



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO

INFORME DE INVESTIGACIÓN SOBRE:

“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL GEN F9 RELACIONADO CON LA HEMOFILIA TIPO B EN SUJETOS DE UNA FAMILIA ECUATORIANA.”

Requisito previo a la Obtención del Título de Licenciada en Laboratorio Clínico

Autora: Morán Erazo, Angie Gabriela

TUTORA: BqCl. Mg. Jaramillo Ruales, Evelyn Katherine

Ambato–Ecuador

Febrero 2024

APROBACIÓN DE LA TUTORA

En mi calidad de Tutora del Proyecto de Investigación con el tema: **“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL GEN F9 RELACIONADO CON LA HEMOFILIA TIPO B EN SUJETOS DE UNA FAMILIA ECUATORIANA”** de la Srta. Morán Erazo Angie Gabriela, estudiante de la Carrera de Laboratorio Clínico de la Universidad Técnica de Ambato. Considero que reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometido a la evaluación por el Jurado examinador designado por el Consejo Directivo de la Facultad de Ciencias de la Salud.

Ambato, Febrero 2024

LA TUTORA

BqCl. Mg. Evelyn Katherine Jaramillo Ruales

AUTORÍA DEL TRABAJO DE GRADO

Los criterios emitidos en el Trabajo de Investigación sobre:

“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL GEN F9 RELACIONADO CON LA HEMOFILIA TIPO B EN SUJETOS DE UNA FAMILIA ECUATORIANA” como también los contenidos, ideas, objetivos y futura aplicación del trabajo de investigación son de exclusiva responsabilidad de mi persona, como autor de este trabajo de grado.

Ambato, Febrero 2024

LA AUTORA

Morán Erazo Angie Gabriela

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que se haga de esta tesis o parte de ella, documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación.

Cedo los derechos en línea patrimoniales de mi proyecto de investigación como fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de esta tesis, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.

Ambato, Febrero 2024

LA AUTORA

Morán Erazo Angie Gabriela

APROBACIÓN DEL JURADO EXAMINADOR

Los miembros del Tribunal Examinador aprueban el Informe de Investigación, sobre el tema: **“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL GEN F9 RELACIONADO CON LA HEMOFILIA TIPO B EN SUJETOS DE UNA FAMILIA ECUATORIANA”** de Morán Erazo Angie Gabriela, estudiante de la Carrera de Laboratorio Clínico.

Ambato, Febrero 2024

Para constancia firman:

PRESIDENTE/A

1er VOCAL

2do VOCAL

DEDICATORIA

Este proyecto de investigación dedico principalmente a mi Dios por darme la salud y fortaleza que necesité para llegar a este punto de mi carrera universitaria.

A mis padres Wilson Morán y Araceli Erazo por ser mi ejemplo de perseverancia y constancia, por haber puesto en mí toda su fe y confianza, y por haberme enseñado el valor de seguir adelante para superarme y culminar mis estudios. Gracias por el esfuerzo que hicieron por mí y por forjar la mujer que ahora soy.

A toda mi familia por su apoyo, por estar pendiente de mí brindándome sus palabras de motivación y consejos positivos que han hecho que este camino sea más ameno.

A mí por haber luchado incansablemente por ser una laboratorista y por haber tomado la mejor decisión de seguir la maravillosa carrera de Laboratorio Clínico hasta lograr mis objetivos.

A Richard Elizalde por su apoyo incondicional en esta travesía de mi vida, por haberme acompañado en los buenos y malos momentos, por haberme dado motivación y amor que me impulsó a no rendirme y siempre recordar todo el esfuerzo que hice para lograr ser una licenciada.

A mis amigos y compañeros que sin esperar nada a cambio compartieron conmigo sus experiencias como universitarios tanto alegrías como tristezas y a todas aquellas amistades que durante estos cinco años estuvieron apoyándome y ofreciéndome su cariño.

A la Universidad Técnica de Ambato por permitirme lograr un paso más de éxito en mi vida profesional llena de conocimientos y expectativas. También quiero dedicar este proyecto de manera muy especial a mis docentes: Ing. Diana González, Mg. Gabriela Paola Valenzuela Sánchez y Bqcl. Mg. Evelyn Katherine Jaramillo Ruales por confiar en mí y darme una formación profesional con calidad.

