

# PARTE 14 **Análisis Genético meslecular**

*Carlos De Brasi & Megan Sutherland*

## TEMAS TRATADOS

- ✓ Características moleculares de los genes y proteínas relacionados con la hemofilia
- ✓ Espectro de variantes causales en la hemofilia
- ✓ Otros fenotipos asociados al gen F8
- ✓ / Otros fenotipos asociados al gen F9
- ✓ Protección contra la trombosis venosa profunda (TVP)
- ✓ Espectro de Enfoques Prácticos Aplicados en Pruebas Genéticas
- ✓ Nomenclatura estandarizada y potencial patogénico de las variantes

El análisis genético de la hemofilia es importante para definir la causa subyacente del trastorno hemorrágico en las personas afectadas y sus familiares. La comprensión de la variante genética asociada con el fenotipo puede ayudar a predecir la gravedad del trastorno, incluido el riesgo de desarrollo de inhibidores. También ayuda en la identificación de mujeres portadoras de hemofilia, a quienes se les puede ofrecer un diagnóstico prenatal. Es importante que las personas que están procediendo a una investigación genética se sometan a un asesoramiento genético adecuado antes de cualquier prueba. Las recientes Directrices de la FMH para el tratamiento de la hemofilia (3.ª edición) (Srivastava et al, 2019) contienen un capítulo dedicado a la evaluación genética de las personas con hemofilia A y hemofilia B. En este capítulo del manual de laboratorio se describen las bases genéticas de la hemofilia A y B y se destaca la heterogeneidad de los enfoques prácticos disponibles actualmente en todo el mundo que se pueden utilizar para investigar las variantes genéticas subyacentes. También describe el uso de la nomenclatura estandarizada para la descripción de las variantes genéticas y su clasificación de patogenicidad, además de destacar la importancia de un informe interpretativo claro y conciso que describa el resultado genético y las implicaciones para el individuo y su familia.

**Características moleculares de los genes y proteínas relacionados con la hemofilia:** Las características moleculares de los genes de la hemofilia, la coagulación FVIII o F8 y la coagulación FIX o F9, se muestran en la Tabla 41. La Tabla 41 muestra las coordenadas genómicas en GRCh38 (hg38), el tamaño del gen y la ubicación citogenética de F8 y F9, su complejidad de exones (número de exones), versiones curadas actualizadas de archivos RefSeq (es decir, NG\_..., NM\_..., NP\_...), y el tamaño molecular relevante de las principales transcripciones de genes y sus isoformas polipeptídicas derivadas.

**Tabla 41.** Características moleculares de los genes F8 y F9

Símbolo oficial de HGNC	Nombre del gen	Localización citogenética	GRCh38 (hg38) (coordenadas NC_000023.11 (longitud [pb]))	Genómica RefSeq (rango de coordenadas)	Transcripción principal* RefSeq (longitud [nts] (exones))	Proteína principal* RefSeq (longitud [aa])	OMIM #
F8	factor VIII de coagulación	Xq28	Dotación (154.835.792-155.022.723) (186.931)	NG_011403.2 (5,001-191,932)	NM_000132.4 (9032) (26)	NP_000123.1 (2351)	300841
F9	factor IX de coagulación	Xq27.1	(139,530,739-139,563,459) (32,720)	NG_007994.1 (5,001-37,723)	NM_000133.4 (2800) (8)	NP_000124.1 (461)	300746

HGNC: Comité de Nomenclatura Genética de HUGO. Longitud [Unidades]: [pb], pares de bases; [nts], nucleótidos; [aa]; Aminoácidos. "Solo se indica la variante de transcripción más larga (más significativa) y su isoforma principal derivada. OMIM: La herencia mendeliana en línea en el hombre (<https://omim.org/>); #, número de accesión. Los datos se recopilaron del NCBI (Centro Nacional de Información Biotecnológica) consultado el 18/ene/2024 ([https:// www.ncbi.nlm.nih.gov/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/)). RefSeq indica los archivos de secuencia de referencia de la plataforma del navegador NCBI.

Adicionalmente, en la Tabla 42 se muestran las características más relevantes de las proteínas FVIII y FIX de la coagulación. La Tabla 42 recopila datos de las principales isoformas de proteínas, la cartografía de aminoácidos (aa) de dominios de proteínas reconocibles (especificados por la base de datos UNIPROT) y los archivos de bases de datos de proteínas (PDB) asociados con modelos de estructura 3D (coordinadas tridimensionales de átomos FVIIIa y FIXa).

**Tabla 42.** Características moleculares de las proteínas del factor VIII y IX de la coagulación

Símbolo de la proteína	Nombre de la proteína: isoforma principal	Isoforma RefSeq (longitud [aa])	UNIPROT* #	Dominios de isoformas: UNIPROT (coordinadas aa)	Estructura 3D ID de PDB (coordinadas aa)
<b>FVIII</b>	factor de coagulación VIII isoforma una preproteína	NP_000123.1 (2351)	P00451	<b>Péptido señal:</b> (1-19) <b>A1:</b> F5/8 tipo A 1 (20-348) <b>A2:</b> F5/8 tipo A 2 (399-730) <b>B:</b> B-region (760-1667) <b>A3:</b> F5/8 tipo A 3 (1713-2040) <b>C1:</b> F5/8 tipo C 1 (2040-2188) <b>C2:</b> F5/8 tipo C 2 (2193-2345)	<b>FVIIIa maduro 2R7E. PDB**</b> A: Cadena pesada A1 -A2 (Legado 1-725) B: Cadena ligera A3-C1 -02 (Legado 1689-2332)
<b>ARREGLAR</b>	isoforma del factor IX de coagulación 1 preproteína	NP_000124.1 (461)	P00740	<b>Péptido señal:</b> (1-28) – <b>Propéptido:</b> (29-46) <b>Gla:</b> rico en $\gamma$ -carboxiglutamato (47-92) <b>EGF1:</b> 1 tipo EGF de fijación a $Ca^{++}$ (93-129) <b>EGF2:</b> 2 tipo EGF (130-171) <b>Act_peptide:</b> Péptido de activación (192-226) <b>Tryp_SPc:</b> Serina proteasa similar a la tripsina (227-457)	<b>modelo de homología FIXa. pdb***</b> L: Cadena ligera Gla-EGF1-EGF2 (47-171) H: Cadena pesada Tryp_SPc (227-461)

