

---

---

## Diagnóstico prenatal molecular indirecto de Hemofilia A y B.

Alisandra Morales-Machín<sup>1</sup>, Lisbeth Borjas-Fajardo<sup>1</sup>, William Zabala<sup>1</sup>, Francisco Álvarez<sup>1</sup>, Erika Fernández<sup>2</sup>, Mariana Zambrano<sup>3</sup>, Wilmer Delgado<sup>1</sup>, María Luisa Hernández<sup>4</sup>, Ernesto Solís-Añez<sup>1</sup> y José Antonio Chacín<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Unidad de Genética Médica, <sup>2</sup>Sección de Bioquímica, Instituto de Investigaciones Clínicas "Dr. Américo Negrette", <sup>3</sup>Cátedra de Bioquímica Clínica, Escuela de Bioanálisis y <sup>4</sup>Cátedra de Histología y Embriología, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela.

**Palabras clave:** Diagnóstico prenatal, hemofilia A, hemofilia B, reacción en cadena de la polimerasa, PCR.

**Resumen.** La hemofilia A (HA) y B (HB), son enfermedades hereditarias de la coagulación sanguínea, su mecanismo de transmisión es recesivo ligado al cromosoma X y son debidas a mutaciones en los genes que codifican respectivamente para el factor VIII, localizado en Xq28 y para el factor IX, localizado en Xq27; esto ocasiona deficiencia o ausencia de estas proteínas en el plasma. Múltiples mutaciones son responsables de la alteración en estos dos genes, razón por la cual resulta poco práctica la aplicación de un método de diagnóstico molecular directo en la identificación de mujeres portadoras y de fetos afectados; por ello, la estrategia diagnóstica adecuada es el empleo de polimorfismos ligados al gen, los cuales son independientes de la mutación y su análisis permite seguirle la pista al cromosoma X portador de la mutación, apoyándose en el estudio del árbol genealógico familiar. El objetivo de este trabajo fue identificar desde el punto de vista molecular, gestantes portadoras de HA o HB y fetos varones afectados o no por estas enfermedades, referidos a la Unidad de Genética Médica de la Universidad del Zulia (UGM-LUZ), Maracaibo, Venezuela. Se analizaron 32 muestras de DNA correspondientes a 8 gestantes, 8 fetos, 8 varones afectados y 8 varones sanos para el factor VIII. A través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se amplificó un fragmento de 142 pares de bases (pb) que corresponde al intrón 18 del gen, el cual contiene un polimorfismo de restricción para la enzima *BclI* y a través de PCR duplex se amplificaron secuencias STRs de los intrones 13 y 22, y para el factor IX, se amplificaron los polimorfismos *HinfI*, *XmnI* y *TaqI*; se pudieron elaborar los haplotipos respectivos en las personas clave de las familias afectadas, que permitieron identificar en 5 de las 8 familias al cromosoma X portador de la mutación responsable de estas

enfermedades, logrando diagnosticar tres fetos varones sanos, dos fetos varones afectados con HA y tres fetos hembras.

### **Indirect prenatal molecular diagnostic of Haemophilia A and B.**

*Invest Clin 2008; 49(3): 289 - 297*

**Key words:** Prenatal diagnosis, Haemophilia A, Haemophilia B, polymerase chain Reaction.

**Abstract.** Haemophilia A (HA) and B (HB) are the most common inherited bleeding diseases. HA and HB are X-linked recessive disorders caused by mutation in the factor VIII gene which maps to Xq28 and factor IX located at Xq27, respectively; resulting in absence or deficiency of these proteins. Several mutations have been reported as responsible for the disturbance of these genes; therefore, the use of direct molecular techniques to analyze the carrier status of women and their affected fetuses is not easy to perform. Thus, gene linked polymorphisms analysis is the most convenient molecular test since it is independent from the nature of the mutation, allowing the identification of the mutant X chromosome by following its segregation along the pedigree. The main objective of this research was to perform the molecular diagnosis of HA or HB carrier status in pregnant women and male fetuses affected or not, who were referred to the Medical Genetic Unit of the University of Zulia (UGM-LUZ), Maracaibo, Venezuela. Molecular analysis for HA and HB was performed in 32 DNA samples from 8 pregnant women, 8 fetuses, 8 affected and 8 healthy males. Using the Polymerase Chain Reaction (PCR), a 142 bp (bases pairs) fragment, which corresponds to intron 18 of the Factor VIII gene, was amplified. This fragment has a restriction polymorphism for the enzyme *Bcl I*. Additionally, a Duplex PCR was performed for the STRs (short tandem repeat) of introns 13 and 22 of the same gene. On the other hand, *Hinf I*, *Xmn I* y *Taq I* polymorphism in the factor IX gene were also amplified, so, we were able to build the haplotypes for each one of the key members in the families affected. The latter, allowed us to identify, in five of the eight cases, the mutant X chromosome responsible of HA and HB, thus, prenatal diagnosis was possible with the following results: three healthy males fetuses, two affected males fetuses with HA and three females fetuses.

