

Inversión de los intrones 1 y 22 del *F8* en pacientes con hemofilia A severa y portadoras del noreste de Uruguay

F8 intron 1 and 22 inversions in patients with severe haemophilia A and in carriers of the northeastern region of Uruguay

Inversão dos introns 1 e 22 do *F8* em pacientes com hemofilia A severa e portadoras do nordeste de Uruguai

Yasser Vega¹, María Faguaga², Martín Abelleyro³, Carlos De Brasi³, Eliane Bandinelli⁴, Mónica Sans⁵, Pedro Hidalgo¹

Resumen

La hemofilia A (HA) es la coagulopatía ligada al cromosoma X más frecuente. Es causada por mutaciones en el gen del factor VIII (FVIII) de coagulación (F8). La HA puede ser severa cuando la actividad del FVIII es menor a 1% (FVIII: C < 1IU/dL). Casi la mitad de las HA severas son producidas por inversiones del F8, como la del intrón 1 (Inv1) y del intrón 22 (Inv22). Los pacientes con HA severa experimentan sus primeros sangrados generales entre los 9,7 - 10,9 meses, ocurriendo principalmente en las articulaciones. Se investigó la presencia de la Inv1 e Inv22 en la región noreste de Uruguay (departamentos de Tacuarembó, Rivera y Cerro Largo) para estimar su frecuencia y detectar la presencia de portadoras. Fueron estudiados 14 individuos (ocho pacientes con HA severa, cuatro madres y dos hermanas de pacientes) de cinco familias. La investigación de las inversiones se realizó aplicando las pruebas de inverse shifting-PCR (IS-PCR). La Inv1 se encontró en

dos pacientes (hermanos) de Tacuarembó, en su hermana y madre (portadoras), mientras que un paciente de Rivera y su madre (portadora) resultaron positivos para la Inv22. Preliminarmente, en conjunto, la Inv1 y la Inv22 representan la causa de la HA severa en el 40% de las familias del noreste de Uruguay, valor menor a lo esperado; sin embargo, debido a la reducida población estudiada, la Inv1 muestra una frecuencia preliminar (20%, 1/5 familias, 25%, 2/8 pacientes) considerablemente mayor a estudios previos. Estos datos permiten caracterizar la etiología genética de la hemofilia, la detección de las portadoras, conocer la distribución geográfica de las mutaciones y el asesoramiento genético.

Palabras clave: Hemofilia A
Factor VIII
Intrones
Pruebas genéticas

1. Centro Universitario Tacuarembó. PDU Diversidad Genética Humana. UDELAR.

2. Banco de Sangre. Hospital Regional Tacuarembó.

3. Instituto Medicina Experimental (CONICET). Instituto Investigaciones Hematológicas Mariano R. Castex (Academia Nacional de Medicina). Buenos Aires. Argentina.

4. Depto. Genética. Instituto Biociencias. Universidad Federal Rio Grande do Sul. Porto Alegre. RS. Brasil.

5. Depto. Antropología Biológica. Facultad de Humanidades y Ciencias de la Educación. UDELAR.

UDELAR.

Trabajo inédito.

Declaramos no tener conflictos de intereses.

