todos los reordenamientos mediados por las copias de *int22h* reportados hasta el momento, las Inv22 canónicas, las Del22 y Dup22, y las variantes informadas aquí.

Nuestros datos de las Inv22-Iv/-IIv en pacientes con HA severa (1,4%) y la existencia del alelo rs73563631*G en diferentes poblaciones del mundo (étnica o geográficamente definidas) estimada a partir del Proyecto 1000 Genomas, predicen un promedio global del 1,27% tanto para pacientes con hemofilia, portadoras o individuos no afectados, con frecuencias moderadas en las personas de ascendencia africana (15,2%), baja en mesoamericanos (0,69-1,38%), y negativa en poblaciones asiáticas y europeas. Es importante indicar que en las dos familias involucradas (con los tres pacientes con la Inv22-Iv y un paciente Inv22-IIv reportados aquí) no pudieron rastrearse indicadores o antecedentes de ascendencia africana, aunque este hecho no puede descartarse completamente.

En el año 2011 un grupo egipcio presentó patrones IS-PCR de la Del22 en tres pacientes con HA severa (Abou-Elew et al, 2011). Dado que la Del22 ha sido indicada como potencialmente letal en varones hemicigotas (El-Hattab et al, 2011) sería posible que estos patrones IS-PCR indicativos de la Del22, encontrada en pacientes egipcios con HA severa sin fenotipos adicionales, estuvieran asociados a la presencia de algún SNP/RFLP presente en la población egipcia, que genere un sitio de restricción *Bcl*I que destruya el fragmento/círculo de 20kb simulando los patrones de la Del22 en estos casos.

Los resultados presentados en este Capítulo II refuerzan la idea que, especialmente en enfermedades ligadas al cromosoma X, la detección de patrones inusuales en el análisis de rearreglos moleculares típicos usando cualquiera de los abordajes experimentales asequibles en los Laboratorios del mundo, debe ser investigada en profundidad hasta determinar precisamente tanto la extensión molecular de las eventuales pérdidas o ganancias de segmentos genómicos como su estructura genómica resultante en cada caso particular para poder sacar conclusiones sobre su posible asociación con características clínicas específicas y su grado de severidad.

CAPÍTULO III

Desarrollo de un nuevo abordaje para medición relativa de dosis génica para análisis de portadoras de grandes deleciones ligadas al X. Aplicación en hemofilia

Las grandes deleciones del *F8* representan el 8-15% de los casos con HA severa (Graw et al, 2005; Rossetti et al, 2013) y las del *F9*, el 6-13% (Radic et al, 2013) de los casos con HB severa. Dada la alta predisposición a desarrollar anticuerpo inhibidor asociada a las grandes deleciones del *F8* y *F9*, su detección molecular rápida y temprana es muy importante para el diagnóstico de portadoras y asesoramiento genético de las familias afectadas.

RESULTADOS III

En pacientes hemicigotas la presencia de una gran deleción se pone en evidencia por ausencia consistente de señales de amplificación PCR específicas en uno o más exones contiguos (Figura C3.1). Sin embargo el diagnóstico de una gran deleción en heterocigosis está dificultado por la presencia de la señal correspondiente al alelo no mutado enmascarando la ausencia de señal asociada al cromosoma X mutado (Figura C3.1).

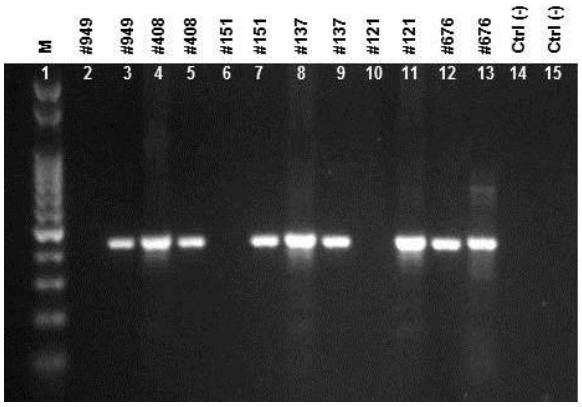


Figura C3.1. Detección de grandes deleciones por PCR estándar en pacientes hemicigotas y no en mujeres en riesgo de ser portadoras. Análisis de productos PCR dentro (*gap*) y fuera de la región que abarca la deleción en un probando hemicigota y una mujer en riesgo. Calle 1 (M), marcador de tamaño molecular (escalera de 100pb), calles 2, 4, 6, 8, 10 y 12 productos involucrados en el *gap* en los pacientes (#949, #151 y #121) y las mujeres en riesgo (#408, #137 y #676) de las familias 1, 2 y 4; calles 3, 5, 7, 9, 11 y 13 productos de amplificación no involucrados en el *gap* en los mismos pacientes y mujeres en riesgo indicadas. Calles 14 y 15, controles negativos (sin ADN).

Los objetivos del Capítulo III fueron diseñar, desarrollar, poner a punto y validar un abordaje costo-efectivo para realizar el diagnóstico de mujeres familiares en riesgo de ser portadoras de grandes deleciones del *F8* y *F9*.

La medición de dosis génica se basa en la cuantificación relativa del número de copias sobre un par de secuencias blanco/referencia (*target*/*reference*) "T/R" en regiones cromosómicas localizadas una en el cromosoma X (T) y la otra, en un autosoma (R) por qPCR. La novedad del abordaje presentado aquí consiste en el uso de poblaciones control de varones (46,XY) y mujeres (46,XX) de la población general para *simular*, sobre base estadística, la variación experimental de los valores T/R de portadoras y no portadoras, respectivamente. Los parámetros estadísticos de estas poblaciones control y el valor T/R de la mujer en riesgo permitirán la estimación de la probabilidad de ser portadora de una deleción en la región blanco del cromosoma X interrogada.

Desarrollo y puesta a punto de las reacciones de amplificación qPCR: curvas de calibración y análisis de productos

La Figura C3.2 muestra las curvas de calibración y *melting*, construidas para cada uno de los protocolos de amplificación de las diferentes regiones blanco y de referencia específicas.

Las eficiencias de amplificación (*ef*), el cuadrado del coeficiente de correlación de Pearson (R^2) y la pendiente (M) de las curvas de calibración de los productos qPCR blanco, T, en el *F8* y el *F9* mostraron los siguientes valores: F8P1AB (*ef* 0,960, R^2 0,994 y M -3,415), F8e6 (*ef* 0,980, R^2 0,998 y M -3,375), F8e26 (*ef* 1,010, R^2 0,994 y M -3,290), F9e8 (*ef* 1,240, R^2 0,990 y M -2,859); y para las curvas de las dos referencias, R: $CTLA_a$ (*ef* 1,060, R^2 0,998 y M -3,188) y $CTLA_b$ (*ef* 1,24, R^2 0,990 y M -2,87). En todos los casos las curvas de *melting* para cada amplímero mostraron picos únicos (Figura C3.2A-F).

En la misma línea, la especificidad de los productos de amplificación qPCR obtenidos fue investigada por unicidad y correspondencia de tamaño de señal mediante electroforesis en gel de agarosa (Figura C3.2G).

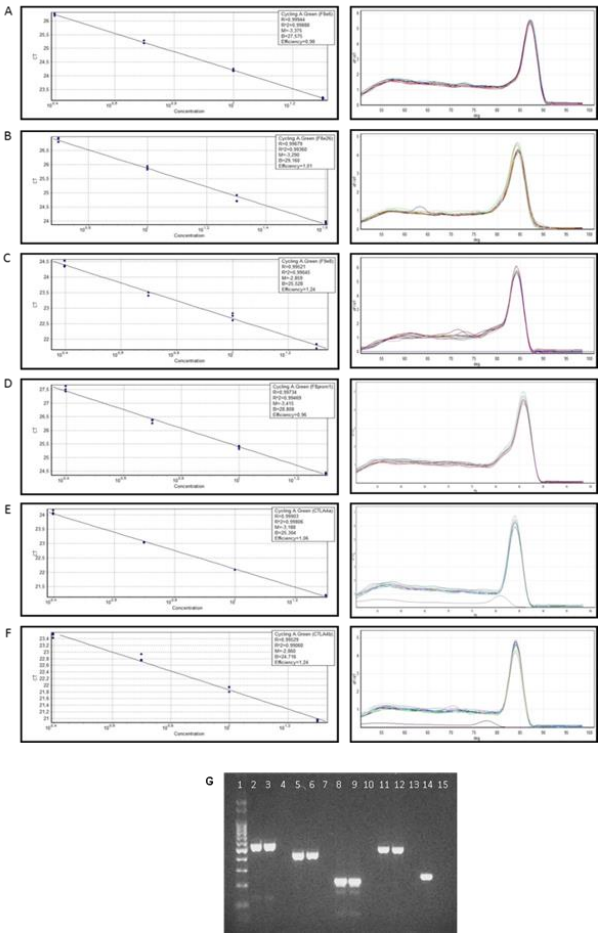


Figura C3.2. Pruebas de amplificación y especificidad de productos qPCR. Curvas de calibración CT *versus* concentración (panel izquierdo) y curvas de *melting* (panel derecho). Las curvas de calibración se hicieron con diluciones seriadas de una muestra de ADN genómico de un varón de la población general sana (CN85) por triplicado (puntos azules). Las curvas de calibración muestran: la pendiente (M), la eficiencia de amplificación (*efficiency*) y el cuadrado del coeficiente de correlación de Pearson (R^2). Curvas de *melting* de cada producto se muestran en cada fila: **A** *F8* exón 6 (F8e6), **B** *F8* exón 26 (F8e26); **C** *F9* exón 8 (F9e8), **D** *F8* promotor (F8P1AB), **E** $CTLA4_a$ (referencia para los T del *F8* exón 6, exón 26 y *F9* exón 8) y **F** $CTLA4_b$ (referencia para el *F8* promotor). **G** Electroforesis en gel de agarosa (1,5%) mostrando la unicidad y tamaño molecular de cada producto qPCR (prueba adicional de especificidad) Promotor del *F8* (calles 2-4), exón 6 del *F8* calles 5-7; *F8* exón 26 calles 8-10, exón 8 del *F9* calles 11-13 y *CTLA4* referencia calles 14-15. Marcador de tamaño molecular calle 1, Control Normal CN85 calles 2, 5, 8, 11, mujeres en riesgo de portadoras calle 3 caso #408, calle 6 #137, calle 9 #563, calle 12 #382, Control Negativo (sin ADN) calles 4, 7, 10, 13 y 15.

Desarrollo, puesta a punto y validación del método para detectar grandes deleciones en heterocigosis y diagnóstico de mujeres en riesgo de ser portadoras

Los resultados de cada región blanco analizada en el cromosoma X se presentarán por separado por motivos didácticos para una mayor claridad.

En nuestro abordaje basado en qPCR la capacidad para distinguir entre la simple dosis y doble dosis de una región blanco de amplificación específica particular ligada al cromosoma X, puede ser asegurada en primera instancia mediante la verificación

del no solapamiento entre los rangos de los valores T/R de las poblaciones control de varones y mujeres de la población Argentina general (validación primaria de la técnica). Esta validación primaria pudo verificarse en las cuatro regiones blanco analizadas en este Capítulo III (i.e., *F8* promotor, *F8* exón 6, *F8* exón 26 y *F9* exón 8). Para la construcción de las curvas de Gauss (Normales) se realizaron previamente los análisis de Shapiro-Wilk para asegurar no alejarse significativamente de la distribución Normal (conclusión obtenida con un nivel p>0.05, no significativo (ns)) indicando que la distribución de los datos T/R en cada uno de los ocho grupos de n=15, dos grupos control, varones y mujeres, para cada uno de las cuatro regiones blanco ligadas al cromosoma X estudiadas (i.e., *F8* promotor, *F8* exón 6, *F8* exón 26 y *F9* exón 8), pueden ser modelados adecuadamente por curvas de distribución Normal usando sus parámetros (media (promedio) y desvío estándar (SD)).

Promotor-exón 1 del F8 (F8P1AB)

Validación primaria:

Los rangos de los valores T/R de los 15 varones fueron 0,71-1,12 y de las 15 mujeres 1,36-2,41, el *test* Shapiro-Wilk resultó no significativo en ambos casos indicando así que puede aceptarse la Normalidad de los datos. Los estimadores estadísticos de posición (media) y desvío estándar (SD) para las poblaciones de varones y mujeres fueron, media 0,911 y 1,84, SD 0,11 y 0,38, respectivamente (Tabla C3.1, Tabla C3.2 y Figura C3.3).

Tabla C3.1: Valores de las muestras de la población Argentina general (F8P1AB)

	Varones 46;XY				Mujeres 46;XX			
	Muestra	**T**	**R**	**T/R**	**Muestra**	**T**	**R**	**T/R**
Promotor del *F8* (P1AB)	CN10	2,26	2,41	0,94	CN104	14,70	7,77	1,90
	CN100	3,83	4,39	0,87	CN12	3,03	1,68	1,81
	CN105	3,15	3,77	0,84	CN13	11,10	7,89	1,40
	CN11	3,81	4,50	0,85	CN14	7,01	3,01	2,33
	CN112	7,79	11,00	0,71	CN145	11,40	6,33	1,80
	CN130	4,87	4,34	1,12	CN15	3,28	1,36	2,41
	CN24	5,72	5,65	1,01	CN16	19,90	13,00	1,53
	CN33	6,29	7,83	0,80	CN17	1,44	0,83	1,74
	CN36	4,01	3,79	1,06	CN18	0,02	0,01	1,46
	CN39	6,89	7,15	0,96	CN19	7,15	4,85	1,47
	CN40	3,36	3,54	0,95	CN20	18,70	8,37	2,24
	CN5	6,23	6,98	0,89	CN26	19,80	8,29	2,39
	CN8	9,68	12,90	0,75	CN27	22,60	10,80	2,10
	CN9	0,91	0,94	0,97	CN34	4,42	2,75	1,61
	CN141	3,90	4,11	0,95	CN93	7,70	5,68	1,36
Valor de *p test* de Normalidad Shapiro-Wilk (conclusión)	**0,99 (ns)**				**0,12 (ns)**			

Aplicación a mujeres en riesgo y validación secundaria por otro método:

Dos Familias con mujeres en riesgo de ser portadoras de deleciones en la región promotora fueron evaluadas en las curvas control y calculado los valores de Pc (probabilidad de ser portadora). Familia 1: caso #14 (T/R: 0,81, Pc: 100%), caso #408

(T/R: 0,77, Pc: 100%); Familia 2: caso #81 (T/R: 0,64, Pc: 100%), caso #242 (T/R: 1,55, Pc: 0%), permitiendo así el diagnóstico de portadoras en las tres primeras y de no portadora en la última. Asimismo, estos cuatro resultados diagnósticos obtenidos por el abordaje presentado aquí aplicando medición de dosis y poblaciones control fueron confirmados/validados en todos menos un caso (caso #14 por una la mala calidad de la muestra de ADN) por aplicación de *gap*-PCR (amplificación específica a través de las rupturas de la deleción, técnica considerada como referencia o *gold standard*) (resultados presentados en el Capítulo IV de esta Tesis) (Tabla C3.2, Figura C3.3).

Tabla C3.2: Análisis de las mujeres en riesgo de ser portadoras y datos de las curvas Control.

Curva Normal Media(SD)		Caso# (Familia#)	Relación Familiar	Deleción En riesgo	T	R	T/R	Pc	Diagnóstico	Validación
46; XY	46; XX									
Promotor-*F8* P1AB										
0,911(0,11)	1,84(0,38)	14 (1)	M	exón 1	7,05	9,478	0,81	100%	Portadora	nv
		408 (1)	S	exón 1	5,31	6,95	0,77	100%	Portadora	*Gap*-PCR*
		242 (2)	S	exón 1	16,64	22,29	1,55	0%	No Portadora	*Gap*-PCR*
		81 (2)	M	exón 1	15,47	9,96	0,64	100%	Portadora	*Gap*-PCR*

nv, no validado. Código de relación familiar: M, madre del paciente; S, hermana. *Casos # 242, #81 y #408 validados por *gap*-PCR (Capítulo IV de esta Tesis).

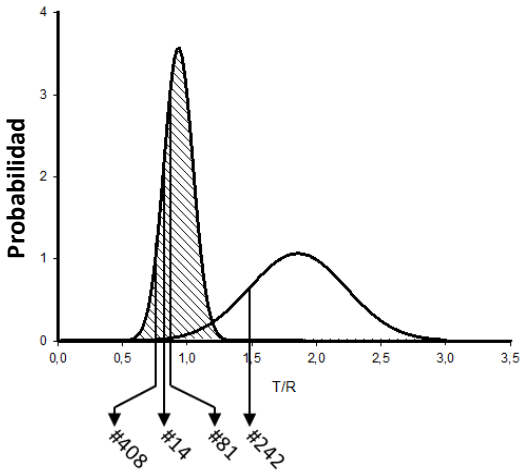


Figura C3.3. Curvas de probabilidad de simple y doble dosis del cromosoma X/Autosoma e interpolación de valores T/R de las mujeres en riesgo de ser portadoras de grandes deleciones en la región promotora del *F8*. Las curvas Normal rayadas y abiertas caracterizan los valores T/R de la población varones (46, XY) (n = 15) y mujeres (46, XX) (n = 15), respectivamente. Se muestra el análisis de F8P1AB en dos familias, los casos #14 y #81 (Familia 1) y #242 y #408 (Familia 2). Se muestran gráficamente los valores T/R de las cuatro mujeres en riesgo. Los valores de tres de ellas interpolan claramente la curva de varones (resultando portadoras con Pc=100%) y sólo una de ellas interpoló en la curva de mujeres (resultando no portadora con Pc=0%).

Exón 6 del F8 (F8e6)

Validación primaria:

Los rangos de los valores T/R de los 15 varones fueron 0,78-1,43 y de las 15 mujeres 1,69-2,37, también en este caso el *test* Shapiro-Wilk para ambas poblaciones resultó no significativo. Los parámetros de las curvas de probabilidad para las poblaciones de varones y mujeres fueron medias de 1,07 y 2,05, y SDs de 0,16 y 0,17, respectivamente (Tabla C3.3, Tabla C3.4 y Figura C3.4).

Tabla C3.3: Valores de las muestras de la población Argentina general (F8e6)

	Varones 46;XY				Mujeres 46;XX			
	Muestra	**T**	**R**	**T/R**	**Muestra**	**T**	**R**	**T/R**
Exón 6 del *F8* (F8e6)	CN100	14,78	12,20	1,21	CN104	19,68	9,69	2,03
	CN101	4,72	5,54	0,85	CN108	29,75	12,56	2,37
	CN105	4,62	5,92	0,78	CN109	21,44	10,28	2,09
	CN106	16,60	11,65	1,42	CN122	24,34	11,90	2,05
	CN107	11,08	11,31	0,98	CN131	21,60	10,41	2,07
	CN111	10,96	10,15	1,08	CN132	20,27	10,40	1,95
	CN120	9,47	9,74	0,97	CN146	14,03	7,49	1,87
	CN130	7,87	7,19	1,10	CN162	22,32	10,19	2,19
	CN133	9,37	10,05	0,93	CN164	12,63	6,74	1,87
	CN142	14,51	13,48	1,08	CN167	23,96	11,13	2,15
	CN145	12,91	11,81	1,09	CN89	33,65	15,63	2,15
	CN154	15,07	14,13	1,07	CN90	7,41	3,83	1,93
	CN161	5,43	4,56	1,19	CN91	12,60	6,03	2,09
	CN163	13,50	11,15	1,21	CN92	25,04	11,30	2,22
	CN86	10,41	10,31	1,01	CN94	14,87	8,82	1,69
Valor de *p* test de Normalidad Shapiro-Wilk (conclusión)	**0,841 (ns)**				**0,958 (ns)**			

Aplicación a mujeres en riesgo y validación secundaria por otro método:

En la Familia 3 se muestra el caso #137, madre de un paciente con HA severa en riesgo sobre el *F8* exón 6, con un valor Pc de 100% (T/R: 0,89) indicando el diagnóstico de portadora. Por otro lado, el probando y su madre (caso #137) fueron previamente caracterizados (Rossetti et al, 2004) con una gran deleción que abarca desde el exón 4 al 10 del *F8* en hemicigosis y heterocigosis (portadora), respectivamente, proveyendo una validación adicional del método presentado (Tabla C3.4, Figura C3.4).

Tabla C3.4: Análisis de las mujeres en riesgo de ser portadoras y datos de las curvas Control.

Curva Normal Media(SD)		Caso# (Familia#)	Relación Familiar	Deleción En riesgo	T	R	T/R	Pc	Diagnóstico	Validación
46; XY	46; XX									
***F8*-exón 6**										
1,07(0,11)	2,05(0,17)	137 (3)	M	exón 4_10	7,08	7,93	0,89	100%	Portadora	*Gap*-PCR

*Caso #137 fue diagnosticada como portadora de una deleción del exón 4_10 del *F8* por *gap*-PCR (Rossetti et al, 2004).

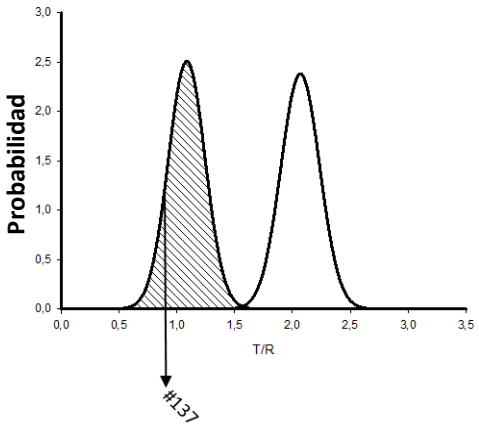


Figura C3.4. Curvas de probabilidad de simple y doble dosis del análisis de la región del exón 6 del *F8* (F8e6) del caso #137, (madre de un probando con HA severa y una deleción hemicigota que abarca el *F8* exón 6) que interpola el valor T/R en la curva de simple dosis indicando su condición de portadora y confirmando los resultados obtenidos por Rossetti et al (2004) por un abordaje independiente (*gap*-PCR). Las referencias de la figura son las mismas que la Figura C3.3.

Exón 26 del F8 (F8e26)

Validación primaria:

Como en las otras regiones estudiadas, los rangos de los valores T/R de los varones (0,70-1,23) y mujeres control (1,57-2,41) no se solapan y el *test* de Normalidad de Shapiro-Wilk resultó no significativo para ambas poblaciones. Los parámetros de las curvas Normal de las poblaciones control de varones y mujeres fueron, medias 0,97 y 1,98, y SDs 0,13 y 0,28, respectivamente (Tabla C3.5, Tabla C3.6 y Figura C3.5).

Tabla C3.5: Valores de las muestras de la población Argentina general (F8e26)

	Varones 46;XY				Mujeres 46;XX			
	Muestra	**T**	**R**	**T/R**	**Muestra**	**T**	**R**	**T/R**
Exón 26 del *F8* (F8e26)	CN100	10,99	9,97	1,10	CN104	26,45	14,75	1,79
	CN101	13,94	15,35	0,91	CN108	33,87	15,02	2,25
	CN105	9,01	12,97	0,69	CN109	32,16	14,40	2,23
	CN106	13,00	13,31	0,98	CN122	45,33	18,80	2,41
	CN107	16,86	13,74	1,23	CN131	43,46	18,36	2,37
	CN111	16,22	14,06	1,15	CN132	22,92	11,12	2,06
	CN120	7,59	8,06	0,94	CN145	22,32	12,28	1,82
	CN130	10,14	11,87	0,85	CN162	21,88	13,92	1,57
	CN133	12,49	12,99	0,96	CN164	17,38	10,60	1,64
	CN142	16,20	14,79	1,10	CN167	22,21	12,59	1,76
	CN145	16,13	16,91	0,95	CN89	26,71	14,18	1,88
	CN154	11,66	12,24	0,95	CN90	17,00	8,18	2,08
	CN161	5,83	6,68	0,87	CN91	12,67	7,21	1,76
	CN163	15,91	15,15	1,05	CN92	36,00	15,77	2,28
	CN86	9,60	10,27	0,93	CN94	19,87	11,65	1,71
Valor de *p* test de Normalidad Shapiro-Wilk (conclusión)	**0,77**				**0,19**			

Aplicación a mujeres en riesgo y validación secundaria por otro método:

Se analizaron dos Familias con mujeres en riesgo de ser portadoras de deleciones en la región del exón 26. En la Familia 4 se analizaron tres muestras, la madre del Probando caso #98 con T/R de 0,93 y un Pc del 100%, dos hermanas, caso #563 T/R 0,89 y Pc 100%, y caso #676 T/R 0,75 y Pc: 100%, concluyendo el diagnóstico de Portadora para cada una las tres familiares en riesgo (Tabla C3.6, Figura C3.5). Estos casos de la Familia 4 fueron confirmados y validados por *gap*-PCR (Capítulo IV de esta Tesis). En la Familia 5 se analizó la hermana del Probando, caso #108 resultando en un T/R de 2,41 y Pc de 0% indicando un diagnóstico de No Portadora (Tabla C3.6, Figura C3.5).