*Recibido: 07-03-2007. Aceptado: 15-11-2007.*

### **INTRODUCCIÓN**

Las Hemofilia A (HA) y B (HB), son enfermedades genéticas graves, cuyo mecanismo de transmisión hereditario es recesivo ligado al cromosoma X; la HA tiene una incidencia de 1 por cada 5.000 a 10.000 varo-

nes nacidos vivos (1-7) y la HB de 1 por cada 30.000 a 40.000 (8, 9).

Ambas entidades se caracterizan por alteraciones en la coagulación sanguínea. La manifestación clínica principal es el sangrado, cuya localización, frecuencia y gravedad dependerá de la actividad del factor

VIII (FVIII) y del factor IX (FIX) respectivamente (7, 9).

El gen que codifica el FVIII se localiza en el brazo largo del cromosoma X en la región Xq28, tiene una longitud de 186 Kilo-bases (Kb) distribuída en 26 exones y 25 intrones. Se han reportado múltiples mutaciones (2, 4, 5, 7, 10, 11). El gen que codifica el factor IX también se localiza en el brazo largo del cromosoma X pero en la región Xq27, tiene una longitud de 34 Kb y está compuesto por 8 exones y 7 intrones, y también se ha detectado amplia heterogeneidad alélica (11-13).

Tradicionalmente, el diagnóstico de afectados y de portadoras de HA y HB se había basado conjuntamente en el cuadro clínico y en la medición del porcentaje de actividad coagulante de los factores VIII y IX respectivamente. El diagnóstico prenatal se realizaba mediante la determinación de la actividad coagulante e inmunológica de FVIII o FIX en sangre obtenida por cordocentesis entre las 18 y 20 semanas de gestación (1, 10, 13-15).

En la actualidad estos métodos han sido superados por la aplicación de las técnicas de análisis directo o indirecto del ácido desoxirribonucleico (ADN) embrionario o fetal, extraído de muestras del producto de la concepción obtenidas por procedimientos invasivos tales como: biopsia de vellosidades coriónicas, amniocentesis y cordocentesis (1, 2, 10, 16).

Debido a la gran variedad de mutaciones que puede presentarse a lo largo del gen, se ha dificultado la detección directa de la mutación causante de la enfermedad, dado que muchas familias afectadas de HA y HB tienen generalmente una mutación distinta en el gen, por lo que, se ha desarrollado una estrategia, basada en el estudio de la segregación familiar de polimorfismos presentes en el DNA, independientes de la naturaleza de la mutación responsable de la enfermedad, lo que ha hecho posible identifi-

car al cromosoma X portador del gen defectuoso. De esta manera, se puede establecer el diagnóstico indirecto molecular tanto de portadoras como del estado de afectación de nuevos casos familiares de HA y HB incluido el diagnóstico prenatal (1, 2, 4-6, 9, 10, 17).

El objetivo de este trabajo fue identificar el estado de portadora de mujeres gestantes con historia familiar de HA o HB mediante análisis molecular indirecto y diagnosticar si sus fetos varones estaban afectados o no con estas enfermedades.

### PACIENTES Y MÉTODOS

Se estudiaron 8 gestantes entre 21 y 30 años de edad con embarazos de edad gestacional entre 15 y 17 semanas, con antecedente de más de 1 familiar en primer y/o segundo grado afectado con HA o HB severa. El diagnóstico de HA y de HB en los familiares afectados fue realizado previamente por un hematólogo, de acuerdo a las manifestaciones clínicas y la determinación de la actividad del FVIII, y del FIX en el plasma según sea el caso, quien los refirió a la consulta de Genética de la Unidad de Genética Médica de LUZ (UGM-LUZ), Maracaibo, Venezuela.

