

[https://doi.org/10.24245/rev\\_hematol.v25id.10083](https://doi.org/10.24245/rev_hematol.v25id.10083)

## Identificación de la inversión del intrón 22 por medio de IS-PCR en dos familias con hemofilia A y B

### Identification of intron 22 inversion by IS-PCR in two families with hemophilia A and B.

Iveth Mendoza Salas,<sup>1</sup> Irma Olarte Carrillo,<sup>1</sup> Tatiana Sarai Rivera Domínguez,<sup>1</sup> Rafael Cerón Maldonado,<sup>1</sup> Adrián De la Cruz Rosas,<sup>1</sup> Juan Collazo Jaloma,<sup>1</sup> Carlos Martínez Murillo,<sup>2</sup> Adolfo Martínez Tovar<sup>1</sup>

#### Resumen

**ANTECEDENTES:** Las hemofilias son genopatías recesivas ligadas al cromosoma X que sobrevienen por deficiencia en la producción de los factores de coagulación. El objetivo de este estudio fue determinar la inversión del intrón 22 del factor 8 de la coagulación en dos familias con hemofilia A y B y su repercusión clínica.

**MATERIALES Y MÉTODOS:** Estudio observacional, descriptivo, que evaluó la alteración molecular en la inversión del intrón 22 en el gen que codifica para el factor VIII de la coagulación en tres familias con hemofilia A y B. Como control negativo se utilizaron individuos sanos. Se tomó muestra de sangre periférica de cada miembro de la familia y del paciente, se aislaron los leucocitos de los que se extrajo ADN. Se realizó por medio de la reacción en cadena de la polimerasa con desplazamiento inverso (IS-PCR) mediante restricción con la enzima BclII, los fragmentos digeridos fueron ligados con T4 ligasa y finalmente se realizó PCR inversa con primers específicos para los tipos 1 y 2 de la inversión del intrón 22.

**RESULTADOS:** En la familia 1, el paciente tuvo inversión del intrón 22 tipo 2, la madre fue positiva y portadora de ésta, una hija del paciente fue negativa a la inversión del intrón 22 y la otra positiva con tipo 2. En la familia 2 el paciente tuvo inversión del intrón 22 tipo 2, la hermana, madre y abuela del paciente eran portadoras de ésta y dos tías y una prima fueron negativas. En la familia 3, el paciente tenía hemofilia B moderada, dos hermanas y la madre fueron negativas para inversión del intrón 22. Los individuos sanos fueron negativos.

**CONCLUSIONES:** La inversión del intrón 22 tipo 2 fue la más frecuente en los pacientes con hemofilia A severa. La técnica de IS-PCR para el estudio de la inversión del intrón 22 constituye una herramienta útil y confiable en el análisis de pacientes y familias afectadas con hemofilia A severa porque permite caracterizar en una sola muestra de sangre el tipo de inversión del intrón 22 (tipo 1 o 2) del paciente.

**PALABRAS CLAVE:** Hemofilia; factores de coagulación; PCR.

#### Abstract

**BACKGROUND:** Hemophilias are recessive genopathies linked to the X chromosome that occur due to deficiency in the production of coagulation factors. The objective of this study was to determine the coagulation factor 8 intron 22 inversion (Inv22) in two families with hemophilia A and B and its clinical impact.

**MATERIALS AND METHODS:** Observational, descriptive study that evaluated the molecular alteration in intron 22 inversion in the gene that codes for coagulation factor VIII in three families with hemophilia A and B. Healthy individuals were negative controls. Peripheral blood samples were taken from each member of the family as well as from the patient, leukocytes were isolated from which DNA was extracted. *In situ*-PCR was performed by restriction with the enzyme BclII, the digested fragments were ligated with T4 ligase and finally inverse PCR was performed with specific primers for types 1 and 2 of intron 22 inversion.

<sup>1</sup> Laboratorio de Biología Molecular, Servicio de Hematología.

<sup>2</sup> Servicio de Hematología. Hospital General de México, Ciudad de México.