Desde el fondo de mi corazón. Muchas gracias. Todo esto se lo debo a ustedes.

Angie Morán

ÍNDICE GENERAL

APROBACIÓN DEL TUTOR.....	i
AUTORÍA DEL TRABAJO DE GRADO.....	ii
DERECHO DE AUTOR	iii
APROBACIÓN DEL JURADO EXAMINADOR.....	iv
DEDICATORIA	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS	vi
ÍNDICE DE TABLAS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
RESUMEN	x
SUMMARY.....	xi
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I.....	3
MARCO TEÓRICO.....	3
1.1 ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS.....	3
1.2 FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA	8
Historia de la Hemofilia.....	8
Epidemiología.....	9
Generalidades de la Hemofilia tipo B.....	10
Factores involucrados en la Hemofilia tipo B	11
Técnicas moleculares.....	12
Alteraciones moleculares del Gen F9.....	13
Extracción y purificación de ADN.....	14
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	14
Electroforesis	15
Secuenciación.....	16

1.3 OBJETIVOS.....	16
1.3.1 OBJETIVO GENERAL	16
1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
CAPÍTULO II	17
METODOLOGÍA.....	17
2.1 TIPO DE INVESTIGACIÓN.....	17
2.2 SELECCIÓN DEL ÁREA O ÁMBITO DE ESTUDIO	17
2.3 POBLACIÓN Y MUESTRA.....	18
2.4 CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN	18
2.5 DESCRIPCIÓN DE LA INTERVENCIÓN Y PROCEDIMIENTOS PARA LA RECOLECCIÓN DE INFORMACIÓN	18
2.6 MATERIALES.....	23
CAPÍTULO III.....	25
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
3.1 RESULTADOS	25
3.2 DISCUSIÓN	44
CAPÍTULO IV	47
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	47
4.1 CONCLUSIONES.....	47
4.2 RECOMENDACIONES	47
4.3 BIBLIOGRAFÍA	48
4.4 ANEXOS.....	50

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Primers para la amplificación del gen F9	21
Tabla 2. Componentes de la Master mix	22
Tabla 3. Programa de PCR	22
Tabla 4. Muestras elegidas en base a la concentración de ADN	26
Tabla 5. Resultados de amplificación de la región 9PA	27
Tabla 6. Resultados de amplificación de la región 9PB	28
Tabla 7. Resultados de amplificación de la región 9A	29
Tabla 8. Resultados de amplificación de la región 9B	30
Tabla 9. Resultados de amplificación de la región 9C.....	31
Tabla 10. Resultados de amplificación de la región 9D	32
Tabla 11. Resultados de amplificación de la región 9E.....	33
Tabla 12. Resultados de amplificación de la región 9F	34
Tabla 13. Resultados de amplificación de la región 9G	35
Tabla 14. Resultados de amplificación de la región 9H1	36
Tabla 15. Resultados de amplificación de la región 9H2	37
Tabla 16. Resultados de amplificación de la región Poly.....	38
Tabla 17. Calidad de las secuencias de las regiones F mediante el programa Geneious....	40
Tabla 18. Calidad de las secuencias de las regiones H1 mediante el programa Geneious	41
Tabla 19. Calidad de las secuencias de las regiones H2 mediante el programa Geneious	42

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N°1 Elaborado por el autor. Protocolo obtenido de la Fuente EDVOTEX, (2016).....	22
Figura N°2 Elaborado por el autor. Protocolo obtenido de la Fuente EDVOTEX, (2016).....	23
Figura N°3 Árbol genético de la familia ecuatoriana de estudio.....	25
Figura N°4 Corrida electroforética de los ADN extraídos	26
Figura N°5 Electroforesis de la región 9PA	27
Figura N°6 Electroforesis de la región 9PB	28
Figura N°7 Electroforesis de la región 9A	29
Figura N°8 Electroforesis de la región 9B	30
Figura N°9 Electroforesis de la región 9C	31
Figura N°10 Electroforesis de la región 9D	32
Figura N°11 Electroforesis de la región 9F	34
Figura N°12 Electroforesis de la región 9G	35
Figura N°13 Electroforesis de la región 9H1	36
Figura N°14 Electroforesis de la región 9H2	37
Figura N°15 Electroforesis de la región Poly.....	38
Figura N°16 Calidad de las secuencias de ADN	42
Figura N°17 Mutación puntal de la región 9F cambio de G>A resaltado con azul	43
Figura N°18 Secuenciación de la región 9H1 sin mutaciones genéticas.....	43
Figura N°19 Secuenciación de la región 9H2 sin mutaciones genéticas.....	44