\*Navegador de proteínas UNIPROT (URL: <https://www.uniprot.org/>). \*\*Shen et al, 2008. \*\*\*Los curadores del Proyecto de Bases de Datos de Variantes de EAHAD (Rallapalli et al, 2013; McVey et al, 2020). La mayoría de los datos se recogieron de las bases de datos de variantes del factor de coagulación de la EAHAD (Asociación Europea de Hemofilia y Trastornos Afines) (URL: <https://dbs.eahad.org/>), consultadas el 18/ene/2024. Los codones y aminoácidos (aa) se numeran siguiendo las reglas de HGVS (es decir, codón +1 que codifica para el primer residuo (Met) del polipéptido primario en FVIII y FIX). En la numeración Legacy, codón/aminoácido +1 se refiere a la codificación del primer aminoácido de la proteína FVIII madura (excluyendo 19 aa del péptido señal) y la proteína FIX (excluyendo 46 aa del péptido señal y el propéptido). Aunque se recomienda la numeración HGVS. La numeración heredada se ha utilizado ampliamente en publicaciones anteriores.

**Espectro de variantes causales en la hemofilia:** La mayoría de las variantes patógenas que afectan al gen F8 causan hemofilia A, mientras que la mayoría de las variantes patógenas F9 causan hemofilia B. La base de datos Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) (<https://www.omim.org/>) recopila un

amplio conjunto de información completa sobre los genes humanos, indica las variantes que afectan a su función y describe y clasifica sus fenotipos asociados. La base de datos OMIM indica que las variantes F8 se asocian a dos fenotipos diferentes: hemofilia A (#306700) y trombofilia 13 (ligada al cromosoma X, por defecto FVIII) (#301071) (THPH13); mientras que la F9, con cuatro fenotipos: hemofilia B (#306900), trombofilia 8 (ligada al cromosoma X, por defecto FIX) (#300807) (THPH8), protección contra la trombosis venosa profunda (DPV) (#300807) y sensibilidad a la warfarina (#301052). En la Tabla 43 y en la Tabla 44, respectivamente, se muestra el espectro de mutaciones F8 causantes de hemofilia A según los niveles de actividad del FVIII de la coagulación (FVIII:C) y mutaciones F9 causantes de hemofilia B, asociadas a los niveles de FIX (FIX:C). La mayoría de las prevalencias relativas de las variantes causales de hemofilia A y hemofilia B, enumeradas en las Tablas 43 y 44, se obtuvieron de las bases de datos de la Asociación Europea de Hemofilia y Trastornos Afines (EAHAD). La base de datos de variantes F8 de la EAHAD excluye las inversiones prevalentes asociadas con la hemofilia A grave que afectan a casi la mitad de los pacientes. Con el fin de presentar una prevalencia no sesgada de mutaciones causantes de la hemofilia A grave, sus frecuencias relativas se combinaron teniendo en cuenta los promedios mundiales de las inversiones del intrón F8 22 (Inv22) reportados por Antonarakis et al (1995), y los estimados para la inversión del intrón F8 1 (Inv1) de una serie internacional de pacientes con hemofilia A (Rossetti et al, 2004) (Cuadro 43).

**Tabla 43.** Variantes F8 causantes de la hemofilia A más típicas en pacientes hemocigotos de fuentes internacionales.

Tipo de variante por efecto	No inversiones graves # casos (%)	Grave a nivel mundial	Moderate # casos (%)	Mild # casos (%)	References
<b>Missense o de cambio de sentido</b>	mesderado	(16.2)	1340 (79.9)	3048 (95.8)	F8_var_db EAHAD*
<b>In-frame-indel</b>	Leve	(0.8)	19 (1.1)	32 (1.0)	F8_var_db EAHAD*
<b>Frameshift-indel</b>	Referencias	(17.0)	142 (8.5)	27 (0.9)	F8_var_db EAHAD*
<b>Defecto de empalme</b>	320 (6.8)	(3.7)	98 (5.8)	68 (2.1)	F8_var_db EAHAD*
<b>Nonsense (sin sentido o parada prematura)</b>	968 (20.6)	(11.1)	59 (3.5)	4 (0.1)	F8_var_db EAHAD*
<b>Delección grande (SV)</b>	426 (9.1)	(4.9)	19 (1.1)	3 (0.1)	F8_var_db EAHAD*
<b>Total de no inversiones</b>	4689 (100)	(53.7)	1677 (100)	3182 (100)	F8_var_db EAHAD*
<b>Inv22 (SV) tipo 1</b>		740 (35.4)			Antonarakis et al, 1995
<b>Inv22 (SV) tipo 2</b>		140 (6.7)			
<b>Inv22 (SV) otros tipos</b>		25 (1.1)			
<b>Total Inv22</b>		2093 (43.2)			
<b>Inv1 (SV)</b>		19 (3.1)			Rossetti et al, 2004
<b>Total Inv1</b>		622 (3.1)			

SV indica variantes estructurales, incluidas las variantes del número de copias (CNV) como delecciones F8 grandes e inversiones F8 grandes (no CNV) como la inversión del intrón 22 (Inv22) y la inversión del intrón 1 (Inv1). Los datos de los pacientes no informativos de las inversiones F8 se obtuvieron de las bases de datos de la EAHAD (Asociación Europea de Hemofilia y Trastornos Afines) que registraban pacientes individuales. \*Base de datos de variantes F8 (<http://f8-db.eahad.org/>).