**Recibido:** 8 de abril 2024

**Aceptado:** 20 de agosto 2024

#### Correspondencia

Adolfo Martínez Tovar  
mtadolfo73@hotmail.com

#### Este artículo debe citarse como:

Mendoza-Salas I, Olarte-Carrillo I, Rivera-Domínguez TS, Cerón-Maldonado R, De la Cruz-Rosas A, Collazo-Jaloma J, Martínez Murillo C, Martínez-Tovar A. Identificación de la inversión del intrón 22 por medio de IS-PCR en dos familias con hemofilia A y B. Hematol Méx 2024; 25 (1): 11-17.

**RESULTS:** In family 1, the patient had intron 22 inversion type 2, the mother was positive and a carrier of Inv22 type 2; one the two daughters of the patient was negative for Inv22 and the other was positive for Inv22 with type 2. In family 2, the patient had Inv22 type 2, the patient's sister, mother and grandmother were carriers of Inv22 type 2, two aunts and a cousin were negative for Inv22. In family 3 the patient had moderate hemophilia B, two sisters and the mother were negative for Inv22. Healthy individuals were negative for intron 22 inversion.

**CONCLUSIONS:** Inv22 type 2 was the most frequent in patients with severe hemophilia A. The *in situ*-PCR technique for the study of Inv22 is a useful and reliable tool in the analysis of patients and families affected by severe hemophilia A, since it allows the characterization of the type of intron 22 inversion (type 1 or 2) of the patient in a single blood sample.

**KEYWORDS:** Hemophilia; Coagulation factors; PCR.

## ANTECEDENTES

Las hemofilias son genopatías recesivas ligadas al cromosoma X que sobrevienen por deficiencia en la producción de los factores de coagulación, como el factor VIII en hemofilia A y el factor IX en hemofilia B. El cuadro clínico incluye hemartrosis, hematomas musculares profundos y hemorragias cerebrales en un 95%, aunque pueden afectar cualquier parte del cuerpo.<sup>1,2,3</sup>

La prevalencia mundial aproximada de la hemofilia A es de 1 por cada 10,000 varones, representa entre el 80 y el 85% de la población total y en México se estiman aproximadamente 6300 casos al año; la cifra exacta se desconoce debido a que no existe un registro nacional metódico y completo.<sup>4,5</sup>

En el 70% de los casos es heredada, en el otro 30% es consecuencia de una mutación *de novo* cuya alteración será transmitida a su descendencia con el mismo patrón recesivo ligado al cromosoma X.<sup>6,7,8</sup> La concentración funcional

del factor permite clasificar la enfermedad en: grave: menos del 1% de la actividad del factor, moderada: del 1 al 5% de la actividad del factor y leve: del 5 al 40% de la actividad del factor. Entre los defectos moleculares implicados en el FVIII están las duplicaciones o eliminaciones, que abarcan uno o varios nucleótidos; el fenotipo de estos pacientes varía entre hemofilia moderada y severa.<sup>2,9,10</sup>

Guo y su grupo analizaron la concentración molecular de 216 familias con hemofilia A mediante 3 técnicas diferentes: reacción en cadena de la polimerasa (PCR), secuenciación de nueva generación y detección de ligandos múltiples.<sup>17</sup> Identificaron mutaciones en 209 familias; inversión del intrón 22 en 89 e inversión 1 en 5. No hubo inversiones en 115 familias, 42 mutaciones *de novo*, 29 variaciones nulas y 13 sin sentido, demostrado por bioinformática.<sup>11,12</sup>

En otro estudio se reportó que en la hemofilia A las alteraciones moleculares impiden la producción del factor VIII, como la inversión del intrón 22,

eliminaciones, mutaciones sin sentido, además de que se asocian con mayor frecuencia de inhibidores que aquéllos con eliminaciones.<sup>13,14,15</sup>

El objetivo de este estudio fue determinar la inversión del intrón 22 del factor 8 de la coagulación en dos familias con hemofilia A y B y su repercusión clínica.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Estudio observacional, descriptivo, que evaluó la alteración molecular en la inversión del intrón 22 en el gen que codifica para el factor VIII de la coagulación en tres familias con hemofilia A y B.

Se incluyeron 2 familias con hemofilia A y una con hemofilia B, así como 20 donadores sanos, mayores de edad, previa firma del consentimiento informado y con expediente clínico completo.