Fecha de recibido: 9 noviembre 2019

Fecha aprobado: 10 marzo 2020

doi: 10.31134/AP.91.2.3

Summary

Hemophilia A (HA) is the most common X-linked coagulopathy, it is caused by mutations in the coagulation factor VIII (FVIII) gene (F8). HA can be severe when the FVIII activity is less than 1% (FVIII: C < 1IU / dL). Almost a half of the severe HAs are produced by inversions of F8, the intron 1 (Inv1) and intron 22 (Inv22). Patients with severe HA show their first general bleeding between 9.7 - 10.9 months, mainly in the joints. We researched the presence of Inv1 and Inv22 in the Northeast region of Uruguay (Departments: Tacuarembó, Rivera and Cerro Largo) to estimate their frequency and detect the presence of carriers. We studied 14 individuals in 5 different families (8 patients with severe HA, 4 mothers and 2 sisters of patients). The inversion study was carried out using inverse shifting-PCR (IS-PCR) tests. Inv1 was found in 2 patients (siblings) from Tacuarembó, in their sister and mother (carriers). A patient from Rivera and his mother (carrier) were positive for Inv22. Inv1 and Inv22 are the cause of severe HA in 40% of the patients in North East of Uruguay, less than expected; however, due to the reduced population studied, Inv1 shows a considerably higher frequency than previous studies. These data enable us to characterize the genetic etiology of hemophilia, to adequately monitor patients, detect carriers, the geographical distribution of mutations and the corresponding genetic counseling for families.

Key words: Hemophilia A
Factor VIII
Introns
Genetic testing

Resumo

A hemofilia A (HA) é a coagulopatia ligada ao cromossomo X mais frequente, causada por mutações no gene do fator VIII (FVIII) de coagulação (FVIII) (F8). A HA pode ser grave quando a atividade do FVIII é menor que 1% (FVIII: C < 1IU / dL). Quase metade da HA grave é produzida por inversões de F8, como a do íntron 1 (Inv1) e do íntron 22 (Inv22). Pacientes com HA grave experimentam seu primeiro sangramento geral entre 9,7 e 10,9 meses, principalmente nas articulações. A presença de Inv1 e Inv22 na região nordeste do Uruguai (departamentos: Tacuarembó, Rivera e Cerro Largo) foi investigada para estimar a sua frequência e detectar a presença de portadora.

Foram estudados 14 indivíduos (8 pacientes com HA grave, 4 mães e 2 irmãs de pacientes) de 5 famílias. A pesquisa das inversões foi realizada aplicando os testes de inverse shifting -PCR (IS-PCR). Encontramos Inv1 em 2 pacientes (irmãos) de Tacuarembó, na sua irmã e mãe (portadoras), enquanto 1 paciente de Rivera e sua mãe (transportadora) foram positivos para Inv22. Preliminarmente, Inv1 e Inv22 juntos representam a causa de HA grave em 40% das famílias do nordeste do Uruguai, valor inferior ao esperado, no entanto, devido à pequena população estudada, Inv1 mostra uma frequência preliminar (20%, 1/5 famílias, 25%, 2/8 pacientes) consideravelmente mais alta que os estudos anteriores. Esses dados permitem-nos caracterizar a etiologia genética da hemofilia, detectar aos portadores, conhecer a distribuição geográfica das mutações e realizar aconselhamento genético.

Palavras chave: Hemofilia A
Fator VIII
Íntrons
Testes genéticos

Introducción

La hemofilia A (HA, MIM # 306700) es la coagulopatía ligada al cromosoma X más frecuente, afectando a 1-2 en 10.000 varones en todas las poblaciones humanas⁽¹⁾. Muestra grados variables de severidad clínica-bioquímica y se puede clasificar como HA severa cuando la actividad del factor VIII de la coagulación es menor a 1% (FVIII: C < 1 IU/dL), HA moderada cuando los valores son de 2% a 5% (FVIII: C: 2 - 5 IU/dL) y HA leve con valores de 6% a 30% (FVIII: C: 6 - 30 IU/dL)⁽²⁾. En proporción, cerca del 50 % de los casos de HA son severos, 10% moderados y aproximadamente un 40% son leves. Se ha observado que las articulaciones son las regiones del cuerpo afectadas más comúnmente, produciéndose inflamación, dolor, disminución de la función y artritis degenerativa⁽¹⁾.