Tabla C3.6: Análisis de las mujeres en riesgo de ser portadoras y datos de las curvas Control.

Curva Normal Media(SD)		Caso# (Familia#)	Relación Familiar	Deleción En riesgo	T	R	T/R	Pc	Diagnóstico	Validación
46; XY	46; XX									
***F8*-exón 26**										
0,97(0,13)	1,975(0,28)	98 (4)	M+S	exón 3_26	33,27	35,81	0,93	100%	Portadora	*Gap*-PCR*
		563 (4)	S+SM	exón 3_26	4,57	5,14	0,89	100%	Portadora	*Gap*-PCR*
		676 (4)	S+SD	exón 3_26	1,25	1,67	0,75	100%	Portadora	*Gap*-PCR*
		108 (5)	S	exón 26	15,76	6,54	2,41	0%	No Portadora	nv*

Código de relación familiar: SM, tía materna; SD, sobrina materna, Signo (+) combina la relación familiar con la de otro paciente con HA severa de la familia. *Casos # 98, #563 y #676 fueron validados por *gap*-PCR (resultados en el Capítulo IV de esta Tesis).

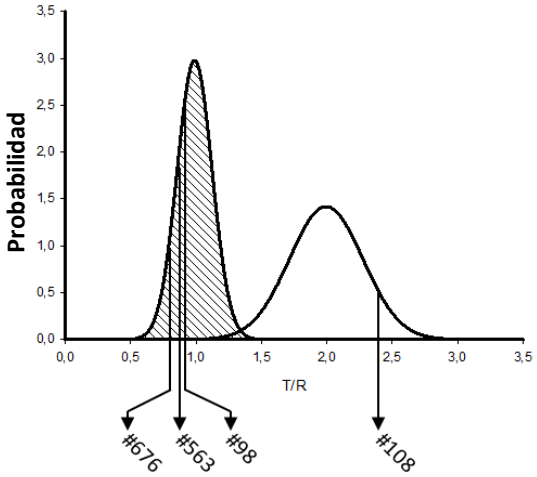


Figura C3.5. Curvas de probabilidad de simple y doble dosis para el análisis del exón 26 del *F8* (F8e26). Las posiciones de los valores T/R (flechas), sugieren claramente el diagnóstico de cada una de las mujeres en riesgo. Casos #676, #563 y #98 indican claramente el diagnóstico de Portadora (simple dosis) y el caso #108, el diagnóstico de No Portadora (doble dosis). Las referencias son iguales a las de la Figura C3.3.

Exón 8 del F9 (F9e8).

Validación primaria:

Los rangos de los valores T/R control de varones fue de 0,40-0,74 y de las mujeres, de 0,95-1,54 y el *test* Shapiro-Wilk también resultó compatible con la distribución Normal en ambas poblaciones. Los valores de la media y SD para las poblaciones de varones y mujeres fueron, las medias de 0,53 y 1,25; y los SDs, 0,10 y 0,19, respectivamente (Tabla C3.7, Tabla C3.8 y Figura C3.6).

Tabla C.3.7: Valores de las muestras de la población Argentina general (F9e8)

	Varones 46;XY				Mujeres 46;XX			
	Muestra	**T**	**R**	**T/R**	**Muestra**	**T**	**R**	**T/R**
Exón 8 del *F9* (F9e8)	CN100	4,62	8,94	0,52	CN104	29,90	19,90	1,50
	CN101	4,51	10,80	0,42	CN108	20,40	15,80	1,29
	CN105	6,06	14,50	0,42	CN109	26,80	20,80	1,29
	CN106	6,62	10,25	0,65	CN122	21,60	14,80	1,46
	CN107	6,83	10,30	0,66	CN131	21,90	18,80	1,17
	CN111	7,46	10,74	0,70	CN132	6,01	6,10	0,99
	CN120	2,32	5,71	0,41	CN145	19,40	16,60	1,17
	CN130	3,64	7,86	0,46	CN162	16,20	12,20	1,33
	CN133	12,20	17,00	0,72	CN164	10,80	10,40	1,04
	CN142	7,12	9,88	0,72	CN90	16,60	17,50	1,54
	CN145	17,30	26,90	0,64	CN167	34,50	22,30	1,19
	CN154	6,86	15,10	0,46	CN89	13,60	11,40	0,95
	CN161	7,27	12,20	0,60	CN91	16,40	11,10	1,48
	CN163	11,15	15,38	0,73	CN92	23,20	17,90	1,30
	CN86	3,02	7,56	0,40	CN94	18,00	16,40	1,09
Valor de *p* test de Normalidad Shapiro-Wilk (conclusión)	**0,08**				**0,55**			

Aplicación a mujeres en riesgo y validación secundaria por otro método:

Se analizaron dos Familias con mujeres en riesgo de ser portadoras de deleciones en el exón 8 del *F9*, último exón 3' del gen. En la Familia 6 se analizó una muestra de una hermana del Probando, caso #382 con T/R 0,47 y una Pc de 100% diagnosticada como Portadora, mientras que en la Familia 7 fueron analizadas la madre #662 (T/R: 0,44, Pc: 100%) Portadora, y la hermana #663 (T/R: 1,09, Pc: 0%) y dos sobrinas casos #664 (T/R: 1,11, Pc: 0%) y #665 (T/R: 1,39, Pc: 0%) todas ellas diagnosticadas

como No Portadoras (Tabla C3.8, Figura C3.6). Los resultados obtenidos en la Familia 7 fueron confirmados por MLPA en el Servicio de Genética del Hospital *Sant Pau* de Barcelona, España (datos cedidos amablemente por el Dr. Eduardo Tizzano).

Tabla C3.8: Análisis de las mujeres en riesgo de ser portadoras y datos de las curvas Control.

Curva Normal Media(SD)		Caso# (Familia#)	Relación Familiar	Deleción En riesgo	T	R	T/R	Pc	Diagnóstico	Validación
46; XY	46; XX									
***F9*-exón 8**										
		382 (6)	S	exón 1_8	15,66	33,05	0,47	100%	Portadora	nv
		662 (7)	M+S	exón 7_8	3,46	7,89	0,44	100%	Portadora	MLPA*
0,53(0,10)	1,25(0,19)	663 (7)	S+SD	exón 7_8	5,15	4,74	1,09	0%	No Portadora	MLPA*
		664 (7)	SD+SDD	exón 7_8	3,96	3,57	1,11	0%	No Portadora	MLPA*
		665 (7)	SD+SDD	exón 7_8	2,61	1,89	1,39	0%	No Portadora	MLPA*

Código de relación familiar: SDD: hija de sobrina materna, * los casos # 662, 663, 664, 665 fueron diagnosticados por MLPA en el hospital *Sant Pau*, Barcelona, España (los datos fueron cedidos amablemente por el Dr, Eduardo Tizzano).

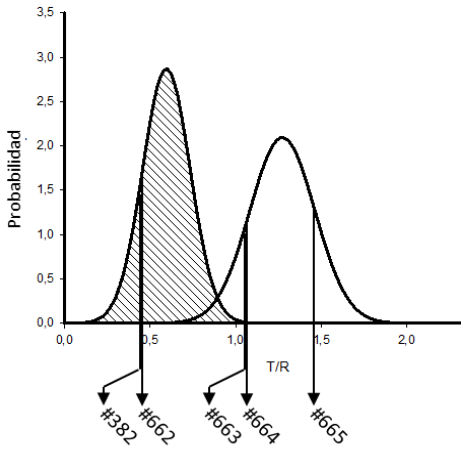


Figura C3.6. Curvas de probabilidad de simple y doble dosis de las mujeres en riesgo de ser portadoras de grandes deleciones del exón 8 del *F9* (F9e8). Las posiciones de los valores T/R (flechas), indican el diagnóstico de cada una de las mujeres en riesgo. Casos #382, #662 Portadoras (simple dosis) y los casos #663, #664, #665 No Portadoras (doble dosis). Las referencias de la figura son iguales a la Figura C3.3.

En resumen de 14 mujeres en riesgo de siete familias con HA o HB severa nueve de ellas se diagnosticaron como portadoras y cinco como no portadoras de grandes deleciones: en el *F8,* siete portadoras de HA y dos no portadoras; y en el *F9*, dos portadoras de HB y tres no portadoras. Asimismo, 11 de los resultados obtenidos por el método presentado aquí fueron confirmados/validados por una técnica alternativa (i.e., *gap*-PCR o MLPA) mostrando una perfecta concordancia entre ellos. Todos estos datos confirman que la técnica presentada tiene la capacidad para poder discriminar entre simple y doble dosis de blancos de amplificación en X/autosoma y por lo tanto puede ser utilizada para el diagnóstico de mujeres portadoras de grandes deleciones en enfermedades ligadas al cromosoma X.

DISCUSIÓN III

De las diferentes mutaciones que afectan al *F8* y *F9* (Tuddenham et al, 1994; Oldenburg et al, 2004), sólo la inversión del intrón 22 del *F8* (Naylor et al, 1993; Lakich et al, 1993) y la inversión del intrón 1 del *F8* (Bagnall et al, 2002) son reconociblemente recurrentes, mientras que el resto de las mutaciones puntuales, pequeñas *Ins/Del,* tanto *frameshift* (con un cambio en el marco de lectura) como *in-frame* (sin cambios en la fase de lectura) y las grandes deleciones genómicas, se distribuyen a lo largo de los genes de hemofilia sin presentar recurrencias o sitios calientes (*hotspots*) en ninguno de los casos.

El diagnóstico molecular y el asesoramiento genético de las familias informativas para las grandes deleciones causales de hemofilia es crucialmente importante tanto para la calidad vida de los pacientes involucrados como para el sistema de salud. Las grandes deleciones de *F8* y *F9*, en particular las que afectan a múltiples dominios de la proteína, se asocian con una alta propensión a desarrollar anticuerpos inhibidores terapéuticos contra el FVIII y FIX en los pacientes con HA y HB, respectivamente (Oldenburg et al, 2004). El desarrollo de inhibidores es la complicación más grave en el tratamiento de la hemofilia debido a que amenaza severamente la calidad de vida de los pacientes (causando artropatías severas, complicaciones quirúrgicas y comprometiendo el tratamiento de terapias sustitutivas) y, por otro lado, afectando seriamente al sistema de salud (debido a los altos costos involucrados en los tratamientos específicos con agentes *bypaseantes* de los pacientes con inhibidor. Recientemente se estimó la asociación genotipo/riesgos de desarrollo de inhibidores en pacientes Argentinos con HA y HB, y se estimó un *odds ratio* (relación entre las probabilidades de desarrollar inhibidor teniendo una mutación específica respecto a no tenerla), OR (IC del 95%) de 3,66 (1,07-12,55) para deleciones multiexónicas en el *F8* (Rossetti et al 2013), y de 32,7 (2,26-471) para deleciones de todo el *F9* (Radic et al, 2013).

Por lo mencionado, en el asesoramiento genético de las familias afectadas por grandes deleciones causales de HA y HB los laboratorios de diagnóstico molecular para la hemofilia deberían incluir un abordaje rápido, confiable y costo-efectivo para proveer diagnóstico de portadoras a las mujeres en riesgo involucradas una vez determinada la extensión del segmento delecionado en el paciente hemicigota. En este escenario, se diseñó un método de alta confiabilidad (basada en estimaciones estadísticas no sesgadas) y costo efectiva (evita los altos costos de la aplicación de MLPA, o la laboriosidad de cercar y caracterizar los puntos de ruptura específicos por

gap-PCR) para diagnosticar grandes deleciones en el cromosoma X en heterocigosis basado en la tecnología de qPCR. Como en el abordaje presentado aquí, Costa et al (2004), Tizzano et al (2005) y Casaña et al (2009) aplican la tecnología de qPCR para el diagnóstico de grandes deleciones heterocigotas en hemofilia. Sin embargo, el abordaje presentado en este Capítulo III aumenta la confiabilidad de la técnica de qPCR tomando ventaja del uso de muestras de varones y mujeres de la población general no afectada como controles para ajustar, validar y estimar probabilidades asociadas a cada conclusión diagnóstica. El presente enfoque tiene como único inconveniente la dificultad para monitorear de una vez todas las posibles deleciones en ubicación y extensión directamente en una eventual portadora como sí pueden hacerlo abordajes como el de MLPA (Lannoy et al, 2009; Chen et al, 2012) o la tecnología de *microarrays* (*comparative genome hibridization*, CGH densos de alta resolución, SNP-*Arrays*) (Chan et al, 2005) que pueden interrogar múltiples objetivos (regiones blanco) y que pueden abarcar grandes regiones genómicas en un solo experimento. Sin embargo, el diagnóstico basado qPCR de grandes deleciones heterocigotas implica costos significativamente menores que los abordajes de MLPA y *microarrays* mencionados mostrando resultados diagnósticos similares (Beber et al, 2006; Casaña et al, 2009), por lo cual puede realizarse en laboratorios de baja o mediana complejidad de países en vías de desarrollo del mundo y por su exactitud puede usarse como técnica confirmatoria para aquellos casos en los que la técnica de MLPA o *microarrays* no sea concluyente. Asimismo, en la práctica, la investigación de la extensión ubicación de la deleción ligada al cromosoma X se determina rutinariamente antes del estudio de portadoras sobre muestras de el/los probandos familiares hemicigotas, por lo cual, el análisis de eventuales portadoras basado en qPCR presentado aquí puede ser aplicado con la información específica de la deleción sin necesidad de monitorear toda la región. En conclusión, sólo sería necesario un monitoreo denso en heterocigosis cuando no se cuenta con muestra del probando familiar, y aun así se podría abordar el estudio de región por región por qPCR sobre la mujer en riesgo.

La distribución de los valores T/R de los controles de simple y doble dosis y en consecuencia el grado de superposición entre sus respectivas curvas Normales muestran la confiabilidad del sistema diagnóstico y actúan como una validación primaria de la capacidad discriminante de una y dos dosis X/autosoma de la técnica presentada. El uso de una probabilidad asociada (Pc) a la conclusión diagnóstica es beneficioso para indicar exactamente el alcance del diagnóstico molecular realizado, dato valioso para el asesoramiento genético-médico de la familia, pero es también útil para repetir el protocolo si el resultado plantea alguna duda. Aunque ninguna de las 14

muestras de mujeres en riesgo analizadas presentó Pc dentro del rango de 5 a 95%, sería recomendable repetir el ensayo en aquellos casos que presentan valores T/R asociado a Pc dentro de este rango evitando presentar una conclusión diagnóstica con un Pc no concluyente.

La puesta a punto y validación de los seis blancos de amplificación qPCR involucrados en el sistema de medición qPCR presentado aquí (regiones blanco de amplificación en el X y la región de referencia en un autosoma), incluyendo el diseño de *primers*, esquemas de termociclado y las condiciones de reactivos no implicó complicaciones particulares que puedan mencionarse. Por lo tanto, el abordaje presentado aquí puede ser adaptado con mínimo esfuerzo para diagnosticar grandes deleciones heterocigóticas en otros genes ligados al cromosoma X, tales como el gen de la distrofina (*DMD*), entre otros genes donde las grandes deleciones son causa común e importante de enfermedad. La inclusión de este abordaje ayudará a la reducción de costos completando la capacidad diagnóstica de los distintos laboratorios en los que se aplique de manera costo-efectiva.

En conclusión, los resultados presentados en este Capítulo III subrayan la importancia de incluir este abordaje basado en qPCR en el algoritmo de análisis molecular en hemofilia después de la detección de una deleción en el *F8* o *F9* en el probando hemicigota familiar.

CAPÍTULO IV

Caracterización molecular de grandes rearreglos del F8. Puntos de ruptura y mecanismos involucrados

Los grandes rearreglos genómicos (e.g., las grandes deleciones) que afectan al *F8* generan graves consecuencias en el probando hemicigota presentándose en la mayoría de los pacientes con un fenotipo de HA severa y predisponiendo a un alto riesgo de desarrollar inhibidores terapéuticos, anticuerpos neutralizantes anti-FVIII, que complican y encarecen el tratamiento específico. Dada estas características clínicas severas es deseable que la mayoría de estas mutaciones sean bien caracterizadas a nivel molecular. Sin embargo, dada las dificultades metodológicas que requiere su caracterización molecular, existen muy pocos trabajos donde estos grandes rearreglos hayan sido estudiados en profundidad determinando sus puntos de ruptura y estimando los potenciales mecanismos involucrados en su origen.

En este Capítulo IV se presenta la caracterización molecular de 10 grandes rearreglos genómicos identificados durante el *screening* primario del *F8*, presentes en 10 familias no relacionadas con HA severa: (1) #121 Ex3_26del, (2) #132 Ex10_18del, (3) #327 y #326 (dos pacientes en la misma familia) Ex1del, (4) #467 Ex24_26del, (5) #570 Ex10del, (6) #572 y #575 (también dos pacientes en la misma familia) Ex7_12del, (7) #617 Ex7_12del, (8) #945 Ex1del, (9) #949 Ex1del y (10) #U2 Ex6del.

RESULTADOS IV

Ajuste de los productos de amplificación de blancos genómicos específicos

Si bien todos los productos de amplificación presentan el producto específico esperado (estudiado a parir de una muestra de ADN genómico de un varón de la población Argentina general como control normal, CN81) algunos muestran productos inespecíficos adicionales. En algunos de estos casos los productos inespecíficos fueron reducidos hasta ser insignificantes o enteramente eliminados con los ajustes realizados usando gradientes de concentración de *primers*, mientras que en otros casos fue necesario además realizar gradientes de temperatura (Anexo, Figura AN.1).

Estos blancos genómicos específicos (mojones), o STS ubicados especialmente para este estudio sobre versiones actuales de la secuencia del GH, fueron diseñados por el método de bipartición de distancias para reducir los límites de la incerteza en cada una de las rupturas involucradas tanto en las deleciones que se extienden más allá de los extremos 5' y 3' del *F8* como en las rupturas que involucran regiones intrónicas del *F8*. Este acercamiento físico por amplificación PCR a los extremos de cada deleción (los

puntos de ruptura 5' y 3') por amplificación de mojones de ubicación conocida tiene como objetivo la amplificación específica a través de la deleción/rearreglo obteniendo un producto PCR (normalmente de gran tamaño, LD-PCR) que contenga los cambios de secuencia característicos del evento de recombinación original (rupturas y pequeñas inserciones, etc) para su caracterización por secuenciación de Sanger.

Acercamiento a las rupturas extragénicas sobre los terminales 5' y 3' del F8

Los pacientes estudiados con deleciones del *F8* terminales (#121, #327, #467, #945 y #949) presentan las señales específicas (igual a la muestra control CN81) o bien ausencia de señal, determinando así la extensión de la deleción en cada caso (Figura C4.1).

Como se muestra en la Figura C4.1 el más alejado de los productos de amplificación PCR positiva del análisis de bipartición fue distinto en cada familia.

Por ejemplo, en el paciente #121 el mojón F8+6,5kb (diseñado 6,5kb río abajo del extremo 3' del *F8*) resultó positivo mientras que el F8+3,5kb fue negativo (confinando así la ruptura a ese intervalo). En el paciente #467 el intervalo de incerteza fue definido por los mojones F8+18,5kb y F8+12,5kb (positivo/negativo). En consecuencia, los posibles *primers* candidatos para la obtención de un producto específico del rearreglo o la deleción con el objetivo de avanzar en la caracterización de estos casos son, F8+6,5kb-lo o eventualmente F8+3,5kb-lo para el caso #121, y F8+18,5kb-lo (o F8+12,5kb-lo) para #467, ubicados todos en la región extra-génica río abajo del *F8* y orientados hacia la deleción o rearreglo en cada caso (Tabla C4.1).

Para nombrar otros ejemplos que ilustran el abordaje aplicado también en la región río arriba del *F8* (deleciones terminales que se extienden más allá de los límites 5' del *F8*) el paciente #326 (y #327) resultó positivo para el mojón más alejado F8-6,5kb y negativo para F8-3,8kb; en el paciente #945 el mojón positivo fue F8-3,8kb; y en #949 el intervalo positivo/negativo fue F8-68kb y F8-62,5kb (Figura C4.1). Con estos resultados los posibles *primers* candidatos para avanzar en la caracterización molecular resultaron: F8-6,5kb-up (o F8-3,8kb-up) para #326/#327, F8-6,5kb-up (o F8-3,8kb-up) para #945, y F8-68kb (o F8-62,5kb) para el caso #949 (Tabla C4.1).

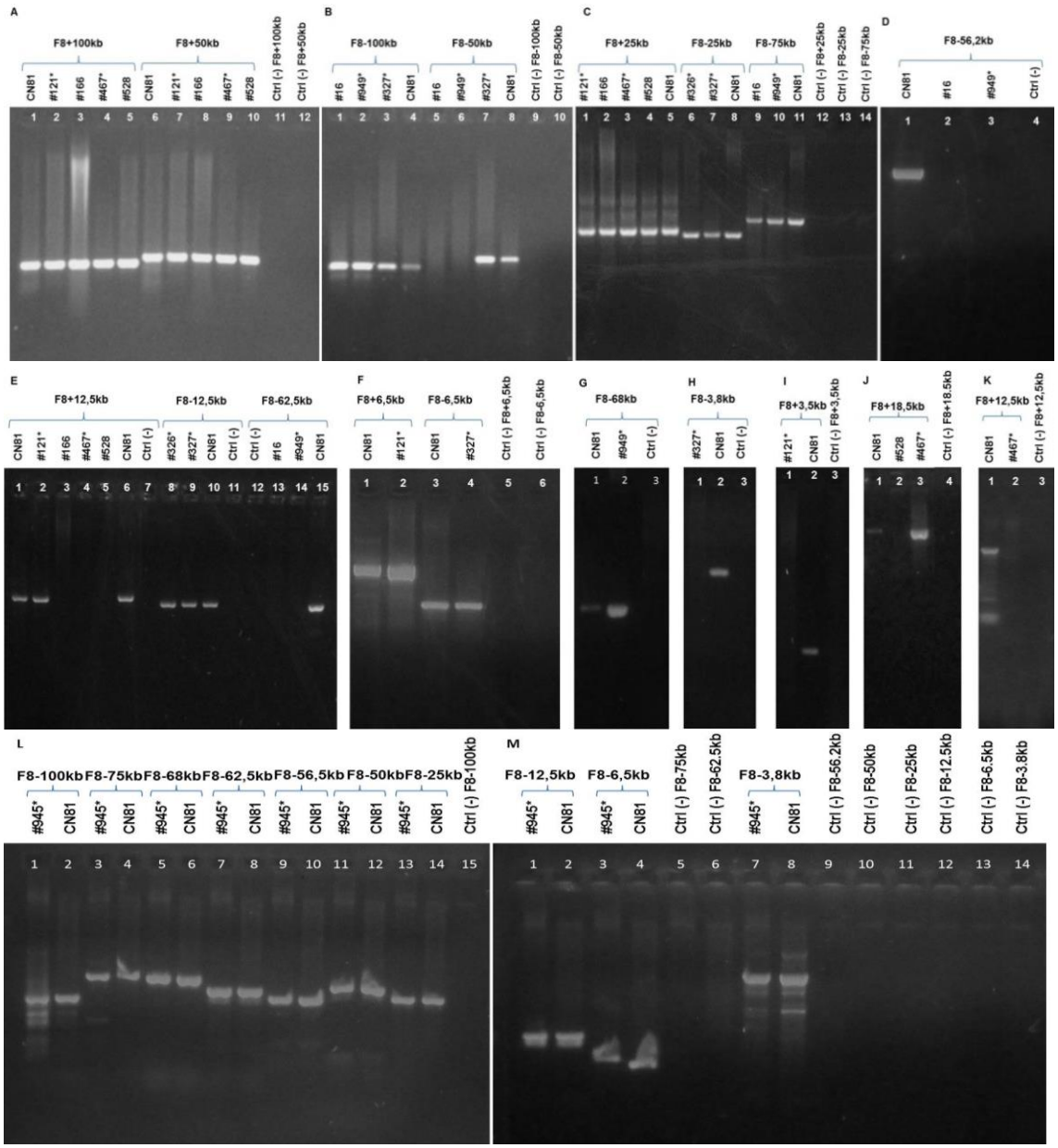


Figura C4.1. Resultados del análisis por bipartición en las regiones terminales 5' y 3' del *F8*. Electroforesis en gel de agarosa (1,5%) mostrando las señales del acercamiento a las rupturas por bipartición de regiones de incerteza. F8-xkb indica regiones xkb río arriba del F8 y F8+xkb, río abajo del *F8*. Los mojones analizados se muestran en la figura y los pacientes bajo análisis se indican con un asterisco (*). Mojones F8+100kb (403pb), F8+50kb (470pb), F8-100kb (400pb), F8-50kb (498pb), F8+25kb (472pb), F8-25kb (416pb), F8-75kb (612pb), F8-56,2kb (395pb), F8+12,5kb (572pb), F8-12,5kb (493pb), F8-62,5kb (462pb), F8+6,5kb (812pb), F8-6,5kb (310pb), F8-68kb (588pb). F8-3,8kb (1.355pb). F8+3,5kb (379pb). F8+18,5kb (1.262pb).