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO

“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL GEN F9 RELACIONADO CON LA
HEMOFILIA TIPO B EN SUJETOS DE UNA FAMILIA ECUATORIANA.”

Autora: Morán Erazo, Angie Gabriela

Tutora: BqCl. Mg. Jaramillo Ruales, Evelyn Katherine

Fecha: Febrero, 2024

RESUMEN

En el año 2023, en Ambato, Tungurahua, se llevó a cabo un estudio para la investigación de la Hemofilia tipo B, esta enfermedad es ocasionada por la deficiencia del factor IX debido a cambios en el gen F9 en el cromosoma X, se hereda de forma recesiva y está ligada al sexo, por lo que afecta mayormente a varones, aunque también a mujeres portadoras, la ausencia del factor IX impide la coagulación sanguínea, lo que genera un trastorno hemorrágico variable en gravedad.

El objetivo principal fue caracterizar el gen F9 relacionado con la Hemofilia tipo B en una familia ecuatoriana, mediante técnicas moleculares como extracción, amplificación, electroforesis, secuenciación y análisis bioinformáticos del gen, se realizó la extracción de ADN de una muestra de sangre, se amplificaron fragmentos de ADN mediante PCR, se observó la presencia de ADN amplificado mediante electroforesis y a continuación se realizó la secuenciación Sanger para identificar fragmentos con alteraciones en el gen relacionado con la Hemofilia tipo B.

Finalmente, todo este proceso permitió la evidenciación de variaciones genéticas que surgieron como consecuencia del análisis genético, contribuyendo al conocimiento de esta enfermedad en la población estudiada.

PALABRAS CLAVES: HEMOFILIA TIPO B, MUTACIONES, GEN F9, FAMILIA ECUATORIANA, AMPLIFICACIÓN, SECUENCIACIÓN.

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO

“MOLECULAR CHARACTERIZATION OF THE F9 GENE RELATED TO
HEMOPHILIA TYPE B IN SUBJECTS FROM AN ECUADORIAN FAMILY.”

Author: Morán Erazo, Angie Gabriela

Tutor: BqCl. Mg. Jaramillo Ruales, Evelyn Katherine

Date: February, 2024

SUMMARY

In the year 2023, in Ambato, Tungurahua, a study was carried out to investigate Hemophilia B type, this disease is caused by factor IX deficiency due to changes in the F9 gene on the X chromosome, is inherited recessively and is sex-linked, affecting mostly males, although female carriers are also affected, the absence of factor IX prevents blood clotting, resulting in a bleeding disorder of varying severity.

The main objective was to characterize the F9 gene related to type B hemophilia in an Ecuadorian family, using molecular techniques such as gene extraction, amplification, electrophoresis, sequencing and bioinformatics analysis, DNA was extracted from a blood sample, DNA fragments were amplified by PCR, the presence of amplified DNA was observed by electrophoresis and then Sanger sequencing was performed to identify fragments with alterations in the gene related to Hemophilia type B.

Finally, this whole process allowed the evidencing of genetic variations that emerged as a consequence of the genetic analysis, contributing to the knowledge of this disease in the studied population.

KEY WORDS: HEMOPHILIA TYPE B, MUTATIONS, F9 GENE, ECUADORIAN FAMILY, AMPLIFICATION, SEQUENCING.

INTRODUCCIÓN

La Hemofilia B (HB) es una coagulopatía congénita que afecta a uno de cada 30,000 a 50,000 varones a nivel mundial y se transmite como un rasgo recesivo ligado al cromosoma X (1–3). A pesar de los avances en diagnóstico y tratamiento, persisten desafíos significativos en términos de variabilidad en la prevalencia de la enfermedad a nivel global y las disparidades en acceso a la atención médica y calidad de vida de los pacientes en diferentes regiones del mundo.