Las articulaciones afectadas con mayor frecuencia son las rodillas, los codos, los tobillos, los hombros y las caderas. La artropatía hemofílica puede producir una afección inflamatoria progresiva que genere limitación del movimiento y discapacidad permanente; las hemorragias musculares pueden causar necrosis y neuropatía; por otra parte, la hemorragia intracraneal muestra ser poco común, pero puede ocurrir luego de algún trauma leve en la cabeza y conlleva severas complicaciones. La hematuria suele ser ocasional y generalmente es indolora, el sangrado de la lengua o laceraciones de los labios es a menudo persistente^(1,2). Los pacientes con HA severa experimentan sus primeros sangrados articulares, en

promedio, entre los 13,8 - 16,1 meses de vida y sangrados generales entre los 9,7 - 10,9 meses⁽³⁾.

Debido a su patrón de herencia ligado al sexo (cromosoma X), la HA afecta casi exclusivamente a los varones; sin embargo, algunas mujeres portadoras pueden tener valores de 50% de la actividad del FVIII y mostrar coagulabilidad disminuida sin signos clínicos⁽⁴⁾. Por otra parte, se ha encontrado que las mujeres portadoras de hemofilia A y B sangran con más frecuencia que las mujeres no portadoras, especialmente después de procedimientos médicos, como extracción de dientes o amigdalectomía. Los niveles reducidos del FVIII se han correlacionado con un fenotipo de hemofilia leve⁽⁵⁾.

La HA es causada por mutaciones deletéreas en el gen del factor VIII (FVIII) de coagulación (*F8*). Casi la mitad de las HA severas están asociadas a inversiones del *F8*, la inversión del intrón 22 (Inv22)^(6,7) y del intrón 1 (Inv1)⁽⁸⁾. En el intrón 22 del *F8* se extiende una secuencia de 9,5 kb (*int22h-1*) que posee dos copias extragénicas (*int22h-2* y *-3*) a una distancia de alrededor de 500 kb a 600 kb del *F8*. Estas copias promueven la recombinación intracromosómica principalmente durante la gametogénesis masculina⁽⁹⁾. La Inv22 puede ser de tipo 1, cuando recombina la copia *int22h-1* y la *int22h-3*, o tipo 2, cuando la recombinación ocurre entre las copias *int22h-1*, y *int22h-2*⁽¹⁰⁻¹¹⁾. Por su parte, el intrón 1 posee un segmento de 1041 pb (*int1h-1*) con una copia extragénica (*int1h-2*) a unas 140 kb hacia el telómero Xq, cuya recombinación puede generar la Inv1⁽⁸⁾.

Según datos de la Federación Mundial de Hemofilia (WFH), para el 2018, se estimó que existían en Latinoamérica más de 32.400 personas que vivían con algún tipo de hemofilia⁽¹²⁾. En Uruguay, en el año 2013, se reportaron 236 personas con hemofilia⁽¹³⁾, y para 2018, según el último reporte de la WFH, existían 278 casos⁽¹²⁾, evidenciando un incremento de 17,8%. Por otra parte, con respecto a la causa genética de la HA severa en países de la región, como Argentina, Brasil y México, se ha estimado que la Inv22 es la causa de 45%-46% de los pacientes con HA severa y la Inv1 de 0,5-1,5%⁽¹⁴⁻²⁰⁾.

La caracterización de la etiología genética de la hemofilia permite una correlación precisa del fenotipo y su severidad, lo cual resulta útil para un seguimiento adecuado del paciente, facilita el diagnóstico de portadoras y permite conocer la distribución de estas mutaciones causales de HA en la población. Este trabajo fue realizado con el objetivo de investigar la presencia de Inv1 e Inv22 del *F8* en pacientes con HA severa del noreste de Uruguay, detectar portadoras y comparar la frecuencia (preliminar) estimada de las inversiones con datos de países de la región.