La variante más característica y recurrente causante de hemofilia A grave en todo el mundo, es la inversión del intrón F8 22, una gran inversión perfecta de 600 kb mediada por recombinación entre repeticiones invertidas de 10 kb (int22h o h) que interrumpe la estructura F8 impidiendo el empalme normal del ARN

entre los exones 22 y 23 (Lakich et al, 1993; Naylor et al, 1993). Hay una copia intragénica F8 de int22h dentro del intrón 22 (h1) y dos copias extragénicas (h2 y h3). Dependiendo de qué copia extragénica se recombina con la intragénica, el Inv22 muestra un patrón de tipo 1 (h1/h3) o un patrón de tipo 2 (h1/h2). El Inv22 se origina casi exclusivamente a partir de células germinales masculinas (Rossiter et al, 1995) y, en consecuencia, la mayoría de las madres de pacientes con el Inv22 son portadoras (Tizzano et al, 1995). El mecanismo molecular de la recombinación homóloga no alélica entre grandes repeticiones invertidas en la meiosis masculina apoya la recurrencia de Inv22 como la causa más prevalente de hemofilia A grave en todo el mundo (Tabla 43). De manera similar, la inversión del intrón F8 1 (Inv1) es una gran inversión perfecta del ADN causada por la recombinación entre repeticiones invertidas de 1 kb (inti h) que interrumpen la estructura F8 en el intrón 1 (Bagnall et al, 2001) e involucra un promedio estimado del 3% de los pacientes con hemofilia A grave en todo el mundo (Tabla 43).

El grupo restante de pacientes con hemofilia A grave, moderada o leve (Cuadro 43), que no incluye información para las inversiones F8, y todos los pacientes con hemofilia B (Cuadro 44) muestran un espectro típico de variantes deletéreas, incluidas las variantes de un solo nucleótido (SNV) que predicen errores de sentido, sinsentido o defectos de empalme; pequeñas inserciones/delecciones (INDEL) que predicen desplazamientos de marco o cambios en el marco; o, con menos frecuencia, grandes variaciones del número de copias (CNV), en su mayoría grandes delecciones.

**Tabla 44.** Variantes F9 causantes de hemofilia B más típicas en pacientes hemicigotos de fuentes internacionales

Variant type by effect	Graves # casos (%)	mesderado # casos (%)	Leve # casos (%)	Referencias
<b>Missense o cambio de sentido</b>	999 (52.3)	1039 (85.1)	719 (95.0)	F9_var_db EAHAD*
<b>In-frame-indel</b>	27 (1.4)	9 (0.7)	1 (0.1)	F9_var_db EAHAD*
<b>Frameshift-indel</b>	185 (9.7)	42 (3.4)	2 (0.3)	F9_var_db EAHAD*
<b>Defecto de empalme</b>	135 (7.1)	66 (5.8)	30 (4.0)	F9_var_db EAHAD*
<b>Nonsense (sin sentido o parada prematura)</b>	459 (24.0)	62 (5.1)	5 (0.7)	F9_var_db EAHAD*
<b>Delección grande (SV)</b>	107 (5.6)	3 (0.3)		F9_var_db EAHAD*
<b>Total</b>	1912 (100)	1221 (100)	757 (100)	F9_var_db EAHAD*

SV indica variantes estructurales como grandes delecciones que afectan parcial o totalmente al gen F9. Los datos de los pacientes con HB se obtuvieron de las bases de datos de la EAHAD (Asociación Europea de Hemofilia y Trastornos Afines) que registraban pacientes individuales. \*Base de datos de variantes F9 (<https://f9-db.eahad.org/>).

La información sobre las variantes F8 y F9 se recopila en bases de datos de acceso público, como las desarrolladas por los CDC (Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades) denominadas CHAMP y CHBMP para la hemofilia A y la hemofilia B, respectivamente (<https://www.cdc.gov/ncbddd/hemophilia/champs.html>), y por la EAHAD (Asociación Europea de Hemofilia y Trastornos Afines) para F8 (<http://f8-db.eahad.org/>) y F9 (<http://f9-db.eahad.org/>) (Cuadros 43 y 44). Consultadas el 18 de enero de 2024, las bases de datos de EAHAD contienen información de 3052 variantes F8 únicas correspondientes a 10144 casos individuales y 1244 variantes F9 únicas correspondientes a 4713 casos individuales. En las Tablas 43 y 44, las variantes genéticas se clasifican por su efecto predicho a partir de la evidencia de secuencia de nucleótidos de ADN observada (es decir, cambio de sentido, delección in-frame, frameshift-indel, defecto de empalme, sin sentido, delección grande). Las variantes F8 y F9, respectivamente, enumeradas en los Cuadros 43 y 44 representan las variantes causantes de hemofilia con frecuencias significativas en todo el mundo, en contraste con las variantes prevalentes encontradas en poblaciones particulares típicamente asociadas con fenotipos no graves (por ejemplo, la duplicación del exón 13 F8 prevalente en la población italiana de hemofilia A leve (Acquila et al, 2004).

## Otros fenotipos asociados con el gen F8

La trombofilia 13 (ligada al cromosoma X, debido a un defecto de FVIII): Shen et al (2013) evaluaron los niveles de actividad de FVIII:C y el número de copias del gen F8 en pacientes con tromboembolismo venoso (TEV) frente a controles sanos. Los pacientes con TEV mostraron un FVIII:C significativamente mayor y un mayor número de copias del gen F8. Simioni et al (2021) reportaron de dos familias italianas con trombofilia 13 e identificaron una duplicación parcial en tándem del gen F8, que es coherente con el patrón de herencia dominante ligado al cromosoma X, ya que los pacientes hemocigotos masculinos se ven más gravemente afectados que las mujeres portadoras.

## Otros fenotipos asociados con el gen F9

La trombofilia 8 (debida a un defecto FIX) es un fenotipo hereditario recesivo ligado al cromosoma X asociado con TEV de inicio temprano causado por un defecto de cambio de sentido F9, R338L o variante de Padua, reportado por Simioni et al (2009). Se ha reportado que Padua mejora la resistencia fibrinolítica de los coágulos de plasma (Ammollo et al, 2014).

