

## APLICACIÓN DEL ANÁLISIS DE AMPLIFICACIÓN DE SONDAS DEPENDIENTE DE LIGACIÓN MÚLTIPLE EN HEMOFILIA

P. Casaña<sup>1</sup>, M.Á. Lerma<sup>1</sup>, A.R. Cid<sup>1</sup>, S. Haya<sup>1</sup>, S. Monfort<sup>2</sup>, F. Martínez<sup>2</sup>, J.A. Aznar<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Unidad de Hemostasia y Trombosis. <sup>2</sup>Unidad de Genética y Diagnóstico Prenatal. Hospital Universitario y Politécnico La Fe. Valencia

Las grandes deleciones son poco frecuentes en hemofilia, pero causan enfermedad grave y conllevan un alto riesgo de aparición de inhibidores. La falta de amplificación de secuencias del gen permite reconocer deleciones en varones. Por el contrario, la identificación de portadoras no es posible por los métodos de amplificación convencionales, ya que la presencia del gen normal enmascara la deleción parcial o completa del gen. El uso de técnicas clásicas para tal fin resulta una tarea ardua, pero el análisis de amplificación de sondas dependiente de ligación múltiple (MLPA) ha demostrado ser de gran utilidad para detectar una o más dosis génica y está disponible para una gran variedad de enfermedades. El objetivo es valorar la aplicación del análisis MLPA en hemofilia A y B con las salsas de sondas comerciales P178 y P207.

**Pacientes y métodos:** En hemofilia A se incluyeron 79 individuos: 8 pacientes graves, 5 mujeres portadoras obligadas o consultantes, 40 pacientes leves y el resto eran familiares. Todos ellos procedían de 54 familias no relacionadas. En hemofilia B se incluyeron 10 mujeres y 2 pacientes pertenecientes a 4 familias no relacionadas, de un total de 42 enroladas en estudios del gen *F9*. Las muestras se resolvieron en un analizador genético 310 con genscan y se analizaron con el programa cofalyser v9.

**Resultados:** Se confirmaron 6 deleciones diferentes en el gen *F8*: Región promotora (RP)-exón (E)1, RP-E8, E3-E12, E16-E20, E23-E26 y E2-E22. Éstas se detectaron en heterozigosis en 7 mujeres y se descartaron en 6. Una disminución menor del 50% en la sonda del E3 se debía a una mutación puntual caracterizada posteriormente. Además, otra mujer resultó ser heterozigota para una gran deleción que comprende RP-E22 del gen *F8*. El resto mostró el patrón normal. La posterior secuenciación en 29 casos indicó solo detectó mutación causal en 9. En hemofilia B, se detectó una deleción que abarca el exón 7 y 8 del gen *F9* en 3 mujeres y se descartó en 2, una deleción del E1 en dos mujeres y una gran deleción que abarca todo el gen *F9* en un paciente y su madre. Otros estudios indicaron que ésta puede alcanzar entre 4 y 10 megabases que incluyen al menos 17 genes, lo cual podría explicar el retraso del desarrollo psicomotor que manifiesta el niño.

**Conclusiones:** En hemofilia A la detección de alteraciones fue aproximadamente del 4%, 8 en un total de 219 familias enroladas en estudios del gen *F8*. En hemofilia B las deleciones acontecieron en aproximadamente el 7% de los casos, 3 en 42 familias. Los resultados globales de detección no fueron elevados, pero están de acuerdo con lo previsto. Sin embargo, la importancia de los casos resueltos y la facilidad de aplicación del método lo convierten en una herramienta alternativa y útil en hemofilia. Las sondas que incluyen las salsas son específicas para zonas codificantes, por lo tanto una deleción completa del gen puede comprender otros genes cercanos que pueden o no manifestar síntomas. En estos casos es conveniente tratar de valorar la extensión de la deleción en beneficio de un mejor consejo genético.

*Financiado en parte por premio Confilhe 2009 de Baxter y proyecto AP 167/08 de la Generalitat Valenciana*