Se recolectaron muestras heparinizadas de sangre periférica de pacientes con hemofilia; para aislar los leucocitos de los eritrocitos se utilizó un buffer de lisis para eritrocitos (Roche AppliedScience). Los leucocitos obtenidos se lavaron dos veces con PBS 1X pH 7.4 y se almacenaron a -80°C hasta su utilización para la extracción de ADN.

El aislamiento de ADN genómico se hizo mediante el reactivo DNAzol (DNAzol® Reagent-Family, Life Technologies) siguiendo la técnica del distribuidor.

### Detección de la inversión del intrón 22 por IS-PCR

Para la detección de la inversión del intrón 22 en las familias con hemofilia se utilizó el protocolo descrito por Rosette y colaboradores. La digestión con la enzima de restricción *Bcl I* (Invitrogen) se hizo durante la noche. El ADN se extrajo en fenol, cloroformo y alcohol isoamílico y se precipitó en 0.3 mol/L KCl utilizado en el

protocolo de Rosette y su grupo. La ligación del ADN se efectuó durante la noche con la ligasa de ADN T4 (Fermentas, Alemania) seguida de la amplificación por PCR del ADN ligado. El ADN ligado se amplificó en condiciones de PCR estándar utilizando los primers IU (intragénico río arriba; 5'-CCTTTCAACTCCATCTCCAT-3'), el primer ID (intragénico río abajo; 5'-ACA-TACGGTTTGTAGTACAAGT-3') y el primer ED (extragénico río abajo; 5'-IC\_CAGTCACTTAGGCTCAG-3').

Brevemente, la PCR se llevó a cabo con 6 µL de ADN en un volumen de 25 µL, que contenía 0.5 U de ADN polimerasa Taq (Promega), 0.6 µM de cada primer, 200 µM de desoxinucleótidos trifosfatos, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub> y tampón de polimerasa Taq estándar [50 mM Tris-HCl (pH 9.0), 50 mM NaCl, 0.1 µg/µL de albúmina de suero bovino]. El paso de desnaturalización inicial de 2 min a 94 °C fue seguido por 30 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 55 °C durante un minuto y 72 °C durante 90 segundos; la extensión final fue a 72 °C durante 5 minutos.

### Análisis de restricción y electroforesis de productos de PCR

Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5% teñidos con midigreen y con marcador de peso de Invitrogen. Las imágenes del gel se documentaron con una cámara digital (HP Photosmart 735) equipada con filtros ultravioleta y las intensidades de las señales electroforéticas se estimaron mediante el programa de análisis GelPro 3.2 (Syrex).

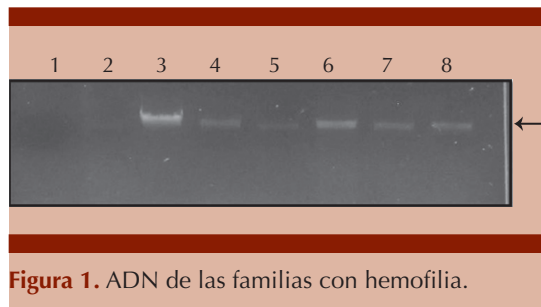
## RESULTADOS

Se analizaron 16 muestras derivadas de 3 familias con hemofilia, la separación de leucocitos de sangre periférica y el aislamiento del ADN se hizo mediante DNAzol (Invitrogen), se analizó la integridad del ADN mediante un gel de agarosa

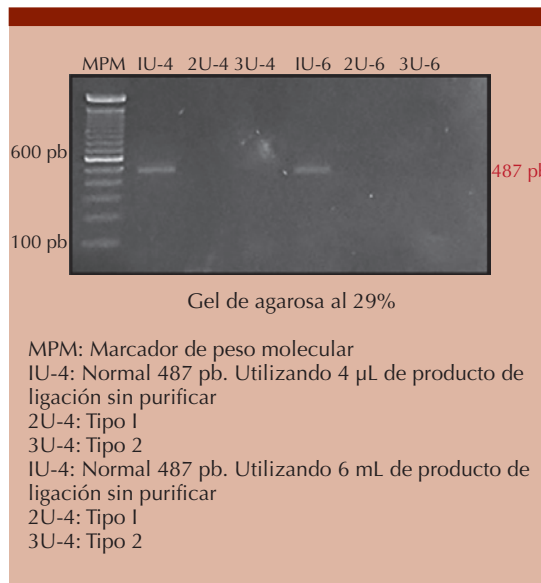
al 1% (**Figura 1**) y la concentración se cuantificó en un nanodrop (Thermo Scientific).