A 7 de las 8 gestantes se les realizó amniocentesis bajo monitorización ecográfica entre las 15 y 17 semanas de gestación, sin complicaciones, se obtuvieron entre 12 y 15 cc de líquido amniótico y se extrajo ADN directamente de amniocitos sin cultivar y amniocitos cultivados, mediante la técnica descrita por Old (18). A una de las gestantes se le realizó la amniocentesis en 2 embarazos consecutivos.

Se obtuvo ADN de 24 muestras, a partir de 200  $\mu$ L de sangre periférica anticoagulada con EDTA 500 mM según técnica CTAB/DTAB (19). Dichas muestras corresponden a las 8 gestantes, un familiar varón afectado y un familiar varón sano por cada una de ellas.

Para la realización de este trabajo, se contó con el consentimiento informado de las familias estudiadas y la aprobación del Comité de Bioética de la UGM-LUZ.

### Análisis molecular

Previo al análisis de los polimorfismos del gen del FVIII y del FIX, a los 8 fetos se les realizó la identificación de género mediante análisis de la presencia de secuencias exclusivas del cromosoma Y (20), confirmado posteriormente a través de cariotipo fetal según técnica convencional.

Para el análisis de polimorfismos en el gen de HA, se realizó PCR para amplificar un fragmento de 142 pb localizado en el intron 18 del gen del FVIII, el cual contiene un polimorfismo de restricción para la enzima *BclI* con alelos de 142 y 99 + 43 pb (6, 17, 21, 22). Para la amplificación se utilizaron los iniciadores: I18A 5'-TAA-AAG-CTT-TAA-ATG-GTC-TAG-GC-3', I18B 5'-TTC-GAA-TTC-TGA-AAT-TAT-CTT-GTT-C-3'. También se amplificaron fragmentos de los intrones 13 y 22, analizando los polimorfismos (CA)<sub>n</sub> y (GT)<sub>n</sub> (AG)<sub>n</sub> (23 - 25). Estos dos polimorfismos se analizaron en una misma reacción de PCR y se caracterizaron en gel de poliacrilamida (PAGE) al 10% con tinción argéntica. Los iniciadores utilizados fueron: I13A 5'-TGC-ATC-ACT-GTA-CAT-ATG-TAT-CTT-3'. I13B 5'-CCA-AAT-TAC-ATA-TGA-ATA-AGC-C-3'. I 22A 5'-TTC-TAA-GAA-TGT-AGT-GTG-TG-3', I 22B 5'-TAA-TGC-CCA-CAT-TAT-AGA-3'.

Para el análisis de polimorfismos en el gen de HB, se amplificaron fragmentos de 325 y 375 pb del polimorfismo *HinfI* (26,27). Se utilizaron los iniciadores: I1A 5'-GTC-CAT-CAT-TGA-CCA-AA-3'. I1B 5'-GAC-ACT-CCT-GAA-CTC-T-3'. Un fragmento de 1.176 pb fue amplificado conteniendo un polimorfismo de restricción para la enzima *XmnI* (9, 28), generando fragmentos de 1.176, 858 + 318 pb (27). Para la amplificación se utilizaron los iniciado-

res: I3A 5'-AAT-CAG-AGA-CTG-CTG-ATT-GAC-TT-3', I3B 5'-AAA-CAG-CCA-GAT-AAA-GCC-TCC-A-3'. Un nuevo fragmento de 343 pb fue amplificado, conteniendo un polimorfismo de restricción para la enzima *TaqI* (29), generando tamaños de 343, 171 + 172 pb (27). Se utilizaron los Iniciadores: I4A 5'-TTG-CAT-CTG-GAG-GTA-AT-3', I4B 5'-CAT-GAC-TAA-ATT-GCT-ATC-3'. Todos los productos amplificados y digeridos según el caso para diagnóstico de HB se caracterizaron en geles de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio.

### RESULTADOS

Se estudiaron 6 gestantes con antecedente de HA y 2 de HB. Del primer grupo, 4 cumplían con criterios de ser portadora obligada y 2 eran posibles portadoras. Para el polimorfismo *BclI* (Fig. 1), 3 de ellas resultaron informativas (heterocigotas), otra para el intrón 13 y las 2 restantes fueron homocigotas para los 3 polimorfismos, sin embargo se pudo determinar el estado portador en ambas, al comparar la muestra de cada una de ellas con la de un familiar en primer grado afectado y uno sano, resultando homocigotas para el alelo presente en el familiar afectado (Tabla I).