Pacientes y método

Pacientes

Se estudiaron un total de 14 individuos (ocho pacientes con HA severa, cuatro madres y dos hermanas) pertenecientes a cinco familias no relacionadas del noreste de Uruguay, de las ciudades de Tacuarembó, Rivera y Melo. Todos los individuos autorizaron su participación en el estudio por medio del consentimiento informado previamente aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Humanidades y Ciencias de la Educación, Universidad de la República (Exp. 121900-000602-19). Los pacientes con HA severa fueron diagnosticados previamente, con base en su clínica y por tener disminuida la actividad del FVIII en menos de 1%.

Extracción de ADN

Se realizó la extracción del ADN genómico a partir de leucocitos de sangre periférica congelada por el método de *salting-out* y precipitación alcohólica⁽²¹⁾.

Detección de las inversiones

La investigación de la Inv1 e Inv22 se realizó aplicando las pruebas de *inverse shifting*-PCR (IS-PCR)⁽²²⁾. En resumen, este protocolo consta de los siguientes pasos:

1. **Restricción.** Tratamiento del ADN genómico con la enzima de restricción *Bcl*-I. Esta enzima realiza cortes del ADN en los extremos flanqueantes a las regiones homólogas del intrón 1 y del intrón 22, tanto en la copia intragénica (prueba diagnóstica) como en las extragénicas (prueba complementaria).
2. **Ligación.** Posteriormente se realiza un paso de ligación (enzima DNA ligasa). En este paso se unen los extremos flanqueantes de cada fragmento de restricción formando círculos *Bcl*-I; entre ellos, se forman los círculos en cuyo interior se encuentran las regiones homólogas pronas a la generación de las inversiones.
3. **Amplificación.** Una vez formados los círculos, se amplifican por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) la región de los extremos que se han ligado, de esta manera se encontrarán fragmentos de amplificación de diferentes tamaños en presencia o ausencia de las inversiones, tanto para la inversión de intrón 22 (tipo 1 o tipo 2) como para la del intrón 1.

La ausencia de Inv22 se observa por la presencia de los fragmentos de 487 pares de bases (pb) (prueba diagnóstica) y de 405/457 pb (prueba complementaria). La inversión 22 tipo 1 se observa al encontrar el fragmento de 333 pb para la prueba diagnóstica y los fragmentos de 457/559 pb en la prueba complementaria. La Inv22 tipo 2 se observa al encontrar el fragmento de amplificación de 385 pb en la prueba diagnóstica y los frag-