Se utilizó un control positivo previamente reportado para la estandarización de las condiciones de amplificación por medio de IS-PCR, los productos amplificados se visualizaron en un gel de agarosa al 1%. **Figura 2**

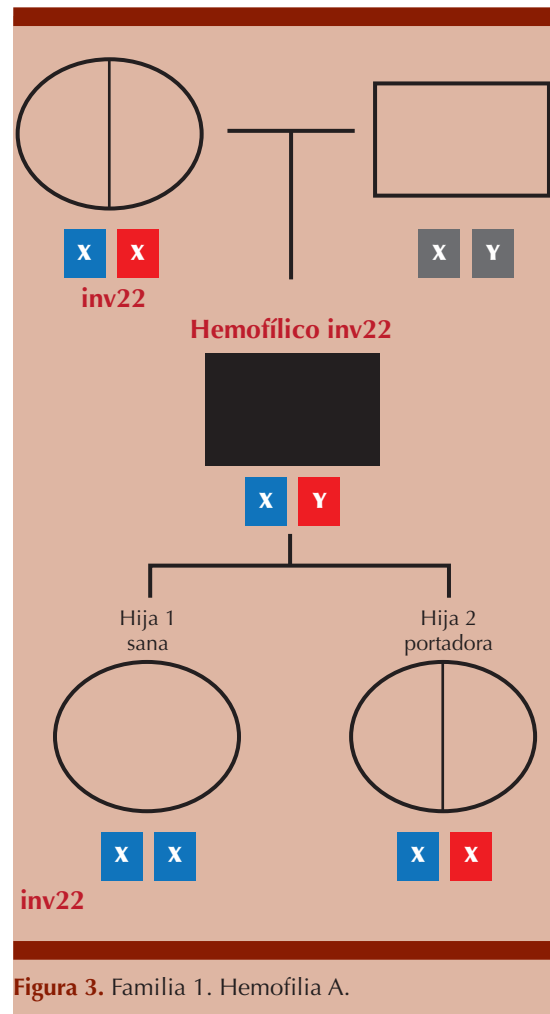
Al evaluar la familia 1, conformada por 5 miembros, se identificó la inversión del intrón 22 por IS-PCR en el paciente con hemofilia grave, así como en su madre y hermana, que fueron portadoras de la enfermedad. **Figura 3**



**Figura 1.** ADN de las familias con hemofilia.



**Figura 2.** Dos controles sanos de la amplificación del intrón 22 normal con 487 pb de producto de ligación sin purificar.