Con respecto a las gestantes con antecedente de HB, ambas fueron homocigotas para los 3 sistemas polimórficos ligados a HB (Tabla II), pero el análisis molecular de los tres polimorfismos permitió diagnosticar a una de ellas como no portadora cuando su muestra fue comparada con la de un hermano afectado y la otra resultó portadora al comparar su muestra con la de una hermana portadora heterocigota y la de un sobrino afectado, resultando ella homocigota para el alelo del afectado.

Con el análisis molecular de las familias, se realizó la construcción de los haplotipos de cada uno de sus integrantes en primer grado en las 6 familias con anteceden-

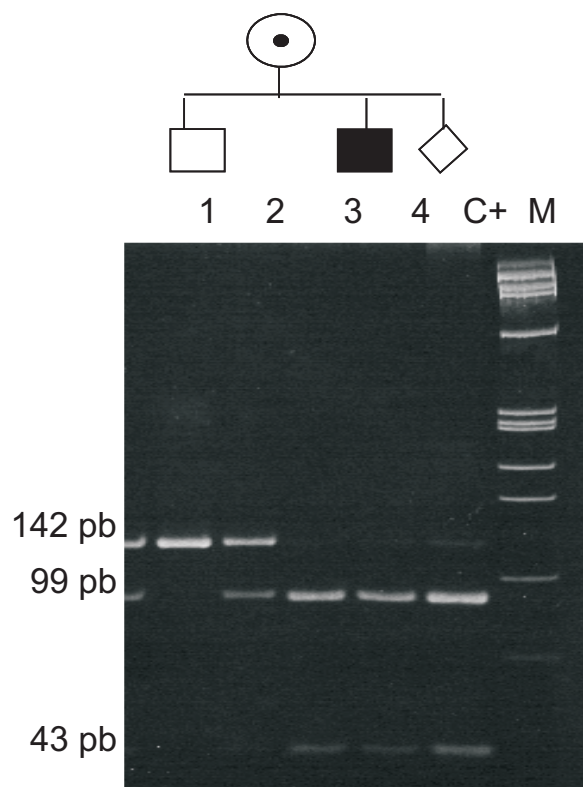


Fig. 1. Imagen de un gel de poliacrilamida al 10% en donde se observan los fragmentos de restricción del polimorfismo *BclI* en la familia N° 1 con antecedentes de HA. Línea 1: hijo sano; línea 2: madre portadora informativa; línea 3: hijo afectado; línea 4: feto afectado; C+: Control positivo de la digestión y M: Marcador de peso molecular  $\theta 174 \times$  Hae III.

tes de HA y en una familia con HB, en la otra familia con antecedentes de HB se incluyeron familiares de segundo grado; las diferencias detectadas por los polimorfismos entre dos regiones homólogas de un mismo par cromosómico permitieron seguir en un árbol genealógico la herencia de cada uno de los miembros de dicho par, e identificar el cromosoma X portador de la mutación, al compararlo con su correspondiente familiar afectado (Figs. 2 y 3).

Se realizaron por análisis molecular 8 diagnósticos de género fetal, confirmados también por citogenética. Se identificaron 5 fetos varones, de los cuales 3 resultaron sanos y 2 afectados con HA y 3 fetos hembras, 2 de madres portadoras de HA y la otra de HB.

Estos resultados fueron confirmados después del nacimiento, analizando muestras sanguíneas de los recién nacidos.

### DISCUSIÓN

El desarrollo y la aplicación de nuevas técnicas diagnósticas a nivel molecular en gestantes con enfermedades hereditarias han permitido satisfactoriamente el diagnóstico in útero de múltiples enfermedades génicas.

En el caso de la HA y HB, estos adelantos han permitido determinar algunos de los defectos moleculares que se producen en estas enfermedades o realizar a través de

**TABLA I**  
MARCADOR MOLECULAR EN LAS GESTANTES CON ANTECEDENTES DE HEMOFILIA A

Gestante	Edad (años)	Antecedente de HA	Portadora obligada	Portadora molecular	Marcador informativo
1	28	Hijo y hermano	Sí	Sí	<i>BclI</i>
2	30	Hijo, padre y 3 sobrinos	Sí	Sí	<i>BclI</i>
3	21	Abuelo materno, hermano y primos	No	Sí	<i>BclI</i>
4	21	Hijo y sobrino	Sí	Sí	(CA)n
5	30	Hijo, 3 hermanos, y 2 sobrinos	Sí	Sí	Ninguno
6	22	Hermano y sobrino	No	Sí	Ninguno