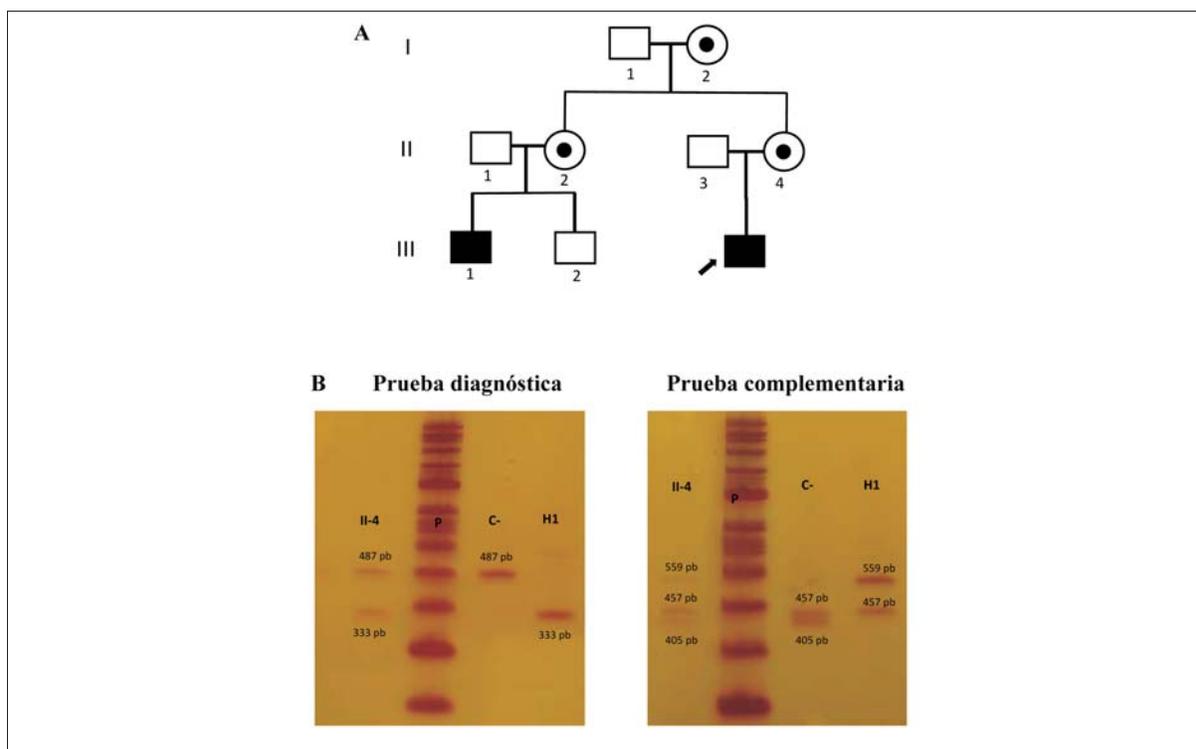


Figura 1. Familia con inversión del intrón 22. El panel A muestra la genealogía de la familia con un caso índice positivo para Inv22 (señalado con la flecha) y su madre (portadora); el paciente III-1 y su madre (II-2) no fueron estudiados. El panel B muestra los resultados de la IS-PCR observada en geles de poliacrilamida. Se muestra que el caso índice (H1) tiene en la prueba diagnóstica el fragmento de 333 pb y en la prueba complementaria los fragmentos de 457 pb y 559 pb, lo que confirma la presencia de Inv22 tipo 1. Su progenitora (II-4) muestra los fragmentos de 333 pb y 487 pb en la prueba diagnóstica y de 405 pb, 457 pb y 559 pb en la prueba complementaria, demostrando su estado de portadora de Inv22 tipo 1. La banda C- representa un control negativo para Inv22. P representa el patrón de peso molecular.

mentos de 405/559 pb. La ausencia de Inv1 se observa con el fragmento de 304 pb, mientras que su presencia se observa al encontrar el fragmento de 224 pb.

Los fragmentos de las amplificaciones obtenidas en la IS-PCR fueron observados y analizados por electroforesis en gel de poliacrilamida al 8% y se emplearon controles positivos para Inv1 e Inv22, cedidos por el equipo de genética de la hemofilia de la Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires.

Resultados y discusión

En ocho individuos estudiados (cinco pacientes, dos madres y una hermana), pertenecientes a tres familias no relacionadas, se observó la ausencia de Inv22 e Inv1, encontrándose las señales de amplificación de los fragmentos de 487 pares de bases (pb) en la prueba diagnóstica de Inv22, las señales de 405/457 pb en la prueba complementaria de Inv22 y la señal de 304 pb de Inv1.

Por otra parte, en una familia proveniente de Rivera (figura 1A), se encontró que un paciente resultó positivo

para Inv22 tipo 1 (figura 1A. H1) al mostrar el fragmento de 333 pb para la prueba diagnóstica de Inv22 y los fragmentos de 457/559 pb en la prueba complementaria de Inv22, su madre (figura 1A. II-4) mostró los fragmentos de 333/487 pb y de 405/459/559 pb en la prueba diagnóstica y complementaria para Inv22, respectivamente, (figura 1B), confirmando su estado de portadora.

En una familia de Tacuarembó (figura 2A) se encontró que dos pacientes (hermanos) resultaron ser positivos para Inv1 (fragmento de 224 pb); su hermana y madre mostraron los fragmentos de 224/324 pb, representativo del estado de portadoras de Inv1 (figura 2B).