Tabla C4.1: Ubicación aproximada de las rupturas y selección de *primers* para la amplificación específica y caracterización de las deleciones parciales del *F8.*

		Extremo 5'				**Extremo 3'**				
Caso	**Ext. Del.**	**Ampl. (+)**	***Primer* (+)**	**Ampl. (-)**	***Primer* (-)**	**Ampl. (-)**	***Primer* (-)**	**Ampl. (+)**	***Primer* (+)**	**Abord. Selec.**
#326/ #327	EX1	F8-6,5kb	F8-6,5 kb-up	F8-3,8kb	F8-3,8 kb-up	IVS1-ID	IVS1-ID-lo	EX2	2B	*Gap* LD-PCR
#945	EX1	F8-3,8kb	F8-3,8kb-up	-	-	-	-	Inv1	1-IU	*Gap* LD-PCR
#949	EX1	F8-68kb	F8-68 kb-up	F8-62,5kb	F8-62kb-up	IVS1	IVS1-lo	IVS1-IU	IVS1-IU-lo	*Gap* LD-PCR
#132	EX10/ EX18	Exón 9	9A	-	-	-	-	EX19	19B	*Gap* LD-PCR
#570	EX10	EX9	9A	-	-	-	-	EX11	11B	*Gap* LD-PCR
#572/ #575	EX7/ EX12	IVS6M	IVS6M-up	IVS6F	IVS6F-up	-	-	IVS12	IVS12-lo	*Gap* LD-PCR
#617	EX5/ EX7	EX4	4A	-	-	-	-	EX8	8B	*Gap* LD-PCR
#U2	EX6	EX5	5A	-	-	IVS6S	IVS6S-lo	IVS6M	IVS6M-lo	*Gap* LD-PCR
#121	EX3/ EX26	EX2	2A	IVS2	IVS2-up	F8+3,5kb	F8+3,5 kb-lo	F8+6,5 kb	F8+6,5 kb-lo	*Gap* LD-PCR
#467	EX24/ EX26	IVS22	IVS22-lo	F8-12,5kb	F8-12,5 kb-lo	EX23	23A	EX24	24A	I-LD-PCR

EX indica exón; Ext. Del., extensión primaria de la deleción en el *F8*; Ampl., amplificación PCR; Abord. Selec., abordaje seleccionado para la amplificación específica de cada deleción.

Análisis de la extensión de las deleciones que involucran el intrón 1 y no al exón 2 del F8 por IS-PCR de la inversión del intrón 1

Los resultados del análisis de la Inv1 permiten tener un panorama del alcance de la deleción en los pacientes #326/#327, #945 y #949 que presentan deleciones que involucran a la región promotora y el exón 1 del *F8* (Figura C4.2).

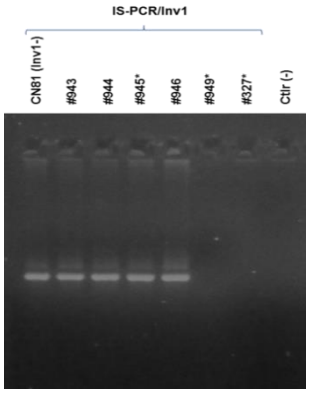


Figura C4.2. Resultados de la Inv1 del *F8* mediante la técnica de IS-PCR/2008. Electroforesis en gel de agarosa que muestra las señales del análisis de la Inv1 del gen del *F8* en la muestra CN81 (calle 1) control negativo para la Inv1 y presentando solo la señal indicativa del alelo normal (304pb), en los casos #945 (calle 4), #949 (calle 6) y #327 (calle 7), todos pacientes con deleciones que involucran a la región promotora y al exón 1 del *F8*. El paciente #945 presenta la señal indicativa del alelo normal, mientras que en los pacientes #327 y #949 no se detecta ninguna señal, Ctrl (-) indica control negativo de contaminación sin ADN (calle 8).

Los pacientes #327 y #949 no mostraron señal en el análisis IS-PCR de la Inv1 mientras que el paciente #945 mostró la señal del alelo normal que indica la conservación de las regiones de los *primers* 1-IU y 1-ID (IS-PCR/2008, Inv1, Rossetti et al, 2008), lo que permite seleccionar 1-IU por su orientación hacia el exón 1 deletado para continuar la caracterización molecular. En consecuencia los resultados de IS-PCR para la Inv1 permitieron reducir los intervalos de incerteza de las rupturas en intrón 1 del *F8*.

Acercamiento a las rupturas intragénicas en los intrones del F8

Al igual que el análisis de las deleciones terminales del *F8*, las muestras de los pacientes #121, #326/#327, #467, #570, #572/#575, #945, #949 y #U2 mostraron o bien las señales específicas de cada mojón presente por la muestra control CN81 o bien ausencia de ésta señal, reduciendo así el intervalo de incerteza del punto de ruptura (secuencias presentes-ausentes) en cada caso (Figura C4.3).

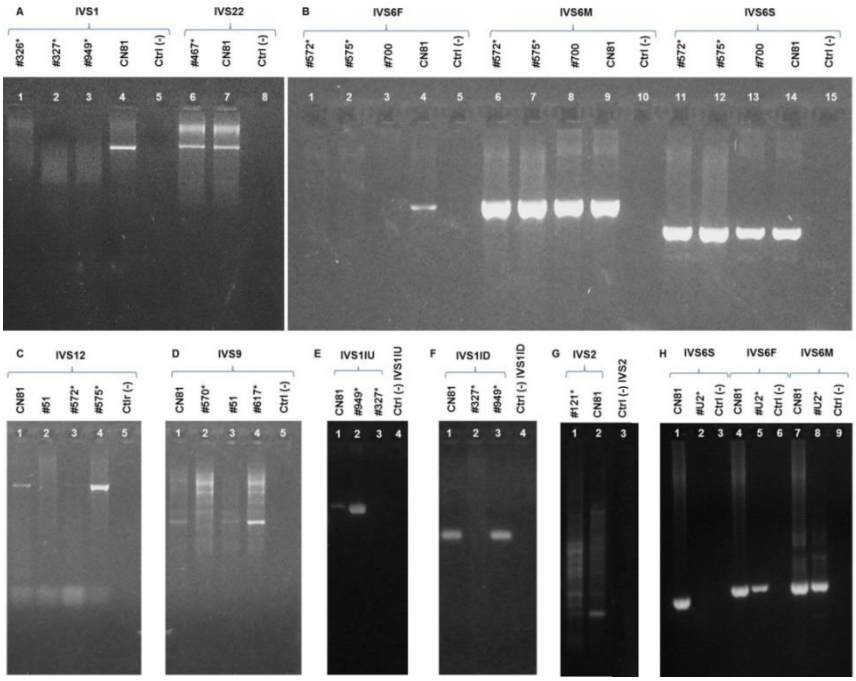


Figura C4.3. Análisis de rupturas en las regiones intrónicas del *F8* por bipartición. Electroforesis en gel de agarosa (1,5%) para detectar presencia o ausencia de señales de los mojones respecto a la muestra control sin mutación (CN81) para acotar la incerteza de las rupturas intrónicas en los pacientes con deleciones parciales del *F8*. **A-H.** Los pacientes con deleciones se indican con # seguido del código de muestra del laboratorio (e.g., #326, #U2) mientras que la región intrónica analizada se marca como IVS y el número (e.g., IVS10: intrón 10 del *F8*). Ctrl (-) indica control sin ADN (control de contaminación negativa). Los asteriscos (*) indican las muestras problema. Mojones IVS1 (1026pb), IVS22 (1157pb), IVS6F (965pb), IVS6F (965pb), IVS6M (1033pb), IVS6S (655pb), IVS12 (1301pb), IVS9 (773pb), IVS1IU (2724pb), IVS2 (479pb).

Los resultados mostrados en la Figura C4.3 permitieron reducir la extensión de la incerteza de las rupturas intrónicas en cada caso específico. Aquí los mojones PCR se nombran por ejemplo IVS2 (*intervening sequence* 2 o intrón 2) indicando su posición respecto *F8*. El análisis aquí es análogo al aplicado para acotar la incerteza de las deleciones que afectan las regiones terminales del *F8* (Figura C4.3).

La Tabla C4.1 resume todos los resultados obtenidos hasta aquí acerca de la reducción de los intervalos de incerteza de las rupturas 5' y 3' delimitando cada una de las deleciones o rerreglos, lo que permitió diseñar abordajes de amplificación posible, suficientemente acotados, para aplicar LD-PCR (e.g., no mayores a 10kb).

Este diseño se refleja en la selección de juegos de *primers* potencialmente útiles para lograr la amplificación específica del evento a caracterizar en cada caso (Tabla C4.1).

Obtención de una señal específica asociada al alelo con la deleción familiar

Para la amplificación específica de cada evento contando con la información recabada se aplicó el abordaje de LD-PCR en las muestras de los pacientes #121, #132, #326/#327, #570, #572/#575, #617, #945, #949 y #U2, y el abordaje de I-LD-PCR en el paciente #467 (Figura C4.4).

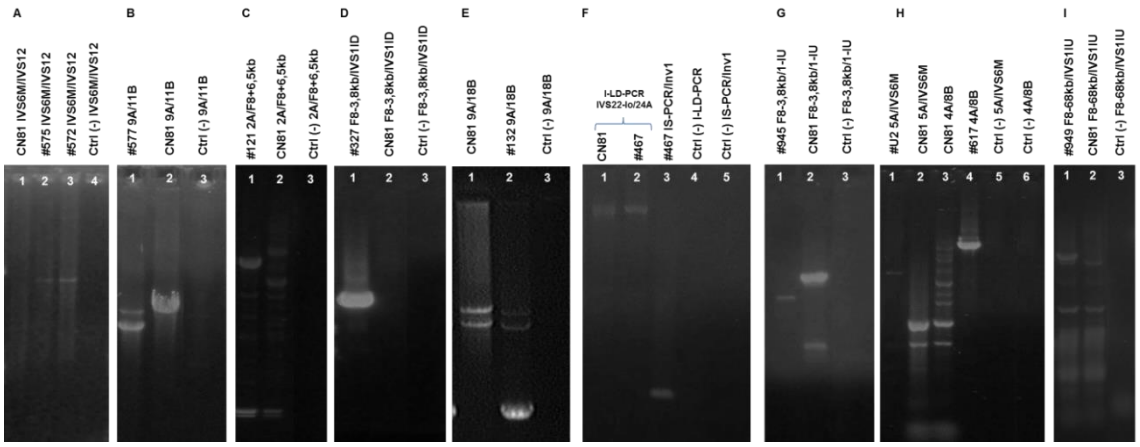


Figura C4.4. Resultados del análisis I-LD-PCR y LD-PCR caso específico. Electroforesis en gel de agarosa (1%) que muestra las señales de los productos de amplificación asociados a la deleción en cada caso individual no presentes en el control normal (CN81). Los casos analizados y los pares de *primers* utilizados se indican en la figura en cada caso. LD-PCR *primers*: IVS6M-up e IVS12-lo (~6.800pb), 9A y 11B (~6.700pb), 2A y F8+6,5kb-lo (4.300pb), F8-3,8kb-up e IVS1ID-lo (~1.600pb), 9A y 19B (~2.300pb), F8-3,8kb-up y 1-IU (~6.300pb), 5A y IVS6M-lo (~2.300pb), 4A y 8B (~4.500pb), F8-68kb-up e IVS1IU (~4.500pb). I-LD-PCR *primers* 24A e IVS22-lo (~4.200pb).

En todos los casos se detectó un producto de amplificación diferencial no observado en el control de la población general no afectado (CN81). Este producto de amplificación diferencial es seleccionado para continuar con la caracterización molecular. En los casos en los que se presentan productos inespecíficos en el paciente (Figura C4.4C, E, I) se extrae la señal por purificación desde el gel de agarosa. En el caso específico #570 la amplificación LD-PCR se realizó sobre la muestra de la madre (porque la muestra de ADN del paciente no presenta la calidad suficiente para la amplificación LD-PCR) (Figura C4.4B). En la sección Materiales y Métodos de esta Tesis (Tabla MM.11) se detallan las características de los *primers* seleccionados con los que se obtuvieron señales específicas asociadas al alelo con la deleción.

Caracterización de cada deleción o rearreglo específico

Deleción del exón 3 al 26 del F8. Paciente #121

La Figura C4.5 muestra los resultados obtenidos en el caso #121 (mojones positivos y negativos), mapas de restricción de las enzimas usadas en el análisis por PCR-RFLP, los productos de amplificación LD-PCR y PCR-estándar en comparación con los productos hipotéticos del alelo normal y el tamaño total de la deleción.

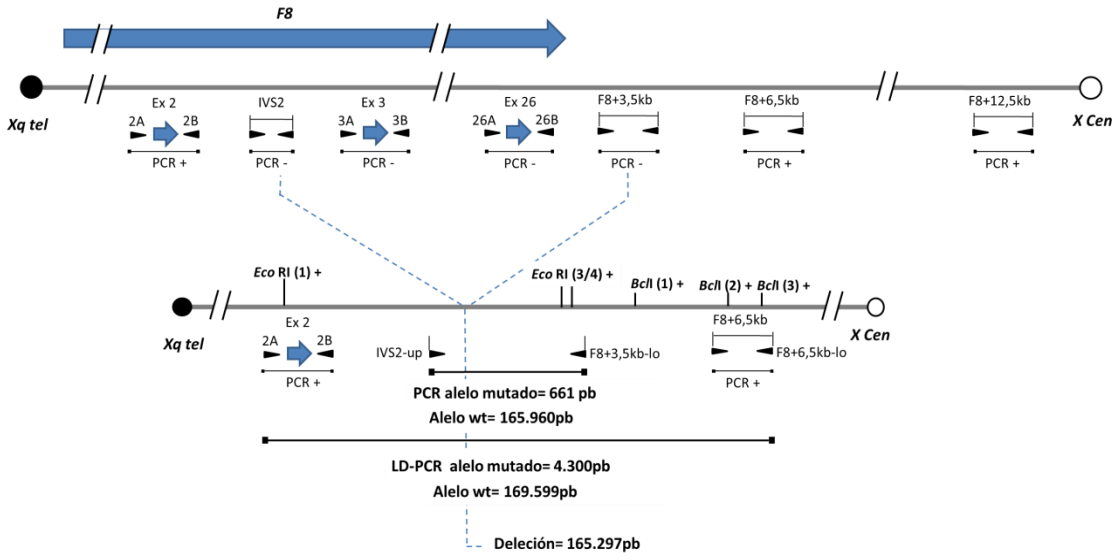


Figura C4.5. Esquema del evento de recombinación de la familia con la deleción del exón 3 al 26 del *F8*. Arriba, esquema del del *F8* (flecha azul) completo (sin deleción) indicando la dirección de transcripción, circulo negro (telómero Xq), circulo blanco (centrómero). Se muestran los productos de amplificación (mojones, triángulos negros y exones, flecha azul entre triángulos negros) importantes para esta deleción, se indican los positivos (+) y los negativos (-). Abajo, se muestra un esquema del *F8* con la deleción (LD-PCR *primers* 2A y F8+6,5kb-lo), se indican las enzimas de restricción utilizadas en el RFLP, *Eco*RI, *Hind* III, *Bcl* I, *Bam* HI, se enumeran del telómero Xq al centrómero y se marcan como positivas (+) aquellas que no se encuentran dentro de la deleción. Se muestran los productos de amplificación LD-PCR y PCR estándar además del tamaño en el alelo salvaje (*wt*) en ambos casos, las líneas punteadas que empiezan en la figura de arriba y terminan en el de abajo indica la deleción con el tamaño en pb.

El producto LD-PCR específico de la Ex3_26del en el caso #121 obtenido con la combinación de *primers* 2A y F8+6,5kb-lo resultó con un tamaño molecular de 4,3kb (Figura C.4C). El análisis por LD-PCR-RFLP del producto de 4,3kb resultó informativo para las enzimas *Bcl*I y *Eco*RI (Anexo, Figura AN.2) y permitió determinar la presencia del sitio específico del *primer* F8+3,5kb-lo aunque el mojón había resultado negativo. La amplificación PCR del *gap* con los *primers* IVS2-up y F8+3,5kb-lo mostró una señal específica de 661pb en el paciente #121 y en tres mujeres de la familia que fueron diagnosticadas como portadoras (#676 sobrina y dos hermanas #98, #563) (Figura C4.6).

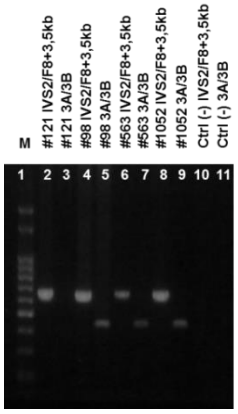


Figura C4.6. *gap*-PCR en el probando #121 y las mujeres familiares. Electroforesis en gel de agarosa 1,5% con la amplificación PCR (*primers* IVS2-up y F8+3,5kb-lo) con la señal deleción-específica (calles 2, 4, 6, 8) con un tamaño de 661pb y con *primers* 3A y 3B señal normal de 335pb (región interna a la deleción) (calles 3, 5, 7, 9). El orden de siembra: marcador de peso molecular (escalera de 100 pb) (calle 1), el paciente con HA severa #121 (calle 2 y 3) y las mujeres familiares en riesgo #676, #98 y #563 (calles 4-9), Ctrl (-) controles

La caracterización final indicó una deleción que involucra los exones 3 al 26 y hasta 3,5kb río abajo del extremo 3' del *F8* abarcando 165,297kb de ADN genómico (ChrX: 154.226.532-154.061.235) (Figura C4.7).

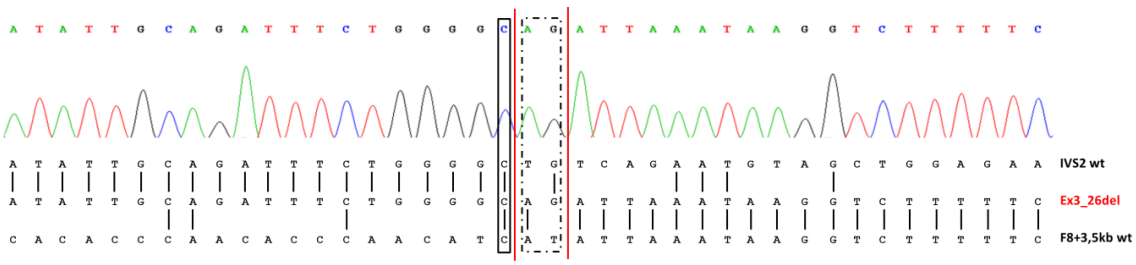


Figura C4.7. Secuencias asociadas al sitio de recombinación de la Ex3_26del. Arriba: electroferograma de la secuenciación de Sanger obtenida con el primer IVS2-up del producto de amplificación deleción específico (661pb). Abajo: alineamiento de parte del IVS2 del *F8* (extremo 5'), la región extra-génica 3,5kb río abajo del *F8* (extremo 3') y la secuencia de la deleción en el caso #121. Las líneas rojas denotan el sitio de ruptura y el recuadro de líneas y puntos las bases insertadas en el evento.

El análisis bioinformático no mostró homologías entre los bordes de las rupturas (sólo comparten un nucleótido), ni elementos repetidos interdispersos (i.e., SINEs LINEs), ni repeticiones de pocas copias (LCR), pero sí se detectó la secuencia *deletion hotspot consensus* asociada a algunas deleciones completamente caracterizadas en la literatura (Krawczak y Cooper, 1991) (Figura C4.7). La deleción del paciente #121, con HA severa e inhibidor de alta respuesta y sin otra característica fenotípica asociada, es NM_000132.3:c.[265+1220_*4636del165297;265+1220_265+1221insAG] según notación HGVS (Human Genome Variation Society)

Deleción del exón 24 al 26 del F8. Paciente #467.

La Figura C4.8A muestra los resultados del caso #467 con la deleción Ex24_26del. Frente a los reiterados resultados negativos utilizando un acercamiento basado en LD-PCR directa con los *primers* 23A, 24A, F8+12,5kb y F8+18,5kb, se aplicó el abordaje I-LD-PCR usando los *primers* IVS22-lo y 24A que presentó un producto de amplificación deleción específico de 4,208kb (Figura C4.8B).

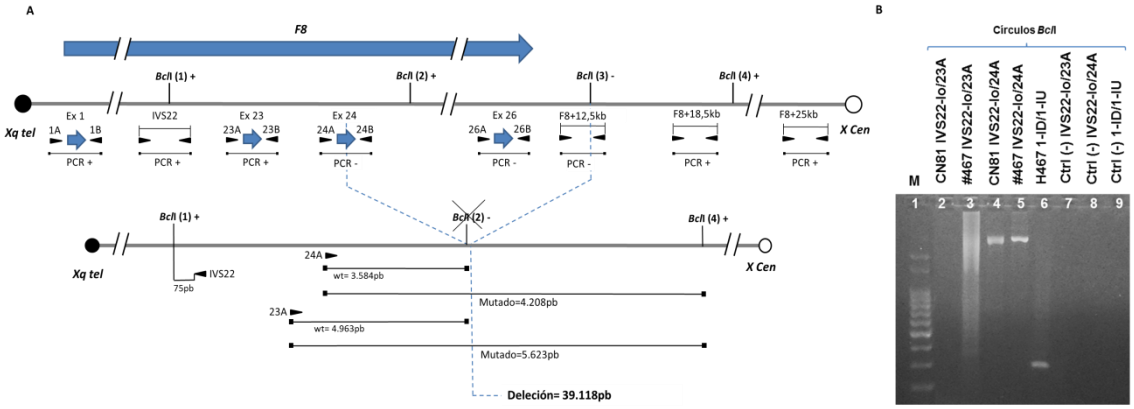


Figura C4.8. Análisis de la deleción del exón 24 al 26 del *F8*. A. Arriba**,** esquema del *F8* (flecha azul) completo (sin deleción) indicando la dirección de transcripción, circulo negro (telómero Xq), circulo blanco (centrómero). Se muestran los productos de amplificación (mojones, triángulos negros y exones, flecha azul entre triángulos negros) importantes para esta deleción, se indican los positivos (+) y los negativos (-), se muestra un esquema de los sitios de restricción importantes de la enzima *Bcl*I utilizada para el abordaje I-LD-PCR (PCR inversa de larga distancia). Abajo, se muestra un esquema del *F8* con la deleción, los fragmentos *Bcl*I, posición de los *primers* usados para el abordaje I-LD-PCR, el sitio *Bcl*I (3) fue tachado pues se destruye con el evento. Las líneas punteadas indican la extensión de la deleción. **B.** Electroforesis en gel de agarosa 1,5% donde se muestran los productos de amplificación sobre círculos *Bcl*I (abordaje de PCR inversa) con los *primers* indicados en cada caso el abordaje I-LD-PCR, Calle 5, producto deleción-específico (4.208pb). Calle 1, marcador de peso molecular λDNA/Hind III, Calle 6, control positivo de circularización, producto de IS-PCR/Inv1.