**TABLA II**  
CARACTERÍSTICAS GENERALES EN GESTANTES CON ANTECEDENTES DE HEMOFILIA B

Gestante	Edad (años)	Antecedente de HB	Portadora obligada	Portadora molecular	Informativa
1	21	Hermano y 2 sobrinos	No	Sí	No
2	21	Hermano y sobrino	No	No	No

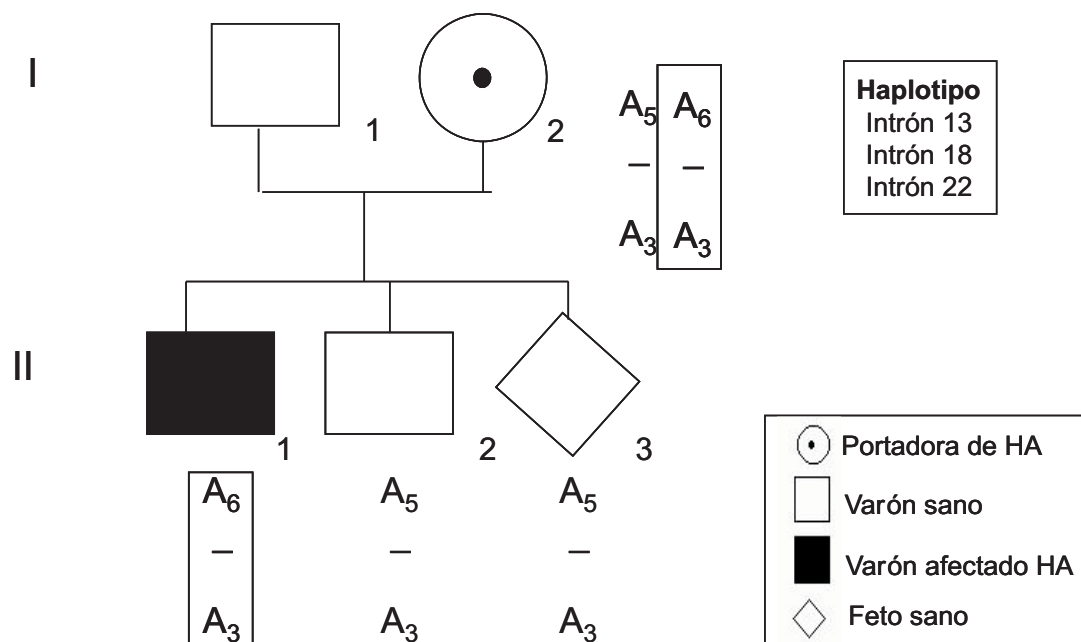


Fig. 2. Genealogía de la familia No. 4 con antecedentes de HA. Se muestran los haplotipos de los polimorfismos de los intrones 13, 18 y 22 del gen del FVIII. La madre (I2), resultó ser heterocigota informativa para el polimorfismo (CA)<sub>n</sub> del intrón 13 y homocigota no informativa para el polimorfismo *Bcl* I, con ausencia del sitio de corte (-) y homocigota no informativa para el polimorfismo (GT)<sub>n</sub> (GA)<sub>n</sub> del intrón 22. Su hijo afectado (II1) heredó el cromosoma X con el haplotipo (A6-A3), su hijo sano heredó el cromosoma X con el haplotipo (A5-A3) y el feto (II3) resultó sano ya que heredó el mismo haplotipo de su hermano sano.

análisis molecular indirecto, el diagnóstico prenatal y de mujeres portadoras; para esto se cuenta con varios polimorfismos que varían en su grado de utilidad, dependiendo de la frecuencia de sus alelos en cada población o grupo étnico.

La adopción de una estrategia para realizar diagnóstico prenatal y de portadoras es un aspecto importante del diagnóstico genético y manejo de hemofilia, lo cual principalmente depende de la tecnología conocida y la disponibilidad de recursos del laboratorio particular.