La estimación de la frecuencia de las inversiones en los pacientes del noreste de Uruguay muestra que preliminarmente el 40% de las familias con HA severa poseen Inv22 o Inv1 (2/5), mientras que por tipos de inversiones, Inv22 es la causa en el 20% (1/5) de las familias estudiadas y la Inv1 es la causa del restante 20% (1/5).

Estos resultados pueden considerarse como preliminares, representan un primer reporte de ocho pacientes

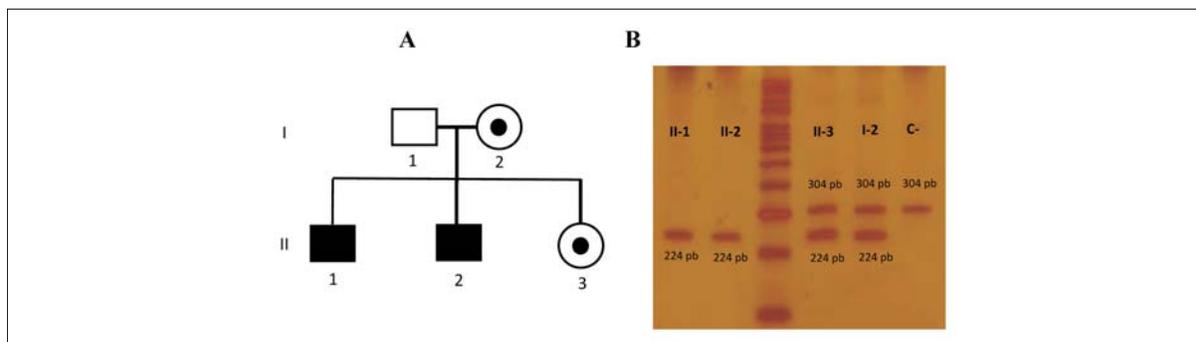


Figura 2. Familia con la inversión del intrón 1. El panel A muestra la genealogía de la familia con dos pacientes positivos para la Inv1 (II-1 y II-2) y a la madre (I-2) y hermana (II-3) como portadoras. El panel B muestra los resultados de las IS-PCR observadas en geles de poliacrilamida, se muestra que los pacientes (II-1 y II-2) tienen el fragmento de 224 pb, confirmando la presencia de la Inv1. La progenitora (I-2) y su hija (II-3) muestran los fragmentos de 224 pb y 304 pb, demostrando su estado de portadoras de la Inv1. La banda C- representa el control negativo para Inv1. P representa el patrón de peso molecular.

pertenecientes a cinco familias con HA severa. Teniendo en cuenta la baja densidad de la población en esta región, que representa un poco más del 8% del total de los habitantes del país (3.440.157), en un área que comprende el 22% del territorio (38.456 km²)⁽²³⁾, el número de individuos estudiados en la región noreste de Uruguay es pequeño en comparación con series similares de países de la región, como Argentina y Brasil. Por tal motivo no resultan extrapolables; sin embargo, es interesante observar que un estudio realizado en Argentina en 80 familias con HA severa, se muestra una frecuencia de 46% para Inv22 e Inv1 en conjunto⁽¹⁷⁻¹⁹⁾. En Brasil, en tres estudios realizados que incluyeron a 189 familias, se observó una frecuencia en promedio igual a la de Argentina (46%)^(15-16,20), lo cual dista en 6% de esta primera aproximación obtenida en el noreste de Uruguay.