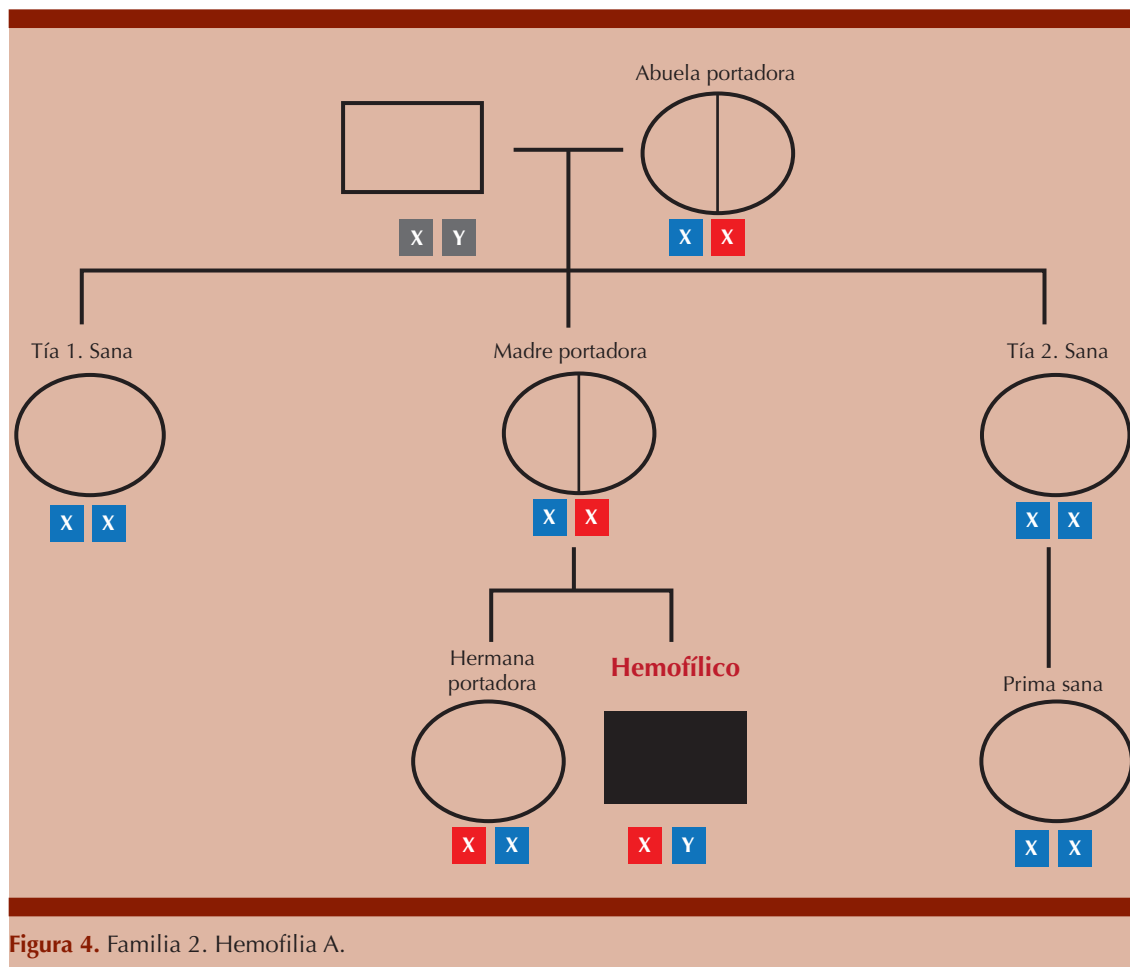
**Figura 3.** Familia 1. Hemofilia A.

En la familia 2, conformada por 7 miembros, el paciente con hemofilia A grave tuvo la inversión 22, así como 4 portadoras, los demás carecían de tal alteración. **Figura 4**

Ninguno de los miembros de la familia con hemofilia B y de los 20 donadores sanos tuvo la inversión del intrón 22. **Figura 5**

## DISCUSIÓN

La hemofilia A y B son enfermedades crónicas hereditarias de la coagulación, la primera es la más común de todas; ambas constituyen un reto



**Figura 4.** Familia 2. Hemofilia A.

importante a los sistemas de salud, debido a que el tratamiento patrón de referencia es la suplementación del factor deficiente, con la finalidad de mantener concentraciones del factor en plasma y así evitar los episodios de hemorragias espontáneas y, en consecuencia, el daño articular.<sup>16,17</sup>

El desarrollo de inhibidores es la complicación más adversa en el tratamiento de los pacientes con hemofilia, que impiden su efectividad, lo que aumenta su morbilidad y mortalidad drásticamente, a pesar de que en todo el mundo se han llevado a cabo múltiples estudios que intentan establecer una causa contundente, como los diversos factores de riesgo genéticos y ambientales.<sup>18,19,20</sup>

En este estudio se analizaron tres familias para identificar la inversión del intrón 22 en pacientes con hemofilia A y B del gen que codifica al factor VIII. De las tres familias ninguna tenía antecedentes familiares genéticos, descritos previamente, lo que fue relevante para comprender los posibles mecanismos genéticos asociados con la aparición de la enfermedad en estas familias, así como el asesoramiento genético correspondiente. Los resultados mostraron la inversión del intrón 22 en los pacientes con hemofilia A, así como en las portadoras.