En el contexto regional, América enfrenta disparidades en el acceso a la atención médica para la Hemofilia B, esta situación se manifiesta en la falta de cobertura adecuada, diagnóstico subóptimo y acceso limitado a tratamientos óptimos en varios países.

México y otros países de América Latina luchan con problemas de subregistro, diagnóstico tardío y falta de infraestructura médica (4). Además, en Ecuador, hasta diciembre de 2016, se han registrado 84 pacientes con Hemofilia B y a pesar de que existe una escasez de información genética sobre las mutaciones de la enfermedad, se han tomado medidas para mejorar la atención a través de programas especiales y guías clínicas (5,6).

La variabilidad en la prevalencia de la Hemofilia B en diferentes países es un tema que plantea interrogantes sobre las influencias genéticas, ambientales y socioculturales que contribuyen a esta disparidad, además, el diagnóstico temprano y preciso es esencial para mejorar la calidad de vida de los pacientes, pero en casos leves, puede ser un desafío (4).

La identificación de mutaciones genéticas específicas a través de análisis avanzados puede proporcionar herramientas diagnósticas más eficaces y facilitar estrategias de tratamiento personalizadas. Para detectar mutaciones en más del 97 al 99 % de los pacientes con hemofilia B, se requieren técnicas de análisis de mutaciones como la PCR y secuenciación Sanger (3). Sin embargo, debido a la alta variabilidad mutacional en la hemofilia B, es esencial secuenciar fragmentos del gen en cada individuo para determinar las mutaciones de la enfermedad (7).

El enfoque de esta investigación se centra en la identificación y análisis de las mutaciones genéticas asociadas con la Hemofilia B en una muestra de una familia ecuatoriana, a través de un análisis genético, que busca avanzar en el conocimiento sobre la base genética de la enfermedad, mejorar el diagnóstico, personalizar el tratamiento, y potencialmente influir en futuras investigaciones y terapias específicas para la población ecuatoriana, enfatizando en la importancia de pruebas genéticas para detectar pacientes portadores y enfermos; y brindar consejo genético a las familias afectadas. Aunque no se practica actualmente en el país, el diagnóstico prenatal se contempla como una opción, conociendo los riesgos asociados (6). Al comprender mejor las mutaciones y la prevalencia de Hemofilia B en Ecuador, se podrán tomar decisiones más informadas sobre políticas de salud pública y asignación de recursos para la atención y apoyo a los pacientes.

Por lo tanto, este proyecto de investigación tiene como objetivo caracterizar el gen F9 relacionado con la HB para profundizar el conocimiento genético en Ecuador, al estudiar las mutaciones genéticas en una familia ecuatoriana afectada, se contribuirá a la base científica sobre la enfermedad en esta población y a la identificación de mutaciones específicas que podrían mejorar el diagnóstico y permitir un tratamiento más personalizado y eficaz, lo que a su vez podría influir en futuras políticas de salud pública.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1. ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS

A nivel mundial la hemofilia B (HB) presenta una prevalencia aproximada de uno de cada 5000 hombres, con una incidencia cercana a uno de cada 1333 varones nacidos vivos. La gravedad de la enfermedad está directamente relacionada con la actividad residual del factor de coagulación en la sangre del paciente de tal manera que, el diagnóstico y tratamiento exacto están estrechamente ligados a la situación económica del país de residencia (8).

Según la Federación mundial de Hemofilia, el 75% de las personas con Hemofilia B en naciones en desarrollo enfrentan desafíos y carecen de acceso suficiente a la atención regular, esta disparidad se debe a que, en naciones desarrolladas, existe disponibilidad de concentrados de factor de coagulación (CFC) y la opción de utilizar profilaxis, experimentando mejoras notables en las últimas décadas, no obstante, en naciones en desarrollo, la atención de la HB ha sido históricamente limitada, con un enfoque prioritario en enfermedades infecciosas y otras demandas de salud (9).