El producto deleción-específico fue sometido a secuenciación de Sanger para caracterizar las secuencias involucradas (Figura C4.9). La caracterización molecular completa de la gran deleción genómica resultó abarcar 39,118kb (ChrX: 155.461.820-154.822.703) que involucra parte del *F8* (exones 24 al 26) y 12,5kb de secuencias río abajo de su borde 3' (Figura C4.9). El análisis bioinformático no muestra homologías entre las regiones de las rupturas 5' y 3' de la deleción, ni repeticiones LCR, aunque sí presenta en la ruptura 3' un elemento de la familia LINE (L2b), la secuencia *Murine MHC deletion hotspot* (Steinmetz et al, 1987) en el extremo 5', y en ambos extremos del evento (i.e., (5' y 3') también muestran la secuencia *Vertebrate/plant topoisomerase I consensus cleavage site* (RAT), (Been et al, 1984). En conclusión, el paciente #467 presentó la deleción hemicigota (notación HGVS) NM_000132.3:c.[6620_*13083del39118] sólo asociada a HA severa sin otra característica fenotípica evidente.

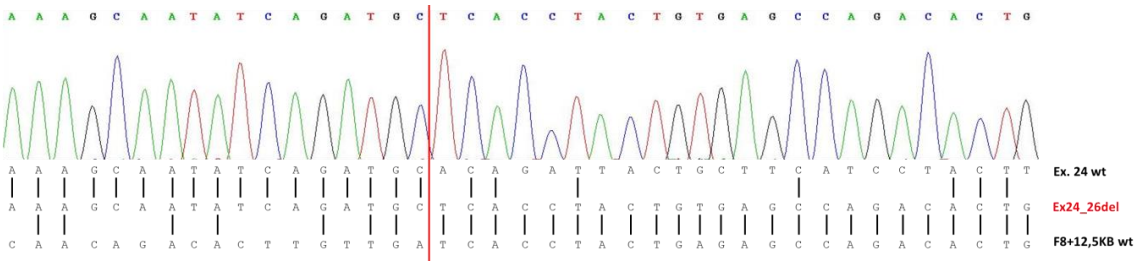


Figura C4.9. Secuencias asociadas al sitio de recombinación de Ex24_26del. Arriba, secuenciación de Sanger con el *primer* 24A del producto de amplificación deleción específico de 4.208pb sobre el punto de ruptura. Abajo se muestra el alineamiento de parte de la secuencia del exón 24, parte de la secuencia de la región extra-génica 12,5kb río abajo del *F8* y la secuencia específica de la deleción del caso #467.

Deleción del exón 10 del F8. Paciente #570

La amplificación LD-PCR con los *primers* exónicos vecinos al exón 10 ausente (i.e., 9A y 11B) en la muestra #577, madre del paciente #570 (elegida debido a que la calidad de la muestra #570 era insuficiente para una amplificación LD-PCR, Figura C4.10B),

generó un producto de 6,7kb para el alelo mutado (Ex10del) y de 9,419kb para el alelo normal (Figura C4.4B).

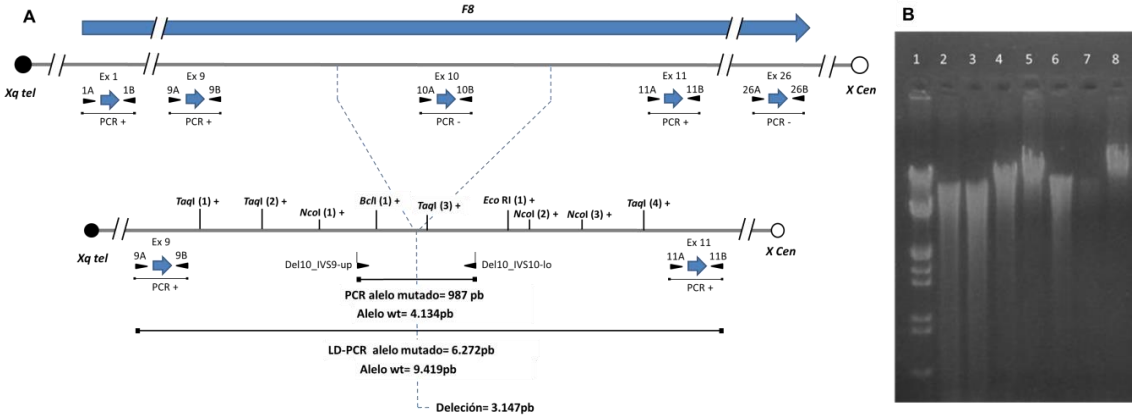


Figura C4.10. Esquema de la deleción del exón 10 del *F8*. A. Los esquemas tienen las mismas referencias que en la Figura C.4.5 y las diferencias son auto-explicativas. Se indican los *primers* (9A y 11B) y los tamaños de los productos LD-PCR normal o salvaje (*wt*) o mutado, y los *primers* para amplificar la deleción por PCR estándar (Del10_IVS9-up y Del10_IVS10-lo). Se indican las enzimas de restricción utilizadas en análisis por LD-PCR-RFLP, *Taq*I, *Nco*I, *Bcl*I y *Eco*RI marcadas como positivas (+) que no se pierden con el rearreglo. **B.** Electroforesis en gel de agarosa 1% mostrando la calidad de las muestras del paciente #570 (calle 7) y su madre #577 (calle 8), calle 1 marcador λDNA/Hind III.

La Figura C4.10A muestra el mapa de la región que incluye la deleción del exón 10 del *F8* del paciente #570. Como resultado del análisis de restricción del producto LD-PCR deleción-específico de 6,3kb usando las enzimas *Taq*I, *Nco*I, *Bcl*I y *Eco*RI (Anexo, Figura AN.3) se verificó la conservación de sitios de restricción terminales tanto en la región 5', en el IVS9, como en la región 3' de la deleción en el IVS10 del *F8*, acotando el sitio de recombinación tal que permitió el diseño de nuevos *primers* (IVS9-up y Del10_IVS10-lo) que permitieron amplificar el alelo mutado en el paciente hemicigota y en la madre heterocigota, en condiciones PCR estándar, obteniéndose un producto deleción-específico de 987pb (Figura C4.11). La secuenciación de Sanger de este producto de 987pb permitió caracterizar la Ex10del (Figura C4.12).

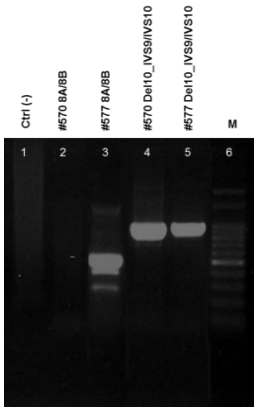


Figura C4.11. *Gap*-PCR en el probando #570 y su madre #577. Electroforesis en gel de agarosa 1,5% de productos PCR estándar en muestras de los pacientes y usando los *primers* indicados. En las calles 2 y 3 se investigan productos PCR control positivo de una región no involucrada en la deleción con los *primers* 8A y 8B (547pb) y en las calles 4 y 5 los productos de amplificación obtenidos con los *primers* IVS9-up y Del10_IVS10-lo con los que se amplificó el alelo con la deleción (987pb) en la madre (calle 5) y en el paciente (calle 4).

La deleción del exón 10 del *F8* involucra una región genómica de 3.147pb (ChrX: 154.962.379-154.959.234) (Figura C4.12).

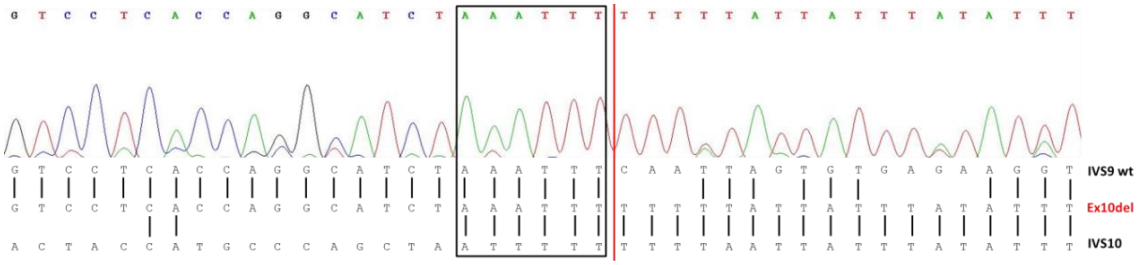


Figura C4.12. Secuencia específica del sitio de recombinación de la Ex10del. Arriba, electroferograma de Sanger obtenido con el *primer* IVS9-up del producto de amplificación deleción-específico. Debajo, se muestra el alineamiento de parte de la secuencia del intrón 9, parte de la secuencia del intrón 10 y la secuencia de la deleción, el rectángulo con líneas solidas indica la región de microhomología de 6pb (AAATTT) de estructura cruciforme.

El análisis bioinformático mostró una microhomología de 6pb en el sitio de unión (Figura C4.12), secuencias asociadas a la generación de rupturas e iniciación de la retrotransposición (*Flanking retrotrasposon sequences*, hexámeros Jurka) (Jurka et al, 1997), motivos SAR (*scaffold attachment region*) (Gale et al, 1992) y secuencias de ADN no-B (e.g., secuencias palindrómicas asociadas a estructuras cruciformes) (Bacolla y Wells, 2009). Ambos extremos de la ruptura se encuentran dentro de elementos repetidos interdispersos de la familia Alu (AluJb, extremo 3' de la ruptura) y parte de un LINE (L2, extremo 5' de la ruptura).

En conclusión, el paciente #570 con HA severa e inhibidor de alta respuesta mostró la deleción monoexónica NM_000132.3:c.[1443+3589_1537+1841del3147].

Deleción del exón 6 del F8. Paciente #U2

La Figura C4.13A muestra un esquema de la Ex6del y los productos de amplificación que resultaron positivos de los exones más cercanos a la deleción (exones 5 y 7) y negativos (exón 6) en la muestra del paciente #U2.

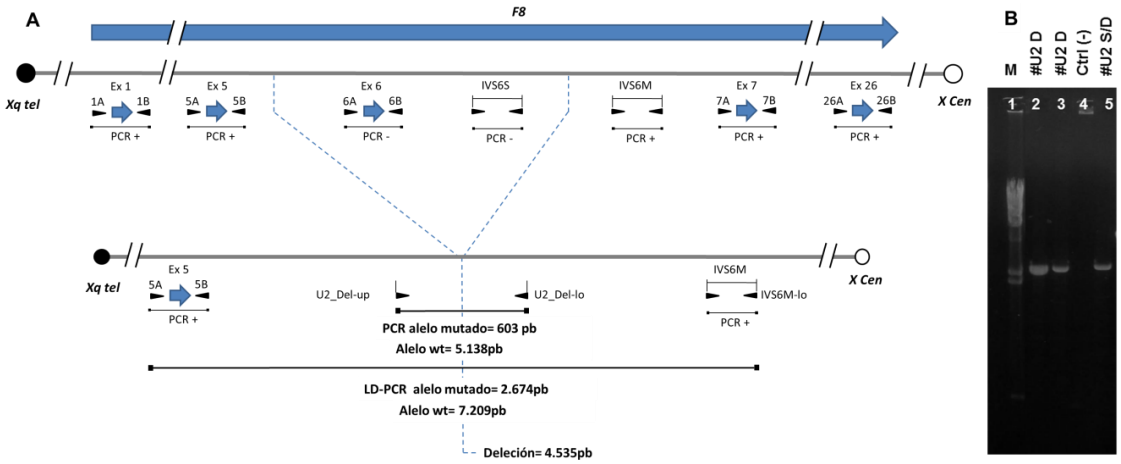


Figura C4.13. Deleción del exón 6 del *F8* en el caso #U2. A. Las referencias son las mismas que para la Figura C4.5. Se indican los *primers* 5A e IVS6M-lo y los tamaños de los productos de amplificación LD-PCR salvaje (wt) o mutado; y los *primers* U2_Del-up y U2_Del-lo y tamaños de los productos PCR estándar *wt* y mutado. **B.** Electroforesis en gel de agarosa 1% que muestra el producto LD-PCR de #U2 (calle 5), y el análisis de restricción con las enzimas *Taq*I y *Sma*I (calles 2 y 3, respectivamente) que no presentaron sitios de restricción. Calle 1, marcador λDNA/Hind III y calle 4, Ctrl (-).

Los mojones diseñados *ad hoc* dentro del intrón 6 del *F8,* IVS6M e IVS6S, resultaron positivo y negativo, respectivamente (Figura C4.13A). La amplificación LD-PCR con los *primers* vecinos a la deleción (i.e., 5A e IVS6M-lo) mostró un producto específico de la deleción de aproximadamente 2,3kb (Figura C4.4H y Figura C4.13B). El análisis de restricción del producto específico resultó no informativo para las enzimas *Taq*I y *Sma*I utilizadas por lo cual se diseñaron nuevos *primers* intrónicos más cercanos al exón 6, U2_Del-up y U2_Del-lo que rindió un producto PCR estándar deleción-específico de 603pb en el paciente hemicigota (Figura C4.14). La secuenciación de Sanger del producto específico de 603pb se muestra en la Figura C4.15.

La caracterización molecular muestra una gran deleción genómica de 4,535kb (ChrX: 154.986.631-154.982.095) que involucra el exón 6 del *F8*. El análisis bioinformático mostró una microhomología estricta de 2pb y una región de 8pb donde se pudo detectar microhomología de 6pb (posiblemente involucrada en la estabilización del sitio de recombinación). En ambos extremos de la ruptura se detectaron *Vertebrate/plant topoisomerase I consensus cleavage sites* (Been et al, 1984) y el extremo 3' de la ruptura se detectó inmerso dentro de un elemento SINE de la familia Alu (AluSg) (Figura C4.15).

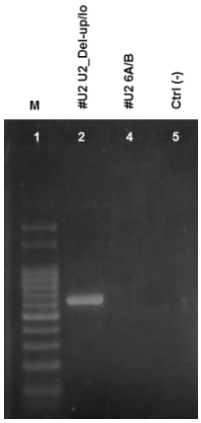


Figura C4.14. *Gap*-PCR en el probando #U2. Electroforesis en gel de agarosa 1,5% donde se muestra en la calle 1 el marcador de peso molecular, escalera de 100 pb, en la calle 2 y 3 los productos de amplificación en condiciones de PCR estándar con los *primers* U2_Del-up y U2_Del10-lo con los que se amplificó el alelo con la deleción (603pb) y los involucrados en la deleción 6A y 6B que resultaron consistentemente negativos. Calle 5, Ctrl (-) de contaminación.

El paciente #U2 con la Ex6del NM_000132.3:c.[669+605_787+2590del4535] se presenta con HA severa sin inhibidor ni características fenotípicas adicionales.

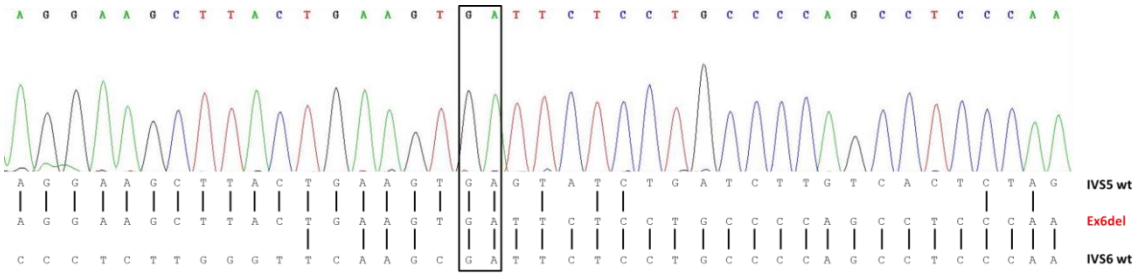


Figura C4.15. Secuencias del sitio de recombinación de la Ex6del. Arriba, electroferograma de Sanger con el *primer* U2_Del-up del producto de deleción específico de 603pb. Abajo, alineamientos del intrón 5 con el intrón 6 del *F8* wt y la secuencia de la deleción. El rectángulo sólido indica la región de microhomología de 2pb.

Deleción del exón 7 al 12 del F8. Pacientes #572 y #575

La Figura C4.16 muestra en el esquema del *F8*, los resultados de amplificación PCR positiva y negativa en los pacientes #572/#575 (hermanos con HA severa).

La amplificación LD-PCR con los *primers* de los mojones positivos más cercanos a la deleción Ex7_12del, IVS6M-up e IVS12-lo, rindió un producto específico aproximado de 7,8kb (Figura C4.4A).

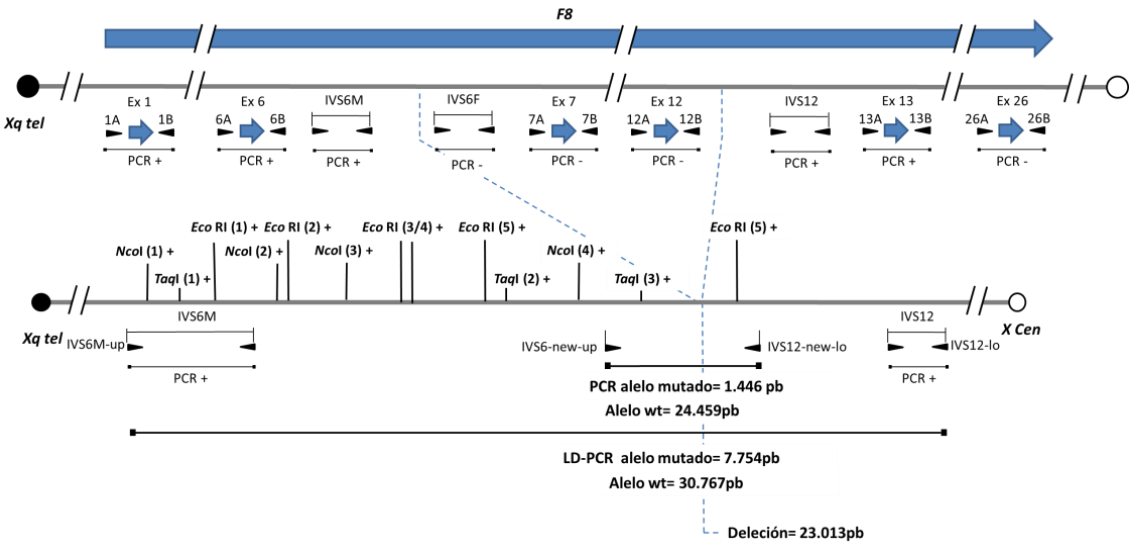


Figura C4.16. Esquema de la deleción que involucra del exón 7 al 12 del *F8*. A. Las referencias son iguales a las figuras anteriores. Los *primers* IVS6M-up e IVS12-lo y los tamaños de amplificación LD-PCR wt y mutado están indicados, y también los *primers* IVS6M-new e IVS12-new y los tamaños de amplificación PCR estándar y el tamaño de la

Los resultados del análisis de restricción con las enzimas *Eco*RI *Nco*I y *Taq*I (Anexo, Figura AN.4) permitieron acotar la deleción y diseñar nuevos *primers* de amplificación, IVS6M-new e IVS12-new y amplificar el alelo mutado en los pacientes hemicigotas en condiciones PCR estándar, en un producto de 1,446kb (Figura C4.17).

Figura C4.17. Amplificación PCR estándar Ex7_12del en los pacientes #572/#575. Electroforesis gel de agarosa 1,5%, la calle 1 marcador λDNA/Hind III, calle 2, 3 y 4, productos de PCR estándar con los *primers* IVS6M-new e IVS12-new, el producto deleción-específico es de 1,446kb, #572 (calle 2), CN81 (calle 3), #575 (calle 4) y calle 5, Ctrl (-) de contaminación.

Los puntos de ruptura de la Ex7_12del del *F8* fueron caracterizados por secuenciación de Sanger sobre el producto específico de 1,446kb con el primer IVS6-new (Figura C4.18), indicando una deleción genómica de 23,013kb (ChrX: 154.975.240-154.952.228).

El análisis bioinformático presentó la inserción de 9pb en el sitio de recombinación (TGTATCCCA) detectada de manera invertida 7pb río arriba del sitio de ruptura 5' (Figura C4.18). En el extremo 3' de la ruptura se detectaron *Vertebrate/plant topoisomerase I consensus cleavage sites* (Been et al, 1984), y el extremo 5' se mostró incluido dentro un elemento la familia LINE (L1).

Los pacientes #572 y #575 presentaron HA severa e inhibidor de alta respuesta causada por la deleción NM_000132.3:c.[787+9445_1903+1662del23013; 787+9454insTGTATCCCA].

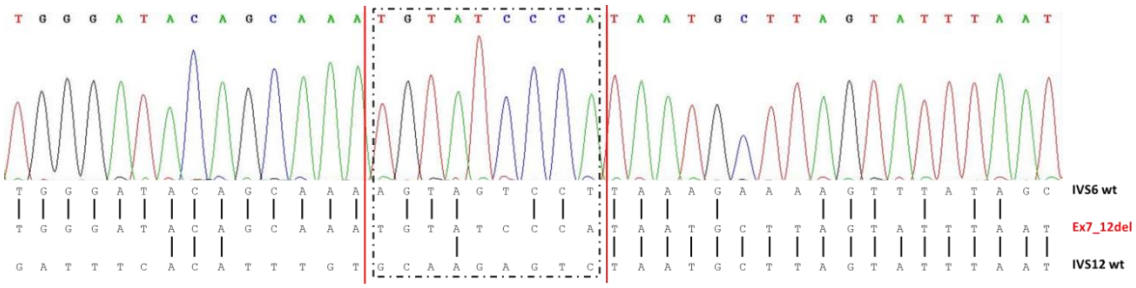


Figura C4.18. Secuencias involucradas en el sitio de recombinación de Ex7_12del. Arriba, electroferograma de Sanger de la secuencia del producto específico de 1,446kb con el *primer* IVS6-new. Abajo, alineamientos del intrón 6 y el intrón 12 de *F8* y la deleción. El rectángulo de líneas y puntos indica la inserción de 9pb (TGTATCCCA).

Deleción del exón 10 al 18 del F8. Paciente #132

La Figura C4.19 muestra el esquema del *F8 con* los exones positivos 5' y 3' (exón 9 y 19) y los negativos (exón 7 y 18) en el paciente #132 con la mutación Ex10_18del.