Debido a la amplia heterogeneidad en los tipos de mutaciones que pueden afectar la funcionalidad y estructura del gen del FVIII, el proceso

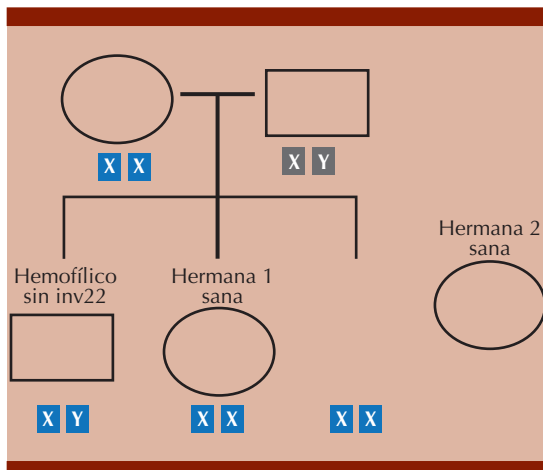


Figura 5. Familia 3. Hemofilia B.

diagnóstico de la población de estudio se hizo partiendo del análisis de la inversión del intrón 22 y, posteriormente, debería hacerse el abordaje de mutaciones *missense*, *nonsense*, inserciones, eliminaciones y de sitios de *splicing*, según recomendaciones de especialistas en el tema.<sup>22,23</sup>

En un estudio efectuado en población mexicana se observó que el 29% de los pacientes positivos para la inversión del intrón 22 desarrollaron inhibidores; sin embargo, al considerar un paciente por familia y hacer un análisis cruzado, se obtuvo un valor de OR a partir de 14 pacientes que confirmó que la inversión del intrón 22 no se observó en esta población como un factor de riesgo del desarrollo de inhibidores ( $p = 1.0$ ).<sup>23</sup>

En un estudio efectuado en población china se asociaron grandes eliminaciones y mutaciones *nonsense* con altos títulos de inhibidores (57.1 y 42.9%, respectivamente). La inversión del intrón 22, pequeñas inserciones y eliminaciones mostraron altos títulos de inhibidores con frecuencia del 20, 21.4 y 37.5%, respectivamente.<sup>24</sup>

### CONCLUSIONES

La inversión del intrón 22 de tipo II fue la más frecuente en los pacientes con hemofilia A

severa. La técnica de IS-PCR para el estudio de la inversión del intrón 22 constituye una herramienta útil y confiable en el análisis de pacientes y familias afectadas con hemofilia A severa, porque permite caracterizar en una sola muestra de sangre el tipo de inversión del intrón 22 (tipo I, II) del paciente.

### Agradecimientos

Proyecto apoyado por la dirección de investigación con registro DI/08/103/4/17 y DI/16/103/3/035.

### REFERENCIAS

1. Pandey GS, Mittal B. Molecular diagnosis in hemophilia A. *J Postgrad Med* 2001; 47 (4): 273-274.
2. Lakich D, Kazazian H, Antonarakis SE, Gitschier J. Inversions disrupting the factor VIII gene are a common cause of severe haemophilia A. *Nature Genet* 1993; 5 (3): 236-241. doi: 10.1038/ng1193-236
3. Naylor J, Brinke A, Hassock S, Green P, Giannelli F. Characteristic mRNA abnormality found in half the patients with severe haemophilia A is due to large DNA inversions. *Hum Mol Genet* 1993; 2 (11): 1773-1778. doi: 10.1093/hmg/2.11.1773
4. Walsh PN, Rainsford SG, Biggs R. Platelet coagulant activities and clinical severity in haemophilia. *Thromb Diath Haemorrh* 1973; 29 (3): 722-729. DOI: 10.1055/s-0038-1648115
5. Bauer KA, Mannucci PM, Gringeri A, et al. Factor IXa-factor VIIIa-cell surface complex does not contribute to the basal activation of the coagulation mechanism in vivo. *Blood* 1992; 79 (8): 2039-2047.
6. Rossetti LC, Raic CP, Larripa IB, De Brasi CD. Genotyping the hemophilia inversion hot spot by using Inverse PCR. *Clin Chem* 2005; 51 (7): 1154-1158. doi: 10.1373/clinchem.2004.046490
7. Rafeeq A, Kannan M, Choudhary VP, Renu S. Mutation report: intron 1 & 22 inversion in Indian hemophiliacs. *Ann Hematol* 2003; 82 (9): 546-547. doi: 10.1007/s00277-003-0704-3
8. Soares RPS, Chamone DAF, Bydlowski SP. FVIII gene inversion and polymorphism in Brazilian patients with hemophilia A: carrier detection and prenatal diagnosis. *Hemophilia* 2001; 7 (3): 299-305. doi: 10.1046/j.1365-2516.2001.00508.x
9. Akkarapatumwong V, Oranwiroon S, Pung-amritt P. Mutation of FVIII gene in Thai haemophilia A patients. *Hum*