La detección de mujeres portadoras de HA y/o HB es de gran importancia, debido a que en estas enfermedades el mecanismo de transmisión hereditario es recesivo ligado al cromosoma X, y generalmente sólo se manifiestan en varones, transmitiéndose a través de mujeres portadoras asintomáticas y ellas tienen un riesgo de 50% de tener un hijo varón afectado y 50% de tener una hija portadora, si su pareja no es hemofílico (30), por lo que la identificación de género fetal es el primer paso que se realiza antes de efectuar el diagnóstico en útero de estas



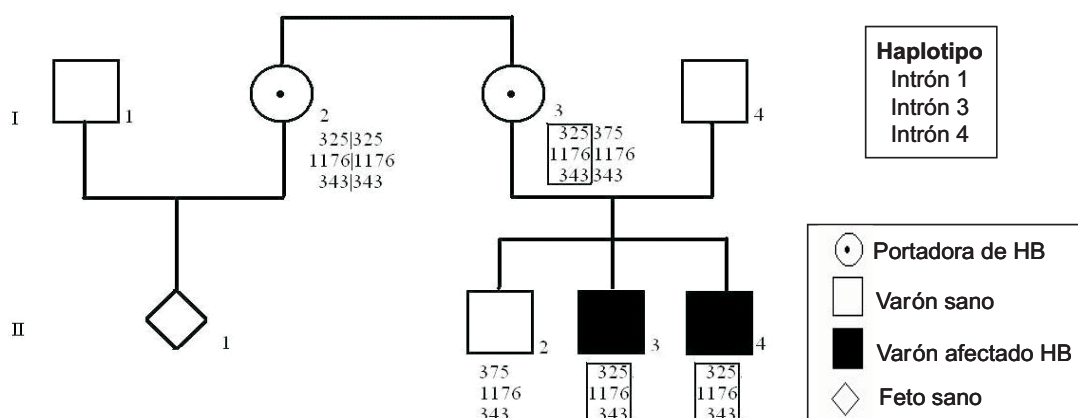


Fig. 3. Genealogía de la familia N° 1 con antecedentes de Hemofilia B. Se muestran los haplotipos de polimorfismos de los intrones 1, 3 y 4. La gestante (I2), resultó homocigota no informativa para todos los polimorfismos, el mismo del haplotipo de dos sobrinos afectados (II3 y II4). Al feto (III1) se le realizó sólo diagnóstico de género fetal y resultado femenino.

enfermedades. En este trabajo se diagnosticaron por análisis molecular 5 fetos masculinos y 3 fetos femeninos confirmados por análisis citogenético.

Para el diagnóstico molecular indirecto prenatal y de portadoras, se utilizaron para HA, los polimorfismos *BclII*, (CA)<sub>n</sub> y (GT)<sub>n</sub> (AG)<sub>n</sub>; su nivel de heterocigosis a nivel mundial ha sido reportado en 39,3% (16); 42% (13,17) y 46,3% (31). Para el polimorfismo (CA)<sub>n</sub> existen cifras de 51,2% (31); 54% (25) y 91% (3) y para el (GT)<sub>n</sub> (AG)<sub>n</sub>, las cifras publicadas son de 33% (23, 25) y 44% (25). En Venezuela, el porcentaje de heterocigotas observadas para el polimorfismo *BclII* se ha estimado en 43% (22), similar a las obtenidas por otros grupos de investigación; y de 59% para los polimorfismos (CA)<sub>n</sub> y (GT)<sub>n</sub> (AG)<sub>n</sub> (27), que resultó de mayor utilidad diagnóstica en nuestra población que en otras, tales como Alemania (23) y China (25), posiblemente explicada por el tamaño de la muestra y las diferencias de grupos étnicos.

En este trabajo, se pudo demostrar el estado de portadoras en las 6 gestantes que acudieron con antecedentes de HA, obteniendo una utilidad diagnóstica del 100%

de los casos, resultando 3 (50%) heterocigotas para el polimorfismo *BclII*, lo cual permitió identificar el diagnóstico de feto afectado con HA en 2 casos y de feto sano en 2 casos; 1 (16,66%) para el polimorfismo (CA)<sub>n</sub>, que permitió identificar a 1 feto varón sano; 2 gestantes (33,33%) resultaron homocigotas para todos los polimorfismos analizados, sin embargo los fetos fueron femeninos. El uso combinado de estos polimorfismos en las gestantes portadoras generó resultados de 66,66% de heterocigotas (4/6).

Con respecto a HB, existen estudios en relación a la heterocigosis para los polimorfismos intragénicos: *HinfI*, *XmnI* y *TaqI*; de 36%, 41% y de 45% respectivamente (13, 28); en Venezuela se ha descrito una heterocigosis en 46%, 21% y 49% respectivamente (27), con lo cual es notable la diferencia con respecto al marcador *XmnI*, menos útil que en poblaciones foráneas. El análisis molecular en las 2 gestantes que consultaron con antecedentes de HB evidenció el estado homocigoto para los tres polimorfismos y solo una de ellas resultó portadora, y al realizar el estudio molecular de género se identificó feto femenino lo cual fue confirmado por citogenética.