Debido a estos factores, esta rara coagulopatía ha sido objeto de investigación genética por diversos expertos, entre ellos, destaca el estudio realizado por Green y colaboradores en 1990, el cual caracterizó las mutaciones de 76 pacientes con Hemofilia B, abarcando la población registrada en el centro de Hemofilia de Malmö y Reino Unido, donde evaluaron haplotipos en los genes defectuosos revelando que 51 sustituciones de un solo par de bases tenían origen claramente independiente, siendo 27 de ellas transiciones CpG como TpG o CpA. en comparación con otros cambios de una sola base, localizaron mayormente nueve sitios CpG críticos, afectando a argininas esenciales y generando codones de parada, dieciséis de las 18 transiciones posibles en estos sitios resultan en Hemofilia B y fueron confirmadas en la población estudiada, por lo que, el exceso de transiciones CpG en HB se atribuye, en parte, a la elevada proporción de sitios CpG en posiciones de críticas, además, sugirieron que esto guarda relación con la hemizigosidad masculina, haciendo que los genes ligados cromosoma X sean especialmente propensos a fuerzas selectivas que favorecen la fijación de sitios CpG en posiciones críticas (10).

En el año 2010, Radic llevó a cabo una investigación genética en Argentina que abordó el estudio de 49 familias para caracterizar las mutaciones causales de HB, implementando un esquema de 12 primers para el gen F9 y utilizando Técnicas como PCR y electroforesis en gel sensible a la confirmación (CSGE), identificaron diversos tipos de mutaciones, como cambios missense 60%, nonsense 14%, defectos de splicing 8%, pequeñas inserciones-delecciones 4%, grandes delecciones 12%, y un cambio en la región promotora del F9, descartaron dos cambios de missense no reportados, los cuales mostraron tener implicaciones severas en el fenotipo de HB, aunque el estudio no exploró la presencia cualitativa y cuantitativa del factor IX de la coagulación en el plasma de los pacientes ni determinó como fue secretado, estudió la estructura tridimensional de la proteína mutada, y recopiló información bibliográfica de cada caso, concluyendo así que es viable asociar el fenotipo observado con el tipo y ubicación de la mutación identificada, la población de pacientes argentinos estudiados exhibió una estrecha relación fenotipo-genotipo en la mayoría de los casos, similar a lo reportado en la base de datos internacional de HB, en consecuencia, la investigación representó la primera serie molecular de mutaciones causales de Hemofilia B en Argentina (2).

En un estudio de 2013 liderado por Rallapalli y su equipo, se evaluaron 1113 mutaciones únicas del gen F9 en una base de datos web interactiva actualizada construida llamada “MySQL” con 3721 registros de pacientes, utilizaron un modelo de homología para estructurar la proteína FIXa, identificando mutaciones en 336 de los 461 residuos de FIX y registraron 812 mutaciones puntuales, 182 delecciones, 54 polimorfismos, 39 inserciones y 26 otras variantes, sumando 111 variantes únicas; la base de datos interactiva emergió como una herramienta valiosa para comprender los mecanismos de la Hemofilia B, destacando que las mutaciones de gravedad leve incluyeron 15 mutaciones cuantitativas (tipo I) y 41 mutaciones cualitativas (tipo II), resaltando que las mutaciones de tipo II afectan principalmente regiones estructurales vinculadas a interacciones funcionales y la segregación de mutaciones de tipo I y II en diferentes regiones de la estructura de la proteína FIXa, aporta nuevas perspectivas, aunque la formación de inhibidores es menos común en la Hemofilia B, la capacidad de agrupar mutaciones según criterios específicos facilita la comparación con un fenotipo particular, especialmente en el reconocimiento de mutaciones asociadas con un riesgo superior al normal (11).