### Protección contra la trombosis venosa profunda (TVP):

La variante polimórfica común FIX-Malmo (frecuencia alélica menor de 0,32), p.(Thr148Ala) debida a una sustitución de un solo nucleótido (SNV) G>A, se asocia con una protección contra el riesgo de TVP con odds ratios o razón de momios (OR) de 0,8 en pacientes masculinos y de 0,89 en pacientes femeninos (Bezemer et al, 2008). Sin embargo, los mecanismos moleculares para la protección de la TVP conferida por el polimorfismo FIX-Malmo seguían siendo desconocidos.

La warfarina es un anticoagulante ampliamente prescrito para la prevención de eventos tromboembólicos en pacientes "de riesgo". La sensibilidad a la warfarina (ligada al cromosoma X, debido a variantes FIX) se refiere a una complicación del fenotipo hemorrágico durante el tratamiento anticoagulante con antagonistas de la vitamina K. Pezeshkpoor et al (2018) reportaron de una asociación entre las variantes de cambio de sentido F9 que afectan al propéptido, como p.(Ala37Thr) y p.(Ala37Val), y la sensibilidad a la warfarina caracterizada por una reducción desproporcionada de los niveles de FIX:C durante el tratamiento con anticoagulación.

La relación causal entre una variante genética dada (por ejemplo, F8 Inv22) y un fenotipo particular (por ejemplo, hemofilia A grave en un paciente hemocigoto) puede modificarse en casos raros mediante la participación de un mosaicismo genético (MG), que se define como la coexistencia de al menos dos clones genéticamente diferentes en un individuo (por ejemplo, células Inv22 positivas y negativas). Un mosaicismo genético puede afectar parcial o totalmente, a algunos o a todos los órganos/tejidos de un individuo afectado, lo que da lugar, por ejemplo, a fenotipos más leves si afecta a las células somáticas (por ejemplo, células productoras de FVIII/FIX derivadas del endotelio hepático) y a la heredabilidad de la variante genética si afecta a las células germinales (por ejemplo, un paciente con hemofilia masculina en mosaico germinal puede ser padre de hijas no portadoras) (Abelleyro et al, 2018).

Como paradigmas históricos de los trastornos recesivos ligados al cromosoma X, la hemofilia A (OMIM #306700) y la hemofilia B (OMIM #306900) se expresan típicamente en pacientes varones hemocigotos (46, XY) y las mujeres heterocigóticas (46, XX) suelen ser asintomáticas. De acuerdo con un punto de vista consensuado entre los hematólogos, una nueva clasificación de la hemofilia femenina considera los niveles de actividad de coagulación del factor, indicando enfermedad grave cuando <1 UI/dl, moderada 1-5 UI/dl y hemofilia leve 5-40 UI/dl; y cuando los niveles del factor son >40 UI/dl, los individuos se clasifican como portadores sintomáticos y asintomáticos (van Galen et al, 2021). La base molecular de la hemofilia femenina implica la alteración de la expresión o el silenciamiento de los alelos F8 o F9 mediado por el fenómeno de inactivación del cromosoma X (XCI), que silencia la expresión génica en cis de una X en cada célula para compensar las dosis con los hombres. XCI tiene lugar al principio de la embriogénesis, normalmente al azar en cada célula, y este estado se hereda clonalmente en la vida adulta de las mujeres.

Se espera que una portadora femenina homocigota y un heterocigoto compuesto expresen hemofilia, así como portadores heterocigotos con XCI sesgado que silencian preferentemente el alelo normal (Radio et al, 2015). Además, Garagiola et al (2021) demostraron una asociación significativa entre los niveles de actividad de coagulación de FVIII/FIX y el patrón de XCI medido en leucocitos de sangre periférica de portadores heterocigotos de hemofilia A con <50 UI/dl.

**Espectro de enfoques prácticos aplicados en las pruebas genéticas:** Dependiendo de la disponibilidad de recursos y experiencia, hay una variedad de técnicas que se pueden emplear para la investigación de variantes genéticas asociadas con la hemofilia A y la hemofilia B. En este capítulo se proporcionan ejemplos de estos enfoques prácticos y referencias, cuando están disponibles. Existen varias técnicas diferentes para la investigación de la inversión del intrón F8 22, como el Southern blot, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de largo alcance y la PCR de desplazamiento inverso (Lakich et al, 1993; Liu et al, 1998; Bagnall et al, 2006; Rossetti et al, 2008; Abelleyro et al, 2016; Ding et al, 2016; Hudcovova et al, 2017; Pan et al, 2014; Kumar et al, 2015; Edison et al, 2016). La inversión del intrón 1 F8 puede detectarse mediante técnicas como la PCR doble o la PCR con desplazamiento inverso (Bagnall et al, 2002; Rossetti et al, 2008). El análisis de los SNV en F8 y F9 puede realizarse mediante una serie de técnicas, como la PCR y la secuenciación de Sanger, o tecnologías de secuenciación de alto rendimiento, como la secuenciación de próxima generación (NGS) (Al-Allaf et al, 2019; Li et al, 2014; Lyu et al, 2016; Manderstedt et al, 2019; Edison et al, 2016). Cuando los recursos son limitados, se podría emplear un enfoque de cribado previo a la secuenciación de Sanger (Salviato et al, 2019), como el análisis heterodúplex mediante electroforesis en gel sensible a la conformación (CSGE). Para el análisis de las SVN en F8 y F9, existen varias técnicas como la PCR gap, la amplificación de sonda dependiente de ligadura múltiple (MLPA), la PCR cuantitativa en tiempo real y la NGS (Rossetti et al, 2004; Payne et al, 2012; Costa et al, 2004; Belvini et al, 2017; Kinkle et al, 2017; Usted et al, 2013; Wu et al, 2014; Fernández-López et al, 2007; Tizzano et al, 2005; Johnsen et al, 2017). En los casos de hemofilia A y hemofilia B en los que no se encuentra una variante genética subyacente en las regiones esenciales de los genes F8 o F9 utilizando las técnicas descritas anteriormente, el análisis de las regiones intrónicas profundas para detectar posibles defectos de empalme puede estar disponible mediante secuenciación masiva paralela dirigida (MPS) o secuenciación del genoma completo (WGS) (Jourdy et al, 2018; Jourdy et al, 2020; Bach et al, 2015; Inaba et al, 2017; Castaman et al, (2011; Chang et al, 2019). El análisis de ligamiento también puede considerarse para estudios familiares en los que no hay una variante F8 o F9 identificable (Sun et al, 2015). La investigación de individuos con fenotipos atípicos que pueden deberse a reordenamientos genómicos complejos puede ser mediante análisis de microarreglos citogenéticos (Jourdy et al, 2016; Jourdy et al, 2017; Janczar et al, 2016; Lannoy et al, 2018). El análisis de la inactivación del cromosoma X puede realizarse mediante una serie de técnicas, como la enzima de restricción específica de metilación, la PCR y el análisis de fragmentos, u otras técnicas cuantitativas (Nisen et al, 1989; Coleman et al, 1993; Johansson et al, 2023; Machado et al, 2014).