- Mutat 2000; 15 (1): 117-118. doi: 10.1002/(SICI)1098-1004(200001)15:1<117::AID-HUMU27>3.0.CO;2-E
10. Naylor JA, Buck D, Green PM, Williamson H, et al. Investigation of the factor VIII intron 22 repeated región (int22h) and the associated inversion junctions. *Hum Mol Genet* 1995; 4 (7): 1217-1224. doi: 10.1093/hmg/4.7.121
  11. Guo Z, Yang L, Qin X, Liu X, Zhang Y. Spectrum of molecular defects in 216 Chinese families with hemophilia A: Identification of noninversion mutation hot spots and 42 novel mutations. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2018; 24 (1): 70-78. doi: 10.1177/1076029616687848
  12. Antonarakis SE, Rossiter JP, Young M, et al. Factor VIII gene inversions in severe hemophilia A: results of an international consortium study. *Blood* 1995; 86 (6): 2206-22113
  13. Liu Q, Sommer SS. Subcycling-PCR for multiplex long-distance amplification of regions with high and low GC content: application to the inversion hotspot in the factor VIII gene. *Biotechniques* 1998; 25 (6): 1022-1028. doi: 10.2144/98256rr01
  14. Leiria LB, Roisenberg I, Salzano FM, Bandinelli E. Introns 1 and 22 inversions and factor VIII inhibitors in patients with severe haemophilia A in southern Brazil. *Haemophilia* 2009; 15 (1): 309-13. doi: 10.1111/j.1365-2516.2008.01868.x
  15. Gouw SC, van den Berg HM. The multifactorial etiology of inhibitor development in hemophilia: Genetics and environment. *Semin Thromb Hemost* 2009; 35 (8): 723. doi: 10.1055/s-0029-1245105
  16. Graw J, Brackmann HH, Oldenburg J, Schneppenheim R, et al. Haemophilia A: from mutation analysis to new therapies. *Nat Rev Genet* 2005; 6 (6): 488-501. doi: 10.1038/nrg1617
  17. Ananyeva NM, Lee TK, Jain N, Shima M, Saenko EL. Inhibitors in hemophilia A: advances in elucidation of inhibitory mechanisms and in inhibitor management with bypassing agents. *Semin Thromb Hemost* 2009; 35 (8): 735-51. doi: 10.1055/s-0029-12451018
  18. Hemophilia A Mutation, Search, Test and Resource Site (HAMSTeRS) database (<http://europium.csc.mrc.ac.uk>)
  19. World Federation of Hemophilia Report on the Annual Global Survey 2010. Report on the Annual Global Survey 2010 is published by the World Federation of Hemophilia. [www.wfh.org](http://www.wfh.org)
  20. Kershaw G, Jayakodi D, Dunkley S. Laboratory identification of factor inhibitors: the perspective of a large tertiary hemophilia center. *Semin Thromb Hemost* 2009; 35 (8): 760-8. doi: 10.1055/s-0029-1245108
  21. Bogdanova N, Markoff A, Pollmann H, Nowak-Göttl U, et al. Prevalence of small rearrangements in the factor VIII gene F8C among patients with severe hemophilia A. *Hum Mutat* 2002; 20 (3): 236-7. doi: 10.1002/humu.90622
  22. Margaglione M, Castaman G, Morfini M, Rocino A, et al; AICE-Genetics Study Group. The Italian AICE-Genetics hemophilia A database: results and correlation with clinical phenotype. *Haematologica* 2008; 93 (5): 722-8. doi: 10.3324/haematol.124223
  23. Brower C, Thompson AR. Hemophilia A. In: Pagon RA, Bird TC, Dolan CR, Stephens K, editors. *GeneReviews*. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-20024.
  24. Reitter S, Sturn R, Horvath B, Freitag R, et al; The Austrian Molecular Haemophilia Study Group. Spectrum of causative mutations in patients with haemophilia A in Austria. *Thromb Haemost* 2010; 104 (1): 78-85. doi: 10.1160/TH09-11-0795