En una exhaustiva revisión bibliográfica en 2013, los autores Li, Miller, Payne & Hopper generaron un recurso integral: la Lista de Mutaciones del Proyecto de Hemofilia B (CHBMP), esta lista, cuenta con 1083 mutaciones únicas recopiladas a partir de literatura y datos del Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC), se presenta en formato Excel y sigue las normas de nomenclatura de la Sociedad de Variaciones del Genoma Humano (HGVS), incluye detalles cruciales como tipos de mutación, cambios de aminoácidos, ubicación, gravedad de la Hemofilia B, presencia de inhibidores y referencias bibliográficas con más de 3700 casos analizados a lo largo de décadas, esta lista se funda como una herramienta esencial para los consejeros genéticos y la investigación, proporcionando información clave sobre los fundamentos moleculares de la enfermedad; disponible en <http://www.cdc.gov/hemophiliamutation>, esta lista ha evolucionado desde su inicio en 1978 consolidándose como un recurso valioso para comprender y colaborar en la investigación de la Hemofilia B (12).

Los estudios mencionados previamente han sido fundamentales para avanzar en la caracterización molecular del gen F9 relacionado con la Hemofilia B, permitiendo comparar las variadas mutaciones presentes en esta condición, en los últimos 5 años, varios países han confirmado la variabilidad mutacional de esta enfermedad mediante enfoques metodológicos similares, respaldando y validando así las investigaciones citadas a continuación.

En 2018, Parrado Y. realizó una caracterización molecular del gen F9 asociado a la Hemofilia B en Colombia abarcando 20 pacientes masculinos no relacionados con edades comprendidas entre 5 y 68 años, realizando procedimientos de aislamiento de ADN, PCR a los 8 exones y regiones UTR 5' y 3' del gen F9, con verificación mediante electroforesis y secuenciación Sanger, identificando 15 mutaciones que incluyen variantes missense, nonsense, una mutación UTR 3', grandes deleciones mayores a 50 pb y una sustitución intrónica, aunque 8 de estas variantes ya estaban documentadas, destacó una deleción inédita de los exones 3 y 4 en bases internacionales, señaló que la mutación en IVS5+13 afecta el splicing, observándola en 7 pacientes, con una frecuencia del 35% y 2 pacientes no relacionados compartían una mutación missense, correlacionando el genotipo-fenotipo de la enfermedad, a excepción de 1 paciente con HB leve asociado a una variante missense previamente vinculada a un fenotipo moderado, relacionándola con el comportamiento clínico, y el análisis mutacional para la identificación de portadoras, informando las primeras mutaciones en la población colombiana con Hemofilia B (13).

En 2019, Li y su equipo realizaron una investigación con el propósito de examinar la patogénesis de dos pacientes con Hemofilia B de diferente gravedad reclutando a una familia con dos individuos afectados por HB, realizando ensayos de coagulación y evaluando la actividad de FIX mediante PCR de todos los exones y límites exón-intrón del gen F9, seguido de análisis mediante secuenciación directa, identificando mutaciones en un niño de 12 años con antecedentes hemorrágicos moderados que mostró un tiempo de tromboplastina parcial activada notablemente prolongado de 98,1 segundos y una actividad de FIX significativamente reducida a 1%; el análisis genético molecular del gen F9 reveló que ambos eran hemocigotos para una nueva mutación sin sentido, c.157G>C (p.Glu53Gln), ampliando la comprensión de las mutaciones del gen FIX (14).

En 2020, Huang e investigadores realizaron un análisis molecular de pedigrís de HB en China, identificando mutaciones responsables de la enfermedad mediante técnicas de secuenciación de nueva generación y una plataforma bioinformática interna, examinaron 76 pedigrís en HB no emparentados, identificando mutaciones que compararon con los resultados de la secuenciación Sanger, clasificando las mutaciones según las directrices del American College of Medical Genetics and Genomics, alcanzando una tasa de detección 94,74%; hallaron 59 variantes causales en 72 pedigrís, abarcando mutaciones missense, nonsense, de empalme, deleciones pequeñas y grandes, así como una mutación intrónica, identificaron diez mutaciones desconocidas, y la variante en mosaico, c.199g>T(p.Glu67Ter), en un pedigrí esporádico de HB, la detección de estas proporcionó valiosos detalles sobre la patogénesis de la HB en la población (15).