Por otra parte, si se clasifica por tipos de inversión, este reporte preliminar muestra que en la región noreste de Uruguay, Inv22 es la causa de la HA severa en el 20% de las familias estudiadas y la Inv1 del restante 20% (si se analiza por pacientes, la frecuencia de Inv22 es aun menor, siendo de 12,5%, y la Inv1 es considerablemente mayor al ser de 25%). En un reporte de 2.093 pacientes con HA severa, estudiados por investigadores de 14 países, se estimó en 42% la frecuencia de Inv22⁽¹¹⁾, y en otra estimación que incluye datos de 3.871 pacientes de 13 países de Europa, Oceanía y Latinoamérica (Argentina, Brasil y México), la frecuencia de Inv22 va de 40% a 49%⁽²⁰⁾. Con respecto a Inv1, las frecuencias varían de 0 a 5% en parte de los países mencionados anteriormente, y en Argentina y Brasil la frecuencia es de 1%⁽¹⁵⁻²⁰⁾. En el noreste de Uruguay se observa un valor preliminar de 20%.

Un dato importante se encontró al estudiar a la hermana de los pacientes con Inv1 (figura 2A y B), cuya actividad del FVIII fue de 97%. Teniendo en cuenta que la

Tabla 1. Pacientes con HA severa y portadoras con inversiones del *F8* (noreste de Uruguay).

	Inversión 22	Inversión 1	Total
Pacientes	1	2*	3
Portadoras	1	2**	3
Total	2	4	6

* Hermanos.

** Madre-hija.

mayoría de las portadoras tienen disminuida la actividad del FVIII en un 50%⁽²⁴⁾, se sospechaba la ausencia de Inv1; sin embargo, el estudio molecular permitió determinar su estado de portadora al encontrar las señales de 204/324 pb en la IS-PCR (figura 2. II-3). La investigación y caracterización de las portadoras es una parte importante en el manejo de la hemofilia que posibilita el adecuado asesoramiento genético de las familias.

El estudio de la inversión del Inv1 y del Inv22 resulta crucial en la determinación de la etiología genética de los pacientes con HA, considerando que entre 40% y 50% de los pacientes con HA severa tienen dichos arreglos en *F8*⁽⁹⁻¹¹⁾, así como para la detección de portadoras. Estos resultados representan el primer estudio realizado en Uruguay para determinar la presencia de Inv1 e Inv22 en pacientes con HA severa de la región noreste, así como la presencia de portadoras en las familias informativas (tabla 1). Dada su aplicabilidad y por ser un estudio adecuado y costo-efectivo para la caracterización de las mutaciones causales de HA severa, consideramos valioso y pertinente que se estudie el total de los pacientes de Uruguay.

Agradecimientos

Agradecemos al personal de enfermería del Servicio de Hemoterapia del Hospital Regional de Tacuarembó por su valiosa colaboración en la obtención de las muestras, así como a los pacientes y sus familiares.