**Nomenclatura estandarizada y potencial patogénico de las variantes:** La precisión en la descripción unívoca de las variantes genéticas es esencial para la investigación y la atención clínica. Para abordar este requisito, el Comité de Nomenclatura de Variantes (HVNC) de la Sociedad de Variación del Genoma Humano (HGVS), bajo el auspicio de la Organización del Genoma Humano (HUGO), desarrolló una serie de recomendaciones. Estos incluyen que las variantes genéticas deben describirse en el nivel más básico, el nivel del ADN, y las descripciones en el nivel del ARN y/o la proteína, en general predichas a partir de la evidencia del ADN, se pueden dar además (<https://hgvs-nomenclature.org/stable/>) (den Dunnen et al, 2016). La nomenclatura HGVS recomienda una numeración específica para las posiciones de los genes que indica el codón +1 que codifica para el primer residuo (Met) del polipéptido primario y el nucleótido +1 para el A del codón de iniciación AUG. En algunas publicaciones anteriores sobre hemofilia, la numeración heredada de codón/aminoácido +1 se refiere a la codificación del primer aminoácido de la proteína madura (es decir, en la numeración HGVS, codón FVIII 20 y codón FIX 47). Para ajustar y normalizar la nomenclatura de las variantes según el HGVS, el sitio web de Mutalyzer ofrece algoritmos eficientes para comprobar y verificar su correcta descripción a partir de las recomendaciones del HGVS (<https://mutalyzer.nl/>) (Lefter et al, 2021). Todas las variantes detectadas deben clasificarse de acuerdo con su potencial para causar el fenotipo observado de acuerdo con las pautas elaboradas por el Colegio

Americano de Genética Médica y Genómica/Asociación de Patología molecular (ACMG/AMP) (Richards et al, 2015). Las recomendaciones del ACMG se pueden aplicar a las pruebas genéticas convencionales o basadas en secuenciación de próxima generación que se utilizan en laboratorios clínicos y comprenden un sistema de clasificación de cinco niveles para las variantes relevantes para los trastornos mendelianos: (1) patógena, (2) probablemente patógena, (3) de significado incierto, (4) probablemente benigna y (5) benigna. Para lograr esta categorización, el ACMG/AMP recomienda un análisis exhaustivo de (a) datos de población, (b) datos computacionales, (c) datos funcionales y (d) datos de segregación.

Por ejemplo, el análisis de las variantes F8 y F9 implica:

El estudio de la variante genotipada en población general y su frecuencia en individuos hemocigotos, heterocigotos, etc. consultando gnomAD (<https://gnomad.broadinstitute.org/>), ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>), y en las bases de datos específicas de genes F8/HA y F9/HB, como EAHAD y CHAMP (referenciadas anteriormente).

La aplicación de herramientas bioinformáticas “in silico” para analizar cambios de cambio de sentido mediante la predicción de eventuales cambios estructurales o funcionales utilizando, por ejemplo, PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>), MutationTaster (<https://www.mutationtaster.org/>) y Varsome (<https://varsome.com/>) entre otros; o para evaluar eventuales defectos de splicing, como NNSplice([https://www.fruitfly.org/seq\\_tools/splice.html](https://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html)), NetGene2 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetGene2-2.42/>) y ESEFinder para buscar diferencias en secuencias de potenciadores de empalme exónico (esefinder.ahc.umn.edu); y muchas otras herramientas computacionales para estimar el impacto de variantes en el promotor, 5'- o 3'-UTR, etc.

Los datos experimentales obtenidos de estudios funcionales in vitro e in vivo de la versión mutada frente a la versión normal que se va a probar, o una parte de ella, proporcionan información significativa para establecer el impacto de una variante genética.

Los datos de segregación asociados con un modo de herencia recesivo ligado al cromosoma X y la cosegregación con hemofilia en múltiples miembros de la familia afectados son indicativos de patogenicidad. Teniendo en cuenta este análisis, los ACMG/AMP indican los criterios para clasificar las variantes patogénicas puntuando la evidencia como muy fuerte (PVS), fuerte (PS), moderada (PM) y de apoyo (PP); y los criterios para clasificar el impacto benigno o neutro de las variantes puntuando la evidencia como independiente (BA), fuerte (BS) y de apoyo (BP). La clasificación final en una categoría para estimar la patogenicidad (1-5) es el resultado de la combinación de las puntuaciones de P\_ y B\_ evidencia (Richards et al, 2015).