Los resultados permiten recomendar la incorporación de otros polimorfismos del gen del FVIII y FIX con el objeto de lograr la identificación del cromosoma X ligado a la enfermedad en los casos donde se presenta homocigosis para los marcadores considerados.

Los resultados generales arrojaron un 71,4% de los casos (6/8) de fetos sanos, lo que generó una reducción importante de los niveles de ansiedad en las parejas por el resto del tiempo de gestación, impidió además la realización de abortos ante el diagnóstico de feto sano, y con respecto a los padres de los 2 fetos de sexo masculino afectados con HA, los ayudó a tomar una decisión informada, previniendo complicaciones y mejorando la calidad de vida de estos niños.

Este trabajo constituye el primer aporte en el Estado Zulia y a nivel nacional de diagnóstico prenatal de HA y HB a través del análisis molecular de polimorfismos intragénicos ligados a estos genes.

#### AGRADECIMIENTO

Este trabajo fue financiado por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CONDES) de la Universidad del Zulia (Proyecto CC-0395-02).

Nuestro agradecimiento a la Dra. Melvis Vizcaíno por la referencia de pacientes.

#### REFERENCIAS

1. **Schwartz M, Cooper D, Millan D, Kakkar V, Scheibel E.** Prenatal exclusion of haemophilia A and carrier testing by direct detection of a disease lesion. *Prenat Diagn* 1992; 12:861-866.
2. **Aguilar-Martinez P, Fabre N, Navarro R, Schved J, Gris J, Romey M, Demaille J, Claustres M.** DNA analysis of haemophilia A families from Southern France. Experience of a hospital laboratory. *Genet Couns* 1993; 4(4):311-319.
3. **Lalloz M, McVey J, Pattinson J, Tuddenham E.** Haemophilia A diagnosis by analysis of a hypervariable dinucleotide repeat within the factor VIII gene. *Lancet* 1991; 338:207-211.
4. **Grover H, Phillips M, Lillcrap P, Giles A, Garvey M, Teitel J, Rivard G, Blanchette V, White B.** Carrier detection of haemophilia A using DNA markers in families with and isolated affected male. *Clin Genet* 1987; 32:10-19.
5. **Gitschier J, Drayna D, Tuddenham E, White R, Law R.** Genetic mapping and diagnosis of haemophilia A achieved through a Bel polymorphism in the factor VIII gene. *Nature* 1985; 314:738-740.
6. **De La Salle C, Wu Q, Baas M, Hanauer A, Ruan Ch, Cazenave J.** Common intragenic and extragenic polymorphisms of blood coagulation factors VIII and IX are different in Chinese and Caucasian populations. *Clin Genet* 1990; 38:434-440.
7. **Kazazian H, Tuddenham E, Antonarakis S.** Hemophilia A and Parahemophilia: Deficiencies of coagulation factors VIII and V. En: Scriver. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. Seventh edition. 1995; p 3241-3267.
8. **Winship P.** Carrier detection in haemophilia B using two further intragenic restriction fragment length polymorphism. *Nucleic Acids Res* 1984; 12(23):8861-8872.
9. **Solari A.** Ligamiento, genes ligados al sexo y fenómenos de compensación de dosis. En: Solari. *Genética Humana. Fundamentos y aplicaciones en medicina*. 3a. Edición. 2004; p 229-257.
10. **White G, Shoemaker C.** Factor VIII gene and hemophilia A. *Blood* 1989; 73(1):1-12.
11. **Giannelli F, Green P.** The molecular basis of haemophilia A and B. *Baillieres Clin Haematol* 1996; 9(2):211-228.
12. **Online Mendelian Inheritance in Man.** Hemophilia B; HEMB \*306900. Update: 27/11/2006. Disponible en: URL: <http://www.ncbi.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=omim>.
13. **Ljung R.** Prenatal diagnosis of haemophilia. *Baillieres Clin Haematol* 1996; 9(2): 243-257.