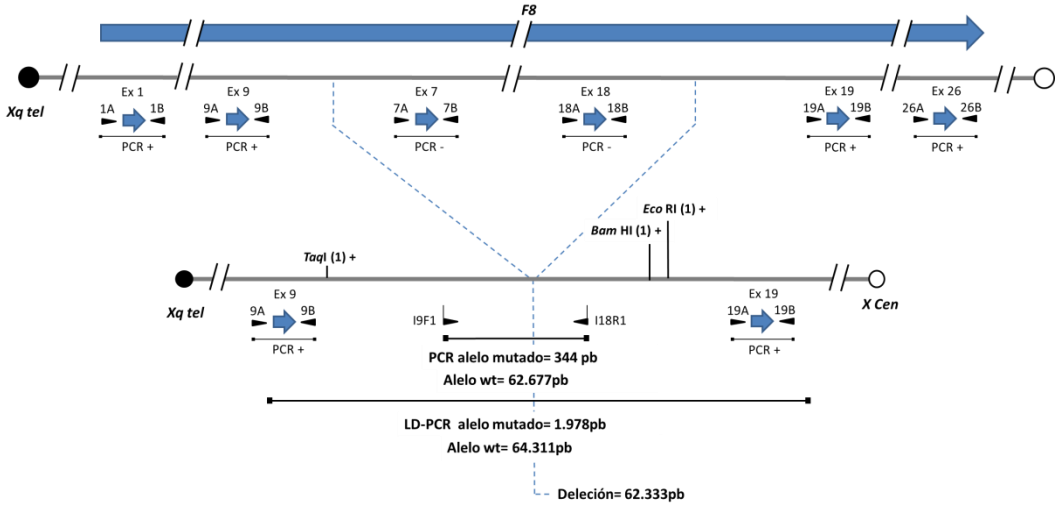


Figura C4.19. Esquema de la deleción del exón 10 al 18 del *F8* en el paciente #132. Las referencias generales son iguales a las previas. *Primers,* productos LD-PCR y PCR estándar y tamaños están indicados.

La amplificación LD-PCR con *primers* 9A y 19B mostró un producto específico de la deleción de 1,978kb (Figura C4.4E).

Con los resultados del análisis de restricción (Anexo, Figura AN.5) se diseñaron los *primers* I9F1 e I18R1 para amplificar el alelo mutado en el paciente hemicigota y su madre heterocigota, en condiciones PCR estándar, obteniéndose un producto deleción-específico de 344pb, que sometido a secuenciación de Sanger permitió caracterizar una gran deleción de 62,333kb (ChrX: 154.902.240-154.902.626) que

involucra desde el exón 9 al 18 del *F8*. El análisis bioinformático mostró una micro-homología de 2pb. El extremo 5' de la ruptura quedó incluido dentro un elemento LINE (L1) y se determinaron *Vertebrate/plant topoisomerase I consensus cleavage sites* (Been et al, 1984) y secuencias de ADN que forman estructuras no-B del ADN (i.e., repeticiones directas asociadas a estructuras secundarias tipo horquilla o tipo *hairspin loop*) (Bacolla y Wells, 2009); y el extremo 3' quedó incluido dentro de un elemento LTR (repetición terminal larga) asociado a elementos genéticos transponibles (Figura C4.20).

En conclusión el paciente #132 presentó un fenotipo de HA severa con inhibidor de alta respuesta causado por la deleción NM_000132.3:c.[1443+1010_5998+1279del62333].

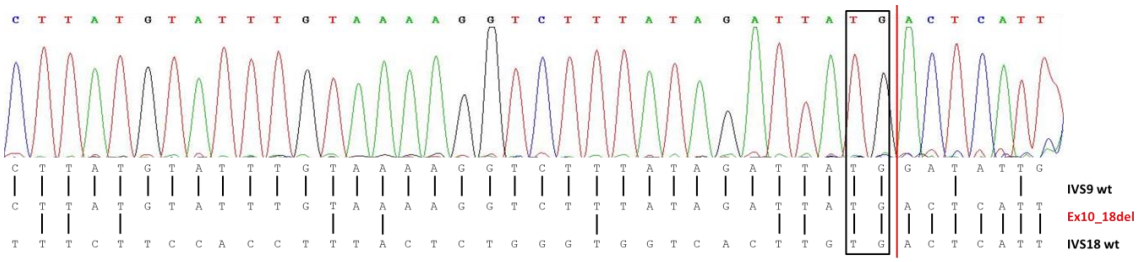


Figura C4.20. Secuencias asociadas al sitio de recombinación de la Ex10_18del. Electroferograma de Sanger obtenido con el *primer* I9F1 del producto deleción específico. Abajo, se muestran los alineamientos parciales del intrón 9, el intrón 10 y la secuencia de la deleción. El rectángulo indica una microhomología de sólo 2pb sobre el sitio de

Deleción del exón 5 al 7 del F8. Paciente #617

La Figura C4.21 presenta un esquema del caso y los resultados primarios. El producto de amplificación LD-PCR específico de Ex5_7del obtenido con los *primers* 4A y 8B mostró un tamaño molecular de 5,024kb (Figura C4.4H).

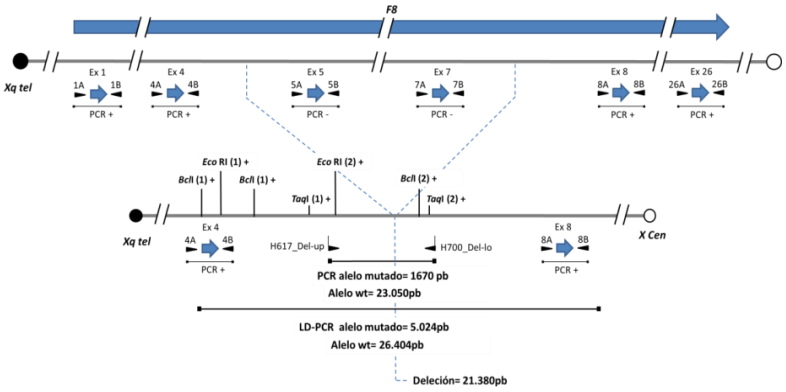


Figura C4.21. Esquema de la deleción que involucra del exón 5 al 7 del *F8*. Las referencias son iguales a los esquemas previos Se indican los *primers* 4A y 8B de los productos LD-PCR wt o mutado y los *primers* H617_Del-up y H700_Del-lo de los productos PCR estándar wt y mutado, y el tamaño de la deleción.

El producto de amplificación PCR estándar obtenido a partir del diseño de nuevos *primers* basados en el resultado del análisis de restricción (Anexo, Figura AN.6) resultó en un tamaño molecular de 1,670kb (Figura C4.22).

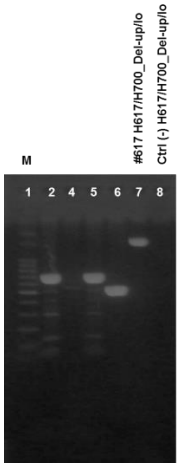


Figura C4.22. PCR específica de Ex5_7del en el paciente #617. Electroforesis en gel de agarosa 1,5% mostrando: calle 1, marcador M molecular (escalera de 100pb), calle 2-6, otros casos no relevantes aquí, calle 7, PCR estándar *primers* H617_Del-up y H700_Del-lo (producto deleción-específico de 1,670kb), calle 8, Ctrl (-).

La gran deleción genómica del paciente #617 involucra los exones 5 al 7 del *F8* y mostró un tamaño molecular de 21,380kb (ChrX: 154.989.956-154.968.575). El análisis bioinformático mostró una microhomología estricta de 2pb en una región de 6pb con microhomología de 5pb (posiblemente involucrada en la estabilización del sitio de recombinación) y en ambos extremos de la ruptura se detectaron *Vertebrate/plant topoisomerase I consensus cleavage sites* (Been et al, 1984). Asimismo, el extremo 5' mostró la secuencia denominada como *DNA polymerase alpha pause site core sequence* (Weaver y DePamphilis, 1982). Ambos extremos de la ruptura se encontraron dentro de elementos repetidos interdispersos, de la familia LINE (L1, extremo 5') y LTR (extremo 3') (Figura C4.23).

En conclusión, el paciente #617 con HA severa con inhibidor de alta respuesta mostró la mutación NM_000132.3:c.[601+2979_1009+745del21380].

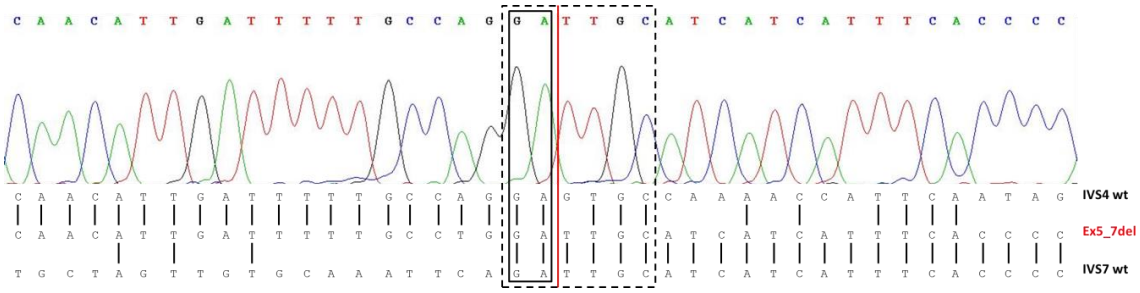


Figura C4.23. Secuencias del sitio de recombinación de la Ex5_7del. Elelectroferograma de Sanger obtenido con el *primer* I9F1 sobre el producto deleción específico de 1,670kb. Abajo, alineamientos del intrón 4 (IVS4), con el intrón 7 (IVS7) y la secuencia de la deleción, el rectángulo negro indica una microhomologÍa de 2 pb, en el sitio de recombinación y el recuadro en línea punteada muestra una región de microhomologia salvo por una base, esta región podría ayudar a estabilizar el sitio de recombinación.

Deleción compleja del exón 1 del F8. Pacientes #326 y #327

La Figura C4.24 resume en esquemas los resultados de la Ex1del compleja de los casos #326/#327 con los mojones positivos y negativos, los mapas de restricción y los productos específicos LD-PCR (Figura C4.4D) (1,6kb) y PCR estándar (363pb, Figura C4.25).

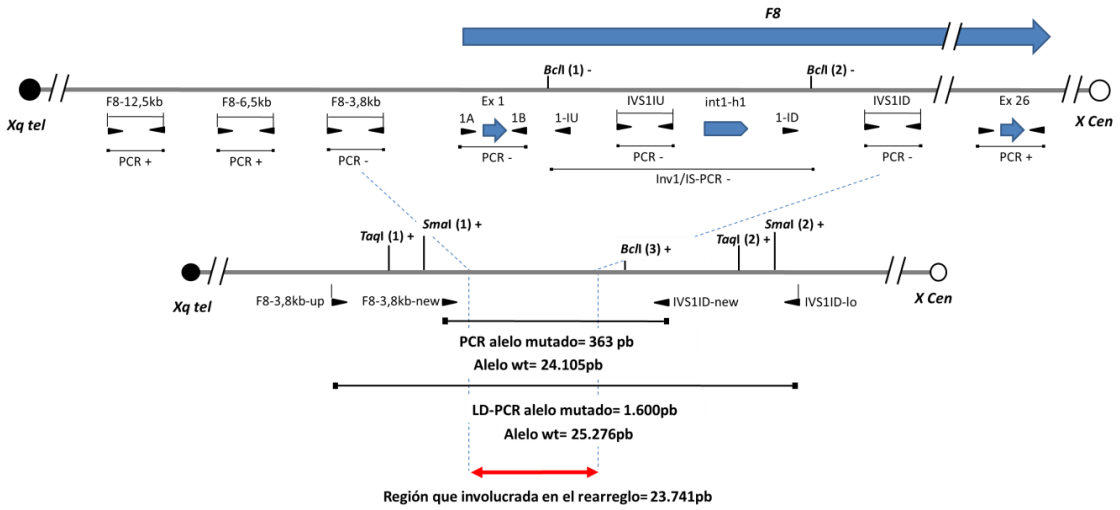


Figura C4.24. Esquema del rearreglo que involucra el exón 1 del *F8* en los pacientes #326/#327. Las referencias son iguales a las previas. Los *primers* LD-PCR (F8-3,8kb-up y IVS1ID-lo) y PCR estándar (F8-3,8kb-new e IVS1ID-new) generan productos Ex1del específicos del tamaño indicado. Se indican las enzimas de restricción informativas utilizadas en el análisis por RFLP informativas, *Taq*I, *Sma*I y *Bcl*I. Signo (+) indica sitio fuera de la región involucrada en el rearreglo complejo.

La Figura C4.25 muestra la amplificación *gap*-PCR estándar utilizando *primers* diseñados (F8-3,8kb-new e IVS1ID-new) en base al análisis de restricción (Anexo, Figura AN.7), observándose la señal deleción-específica (363pb) en el paciente #327, su madre #81 (portadora), pero no en su hermana #242 (no portadora) (Figura C4.25).

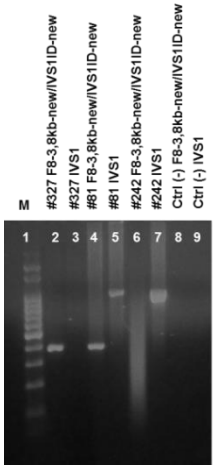


Figura C4.25. Análisis *gap*-PCR en el probando #327 y familiares en riesgo. Electroforesis en gel de agarosa 1,5% del análisis por PCR de la Ex1del con *primers* F8-3,8kb-new e IVS1ID-new de tamaño 363pb, calles 2, 4 y 6, y el análisis del mojón IVS1, involucrado en la región de la deleción, calles 3, 5 y 7, ambos análisis sobre muestras del paciente #327, su madre #81 y su hermana #242, respectivamente. M calle 1, marcador de peso molecular, escalera de 100pb; calles 8 y 9 controles negativos Ctrl (-).

La secuenciación de Sanger muestra un gran rearreglo genómico complejo que involucra 23,836kb (ChrX: 155.025.606-155.001.771) incluyendo parte del *F8* (exón 1 y parte del intrón 1) y 3,8kb de secuencias extragénicas río arriba del *F8*.

El análisis bioinformático presenta tres deleciones discontinuas, una inserción de 6pb, una inserción directa de 47pb y una inserción invertida de 60pb (estas dos últimas correspondientes a distintas regiones del intrón 1) (Figura C4.26). El extremo 3' (ruptura 3) de la inserción invertida y el extremo 5' (ruptura 4) de la inserción directa; y los extremos de las rupturas 5 y 6, ambas presentaron microhomologías de 2 y 4pb, respectivamente (Figura C4.26). Cuatro de los seis extremos de las rupturas involucradas (i.e., 1, 4, 5 y 6) en el rearreglo complejo presentaron elementos repetidos interdispersos de la familia Alu (AluY, AluS y AluJ). Además, en cinco de los seis extremos del rearreglo se detectaron patrones asociados a inestabilidad cromosómica y estimulación de rupturas de doble o simple cadena: *DNA polymerase alpha pause site core sequence* (extremos/rupturas 1, 3, y 6) (Weaver y DePamphilis, 1982); *Vertebrate/plant topoisomerase I consensus cleavage sites* (extremos 1, 2, 3 y 5) (Been et al, 1984) y *Vaccinia topoisomerase I consensus* (extremo 3) (Shuman et al, 1991) (Figura C4.26).

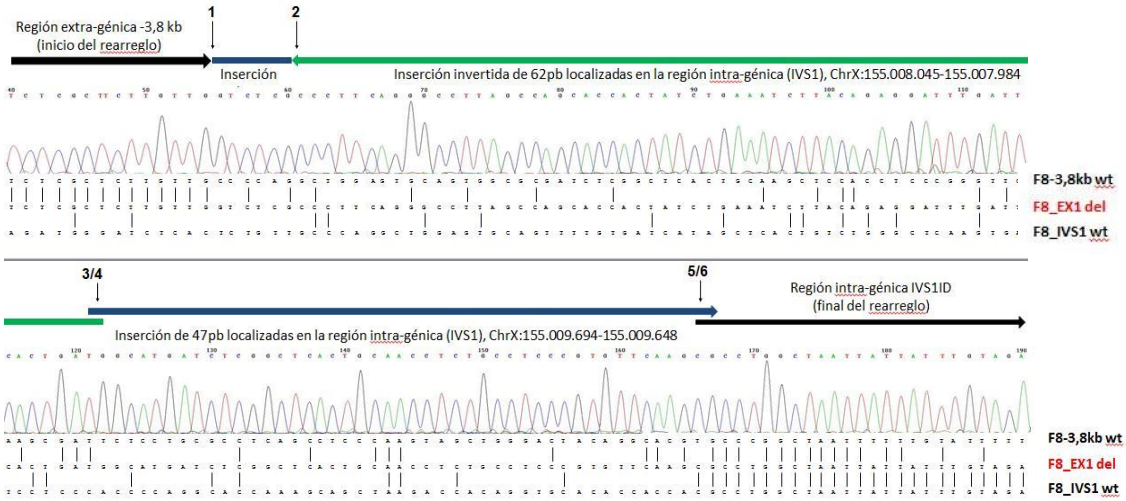


Figura C4.26. Secuencias asociadas al rearreglo complejo Ex1del de los pacientes #326/#327. Arriba, esquema de flechas de cada uno de los segmentos genómicos involucrados en el rearreglo, las regiones están indicadas y orientadas (X centrómero a Xq telómero). Electroferograma de Sanger del rearreglo específico. Abajo, alineamientos entre la región extragénica río arriba del *F8* (extremo 5' del rearreglo), el intrón 1 del *F8* (extremo 3') y la secuencia del rearreglo complejo. Se indican en azul las inserciones directas (de 6pb y 47pb) y en verde, la inserción invertida (de 60pb). Los números 1-6 indican las rupturas.

En resumen, ambos pacientes, #326 y #327, mostraron HA severa sin inhibidor sin otro fenotipo significativo asociado causado por la mutación NM_000132.3:c.[-3058_143+12715del15914{-3058_-3059insGTCTCG};

143+12761_143+14363del1602; 143+14363_143+14425inv; 143+14425_143+20543del6118].

Deleción parcial del exón 1 del F8. Paciente #945

La Figura C4.27 muestra el esquema de la deleción parcial del exón 1 del *F8* en el paciente con HA severa, #945.

El producto LD-PCR de la Ex1del-parcial obtenido con el par F8-3,8kb-up y 1-IU en el paciente #945 presentó un peso molecular de 8,3kb (Figura C4.4G).

El diseño de un nuevo *primer* en la región extragénica 2kb río arriba del exón 1 del *F8*, 2kbN945, se realizó basado en los resultados del análisis de restricción (Anexo, Figura AN.8).

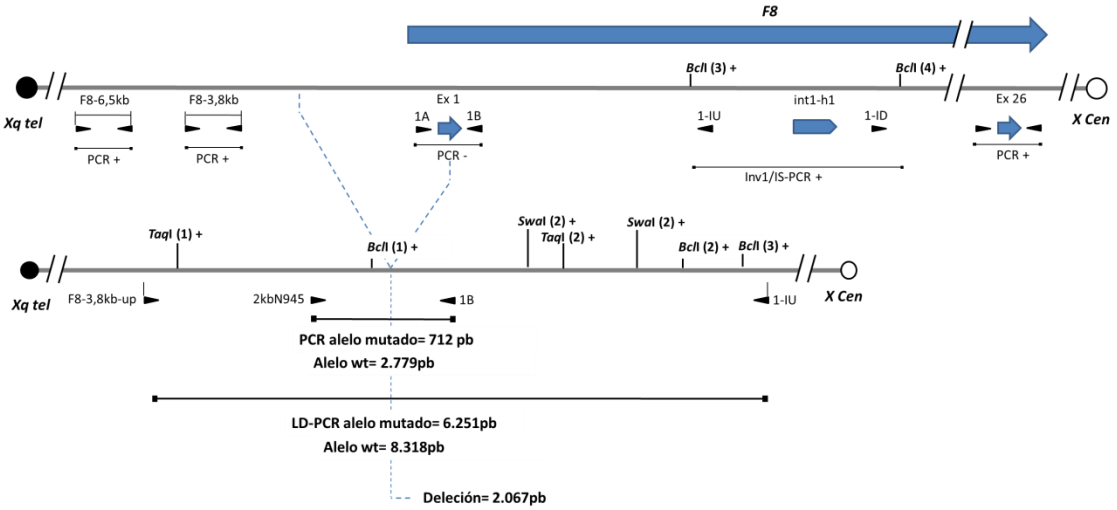


Figura C4.27. Esquema de la deleción que involucra parcialmente el exón 1 del *F8* en el paciente #945. Las referencias son iguales a las previas. La amplificación PCR (LD-PCR y PCR estándar) de los alelos *wt* y mutado, los *primers* y los tamaños de amplificación están indicados.

La Figura C4.28A muestra los resultados de la amplificación LD-PCR con la combinación de cada uno de los tres *primers* de la región extragénica río arriba orientados hacia el *F8* (2kbN945, P1A y P2A) con el *primer* 1-IU generando sólo un producto de amplificación específico con el par 2kbN945 y 1-IU de tamaño molecular de 2,779kb. Debido a la ausencia de amplificación con el par P1A/1-IU y al tamaño del producto con el par 2kbN945/1-IU se concluyó que el *primer* P1B encontraría conservado su sitio específico de unión en el alelo mutado hacia 3' del evento de recombinación. La amplificación PCR estándar con los *primers* 2kbN945 y P1B mostró un producto específico *gap*-PCR de 712pb en el paciente #945 y su hermana #946 (Figura C4.28B). Para confirmar la condición de portadora heterocigota de la hermana del probando, caso #946, se investigó en paralelo la presencia del alelo normal con los

primers P1A/P1B (539pb) además del alelo con la deleción con el par 2kbN945/P1B (Figura C4.28B).

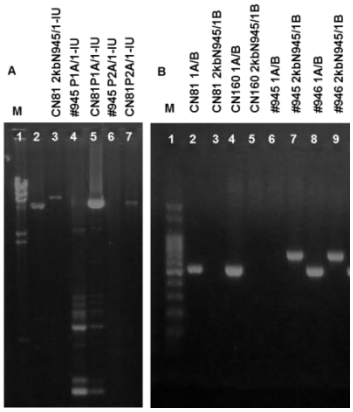


Figura C4.28. Análisis por combinación de *primers* y *gap*-PCR. A. Electroforesis en gel de agarosa 1,5% con la amplificación PCR con el *primer* 1-IU y los *primers* 2kbN945 (6921pb), P1A (5563pb), P2A (5151pb), calle 1: Marcador de tamaño molecular (λ ADN/Hind III). **B.** Gel de agarosa 1,5% con la amplificación PCR, *primers* 2kbN945 y 1B, con la señal deleción-específica (712pb) y con los *primers* 1AB, involucrados en la deleción, (526pb). Calle 1: marcador de peso molecular, escalera de 100 pb.

La secuenciación de Sanger del producto de 712pb permitió caracterizar una deleción genómica de 2,067kb (ChrX: 155.024.726-155.022.657) que involucra sólo parcialmente al exón 1 del *F8* y 2kb de sus secuencias río arriba. El análisis bioinformático mostró que el extremo 5' está incluido dentro de un elemento de la familia LINE (L2b) y secuencias asociadas a retrotransposición (*Flanking retrotrasposon sequences*, hexanucleótidos Jurka) (Jurka et al, 1997), mientras que el extremo 3' mostró la secuencia *Vertebrate/plant topoisomerase I consensus cleavage sites* (RAT) (Been et al, 1984) (Figura C4.29).

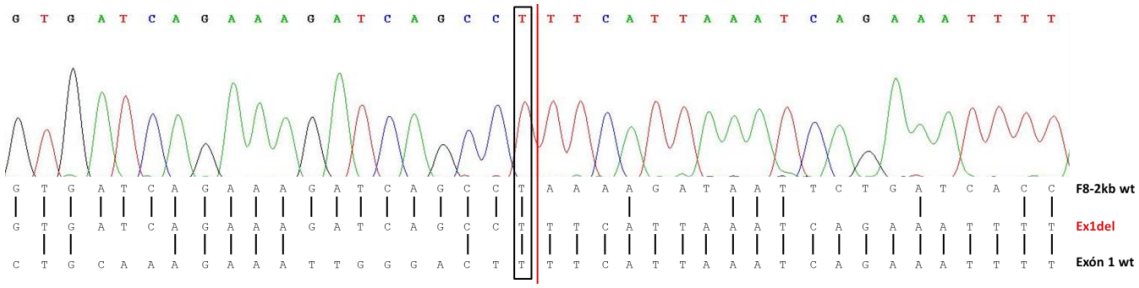


Figura C4.29. Electroferograma del sitio de recombinación de la deleción parcial del exón 1. El electroferograma muestra la secuenciación con el *primer* 2kbN945 del producto de amplificación deleción específico. Debajo, se muestra el alineamiento de parte de la secuencia del exón 1, parte de la secuencia de 2kb río arriba del *F8* y la secuencia de la deleción, el rectángulo negro indica el sitio de recombinación y el nucleótido (T) que comparten las tres secuencias. .