**Informes interpretativos:** Los informes interpretativos deben ser claros y concisos, y abordar el diagnóstico de la persona investigada. Más allá de su enfoque principal que establece su conclusión molecular general al responder a la pregunta genética, un informe interpretativo debe incluir suficientes detalles para permitir la identificación de la variante en otros laboratorios (es decir, indicar los enfoques prácticos utilizados, las limitaciones de las técnicas, la secuencia genómica de referencia utilizada y la clasificación de la patogenicidad de acuerdo con las guías del ACMG, incluidas las pruebas aplicadas para la clasificación y las referencias; Directrices para la presentación de informes de ACGS, 2020; Deans et al, 2022; Claustres et al, 2014; Gómez et al, 2019). Los informes interpretativos deben incluir información que explique el alcance real del diagnóstico molecular en un lenguaje sencillo con una indicación clara de, por ejemplo, los riesgos específicos para el desarrollo de fenotipos específicos en la familia.

**Aseguramiento de la calidad:** En las pruebas genéticas, el aseguramiento de la calidad abarca todos los aspectos del proceso de diagnóstico, desde la extracción de ácidos nucleicos y los procedimientos analíticos, hasta la clasificación y descripción de las variantes detectadas y la elaboración de un informe interpretativo. El control de calidad interno (CCI) de las pruebas genéticas debe realizarse de forma rutinaria para garantizar la validez de los resultados obtenidos. Existen esquemas formales de EQA para garantizar que el proceso de diagnóstico y los procedimientos de notificación estén de acuerdo con otros laboratorios (por ejemplo, la Evaluación de la Calidad Genómica [GenQA], y específicamente para

la evaluación genética de la hemofilia por el Servicio Nacional de Evaluación de la Calidad Externa del Reino Unido [NEQAS] para la Coagulación de la Sangre). Los laboratorios de genética deben someterse a una acreditación periódica, si la hay, con arreglo a normas acordadas internacionalmente, por parte de un organismo aprobado. Esto garantiza una prestación de alta calidad del servicio de diagnóstico genético.

## Referencias

Abelleyro MM, Rossetti LC, Curto Mde L, Radio CP, Marchione VD, De Brasi CD. Inversiones del intrón F8 22 y el SNP rs73563631 en familias no emparentadas con hemofilia A grave: características clínicas e implicaciones de las pruebas genéticas. *Thromb Haemost* 2016; 115(3): 678-681.

Abelleyro MM, Marchione VD, Elhelou L, Radio CP, Rossetti LC, Neme D, De Brasi CD. El mosaicismo somático/germinal de la delección de un promotor F8 confunde las predicciones clínicas en una familia con hemofilia A: Papel clave de la cuantificación del genotipo. *Thromb Haemost* 2018; 118(3): 617-620.

Acquila M, Pasino M, Lanza T, Bottini F, meslinari AC, Bicocchi MP. La duplicación del exón 13 causa un tercio de los casos de hemofilia A leve en el norte de Italia. *Haematologica* 2004; 89(6): 758-759.

Al-Allaf FA, Abduljaleel Z, Bogari NM, Owaidah TMA, Taher MM, Athar M et al. Identificación de seis nuevas variantes genéticas del factor VIII mediante secuenciación de próxima generación y simulación de dinámica molecular. *Acta Biochim Pol* 2019; 66(1): 23-31.

Ammollo CT, Semeraro F, Colucci M, Simioni P. El factor IX-Padua mejora la resistencia fibrinolítica de los coágulos plasmáticos. *Thromb Haemost* 2014; 111 (2): 226-232.

Antonarakis SE, Rossiter JP, Young M, Horst J, de meserlose P, Sommer SS et al. Inversiones génicas del factor VIII en la hemofilia A grave: resultados de un estudio de consorcio internacional. *Sangre* 1995; 86(6): 2206-2212.

Asociación para la Ciencia Genómica Clínica. Directrices de buenas prácticas de ACGS para la clasificación de variantes en enfermedades raras. 2020. <https://www.acgs.uk.com/quality/best-practice-guidelines/>.

Bach JE, Wolf B, Oldenburg J, Muller CR, Rost S. Identificación de variantes intrónicas profundas en 15 pacientes con hemofilia A mediante secuenciación de próxima generación de todo el gen del factor VIII. *Thromb Haemost* 2015; 114(4): 751-761.

Bagnall RD, Giannelli F, Green PM. Inversiones relacionadas con Int22h que causan hemofilia A: Una nueva perspectiva sobre su origen y una nueva prueba PGR más discriminante para su detección. *J Hemosta de trombo*. 2006; 4(3): 591-598.

Bagnall RD, Waseem N, Green PM, Giannelli F. La inversión recurrente que rompe el intrón 1 del gen del factor VIII es una causa frecuente de hemofilia A grave. *Sangre* 2002; 99(1): 168-174.

Castaman G, Giacomelli SH, Mancuso ME, D'Andrea G, Santacroce R, Sanna S, Santagostino E, Mannucci PM, Goodeve A, Rodeghiero F. Las variaciones intrónicas profundas pueden causar hemofilia leve a. *J Thromb Haemost* 2011; 9(8): 1541-1548.

Chang CY, Peng CL, Cheng SN, Hu SH, Wu TY, Lin SY, Chen YC. La variante intrónica profunda c.5999-277G>A del gen F8 puede ser una mutación puntual para los pacientes con hemofilia A leve sin mutación en el ADN exónico. *Eur J Haematol* 2019; 103(1): 47-55.

Claustres M, Kozich V, Dequeker E, Fowler B, Hehir-Kwa JY, Miller K et al. Recomendaciones para reportar los resultados de las pruebas genéticas diagnósticas (bioquímicas, citogenéticas y moleculares). *Eur J Hum Genet* 2014; 22(2): 160-170.

Coleman R, Genet SA, Harper JI, Wilkie AO. ¡Interacción del pigmento de la incontinencia! y mutaciones en el factor VIII en una mujer con inactivación sesgada del cromosoma X, que dan lugar a hemofilia. *J Med Genet* 1993; 30(6): 497-500.