14. **Mibashan R, Rodeck C, Furlong R, Bains L, Peake I, Thumpston J, Gorer R, Bloom A.** Dual diagnosis of prenatal Haemophilia A by measurement of fetal Factor VIIIc and VIIIc antigen (VIIIcAg). *Lancet* 1980; 2(8202):994-997.
15. **Fishman D, Jones P, Menitove J, Ratnoff O, Everson B.** Detection of the carrier state for classic hemophilia using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Blood* 1982; 59 (6):1163-1168.
16. **Shetty SH, Ghosh K, Jijina F.** First-trimester prenatal diagnosis in haemophilia A and B families - 10 years experience from a centre in India. *Prenat Diagn* 2006; 26: 1015-1017.
17. **Hussain S, Shamin A, Vencer L, Butt I, Al-Harithy R, Nasim A.** Determination of haemophilia A carrier status from hair samples using polymerase chain reaction technique. *Clin Genet* 1994; 46:263-267.
18. **Old J.** Fetal DNA análisis. En: Davies KE. *A practical approach. Human Genetics Diseases*; 1986. p 17.
19. **Gustincich S, Carminci P, Del Sal G, Mamfiollelli G, Schneider C.** A fast method for high-quality genomic DNA extraction from whole human blood. *Biotechniques* 1991; 11:300-302.
20. **Kogan SC, Gitschier J.** Genetic prediction of Hemofilia A. En: *PCR Protocols: A guide to methods and applications*. Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White D. (eds). Academic Press, Inc. 1990; 288-299.
21. **Kogan S, Doherty M, Gitschier J.** An improved method of prenatal diagnosis of genetics diseases by analysis of amplified DNA sequences. Application to hemophilia A. *N Engl J Med* 1987; 317:985-990.
22. **Borjas-Fajardo L, Pineda L, Arteaga-Vizcaíno M, Morales-Machin A, Delgado W, Martinez MC.** Análisis del polimorfismo Bel I del gen del factor VIII en el diagnóstico en el diagnóstico molecular de portadoras de Hemofilia A en familias del noroccidente de Venezuela. *Sangre* 1999; 44(1): 19-23.
23. **Lalloz MR, Schwaab R, McVey JH, Michaelides K, Tuddenham EG.** Haemophilia A diagnosis by simultaneous analysis of two variable dinucleotide tandem repeats within the factor VIII gene. *Br J Haematol* 1994; 86:804-809.
24. **Windsor S, Taylor S, Lillicrap D.** Multiplex analysis of two intragenic microsatellite repeat polymorphisms in the genetic diagnosis of haemophilia A. *Brit J Haematol* 1994; 86:810-815.
25. **Yip B, Chan V, Chan TK.** Intragenic dinucleotide repeats in factor VIII gene for the diagnosis of haemophilia A. *Br J Haematol* 1994; 88:889-891.
26. **Koeberl D, Bottema C, Ketterling R, Bridge P, Lillicrap D, Sommer S.** Mutations causing hemophilia B: Direct estimate of the underlying rates of spontaneous germ-line transitions, transversions and deletions in a human gene. *Am J Med Genet* 1990; 47:202-217.
27. **Borjas-Fajardo L.** Diagnóstico molecular de portadoras de hemofilia A y B a través del análisis de polimorfismos de ADN en los genes que codifican para los factores VIII y IX en familias del Estado Zulia. Venezuela. [Trabajo de ascenso]. Maracaibo: Universidad del Zulia; 2000.
28. **Winship P, Rees DJ, Alkan M.** Detection of polymorphism at cytosine phosphoguanadine dinucleotides and diagnosis of haemophilia B. *Lancet* 1989; 1(8639): 631-633.
29. **Camerino G, Grzeschik K, Jaye M, De La Salle H, Tolstoshev P, Lecocp J, Heilig R, Mandel J.** Regional localization on the human X chromosome and polymorphism of the coagulation factor IX gene (Hemofilia B locus). *Proc Natl Acad Sci. USA.* 1984; 81: 498-502.
30. **Peyvandi F, Jayandharan G, Chandy M, Srivastava A, Nakaya S, Johnson M, Thompson A, Goodeve A, Garagiola I, Lavoretano S, Menegatti M, Palla R, Spreafico M, Tagliabue L, Asselta R, Duga S, Mannucci P.** Genetic diagnosis of haemophilia and other inherited bleeding disorders. *Haemophilia* 2006; 12(3):82-89.
31. **Chowdhury M, Tiwari M, Kabra M, Menon P.** Prenatal diagnosis in hemophilia A using factor VIII gene polymorphism-Indian experience. *Ann Hematol* 2003; 82:427-430.