El paciente #945 con el genotipo NM_000132.3:c.[-2047*_16del2067] del *F8* sólo mostró HA severa sin inhibidor sin otra característica clínica significativa.

<u>*Gran deleción del exón 1 del F8. Paciente #949*</u>

La Figura C4.30 muestra un resumen de los resultados obtenidos para la muestra #949. La amplificación LD-PCR (*primers* F8-68kb-up e IVS1IU-lo) en el paciente #949

mostró un tamaño de 4,799kb (Figura C4.4I) que fue también observada en su hermana, caso #408.

El análisis de restricción permitió diseñar nuevos *primers*, F8-68kb-new e IVS1IU-new, con los que se pudo obtener una señal específica de la deleción de 1,275kb (Anexo, Figura AN.9).

A partir de este producto específico de 1,275kb se caracterizó una gran deleción genómica que involucra 78,145kb (ChrX: 155.089.415-155.011.283) que abarca el exón 1, parte del intrón 1 del *F8* y 68kb de sus secuencias extragénicas río arriba (Figura C4.30).

La Figura C4.31A muestra el análisis *gap*-PCR estudiando los productos LD-PCR, específico de la gran deleción del exón 1 del *F8* y el alelo normal sobre la región IVS1, ausente en el caso #949 y presente en su hermana #408, indicando en ella su condición de portadora heterocigota.

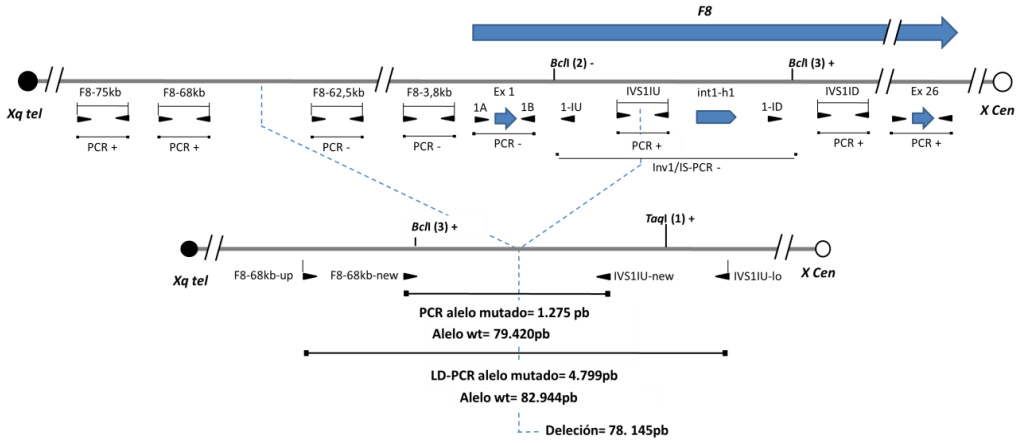


Figura C4.30. Esquema de la gran deleción del exón 1 del *F8* en el paciente #949. Las referencias son iguales a las anteriores. Se indican la posición relativa de los *primers,* los tamaños de los productos de amplificación LD-PCR y PCR estándar y mutado y el tamaño total de la deleción.

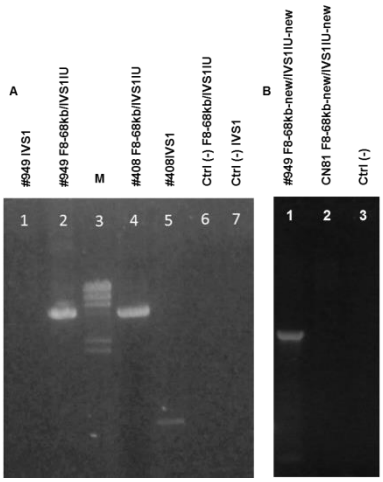


Figura C4.31. Análisis molecular de la deleción que involucra al exón 1 del *F8*. A. Electroforesis en gel de agarosa 1% mostrando el producto de amplificación LD-PCR deleción-especifico (4.799pb) en el paciente #949 (calle 2) y su hermana portadora de la deleción #408 (calle 4) y un producto de amplificación ubicado en la deleción, mojón IVS1 (1.027pb). Calle 3, M marcador de tamaño molecular (λ ADN/*Hind*III), calles 6 y 7, ctrl (-). **B.** Producto PCR estándar deleción-específico con el par F8-68kb-new e IVS1IU-new (1.275pb) en el paciente (calle 1), ausente en CN81 (calle 2). Calle 3, ctrl (-).

El análisis bioinformático mostró una microhomología de 3pb entre los extremos de las rupturas (Figura C4.32). El extremo 5' presentó un elemento de la familia LINE (L2a) y el extremo 3' mostró secuencias de ADN que forman estructuras no clásicas del ADN (ADN no-B) (i.e., repeticiones directa, asociadas a estructuras en forma de horquillas o *hairspin loops*) a 6pb del sitio de recombinación (Bacolla y Wells, 2009).

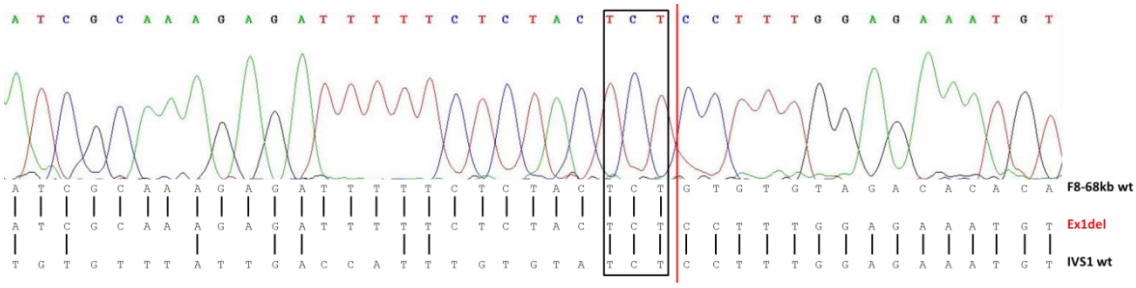


Figura C4.32. Secuencias asociadas al sitio de recombinación de la Ex1del-68. Arriba, electroferograma de Sanger con el *primer* F8-68KB-new del producto de amplificación deleción específico (1,275kb). Abajo, se muestran los alineamientos del intrón 1 del *F8*, región 68kb río arriba del *F8* y la secuencia de la deleción, el rectángulo negro indica el sitio de recombinación y la microhomologia de 3 pb.

En conclusión el paciente #949 con HA severa sin inhibidor ni otro fenotipo asociado, y su hermana portadora, caso #408, mostraron la gran deleción genómica NM_000132.3:c.[-66732*_271+11409del78145] en hemicigosis y heterocigosis, respectivamente.

DISCUSIÓN IV

Los grandes rearreglos y entre ellos las grandes deleciones del *F8* representan del 8 al 15% de las HA severas (Graw et al, 2005; Rossetti et al, 2007). Dependiendo del tamaño y funcionalidad de la pérdida de secuencias genómicas, las grandes deleciones predisponen al desarrollo de inhibidores terapéuticos, anticuerpos anti-factor VIII (Rossetti et al, 2013). La caracterización molecular completa de estas grandes deleciones causales de hemofilia son, aún hoy, un reto tanto experimental, por la heterogeneidad y relativa complejidad de los métodos involucrados, como económico, característica particularmente sensible en países en desarrollo. La serie de pacientes con grandes deleciones caracterizados en este Capítulo IV (n=10) es la más grande de las descriptas en hemofilia hasta el presente.

Desde una perspectiva clínica, todos los pacientes estudiados mostraron sólo HA severa, con o sin inhibidor, pero sin fenotipos asociados. Dos de los casos presentaron deleciones de la región extragénica río abajo del *F8* no involucrando ningún gen

vecino. Otros tres casos mostraron deleciones extendidas hacia la región extragénica río arriba del *F8*. En este grupo, los pacientes #326/#327 con la Ex1del compleja mostraron que la deleción alcanzaba al gen *FUNDC2*, pero al igual que lo presentado en la literatura esta pérdida funcional hemicigota no presentó ningún fenotipo asociado (Sheen et al, 2007). También en este grupo, el caso #949 (Ex1del-68kb) presentó una deleción hemicigota involucrando 17kb del gen *BRCC3* y la deleción completa de los genes *FUNDC1, MTCP1* y *CMC4*, combinación con consecuencias fenotípicas descriptas en la literatura y en el Capítulo I de esta Tesis como asociada a la enfermedad Moyamoya en el cromosoma X (OMIM #300845) y a características faciales reconocibles por médicos especializados en Genética (Janczar et al, 2014; El-Hattab et al, 2015).

Más allá de la interesante relación genotipo-fenotipo discutida en los párrafos anteriores mayormente relacionada a la extensión y función del segmento ausente o rearreglado, el objetivo principal de este Capítulo IV hace foco en los posibles mecanismos que dieron origen a cada rearreglo caracterizado. A pesar que cada uno de los casos descriptos aquí mostró varias secuencias asociadas a inestabilidad genómica como posibles estimuladores de focalización de rupturas de doble o simple cadena, como se resume en Vissers et al (2009), no se pudo determinar una única secuencia específica común a todos los casos analizados. Sin embargo, el 80% de los 10 rearreglos descriptos mostraron elementos repetitivos interdispersos sean largos (LINE) o cortos (SINE), por ejemplo LINE1, Alu, LTR, etc. dentro, o cerca, de alguno de los puntos de ruptura confirmando la inestabilidad que determina su presencia en el genoma humano (Woods-Samuels et al, 1988; Eldeman et al, 1989; Deninger y Batzer, 1999).

Los 10 casos presentados en este Capítulo IV revelaron un catálogo heterogéneo y abarcativo con distintos tipos de rearreglos asociados a características moleculares específicas en los puntos de ruptura. Entre los mecanismos probablemente involucrados en el origen de los rearreglos aquí presentados (n=10), no se detectó ninguno asociado a regiones de homología extensas, ya sea por recombinación homóloga no alélica clásica (NAHR) (Szostak et al, 1983), ni homeóloga por recombinación entre secuencias con un grado intermedio de identidad (75-90%) (e.g., Rossetti et al, 2004) ni tampoco la asociada a la replicación del ADN por *Break-induce replication* (BIR) donde se requieren al menos 50pb de homología (Malkova e Ira, 2013). El marco teórico incluye modelos de recombinación donde no es necesaria la interacción entre secuencias homólogas, como los modelos asociados a la replicación del ADN descriptos para explicar eventos caracterizados en humanos y en bacterias, como el modelo de *Micro-homology-mediated Break-induce replication* (MMBIR)

(Hastings et al, 2009); el modelo de *Fork Stalling and Template Switching* (FoSTeS) (Lee et al, 2007) presentando en la mayoría de los casos un solo colapso de la horquilla de replicación y un solo salto de la ADN polimerasa hacia otro segmento a copiar (molde o templado); o el modelo clásico de reparación por unión de extremos no homólogos (NHEJ) (Moore y Harber, 1996; Woods-Samuels et al, 1991).

Los rearreglos cuyos puntos de ruptura han sido caracterizados en esta serie de pacientes, son aquellos asociados a la detección primaria que presentaron siempre pérdida de material o deleción de uno o más de los 38 amplímeros en los que se monitorean las regiones más importantes del *F8* (el promotor y los 26 exones incluyendo las secuencias intrónicas vecinas necesarias para el proceso de *splicing* del ARN).

El alcance de este análisis primario excluye por ejemplo las inserciones/duplicaciones con rupturas intrónicas profundas entre otros rearreglos que también son posibles aunque infrecuentes.

El análisis de los casos #326/#327 (Ex1del compleja) determinó la presencia de dos inserciones de distintas secuencias del intrón 1 del *F8*, ambas mayores de 40pb, una de ellas invertida, y la otra directa sumada a una inserción pequeña de 6pb, no detectada en la vecindad, posiblemente generada durante el evento de recombinación. Esta Ex1del compleja mostró una alta densidad de elementos repetitivos interdispersos en la vecindad de los puntos de ruptura (cuatro de los seis estuvieron inmersos en SINEs o LINEs), característica asociada al acercamiento/estabilización de las regiones involucradas o "sinapsis ectópica" (Liu et al, 2011). Estas características de la Ex1del compleja son iguales a las descriptas para rearreglos, tanto del X como de autosomas, asociadas al modelo FoSTeS durante la replicación del ADN (Lee et al, 2007; Gu et al, 2008; Colnaghi et al, 2011).

Otros cinco casos, #132 (Ex10_18del), #467 (Ex24_26del), #617 (Ex5_7del), #949 (Ex1del-68kb) y #U2 (Ex6del), presentaron microhomologías de dos y tres pares de bases, y en algunos casos pequeñas inserciones en los sitios de rupturas. Estas características presentes en el sitio de recombinación se describen también en otros casos de la literatura abarcando tanto pacientes con Hemofilia como otras patologías hereditarias, asociadas a MMBIR (Slack et al, 2006; Vissers et al, 2009; You et al 2013) o NHEJ (Woods-Samuels et al, 1991; Vissers et al, 2009; You et al, 2013). Particularmente el caso #570 (Ex10del) presenta una microhomología de siete pares de bases, la característica más significativa para involucrar a MMBIR por sobre NHEJ, donde puede haber o no microhomología, aunque la ausencia de otras características asociadas a la replicación del ADN que reforzara al modelo MMBIR, no permite descartar NHEJ.

Dos de nuestros casos, #121 (Ex3_26del) y #945 (Ex1del-parcial), presentaron las características clásicas de NHEJ con una sola base compartida entre los dos extremos del evento de recombinación. Uno de estos casos, #121, presentó una inserción de dos pares de bases que puede estar asociada al evento de reparación por extremos no homólogos, NHEJ, como se describe en el trabajo de Woods-Samuels et al (1991).

Finalmente, los casos #572 y #575 asociados a la Ex7_12del presentaron marcas distintivas asociadas a MMBIR, con inserciones de secuencias cercanas al sitio de recombinación como la duplicación de orientación invertida detectada a seis pares de bases río arriba del punto de intercambio (Hastings et al, 2009; Liu et al, 2012).

Es necesario indicar que el análisis bioinformático de los mecanismos basado en modelos teóricos sólo son hipótesis basadas en elementos comunes descriptos en las series caracterizadas en la literatura y no implica la certeza de un mecanismo específico.

Todo lo descripto en estas 10 deleciones parciales del *F8* ilustra la complejidad y heterogeneidad de origen de las variantes estructurales causales de enfermedad.

La focalización de nuestra caracterización sobre los puntos de la deleción excluye el estudio de CNVs en otras regiones del X y nos induce a aplicar las tecnologías de microarreglos SNP-CGH y/o MPS (*Massive parallel sequencing*) a nuestra serie de pacientes con HA severa para tener un panorama genómico más amplio de la naturaleza de cada evento particular.

DISCUSIÓN GENERAL

El presente trabajo tiene impacto sobre dos áreas de tradicional interés en medicina, como son, en lo académico, el análisis de los mecanismos que dan origen a los grandes rearreglos genómicos causales de enfermedad y el estudio epidemiológico molecular de estos rearreglos causales de Hemofilia en nuestra población; y desde el punto de vista práctico, el desarrollo de herramientas tecnológicas de bajo costo y mediana o baja complejidad de aplicación diagnóstica primaria en los Laboratorios de Genética Molecular de la Hemofilia pero que pueden ser adaptados con mínimo esfuerzo a otras enfermedades ligadas al cromosoma X.

El análisis y caracterización de los grandes rearreglos genómicos, en especial aquellos que resultan en la interrupción de la estructura normal de los genes y causan enfermedad (trastornos genómicos; Lupski, 2009), alimenta la colección de datos moleculares que por razones experimentales es llamativamente escasa en humanos y abre la posibilidad de revisar y reclasificar los mecanismos involucrados definiendo el marco teórico con una mayor precisión. Este trabajo de Tesis presenta la caracterización de grandes rearreglos causales de Hemofilia en la serie de pacientes más grande descripta en la literatura hasta el presente y abarca todos los tipos de mecanismos causales descriptos hasta hoy: recombinación homóloga, recombinación no homóloga y mecanismos asociados a replicación del ADN

Aunque las nuevas tecnologías como el MLPA, *microarrays*-CGH o la MPS ofrecen soluciones a la detección de grandes rearreglos genómicos, excluyendo aquellas inversiones mediadas por recombinación homóloga entre duplicones como las Inv22 e Inv1, los altos costos involucrados en su implementación rutinaria en los laboratorios de genética molecular clínica dificultan su uso especialmente en países en vías de desarrollo.

Es conocida la propensión de los grandes rearreglos causales de hemofilia a desarrollar inhibidor (Rossetti et al, 2013), anticuerpos que hacen inefectiva la terapia sustitutiva del factor ausente o defectuoso (FVIII o FIX según el caso). Los pacientes con hemofilia e inhibidor requieren, por sus probables complicaciones clínicas, mayores gastos en internación que aquellos sin inhibidor (Rocha et al, 2015), necesitan un tratamiento específico con agentes alternativos (e.g., complejo protrombínico activado, FVIIa) o intentan eliminar definitivamente el inhibidor mediante la inducción de inmunotolerancia al FVIII/FIX (ITI) usando dosis masivas del factor que terminan por agotar la respuesta del sistema inmune del paciente, todo lo cual es extremadamente costoso.

Como se mencionó arriba, otro factor limitante es que muchos grandes rearreglos no pueden ser resueltos debido a limitaciones propias de las técnicas (e.g., las grandes inversiones mediadas por replicones que presentan alto grado de homología no suelen estar asociados ni a cambios de secuencias, ni a CNVs) (Gonzaga-Jauregui et al, 2012). Por lo tanto, el desarrollo de nuevas técnicas, que superen a las de uso actual en sus costos de aplicación, rapidez, sensibilidad y/o especificidad que las haga más confiables permitirá su aplicación rutinaria internacional para la caracterización de las mutaciones causales de hemofilia mejorando las áreas de diagnóstico molecular extendiendo estos análisis a virtualmente todos los estratos sociales-económicos de la población y en epidemiología molecular para el estudio de grandes series de pacientes, mejorando, en síntesis, el acceso a esta información que resulta indispensable para el paciente y su familia (detección de portadoras y en diagnóstico prenatal) (Windsor et al, 1994; Rossetti et al 2008; Radic et al, 2009) y el sistema nacional de salud involucrado.

Enfocados en esta problemática, este trabajo presenta la caracterización y estudio molecular de grandes rearreglos en pacientes con Hemofilia de fenotipo severo y mujeres familiares en riesgo de ser portadoras, utilizando tecnologías relativamente sencillas actualmente disponibles tanto en los laboratorios de países desarrollados como también en países con economías en desarrollo.

Por razones históricas y por las características heterogéneas de los genes del *F8*/*F9*, el estudio de las mutaciones causales de HA/HB han tenido, y aún tiene, gran influencia pionera en el área de la genética humana. Por ejemplo, la Inv22 ha sido la primera inversión recurrente y perfecta con eventos de recombinación homóloga no-alélica mediada por duplicones (i.e., h1, h2 e h3) que fueron finalmente caracterizados por Naylor et al (1995), y más tarde, ubicados con precisión en el genoma con sus orientaciones relativas gracias al libre acceso a la secuencia terminada del cromosoma X abriendo nuevas preguntas e hipótesis acerca de la diversidad de los rearreglos existentes y los potenciales asociados a los distintos eventos de recombinación entre las copias de *int22h* (Ross et al, 2005; Bagnall et al, 2005; De Brasi y Bowen, 2008). En el campo técnico, la detección molecular de la Inv22 marcó también etapas históricas en el diagnóstico molecular, primero utilizando el análisis de *Southern Blot* (Lakich et al, 1993), después los abordajes de LD-PCR e IS-PCR no discriminantes (Liu et al, 1998; Rossetti et al, 2005) y más recientemente, los mismos abordajes pero discriminantes, con la posibilidad de clasificar todas las variantes estructurales asociadas a recombinación entre las copias de *int22h* (Inv22, Dup22 y Del 22) (Bagnall et al, 2006; Rossetti et al, 2008).

Tanto la evidencia mostrada en los trabajos de investigación sobre genomas completos (Lafrate et al, 2004; Redon et al, 2006) como los proyectos HapMap (The International HapMap Consortium, 2010) y estudio de 1000 genomas (1000 Genomes Project Consortium, 2010) muestran la relevancia de las variantes estructurales participando en la variabilidad genómica entre individuos con o sin impacto específico reconocible en el fenotipo clínico. En los casos analizados en este trabajo se ha podido observar una amplísima variedad de rearreglos, cada uno con distintas características moleculares (firmas moleculares) sobre sus puntos de ruptura, y siendo la serie más grande de deleciones parciales del *F8* presentada en hemofilia fue posible asociar el origen de cada uno de ellos con uno o dos modelos mecanísticos teóricos descriptos en la literatura ligados a la replicación del ADN (i.e., MMBIR, FoSTeS) (Lee et al, 2007; Hastings et al, 2009; Costantino et al, 2014) o los modelos clásicos de recombinación no-homóloga descriptos en la literatura (i.e., NHEJ) (Woods-Samuels et al, 1991).

La evidencia teórico-práctica obtenida en este trabajo, tomando a la hemofilia como modelo, alimenta no sólo al conocimiento de la fisiopatología molecular de enfermedades hereditarias ligadas al cromosoma X, sino también de enfermedades autosómicas con interacciones alélicas complejas.

El análisis epidemiológico molecular de los rearreglos de *int22h*, estimando las frecuencias de la Inv22, Dup22 y Del22 en una serie grande de pacientes y controles como la estudiada, revela la importancia relativa de estas variantes estructurales en nuestra población y acota el alcance de posibles errores en el diagnóstico de la hemofilia. La caracterización molecular detallada de las grandes deleciones/rearreglos-complejos del *F8* en el paciente hemicigota, la variedad de sus firmas moleculares y su asociación específica con mecanismos moleculares específicos que le hayan dado origen, amplía el conocimiento de la relación genotipo-fenotipo de estas mutaciones frente a los pocos datos presentes en la literatura.

Por sus características (confiabilidad diagnóstica, rapidez y costo-efectividad) los nuevos abordajes presentados (i.e., medición de dosis génica, IS-PCR/2008 modificada y los acercamientos por bipartición para la caracterización de los rearreglos) pueden ser valorados positivamente en la comunidad científica mejorando la atención del paciente con hemofilia y su familia tanto en países desarrollados como no desarrollados.

CONCLUSIONES

CAPÍTULO I

- Se estimó la prevalencia de la inversión del intrón 22 (Inv22) en 44% (126) (38% (109) correspondiente a la Inv22-I y 6% (17) a la Inv22-II) en un total de 267 de Familias Argentinas con HA severa analizadas por la técnica de IS-PCR/2008, siendo muy similares a los promedios internacionales descriptos en la literatura para la Inv22 (Antonarakis et al, 1995, estimó 42%, 37% y 7%, respectivamente).
- Se investigó la presencia de las duplicaciones (Dup22) y deleciones (Del22) mediadas por en 703 cromosomas X de familias Argentinas con hemofilia A severa y de la población Argentina general no afectada utilizando la técnica de IS-PCR/2008 *test* diagnóstico y complementario. Se verificó la ausencia de la Dup22 en 475 cromosomas X potencialmente informativos, q<1/476≈0,2%. También se verificó la ausencia de la Del22 en 183 cromosomas X potencialmente informativos, q<1/184≈0,5%. La escasez de casos reportados en la literatura correspondientes a la Dup22 o Del22 concuerda con los resultados obtenidos en el estudio de nuestras series.