Referencias bibliográficas

1. **Antonarakis S, Kazazian H, Tuddenham E.** Molecular etiology of factor VIII deficiency in hemophilia A. *Hum Mutat* 1995; 5(1):1-22.
2. **Hoyer L.** Hemophilia A. *N Engl J Med* 1994; 330(1):38-47.
3. **Carcao M, van den Berg H, Ljung R, Mancuso M.** Correlation between phenotype and genotype in a large unselected cohort of children with severe hemophilia A. *Blood* 2013; 121(19):3946-52.
4. **Srámek A, Kriek M, Rosendaal F.** Decreased mortality of ischaemic heart disease among carriers of haemophilia. *Lancet* 2003; 362(9381):351-4.
5. **Plug I, Mauser E, Bröcker A, van Amstel H, van der Bom J, van Diemen J, et al.** Bleeding in carriers of hemophilia. *Blood* 2006; 108(1):52-6.
6. **Lakich D, Kazazian H Jr, Antonarakis S, Gitschier J.** Inversions disrupting the factor VIII gene are a common cause of severe haemophilia A. *Nat Genet* 1993; 5(3):236-41.
7. **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):1773-8.
8. **Bagnall R, Waseem N, Green P, Giannelli F.** Recurrent inversion breaking intron 1 of the factor VIII gene is a frequent cause of severe hemophilia A. *Blood* 2002; 99(1):168-74.
9. **Rossiter J, Young M, Kimberland M, Hutter P, Ketterling R, Gitschier J, et al.** Factor VIII gene inversions causing severe hemophilia A originate almost exclusively in male germ cells. *Hum Mol Genet* 1994; 3(7):1035-9.
10. **Naylor J, Buck D, Green P, 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(7):1217-24.
11. **Antonarakis S, Rossiter J, Young M, Horst J, de Moerloose P, Sommer S, et al.** Factor VIII gene inversions in severe hemophilia A: results of an international consortium study. *Blood* 1995; 86(6):2206-12.
12. **World Federation of Hemophilia.** 20 Report of the Annual Global Survey 2018. Montréal: WFH, 2019. Disponible en: <http://www1.wfh.org/publications/files/pdf-1731.pdf>. [Consulta: 28 febrero 2020].
13. **Boggia B, Lemos F, Mezzano R, Tiscornia A, Segovia A.** Primera guía práctica clínica de hemofilia, Uruguay 2013. Montevideo: Sociedad Uruguaya de Pediatría, Sociedad Uruguaya de Hemostasia y Trombosis, 2013.
14. **Mantilla J, Beltrán C, Luna H, Aguilar L, Esparza M, López B, et al.** Frequency of intron 1 and 22 inversions of Factor VIII gene in Mexican patients with severe hemophilia A. *Am J Hematol* 2007; 82(4):283-7.
15. **Figueiredo M, Tavella M, Simões B.** Large DNA inversions, deletions, and TaqI site mutations in severe haemophilia A. *Hum Genet* 1994; 94(5):473-8.
16. **Soares R, Chamone D, Bydlowski S.** Factor VIII gene inversions and polymorphisms in Brazilian patients with haemophilia A: carrier detection and prenatal diagnosis. *Haemophilia* 2001; 7(3):299-305.
17. **De Brasi C, Candela M, Cermelj M, Slavutsky I, Larripa I, Bianco R, et al.** Intron 22 factor VIII gene inversions in Argentine families with severe haemophilia A. *Haemophilia* 2000; 6(1):21-2.
18. **Rossetti L, Candela M, Bianco R, de Tezanos M, Western A, Goodeve A, et al.** 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(7):569-72.
19. **Rossetti L, Radic C, Candela M, Pérez R, de Tezanos M, Goodeve A, et al.** Sixteen novel hemophilia A causative mutations in the first Argentinian series of severe molecular defects. *Haematologica* 2007; 92(6):842-5.
20. **Leiria L, Roisenberg I, Salzano F, 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.
21. **Lahiri D, Nurnberger J.** A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* 1991; 19(19):5444.
22. **Rossetti L, Radic C, Larripa I, De Brasi C.** Developing a new generation of tests for genotyping hemophilia-causative rearrangements involving int22h and int1h hotspots in the factor VIII gene. *J Thromb Haemost* 2008; 6(5):830-6.
23. **Instituto Nacional de Estadística.** Uruguay en cifras 2014. Montevideo: INE, 2014. Disponible en: http://www.ine.gub.uy/documents/10181/39317/Uruguay_en_cifras_2014.pdf. [Consulta: 21 octubre 2019].
24. **Rapaport S, Patch M, Moore F.** Anti-hemophilic globulin levels in carriers of hemophilia A. *J Clin Invest* 1960; 39(11):1619-25.

Correspondencia: Msc. Yasser Vega.
Correo electrónico: yasser.vega@cut.edu.uy

Todos los autores declaran haber colaborado en forma significativa.

Yasser Vega ORCID 0000-0002-8554-5266, María Faguaga ORCID 0000-0003-4194-9784, Martín Abelleiro ORCID 0000-0002-9961-9414, Carlos De Brasi ORCID 0000-0003-2379-4379, Eliane Bandinelli ORCID 0000-0002-7697-9097, Mónica Sans ORCID 0000-0002-1564-8761, Pedro Hidalgo ORCID 0000-0001-5207-9660