Deans ZC, Ahn JW, Carre!ra IM, Dequeker E, Henderson M, Lovrecic L, Ounap K, Tabiner M, Treacy R, van Asperen CJ. Recomendaciones para reportar los resultados de las pruebas genómicas diagnósticas. *Eur J Hum Genet* 2022; 30(9): 1011-1016.

den Dunnen JT, Dalgleish R, Maglott DR, Hart RK, Greenblatt MS, McGowan-Jordan J, Roux AF, Smith T, Antonarakis SE, Taschner PE. Recomendaciones de HGVS para la descripción de variantes de secuencia: actualización de 2016. *Hum Mutat* 2016; 37(6): 564-569.

Ding Q, Wu X, Lu Y, Chen C, Shen R, Zhang X, Jiang Z, Wang X. Cuantificación de AccuCopy combinada con pre-amplificación de PCR a larga distancia para un análisis rápido de la inversión del intrón 22 en la hemofilia A. *Clin Chim Acta* 2016; 458: 78-83.

Edison E, Konkle BA, Goodeve AC. Análisis genético de los trastornos hemorrágicos. *Hemofilia* 2016; 22 Suppl 5(Suppl 5): 79-83.

Garagiola I, Mortarino M, Siboni SM, Boscarino M, Mancuso ME, Biganzoli M, Santagostino E, Peyvandi F. Inactivación del cromosoma X: Un modificador de los niveles plasmáticos de factor VIII y IX y del fenotipo hemorrágico en portadores de hemofilia. *Eur J Hum Genet* 2021; 29(2): 241-249.

Gomez K, Laffan M, Keeney S, Sutherland M, Curry N, Lunt P. Recomendaciones para la interpretación clínica de las variantes genéticas y la presentación de los resultados a los pacientes con trastornos hemorrágicos hereditarios. Documento de buenas prácticas de la Organización de Médicos del Centro de Hemofilia del Reino Unido. *Hemofilia* 2019; 25(1): 116-126.

Hudecova I, Jiang P, Davies J, Lo YMD, Kadir RA, Chiu RWK. Detección no invasiva de inversiones relacionadas con F8 int22h y variantes de secuencia en plasma materno de portadores de hemofilia. *Sangre* 2017; 130(3): 340-347.

Inaba H, Shinozawa K, Amano K, Fukutake K. Identificación de variantes individuales intrónicas profundas en pacientes con hemofilia A mediante la secuenciación de próxima generación de todo el gen del factor VIII. *Res Pract Thromb Haemost* 2017; 1 (2): 264-274.

Janczar S, Kosinska J, Ploski R, Pastorczak A, Wegner O, Zalewska-Szewczyk B, Paige AJ, Borowiec M, Mlynarski W. Hemofilia A y morbilidad cardiovascular en una mujer portadora del síndrome SHAM debido a la inactivación sesgada del cromosoma X. *Eur J Med Genet* 2016; 59(1): 43-47.

Johansson J, Lideus S, Hojjer I, Ameer A, Gudmundsson S, Anneren G, Bondeson ML, Wilbe M. Un novedoso análisis cuantitativo dirigido de la inactivación del cromosoma X (XCI) mediante secuenciación de nanoporos. *Sci Rep* 2023; 13(1): 12856.

Jourdy Y, Chatron N, Carage ML, Fretigny M, Meunier S, Zawadzki C, Gay V, Negrier C, Sanlaville D, Vinciguerra C. Estudio de seis pacientes con delección completa de F9 caracterizada por microarrays citogenéticos: papel del gen SOX3 en la discapacidad intelectual. *J Thromb Haemost* 2016; 14(10): 1988-1993.

Jourdy Y, Chatron N, Fretigny M, Carage ML, Chambost H, Claeysens-Donadel S, Roussel-Robert V, Negrier C, Sanlaville D, Vinciguerra C. Caracterización citogenética molecular de cinco reordenamientos del complejo F8: utilidad para el asesoramiento genético de la hemofilia A. *Hemofilia* 2017; 23(4): e316-e323.

Jourdy Y, Fretigny M, Lassalle F, Lillicrap D, Negrier C, Vinciguerra C. Las delecciones altamente prevalentes en el intrón F8 13 que se encuentran en los pacientes franceses con hemofilia a leve son el resultado tanto del efecto fundador como de los eventos recurrentes de novo. *J Thromb Haemost* 2020; 18(5): 1087-1093.

Jourdy Y, Janin A, Fretigny M, Lienhart A, Negrier C, Bozon D, Vinciguerra C. La delección intrónica recurrente de F8 encontrada en la hemofilia A leve causa exonización de Alu. *Am J Hum Genet* 2018; 102(2): 199-206.

Kumar P, Husain N, Soni P, Farid! Nueva Jersey, Goel SK. Nuevo protocolo para la detección de la mutación de inversión del intrón 22 en casos con hemofilia A. *Clin Appl Thromb Hemost* 2015; 21(3): 255-259.

Lakich D, Kazazian HH, Jr., Antonarakis SE, Gitschier J. Las inversiones que alteran el gen del factor VIII son una causa común de hemofilia A grave. *Nat Genet* 1993; 5(3): 236-241.

Lannoy N, Hermans C. Revisión de los mecanismos moleculares en Xq28 distal que conducen a reordenamientos genómicos equilibrados o desequilibrados y sus impactos fenotípicos en la hemofilia. *Hemofilia* 2018; 24(5): 711-719.

Lefter M, Vis JK, Vermaat M, den Dunnen JT, Taschner PEM, Laras JFJ. Mutalyzer 2: Comprobador de nomenclatura HGVS de última generación. *Bioinformática* 2021; 37(18): 2811 -2817.

Li T, Miller CH, Driggers J, Payne AB, Ellingsen D, Hooper WC. Análisis de mutaciones de una cohorte de pacientes estadounidenses con hemofilia B. *Am J Hematol* 2014; 89(4): 375-379.

Liu Q, Nozari G, Sommer SS. Reacción en cadena de la polimerasa de un solo tubo para el diagnóstico rápido del punto caliente de inversión de la mutación en la hemofilia A. *Sangre* 1998; 92(4): 1458-1459.