CAPÍTULO II

- Se caracterizaron dos variantes de la Inv22 (In22v) en cuatro pacientes con HA severa, tres derivados del tipo I (Familia 1) y uno del tipo II (Familia 2). La prevalencia de la Inv22v fue estimada en 1,3% de los pacientes con HA severas (4/306) (3 con Inv22-Iv, 1,0%; y 1 con la Inv22-IIv, 0,30%) y en 2,7% de los pacientes con la Inv22 (4/149). Se diagnosticaron como portadoras de la Inv22v a las madres de los pacientes informativos en ambas familias y a una tía materna de la Familia 2, mientras que otra tía materna de la Familia 2 resultó no portadora.
- Por medio de un monitoreo bioinformático y mapas de restricción teóricos cambiando cada uno de los 85 alelos variantes de los SNPs potencialmente involucrados, se determinó que ambas variantes de la Inv22 están asociadas al alelo G del SNP rs73563631 [A/G], que modificó los patrones de restricción *Bcl*I modificando los patrones de análisis IS-PCR/2008. El análisis de la presencia del SNP rs73563631 dio negativo en 404 cromosomas X de la población Argentina general estimándose una frecuencia menor a 0,24% del alelo G.
- Para permitir una genotipificación correcta, unificada y costo-efectiva de todos los patrones canónicos (las Inv22-1 e Inv22-2, las Del22-1 y Del22-2 y las Dup22) y las dos variantes descriptas aquí (Inv22-Iv e Inv22-2v) se incorporó el *primer* Bcl_N-lo al *set* de cuatro *primers* original del *test* diagnóstico IS-PCR/2008 completando el análisis por PCR *multiplex*. De este modo el abordaje IS-PCR/2008 modificado

tiene la capacidad de diferenciar todos los rearreglos asociados recombinación entre las copias del duplicón *int22h* reportados hasta el presente.

CAPÍTULO III

- Utilizando la tecnología de qPCR se diseñó y desarrolló un sistema de medición relativa de dosis génica (X/autosoma, blanco/referencia, T/R) rápido y costo-efectivo para la detección heterocigota de grandes deleciones en mujeres familiares de pacientes con HA y HB severa. Se realizó una validación primaria verificando la capacidad del método para diferenciar entre simple y doble dosis en 15 varones y 15 mujeres controles de la población Argentina general, respectivamente. La distribución de valores en estas dos poblaciones control se aprovecharon para calcular la probabilidad de una mujer de ser portadora de una gran deleción (Pc) aportando límites de confiabilidad diagnóstica sobre base experimental, lo que es de gran utilidad para el asesoramiento genético de familias con hemofilia severa causada por grandes deleciones del *F8*/*F9*.
- El abordaje qPCR desarrollado para diagnóstico de portadoras de grandes deleciones causales de hemofilia fue aplicado a cuatro regiones (*F8*: Promotor, Exón 6, Exón 26, y *F9*: Exón 8) cada una de las cuales fue validada por obtención de resultados coincidentes y valores Pc de certeza diagnóstica (0%, no portadora; o 100%, portadora) en comparación con técnicas de diagnóstico de CNVs independientes cuyo uso ya ha sido establecido (i.e., MLPA, *gap*-PCR). La incorporación de este abordaje qPCR permitió el diagnóstico de 14 mujeres en riesgo de ser portadoras en siete familias no relacionadas afectadas con HA o HB severa que se encontraban pendientes. Nueve de ellas resultaron portadoras y cinco, no portadoras de grandes deleciones del *F8* (siete portadoras y dos no portadoras) o *F9* (dos portadoras y tres no portadoras). Este abordaje qPCR con aplicación de controles de doble y simple dosis usando individuos de la población general resulta confiable, rápido, costo-efectivo y potencialmente adaptable con mínimo esfuerzo a otras regiones blanco en el cromosoma X para el análisis de portadoras de otras enfermedades ligadas al cromosoma X.

CAPITULO IV

- Mediante un monitoreo por amplificación de los 26 exones del *F8* con 38 amplímeros se detectaron diez deleciones parciales distintas en el *F8* en familias con HA severa (13 pacientes varones hemicigotas y 12 mujeres familiares heterocigotas)
- Para amplificación de los puntos de ruptura se desarrollaron abordajes de PCR con acercamientos diseñados por bipartición de segmentos indeterminados, por LD-

PCR y RFLP, *gap*-PCR e I-PCR, todas técnicas costo-efectivas ideales para aplicar en países con recursos limitados. Así se logró amplificar específicamente y caracterizar las secuencias de los puntos de ruptura involucrados en los 10 rearreglos/deleciones del *F8*. Cinco de estos rearreglos quedaron confinados dentro del *F8* (intersticiales) y las cinco restantes abarcaban la región extragénica del *F8* en uno de sus extremos, tres involucrando regiones río arriba involucrando genes vecinos en Xq28 (aunque los pacientes no presentaron otro fenotipo distinto de HA severa) y dos río abajo no involucrando genes vecinos 3' del *F8*. Esta serie de 10 rearreglos/deleciones caracterizada en este trabajo representa una de las más grandes descriptas en hemofilia hasta el presente.

- El análisis de los puntos de ruptura reveló patrones asociados a inestabilidad cromosómica, secuencias estimuladoras de rupturas de doble o simple cadena y secuencias generadoras de estructuras secundarias en el ADN. En coincidencia con la literatura no se detectaron patrones comunes específicos que se repitiera en todos los casos. El 80% de los casos mostró elementos repetitivos interdispersos (e.g., LINE, Alu, LTR) en por lo menos uno de los puntos de ruptura confirmando la inestabilidad que representa su presencia en el genoma humano.
- En los 10 rearreglos/deleciones caracterizados fue posible estimar el mecanismo involucrado en su origen indicando tres modelos bien caracterizados en la literatura como posibles y probables mecanismos aplicando el principio de máxima parsimonia.

  (a) Un caso asociado a MMBIR:
  Ex7_12del c.[787+9445_1903+1662del23013; 787+9454insTGTATCCCA].
  (b) Un caso asociado a FoSTeS:
  Ex1del compleja c.[-3058_143+12715del15914{-3058_-3059insGTCTCG};
  143+12761_143+14363del1602; 143+14363_143+14425inv;
  143+14425_143+20543del6118].
  (c) Dos casos asociados a NHEJ:
  Ex3_26del c.[265+1220_*4636del165297;265+1220_265+1221insAG];
  Ex1del-parcial c.[-2047*_16del2067]
  (d) Seis casos asociados primero a MMBIR pero también a NHEJ:
  Ex24_26del c.[6620_*13083del39118];
  Ex 10del c.[1443+3589_1537+1841del3147];
  Ex6del c.[669+605_787+2590del4535];
  Ex7_18del c.[1443+1010_5998+1279del62333];
  Ex5_7del c.[601+2979_1009+745del21380];
  Ex1del-68kb c.[-66732*_271+11409del78145].

BIBLIOGRAFÍA

Abecasis GR, Auton A, Brooks LD, DePristo MA, Durbin RM, Handsaker RE, Kang HM, Marth GT, McVean GA. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. Nature 2012; 491: 56-65.

Abelleyro MM, Rossetti LC, Radic CP, Candela M, Larripa IB, De Brasi CD. Inversión del intrón 22 variante asociada a un nucleótido polimórfico en familias con hemofilia A severa. Basic Appl Genet 2011; pp: 99.

Abelleyro MM, Rossetti LC, Radic CP, Candela M, Larripa IB, De Brasi CD. Are int22h-mediated deletions a common cause of hemophilia?. Ann Hematol 2012; 4: 633-6.

Abeysinghe SS, Chuzhanova N, Krawczak M, Ball EV, Cooper DN. Translocation and gross deletion breakpoints in human inherited disease and cancer I: Nucleotide composition and recombination-associated motifs. Hum Mutat 2003; 3: 229-44.

Abou-Elew H, Ahmed H, Raslan H, Abdelwahab M, Hammoud R, Mokhtar D, Arnaout H. Genotyping of intron 22-related rearrangements of F8 by inverse-shifting PCR in Egyptian hemophilia A patients. Ann Hematol 2011; 5: 579-84.

Andersen EF, Baldwin EE, Ellingwood S, Smith R, Lamb AN. Xq28 duplication overlapping the int22h-1/int22h-2 region and including RAB39B and CLIC2 in a family with intellectual and developmental disability. Am J Med Genet A 2014; 164: 1795–801.

Anson DS, Choo KH, Rees DJ, Giannelli F, Gould K, Huddleston JA, Brownlee GG. The gene structure of human anti-haemophilic factor IX. EMBO J 1984; 3: 1053-60.

Antonarakis SE, Rossiter JP, Young M, Horst J, de Moerloose P, Sommer SS, Ketterling RP, Kazazian HH Jr, Negrier C, Vinciguerra C, Gitschier J, Goossens M, Girodon E, Ghanem N, Plassa F, Lavergne JM, Vidaud M, Costa JM, Laurian Y, Lin S-W, Lin S-R, Shen M-C, Lillicrap D, Taylor SAM, Windsor S, Valleix SV, Nafa K, Sultan Y, Delpech M, Vnencak-Jones CL, Phillips JA, Ljung RCR, Koumbarelis E, Gialeraki A, Mandalaki T, Jenkins PV, Collins PW, Pasi KJ, Goodeve A, Peake I, Preston FE, Schwartz M, Scheibel E, Ingerslev J, Cooper DN, Millar DS, Kakkar VV, Giannelli F, Naylor JA, Tizzano EF, Baiget M, Domenech M, Altisent C, Tusell J, Beneyto M, Lorenzo JI, Gaucher C, Mazurier C, Peerlinck K, Matthijs G, Cassiman JJ, Vermylen J, Mori PG, Acquila M, Caprino D and Inaba H. FVIII gene inversions in severe haemophilia A: results of an international consortium study. Blood 1995; 86: 2206-12.

Bacolla A, Wells RD. Non-B DNA conformations, genomic rearrangements, and human disease. J Biol Chem 2004; 279: 47411-4.

Bagnall RD, Giannelli F and Green PM. Int22h-related inversions causing hemophilia A: a novel insight into their origin and a new more discriminant PCR test for their detection. J Thromb Haemost 2006; 4: 591-98.

Bagnall RD, Giannelli F, Green PM. Polymorphism and hemophilia A causing inversions in distal Xq28: a complex picture. J Thromb Haemost 2005; 2: 2598-99.

Bagnall RD, Waseem N, Green PM, Giannelli F Recurrent inversion breaking intron 1 of the factor VIII gene is a frequent cause of severe Hemophilia A. Blood 2002; 99: 168-74.

Base de datos de HA, Factor VIII Variant Database: http://www.factorviii-db.org

Base de datos de HB, Factor IX Variant Database: http://www.factorix.org

Been MD, Burgess RR, Champoux JJ. Nucleotide sequence preference at rat liver and wheat germ type 1 DNA topoisomerase breakage sites in duplex SV40 DNA. Nucleic Acids Res 1984; 12: 3097-114.

Berber E, Leggo J, Brown C, Berber E, Gallo N, Feilotter H, Lillicrap D. DNA microarray analysis for the detection of mutations in hemophilia A. J Thromb Haemost 2006; 4: 1756-62.

Biggs R, Douglas AS, Macfarlane RG, Dacie JV, Pitney WR, Merskey C. Christmas disease a condition previously mistaken for haemofilia. Br Med J 1952; 2: 1378-82.

Bowen DJ. Haemophilia A and haemophilia B: molecular insights. Mol Path 2002; 55: 1-18.

Casaña P, Haya S, Cid AR, Oltra S, Martínez F, Cabrera N, Aznar JA. Identification of deletion carriers in hemophilia B: quantitative real-time polymerase chain reaction or multiple ligation probe amplification. Transl Res 2009; 153: 114-7.

Chan K, Sasanakul W, Mellars G, Chuansumrit A, Perry D, Lee CA, Wong MS, Chan TK, Chan V. Detection of known haemophilia B mutations and carrier testing by microarray. Thromb Haemost 2005; 94: 872-8.

Chen X, Liang Y, Yan M, Liu JZ. Carrier diagnosis of F9 gross deletion by multiple ligation-dependent probe amplification in hemophilia B. Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi. 2012; 33: 1038-41.

Colnaghi R, Carpenter G, Volker M, O'Driscoll M. The consequences of structural genomic alterations in humans: genomic disorders, genomic instability and cancer. Semin Cell Dev Biol 2011; 22: 875-85.

Costa C, Jouannic JM, Stieltjes N, Costa JM, Girodon E, Goossens M. Quantitative real-time PCR assay for rapid identification of deletion carriers in hemophilia. Clin Chem 2004; 50: 1269-70.

Costantino L, Sotiriou SK, Rantala JK, Magin S, Mladenov E, Helleday T, Haber JE, Iliakis G, Kallioniemi OP, Halazonetis TD. Break-induced replication repair of damaged forks induces genomic duplications in human cells. Science 2014; 343:88-91

De Brasi CD, Bowen DJ. Molecular characteristics of the intron 22 homologs of the coagulation factor VIII gene: an update. J Thromb Haemost 2008; 6: 1822-24.

De Brasi CD, Candela M, Cermelj M, Larripa LB., Pérez Bianco R, de Tezanos Pinto M Intron 22 factor VIII gene inversions in Argentine patients with severe haemophilia A. Haemophilia 2000; 6: 21-2.

Deininger PL, Batzer MA. Alu repeats and human disease. Mol Genet Metab 1999; 67: 183-93.

Di Scipio RG, Kurachi K, Davie EW. Activation of human factor IX (Christmas factor). J Clin Invest 1978; 61: 1528–38.

Edelmann J, Deichsel D, Hering S, Plate I, Szibor R. Sequence variation and allele nomenclature for the X-linked STRs DXS9895, DXS8378, DXS7132, DXS6800, DXS7133, GATA172D05, DXS7423 and DXS8377. Forensic Sci Int 2002; 129: 99-103.

El-Hattab AW, Fang P, Jin W, Hughes JR, Gibson JB, Patel GS, Grange DK, Manwaring LP, Patel A, Stankiewicz P, Cheung SW. Int22h-1/int22h-2-mediated Xq28 rearrangements: intellectual disability associated with duplications and in utero male lethality with deletions. J Med Genet 2011; 48: 840-50.

El-Hattab AW, Schaaf CP, Fang P, Roeder E, Kimonis VE, Church JA, Patel A, Cheung SW. Clinical characterization of int22h1/int22h2-mediated Xq28 duplication/deletion: new cases and literature review. BMC Med Genet 2015; 16: 12.

Fimiani G, Laperuta C, Falco G, Ventruto V, D'Urso M, Ursini MV, Miano MG. Heterozygosity mapping by quantitative fluorescent PCR reveals an interstitial deletion in Xq26.2-q28 associated with ovarian dysfunction. Hum Reprod 2006; 21: 529-35.

Ganguly A, Rock MJ, Prockop DJ. Conformation-sensitive gel electrophoresis for rapid detection of single-base differences in double-stranded PCR products and DNA fragments: evidence for solvent-induced bends in DNA heteroduplexes. Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90: 10325-9.

Gitschier J, Wood WI, Goralka TM, Wion KL, Chen EY, Eaton DH, Vehar GA, Capon DJ, Lawn RM. Characterization of the Human factor VIII gene. Nature 1984; 312: 326-30.

Gonzaga-Jauregui C, Lupski JR, Gibbs RA. Human genome sequencing in health and disease. Annu Rev Med 2012; 63: 35-61.

Graw J, Brackmann HH, Oldenburg J, Schneppenheim R, Spannagl M, Schwaab R. Haemophilia A: from mutation analysis to new therapies. Nat Rev Genet 2005; 6: 488-501.

Green P, Hill M, Bowen DJ and the UK hemophilia centre doctors´ organization hemophilia genetics network. Duplication involving int22h-1 of the factor VIII gene: a cause for concern in genetic testing for hemophilia A?. J Thromb Haemost 2007; 5: 2155-56.

Haldane JB. The rate of spontaneous mutation of human gene. J Genet 1935; 83: 235-44.

Hastings PJ, Ira G, Lupski JR. A microhomology-mediated break-induced replication model for the origin of human copy number variation. PLoS Genet 2009; 5: e1000327.

Holliday R. A mechanism for gene conversion in fungi. Genet Res 1964; 5: 282-304.

Hoyer LW. Medical Progress: Hemophilia A. N Engl J Med 1994; 330: 38-47.

Iafrate AJ, Feuk L, Rivera MN, Listewnik ML, Donahoe PK, Qi Y, Scherer SW, Lee C. Detection of large-scale variation in the human genome. Nat Genet 2004; 36: 949-51.

Igram GIC. The history of haemophilia. J Clin Path 1976; 29: 469-79.

Janczar S, Fogtman A, Koblowska M, Baranska D, Pastorczak A, Wegner O, Kostrzewska M, Laguna P, Borowiec M, Mlynarski W. Novel severe hemophilia A and moyamoya (SHAM) syndrome caused by Xq28 deletions encompassing F8 and BRCC3 genes. Blood 2014; 123: 4002-4.

Jurka J. Sequence patterns indicate an enzymatic involvement in integration of mammalian retroposons. Proc Natl Acad Sci USA 1997; 94: 1872-7.

Kazazian HH Jr. Mobile elements: drivers of genome evolution. Science 2004; 303: 1626-32.

Kurachi K, Davie EW. Isolation and characterization of a cDNA coding for human factor IX. Proc Natl Acad Sci USA 1982; 79: 6461-4.

Lahiri DK, Nuremberg JI. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. Nucleic Acids Res 1991; 19: 5444.

Lakich D, Kazazian HH, Antonarakis SE, Gitschier J. Inversions disrupting the factor VIII gene are common cause of severe Haemophilia A. Nature Genet 1993; 5: 236-41.

Lander ES and International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature 2001; 409: 860-921.

Lannoy N, Abinet I, Dahan K, Hermans C. Identification of de novo deletion in the factor VIII gene by MLPA technique in two girls with isolated factor VIII deficiency. Haemophilia 2009; 15: 797-801.

Lannoy N, Grisart B, Eeckhoudt S, Verellen-Dumoulin C, Lambert C, Vikkula M, Hermans C. Intron 22 homologous regions are implicated in exons 1-22 duplications of the F8 gene. Eur J Hum Genet 2013; 2: 970-6.

Lee JA, Carvalho CM, Lupski JR. A DNA replication mechanism for generating nonrecurrent rearrangements associated with genomic disorders. Cell 2007; 131: 1235-47.

Lewis T, Pont-Kingdon G, Louie Y, Swenson J. Interference with IS-PCR assays for Inv22 Testing of Hemophilia A. ASGH 2012; pp: 242.

Liang Y, Zhao Y, Yan M, Fan XP, Xiao B, Liu JZ.. Prenatal diagnosis of haemophilia A in China. Prenat Diagn 2009; 29: 664-7.

Liu P, Carvalho CM, Hastings PJ, Lupski JR. Mechanisms for recurrent and complex human genomic rearrangements. Curr Opin Genet Dev 2012; 22: 211-20.

Liu Q, Nozari G, Sommer SS. Single-tube polymerase chain reaction for rapid diagnosis of the inversion hotspot of mutation in haemophilia A. Blood 1998; 92: 1458-9.

Lupski JR. Genomic disorders: structural features of the genome can lead to DNA rearrangements and human disease traits. Trends Genet 1998; 14: 417-22.

Lupski JR. Structural variation mutagenesis of the human genome: Impact on disease and evolution. Environ Mol Mutagen. 2015; Epub ahead of print.

Machado FB, Alves Da Silva AF, Rossetti LC, De Brasi CD, Medina-Acosta E. Informativeness of a novel multiallelic marker-set comprising an F8 intron 21 and three tightly linked loci for haemophilia A carriership analysis. Haemophilia 2011; 17: 257-66.

Machado FB, Medina-Acosta E. High-resolution combined linkage physical map of short tandem repeat loci on human chromosome band Xq28 for indirect haemophilia A carrier detection. Haemophilia 2009; 15: 297-308.

Malkova A, Ira G. Break-induced replication: functions and molecular mechanism. Curr Opin Genet Dev 2013; 23: 271-9.

Miskinyte S, Butler MG, Hervé D, Sarret C, Nicolino M, Petralia JD, Bergametti F, Arnould M, Pham VN, Gore AV, Spengos K, Gazal S, Woimant F, Steinberg GK, Weinstein BM, Tournier-Lasserve E. Loss of BRCC3 deubiquitinating enzyme leads to abnormal angiogenesis and is associated with syndromic moyamoya. Am J Hum Genet 2011; 88: 718-28.

Moore JK, Haber JE. Cell cycle and genetic requirements of two pathways of nonhomologous end-joining repair of double-strand breaks in Saccharomyces cerevisiae. Mol Cell Biol 1996; 16: 2164-73.

Mühle C, Zenker M, Chuzhanova N, Schneider H. Recurremt inversion with concomitant deletion and insertion events in the coagulation factor VIII gene suggests a new mechanism for X-chromosomal rearrangements causing hemophilia A. Hum Mutat 2007; 28: 1045.

Naylor J, Brinke A, Hassock S, Green PM, Giannelli F. Characteristic mRNA abnormality found in half the patients with severe Haemophilia A is due to large inversions. Hum Mol Genet 1993; 2: 1773-78.

Naylor J, Buck D, Green PM, Williamson H, Bentley D, Giannelli F. Investigation of the factor VIII intron 22 repeated region (int22h) and the associated inversion junctions. Hum Mol Genet 1995; 4: 1217-24.

Ochman H, Gerber AS, Hartl DL. Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. Genetics 1988; 120: 621-3.

Oldenburg J, Schroder J, Hermann Brackmann H, Muller-Reible C, Schwaab R, Tuddenham E. Environmental and genetic factors influencing inhibitor development. Semin Hematol 2004; 41(1 Suppl 1):82-8.

Pavlovsky A. Contribution to the pathogenesis of hemophilia. Blood 1947; 2: 185-91.

Pegoraro E, Whitaker J, Mowery-Rushton P, Surti U, Lanasa M, Hoffman EP. Familial skewed X inactivation: A molecular trait associated with high spontaneous-abortion rate maps to Xq28. Am J Hum Genet 1997; 61: 160-70.

Peretz H, Usher S, Martinovitz U, Seligsohn U. Factor VIII gene rearrangement in hemophilia A carrier detection: A word of caution. Blood 1994; 84: 1351-52.

Pezeshkpoor B, Rost S, Oldenburg J, El-Maarri O. Identification of a third rearrangement at Xq28 that causes severe hemophilia A as a result of homologous recombination between inverted repeats. J Thromb Haemost 2012; 10: 1600-8.

Radic CP, Rossetti LC, Abelleyro MM, Candela M, Pérez Bianco R, de Tezanos Pinto M, Larripa IB, Goodeve A, De Brasi C. Assessment of the F9 genotype-specific FIX inhibitor risks and characterisation of 10 novel severe F9 defects in the first molecular series of Argentinian patients with haemophilia B. Thromb Haemost 2013; 109: 24-33.

Radic CP, Rossetti LC, Zuccoli JR, Abelleyro MM, Larripa IB and De Brasi CD. Inverse shifting PCR based prenatal diagnosis of hemophilia-causative inversions involving int22h and int1h hotspots from chorionic villus samples. Prenatal Diagnosis 2009; 29: 1183-5.

Rallapalli PM, Orengo CA, Studer RA, Perkins SJ. Positive selection during the evolution of the blood coagulation factors in the context of their disease-causing mutations. Mol Biol Evol 2014; 31: 3040-56.

Rallapalli PM, Kemball-Cook G, Tuddenham EG, Gomez K, Perkins SJ. An interactive mutation database for human coagulation factor IX provides novel insights into the phenotypes and genetics of hemophilia B. J Thromb Haemost 2013; 11: 1329-40.

Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, Feuk L, Perry GH, Andrews TD, Fiegler H, Shapero MH, Carson AR, Chen W, Cho EK, Dallaire S, Freeman JL, González JR, Gratacòs M, Huang J, Kalaitzopoulos D, Komura D, MacDonald JR, Marshall CR, Mei R, Montgomery L, Nishimura K, Okamura K, Shen F, Somerville MJ, Tchinda J, Valsesia A, Woodwark C, Yang F, Zhang J, Zerjal T, Zhang J, Armengol L, Conrad DF, Estivill X, Tyler-Smith C, Carter NP, Aburatani H, Lee C, Jones KW, Scherer SW, Hurles ME. Global variation in copy number in the human genome. Nature 2006; 444: 444-54.

Rocha P, Carvalho M, Lopes M, Araújo F. Costs and utilization of treatment in patients with hemophilia. BMC Health Serv Res 2015; 15: 484.

Ross MT and International Human Genome Sequencing Consortium. The DNA sequence of the human X chromosome. Nature 2005; 434: 325-37.

Rossetti LC, Candela M, Bianco RP, De Tezanos Pinto M, Western A, Goodeve A, Larripa IB and De Brasi CD. Analysis of factor VIII gene intron 1 inversion in Argentinian families with severe haemophilia A and a review of the literature. Blood Coagul Fibrinolysis 2004; 15: 569-72.

Rossetti LC, Goodeve A, Larripa IB, De Brasi CD. Homeologous recombination between AluSx-sequences as a cause of hemophilia. Human mutation 2004; 24: 440.

Rossetti LC, Radic CP, Abelleyro MM, Larripa IB, De Brasi CD. Eighteen years of molecular genotyping the hemophilia inversion hotspot: from southern blot to inverse shifting-PCR. Int J Mol Sci 2011; 12: 7271-85.

Rossetti LC, Radic CP, Candela M, Pérez Bianco R, de Tezanos Pinto M, Goodeve A, Larripa IB, De Brasi CD. Sixteen novel hemophilia A causative mutation in the first Argentinian series of severe molecular defects. Haematologica 2007; 92: 842-5.

Rossetti LC, Radic CP, Larripa IB, De Brasi CD. Developing e new generation of tests dor genotyping hemophilia-causative rearrangements involving int22h and int1h hotspots in the factor VIII gene. J Thromb Haemost 2008; 6: 830-6.

Rossetti LC, Radic CP, Larripa IB and De Brasi CD. Genotyping the hemophilia inversion hotspot by use of inverse PCR. Clinical Chemistry 2005; 51: 1154-8.

Rossetti LC, Szurkalo I, Radic CP, Abelleyro MM, Primiani L, Neme D, Candela M, Bianco RP, de Tezanos Pinto M, Larripa IB, De Brasi CD. Factor VIII genotype characterization of haemophilia A affected patients with transient and permanent inhibitors: a comprehensive Argentine study of inhibitor risks. Haemophilia 2013; 19: 511-8.

Rossiter JP, Young M, Kimberland L, Hutter P, Ketterling RP, Gitschier J, Horst J, Morris MA, Schaid J, Moerloose P, Sommer SS, Kazazian HH, Antonarakis SE. Factor VIII gene inversions causing severe Hemophilia A originate almost exclusively in male germ cells. Hum Molec Genet 1994; 3:1035-9.

Rothkamm K, Krüger I, Thompson LH, Löbrich M. Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. Mol Cell Biol 2003; 23: 5706-15.

Rüdriger NS, Gregersen N, Kielland-Brand MC. One short well conserved region of Alu-sequences is involved in human gene rearrangements and has homology with procaryotic chi. Nucleic Acids Res 1995; 23: 256-60.

Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T. Molecular Cloning: a laboratory manual 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA, 1989. ISBN 0-87969-309-6. pp: 1659.

Sheen CR, Jewell UR, Morris CM, Brennan SO, Férec C, George PM, Smith MP, Chen JM. Double complex mutations involving F8 and FUNDC2 caused by distinct break-induced replication. Hum Mutat 2007; 28: 1198-206.

Slack A, Thornton PC, Magner DB, Rosenberg SM, Hastings PJ. On the mechanism of gene amplification induced under stress in Escherichia coli. PLoS Genet 2006; 2: e48.

Smith CE, Llorente B, Symington LS. Template switching during break-induced replication. Nature 2007; 447: 102–5.

Szostak JW, Orr-Weaver TL, Rothstein RJ, Stahl FW. The double-strand break repair model for recombination. Cell 1983; 33: 25-35.

Tizzano EF, Barceló MJ, Baena M, Cornet M, Venceslá A, Mateo J, Fontcuberta J, Baiget M. Rapid identification of female haemophilia A carriers with deletions in the factor VIII gene by quantitative real-time PCR analysis. Thromb Haemost 2005; 94: 661-4.

Tizzano EF, Domenech M, Altisent C, Tusell J, Baiget M. Inversions in the factor VIII gene in Spanish Hemophilia A patients. Blood 1994a; 83: 3826.

Tuddenham EG, Schwaab R, Seehafer J, Millar DS, Gitschier J, Higuchi M. Haemophilia A: database of nucleotide substitutions, deletions, insertions and rearrangements of factor VIII gene, second edition. Nucleic Acids Res 1994; 22: 4851-68.

Van de Water N, Williams R, Ockelford P, Browett P. A 20.7 kb deletion within the factor VIII gene associated with LINE-1 element insertion. Thromb Haemost 1998; 79: 938-42.

Vehar GA, Keyt B, Eaton D, Rodríguez H, O'Brien DP, Roblat F, Oppermann H, Keck R, Wood WL, Harkins RN, Tuddenham EGD, Lawn RM, Capon J. Structure of Human factor VIII. Nature 1984; 312: 337-42.

Vidal F, Farssac E, Tusell J, Puig L, Gallardo D. First molecular characterization of an unequal homologous alu-mediated recombination event responsible for hemophilia. Thromb Haemost 2002; 88: 12-6.

Vissers LE, Bhatt SS, Janssen IM, Xia Z, Lalani SR, Pfundt R, Derwinska K, de Vries BB, Gilissen C, Hoischen A, Nesteruk M, Wisniowiecka-Kowalnik B, Smyk M, Brunner HG, Cheung SW, van Kessel AG, Veltman JA, Stankiewicz P. Rare pathogenic microdeletions and tandem duplications are microhomology-mediated and stimulated by local genomic architecture. Hum Mol Genet 2009; 18: 3579-93.

Vogel F, Motulsky AG. Human Genetics. Problems and Approaches. Third edition 1997. Springer-Verlag Berlin.

Vogel F. A probable sex difference in some mutation rates. Am J Hum Genet 1977; 29: 312-19.

Weaver DT, DePamphilis ML. Specific sequences in native DNA that arrest synthesis by DNA polymerase alpha. J Biol Chem 1982; 257: 2075-86.

Weckselblatt B, Rudd MK. Human Structural Variation: Mechanisms of Chromosome Rearrangements. Trends Genet 2015; 31: 587-99.

Wenli Gu, Feng Zhang and James R Lupski. Mechanisms for human genomic rearrangements. Pathogenetics. 2008; 1: 4.

White GC, Rosendaal F, Aledort LM, Lusher JM, Rothschild, Ingerslev J. Definitions in hemophilia. Recommendation of scientific subcommittee on factor VIII and factor IX of the scientific and standardization committee of the international society on thrombosis and haemostasis. Thromb Haemost 2001; 85: 560.

Windsor S, Taylor SAM, Lillicrap D. Direct detection of a common inversion mutation in the genetic diagnosis of severe hemophilia A. Blood 1994; 84(7): 2202-05.

Wood WL, Capon DJ, Simonsen CC, Eaton DL, Gitschier J, Keyt B, Seeburg PH, Smith DH, Hollingshead P, Wion KL, Delwart E, Tuddenham EGD, Vehar GA, Lawn RM. Expression of active Human factor VIII from recombinant DNA clones. Nature 1984; 312: 330-6.

Woods-Samuels P, Kazazian HH Jr, Antonarakis SE. Nonhomologous recombination in the human genome: deletions in the human factor VIII gene. Genomics 1991; 10: 94-101.

World Federation of Hemophilia. Report on the annual global survey 2014. René Lévesque Boulevard West, Montreal, Quebec H3G1T7. 2015; pp: 17-22.

Wright AE. Upon a New Styptic, and upon the Possibility of Increasing the Coagulability of the Blood in the Vessels in Cases of Haemophilia and Aneurysm and Internal Haemorrhage. Br Med J 1891; 2: 1306-8.

Wright IS. The nomenclature of blood clotting factors. Can Med Assoc J 1962; 86: 373-4.

Yoshitake S, Schach BG, Foster DC, Davie EW, Kurachi K. Nucleotide sequence of the gene for human factor IX (antihemophilic factor B). Biochemistry 1985; 24: 3736-50.

You GL, Ding QL, Lu YL, Dai J, Xi XD, Wang XF, Wang HL. Characterization of large deletions in the F8 gene using multiple competitive amplification and the genome walking technique. J Thromb Haemost 2013; 11: 1103-10.

Zhang F, Khajavi M, Connolly AM, Towne CF, Batish SD, Lupski JR. The DNA replication FoSTeS/MMBIR mechanism can generate genomic, genic and exonic complex rearrangements in humans. Nat Genet 2009; 41: 849-53.

Zimmermann MA, Oldenburg J, Müller CR, Rost S. Unusual genomic rearrangements in introns 1 and 22 of the F8 gene. Hamostaseologie 2011; 31: 69-73.

ANEXO

CAPÍTULO IV: *Ajuste de amplificación de blancos genómicos específicos*

El ajuste de amplificación de los mojones, diseñados para el análisis por bipartición de distancias, tiene como objetivo la obtención de un producto PCR específico en el que sea clara su ausencia o presencia de estar o no involucrado en la deleción, respectivamente en el paciente hemicigota. Porque al estar diseñados en regiones no estudiadas en profundidad del genoma, regiones extragénicas o intrónicas, pueden presentar inespecíficos que dificulten o conduzcan a errores en la interpretación de los resultados.

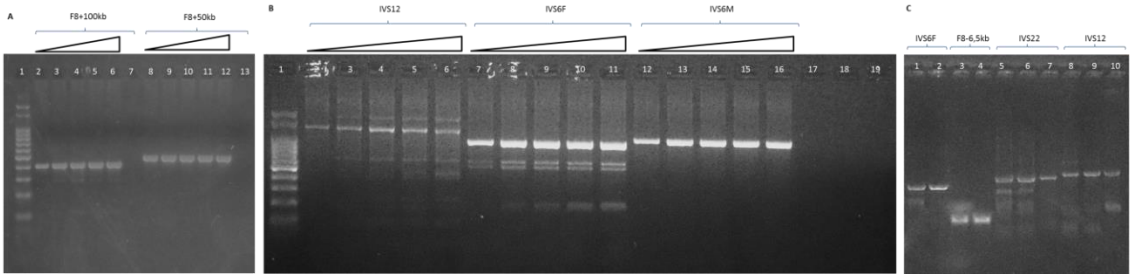


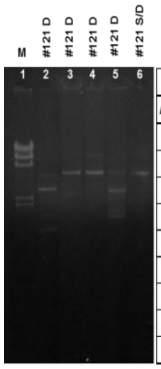
Figura AN.1. Puesta a punto de los mojones (*tags*). Geles de agarosa (1,5%) que muestra toda la variedad de señales obtenidas en la puesta a punto de los mojones utilizados en el Capítulo IV, en todos los casos para la puesta a punto se utilizó un varón de la población Argentina general (CN81). **A, B.** Muestran la puesta a punto por gradiente de concentración 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 y 1,0µM (calles 2-6 y 8-12, A y calles 2-6, 7-11 y 12-16, B). **C.** Muestra el ajuste realizado por temperatura de algunos de los mojones del gel B (IVS6F e IVS12) y otros no mostrados, las temperaturas utilizadas fueron 53°C (calles 3, 5, 8), 55°C (calles 1, 4, 6, 9) y 59°C (calles 2, 6, 10).

CAPÍTULO IV: Análisis de restricción de rearreglos genómicos.

El análisis de restricción se realiza sobre un producto PCR específico de la deleción con extremos conocidos, determinados por los *primers*, y una región desconocida que contiene el sitio de ruptura del rearreglo (zona de incerteza) con un tamaño estimado conocido. Con los resultados del patrón de restricción del producto PCR y los patrones de restricción de la región definida por cada uno de los *primers* en la secuencia de referencia se pueden determinar aquellos fragmentos de restricción que se conservan y aquellos que no se conservan que representan los involucrados en la deleción acotando la zona de incerteza a este fragmento.

Caso #121, Ex3_26del

Los resultados del análisis de restricción del producto LD-PCR deleción-específico se muestran en la Figura AN.2 indicando las enzimas usadas (*Bcl*I, *Eco*RI, *Bam*HI y *Hind*III) y los tamaños moleculares aproximados estimados por el programa GelPro.



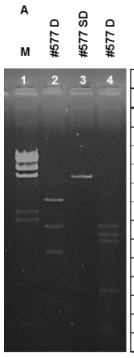
Calle 1	Calle 2	Calle 3	Calle 4	Calle 5	Calle 6
λ ADN *Hind* III	*Bcl*I dig.	*Bam* HI dig	*Hind* III dig.	*Eco*RI dig.	Sin dig.
23130					
9416					
6557					
4361		4361	4361		4361
	2834			2641	
2322					
2027					
				1584	
	1275				

Figura AN.2. Análisis de restricción del producto de amplificación LD-PCR. Panel izq. Electroforesis en gel de agarosa del producto LD-PCR específico de la deleción, D digerido o S/D sin digerir con las enzimas indicadas en el panel derecho y los tamaños correspondientes estimados por GelPro.

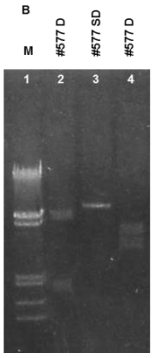
La presencia del sitio de restricción *Eco*RI (Figura AN.2) permitió acotar la incerteza de la región extragénica a una región ubicada en el mojón F8+3,5kb. Asimismo se diseñó un mojón dentro del intrón 2 del *F8* (IVS2). Aunque el producto de amplificación IVS2 resultó negativo se intentó obtener una amplificación positiva con los *primers* IVS2-up y F8+3,5kb-lo y se obtuvo un producto específico de la deleción 661pb (Figura C4.6).

Caso #570, Ex10del

La Figura AN.3 muestra el análisis de restricción del producto específico del alelo Ex10del (Figura C4.4). El análisis de restricción permitió determinar la presencia de los sitios *Bcl*I (1) y *Taq*I (3) (Figura C4.10) y diseñar dos *primers* (IVS9-up y Del10_IVS10-lo) cercanos ambos sitios para obtener un producto PCR estándar específico de la deleción (Figura C4.11).



Calle 1	Calle 2	Calle 3	Calle 5
λ ADN *Hind* III	*Nco*I dig.	Sin dig.	*Taq* I dig.
23130			
9416			
6557		6193	
4361			
2322	2967		
2027	1861		
			1861
	1388		1709
			1569
		546	856
564			528



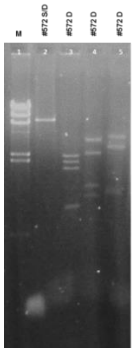
Calle 1	Calle 2	Calle 3	Calle 5
λ ADN *Eco* RI/*Hind* III	*Eco* RI dig.	Sin dig.	*Bcl*I dig.
21226			
5148		6834	
4268	4491		
3530			3405
			2911
2027			
1904	1843		
1584			
1375			
938			

Figura AN.3. Análisis de restricción del producto de amplificación LD-PCR de la Ex10del. A y B: Der. Tabla de análisis de tamaño de los fragmentos de restricción; Izq. electroforesis en gel de agarosa con los productos de la LD-PCR y los productos de la digestión. D, digerido; S/D, sin digerir

Casos #572/#575, Ex7_12del.

La Figura AN.4 muestra el análisis de restricción verificándose la presencia de los sitios de restricción *Taq*I (3) y *Eco* RI (5) (Figura C4.16), acotando la incerteza de la deleción y permitiendo el diseño de dos nuevos *primers* (IVS6M-new e IVS12-new) por

detrás de estos sitios para amplificar el sitio de ruptura con una PCR de tamaño estándar (Figura C4.17) que resultó de 1.446pb.

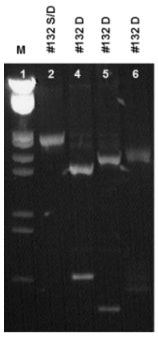


Calle 1	Calle 2	Calle 3	Calle 4	Calle 5
λ ADN *Hind* III	Sin dig.	*Eco* RI dig.	*Nco* I dig.	*Taq* I dig.
23130				
9416				
6557	7754			
4361				
			3249	3584
2322		2169	2283	2635
2027		1907		
		1680		
			1158	1057
		779/754	965	
564				

Figura AN.4. Análisis de restricción del producto LD-PCR Ex7_12del. Der. Electroforesis en gel de agarosa, **Izq**. tabla de análisis de tamaños por GelPro y referencias del gel de agarosa.

Caso #132, Ex10_18del

Los resultados de la digestión del producto Ex10_18del-específico (Figura C4.4) mostrando la presencia de los sitios *Taq*I (1) y *Bam* HI (1) (Figura C4.19). En este caso se diseñaron dos *primers* por delante de los sitios de restricción, intentando evitar regiones ricas en elementos repetitivos, para la obtención de un producto PCR acotado. Se obtuvo una señal específica de 344pb cuya secuencia se muestra en la Figura C4.20.

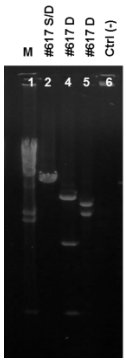


Calle 1	Calle 2	Calle 3	Calle 4	Calle 5
λ ADN *Eco* RI-*Hind* III	Sin dig.	*Bam* HI dig.	*EcoR*I dig.	*Taq*I dig.
21226				
5148				
4973				
4268				
3530				
2027	1980			
1904				
1584		1409	1551	1468
1375				
947				
564		571	429	512
125				

Figura AN.5. Análisis de restricción del producto LD-PCR Ex10_18del. Der. Se muestra la electroforesis en gel de agarosa al 1% con los patrones de restricción. **Izq**. Se presenta una tabla con el análisis de los tamaños de los fragmentos de restricción.

Caso #617, Ex5_7del

El resultado LD-PCR-RFLP (Figura AN.6) del producto de amplificación Ex5_7del-específico (Figura C4.4) confirmó la presencia de los sitios de restricción de las enzimas *Bcl*I (2) y *Eco*RI (2) (Figura C4.21). Se diseñaron dos *primers* (H617_Del-up y H700_Del-lo) con los que se obtuvo una señal alelo específica de la deleción de 1.670pb (Figura C4.22).

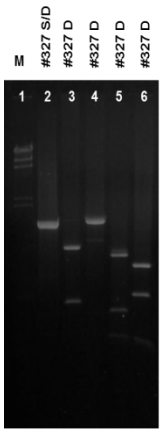


Calle 1	Calle 2	Calle 3	Calle 4
λ ADN *Hind* III	Sin dig.	*Bcl*I dig.	*EcoR*I dig.
23130			
9416			
6557	5024		
4361			
		3456	2946
2322			2390
2027			
		1467	
564		572	

Figura AM.6. Análisis de restricción del producto Ex5_7del-especifico. Der. Electroforesis en gel de agarosa. **Izq**. Tabla con análisis de tamaños de los fragmentos de restricción.

Caso #327, Ex1del compleja

La Figura AN.7 muestra los resultados del análisis RFLP sobre los productos LD-PCR de la Ex1del compleja (Figura C4.4). El análisis de restricción mostró el sitio *Bcl*I (3) en el intrón 1 y los sitios de restricción *Taq*I (1) y *Sma*I (1) en la región extragénica río arriba del *F8*. Con estos resultados se logró acotar la incerteza de la deleción y se diseñó dentro del intrón 1 un *primer* cercano al sitio *Bcl*I positivo (IVS1ID-new). Las características de la región (rica en elementos repetitivos) obligó diseñar un *primer* (F8-3,8kb-new) dentro de la zona de incerteza, aunque cercano al ultimo sitio de restricción positivo (*Sma*I). Con estos dos nuevos *primers* diseñados se obtuvo un producto PCR de tamaño estándar, 363pb, conteniendo al sitio de recombinación (Figura C4.25).



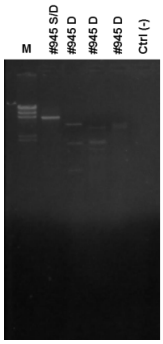
Calle 1	Calle 2	Calle 3	Calle 4	Calle 5	Calle 6
λ ADN *Hind* III	Sin dig.	*Bcl*I dig.	*Swa* I dig.	*Taq* I dig.	*Sma* I dig.
23130					
9416					
6557					
4361					
2322					
2027					
	1540		1540		
		1061		951	
					817
		546		509	581
				426	421

Figura AN.7. Análisis de restricción del producto LD-PCR de la Ex1del compleja. Der. Electroforesis en gel de agarosa con los patrones de restricción del producto LD-PCR conteniendo la deleción (muestra #327). **Izq.** Referencias y resultados del análisis de tamaño realizado con el programa GelPro del gel de la derecha.

Caso #945, Ex1del-parcial

Los resultados del análisis de restricción del producto LD-PCR de la Ex1del-parcial se muestran en la Figura AN.8. Estos resultados permitieron cercar la deleción 2kb río arriba del *F8* y se diseñó un *primer* (2kbN945) cercano al sitio *Bcl*I (1) (Figura C4.27). Sin embargo, en la región intragénica no fue posible cercar la deleción con el análisis de restricción. Se realizó un acercamiento mediante amplificación con el *primer* 1-IU y

distintos *primers* enfrentados (i.e., P1A y P2A) para lograr acotar la región del intrón 1 involucrada (Figura C4.28).

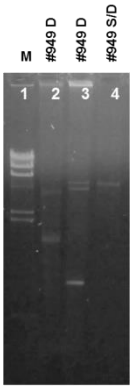


Calle 1	Calle 2	Calle 3	Calle 4	Calle 5
λ ADN *Hind* III	Sin dig.	*Bcl*I dig.	*Swa*I dig.	*Taq*I dig.
23130				
9416				
6557	5024			
4361				
		3643	3012	3117/2719
2322				
2027				
		1783	1779	
			1460	
		833		
564				

Figura AN.8. Análisis de restricción del producto de la Ex1del-parcial. Der. Electroforesis en gel de agarosa con los patrones de restricción de la muestra #945. **Izq.** Tabla con el de análisis de tamaño de los fragmentos de restricción.

Caso #949, Ex1del-68kb

El análisis de restricción del producto LD-PCR de la Ex1del-68kb permitió cercar la deleción y diseñar dos nuevos *primers* (F8-68kb-new e IVS1IU-new) cercanos a los sitios de restricción que no involucrados, *Bcl*I (1) y *Taq*I (1) (Figura C4.30). El diseño de los *primers* F8-68kb-new y IVS1IU-new fue restringido a regiones libres de elementos repetitivos, obteniéndose un producto PCR de 1.275pb (Figura C4.31).



Calle 1	Calle 2	Calle 3	Calle 4
λ ADN *Hind* III	*Taq*I dig.	*Bcl*I dig.	Sin dig.
23130			
9416			
6557			
4361		4799 S/D	4799
	3351	3952	
2322			
2027			
	1450		
		849	
564			

Figura AN.9. Análisis de restricción del producto LD-PCR de la Ex1del-68kb. Der. Análisis por electroforesis en gel de agarosa de la restricción del producto LD-PCR conteniendo la deleción (muestra #949). **Izq.** tabla con el de análisis de tamaños moleculares.