Lyu C, Xue F, Liu X, Liu W, Fu R, Sun T et al. Identificación de mutaciones en los genes F8 y F9 en familias con hemofilia mediante secuenciación dirigida de alto rendimiento. *Hemofilia* 2016; 22(5): e427-e434.

Machado FB, Machado FB, Faria MA, Lovatel VL, Alves da Silva AF, Radio CP et al. Las marcas epigenéticas 5meCpG vecinas a una repetición corta en tándem del promotor central conservado en primates indican inactivación del cromosoma X. *PLoS One* 2014; 9(7): e103714.

Manderstedt E, Nilsson R, Lind-Hallden C, Ljung R, Astermark J, Hallden C. Resecuenciación dirigida de F8, F9 y FVW: caracterización de los datos de Ion Torrent e implicaciones clínicas para el cribado de mutaciones. *PLoS One* 2019; 14(4): e0216179.

McVey JH, Rallapalli PM, Kemball-Cook G, Hampshire DJ, Giansily-Blaizot M, Gomez K, Perkins SJ, Ludlam CA. Bases de datos de variantes del factor de coagulación de la Asociación Europea de Hemofilia y Trastornos Afines (EAHAD): recursos importantes para médicos e investigadores de hemostasia. *Hemofilia* 2020; 26(2): 306-313.

Nisen PD, Waber PG. Patrones no aleatorios de metilación del ADN del cromosoma X en mujeres hemofílicas. *J Clin Invest* 1989; 83(4): 1400-1403.

Pan TY, Chiou SS, Wang CC, Wu SM. Separación de la inversión del intrón 22 tipo 1 y 2 de la hemofilia A mediante reacción en cadena de la polimerasa inversa modificada y electroforesis en gel capilar. *Talanta* 2014; 130: 328-335.

Pezeshkpoor B, Czogalla KJ, Caspers M, Berkemeier AC, Liphardt K, Ghosh S, Kellner M, Ulrich S, Pavlova A, Oldenburg J. Variantes en el propéptido FIX asociadas con la hipersensibilidad al antagonista de la vitamina K: análisis funcional y datos adicionales que confirman las mutaciones fundadoras comunes. *Ann Hematol* 2018; 97(6): 1061-1069.

Radio CP, Rossetti LC, Abelleiro MM, Tetzlaff T, Candela M, Neme D et al. Las correlaciones fenotipo-genotipo en portadores de hemofilia A son consistentes con el papel binario de la fase entre F8 y la inactivación del cromosoma X. *J Thromb Haemost* 2015; 13(4): 530-539.

Rallapalli PM, Kemball-Cook G, Tuddenham EG, Gomez K, Perkins SJ. Una base de datos interactiva de mutaciones para el factor IX de la coagulación humana proporciona nuevos conocimientos sobre los fenotipos y la genética de la hemofilia B. *J Thromb Haemost* 2013; 11(7): 1329-1340.

Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J et al. Estándares y guías para la interpretación de variantes de secuencia: una recomendación de consenso conjunta del Colegio Americano de Genética Médica y Genómica y la Asociación de Patología molecular. *Genet Med* 2015; 17(5): 405-424.

Rossetti LC, Candela M, Bianco RP, de Tezanos Pinto M, Western A, Goodeve A, Larripa IB, De Brasi CD. Análisis de la inversión del gen del factor VIII intrón 1 en familias argentinas con hemofilia A severa y revisión de la literatura. *Fibrinólisis de coágulos sanguíneos* 2004; 15(7): 569-572.

Rossetti LC, Radio CP, Larripa IB, De Brasi CD. Desarrollo de una nueva generación de pruebas para el genotipado de los reordenamientos causales de hemofilia que involucran puntos calientes int22h e inti h en el gen del factor VIII. *J Thromb Haemost* 2008; 6(5): 830-836. Salviato R, Belvini D, Radossi P, Tagariello G. Fusión de alta resolución para el análisis de mutaciones del gen F9 en pacientes con hemofilia B. *Transfus de sangre* 2019; 17(1): 72-82.

Shen BW, Spiegel PC, Chang CH, Huh JW, Lee JS, Kim J, Kim YH, Stoddard BL. Estructura terciaria y organización del dominio del factor VIII de coagulación. *Sangre* 2008; 111(3): 1240-1247.

Shen W, Gu Y, Zhu R, Zhang L, Zhang J, Ying C. Las variaciones en el número de copias del gen F8 se asocian con tromboembolismo venoso. *Blood Cells Mol Dis* 2013; 50(4): 259-262.

Simioni P, Cagnin S, Sartorello F, Sales G, Pagan! L, Bulato C et al. Duplicación parcial del gen F8 (factor VIII Padua) asociada a niveles elevados de factor VIII y trombofilia familiar. *Sangre* 2021; 137(17): 2383-2393.

Simioni P, Tormene D, Tognin G, Gavasso S, Bulato C, Lacobelli NP, Finn JD, Spiezia L, Radu C, Arruda VR. Trombofilia ligada al cromosoma X con un mutante del factor IX (factor IX Padua). *N Engl J Med* 2009; 361(17): 1671-1675.

Srivastava A, Santagostino E, Dougall A, Kitchen S, Sutherland M, Pipe SW et al. Directrices de la FMH para el tratamiento de la hemofilia, 3.ª edición. *Hemofilia* 2020; 26 Suppl 6: 1-158.

Sun P, Ma L, Diao G, Li CO, Lin FZ. Aplicación del análisis de ligamiento indirecto y genotipado directo a la detección de portadores de hemofilia A en Sichuan, China. *Genet Mol Res* 2015; 14(3): 8229-8235.

van Galen KPM, d'Oiron R, James P, Abdul-Kadir R, Kouides PA, Kulkarni R et al. Una nueva nomenclatura de portadores de hemofilia para definir la hemofilia en mujeres y niñas: Comunicación del SSC de la I STH. *J Thromb Haemost* 2021; 19(8): 1883-1887.