En el año 2021, Ghada y colaboradores efectuaron una investigación con el propósito de identificar las mutaciones causantes en una muestra de pacientes egipcios con Hemofilia B incorporando datos clínicos de 11 pacientes con HB, pertenecientes a 6 familias no relacionadas, y una séptima familia que incluía una madre portadora con el historial de un hermano fallecido por Hemofilia B, realizaron una secuenciación del gen F9, revelando la presencia de 4 mutaciones; 2 missense Nm_000133.3:c-676>G, (P.Arg226Gly) y NM_000133.3:c.1305T>G,(p.Cys435Trp), y 2 mutaciones nonsense NM_000133.3:c.880 C>T, (p.Arg294*) y NM_000133.3:c.1150>T, (p.Arg384*), que abarcaron los exones 6 y 8, localizando 3 mutaciones en el exón 8 del gen F9, logrando establecer una correlación entre genotipo-fenotipo, proporcionando respaldo para un asesoramiento genético adecuado en estos pacientes (16).

En el 2021, el artículo original de Agrawal N. e investigadores detalló el espectro mutacional de los pacientes con HB grave atendidos en un centro de atención terciaria en la India la metodología empleada consistió en extraer ADN a partir de las muestras de sangre periférica de 35 pacientes diagnosticados con la enfermedad, pertenecientes a 32 familias, utilizando el método de secuenciación Sanger, identificando 27 mutaciones diferentes en 30 pacientes, abarcando 20 variantes previamente conocidas y siete nuevas, encontrando un caso sospechoso de delección génica completa, destacando que la mayoría de las variantes se localizan en el dominio serina peptidasa, y detectando anticuerpos inhibidores en 2 pacientes, proporcionando un espectro mutacional y una estrategia de detección de mutaciones a través de la secuenciación Sanger del gen F9 en pacientes con Hemofilia B grave, en un entorno de escasos recursos (17).

En el año 2022, los investigadores Shen, Gao, Cao y Li realizaron un resumen sistemático que abordó las características estructurales y funcionales del factor IX, así como los mecanismos patogénicos de las mutaciones identificadas hasta la fecha, revelaron la diversidad de mecanismos subyacentes a la deficiencia de FIX, desencadenada por varias mutaciones, identificaron alteraciones como deleciones, inserciones, duplicaciones e indels, que, con frecuencia, desembocan en formas graves de Hemofilia B que afectan las regiones de los exones generando mutaciones de cambio de marco, mientras que las mutaciones en los intrones contribuyen al splicing aberrante, destacaron que los fenotipos hemorrágicos presentan una amplia gama desde los casos graves hasta manifestaciones más leves en los pacientes con HB, siendo las mutaciones sin sentido las que generan FIX truncando o HB grave, mientras que las mutaciones silenciosas pueden afectar al splicing o a la traducción del FIX, proporcionando información relevante para el diagnóstico y el tratamiento de los pacientes (18).

En el año 2022, Dericquebourg y su equipo de expertos realizaron una secuenciación del gen F9, con el propósito de identificar variaciones intrónicas en pacientes con HB sin resolver genéticamente, secuenciando el gen F9 en 17 pacientes, evaluando el impacto patogénico de las variantes identificadas mediante análisis bioinformático y ensayos de minigenes, descubriendo 9 variantes (c.278-1806A>C y la combinación c.278-1244A>G y c.392-864T>G), siendo 7 sustituciones intrónicas y dos inserciones de elementos móviles; el análisis predijo el impacto del splicing para 4 sustituciones c.278-1806A>C, c.392-864T>G, c.724-2385G>T, c.723+4297T>A, confirmado por el ensayo de minigenes y clasificaron 5 variantes como probablemente patógenas según las directrices

del American Collage of Medical Genetics and Genomics, y 4 como de importancia desconocida, identificando la causa en el 76% de las familias de este estudio (19).

En 2022, Johnsen y un equipo de expertos lideraron una iniciativa estadounidense pionera para mejorar la comprensión de la Hemofilia, analizando los genotipos de 11.341 participantes en la iniciativa “Mi vida, nuestro futuro”, involucrando la inscripción de individuos y posibles portadores genéticos en Centro de Tratamiento de Hemofilia (HTC) en los Estados Unidos, realizaron genotipados, entregando resultados a los proveedores y extrajeron datos clínicos de la Red Americana de Trombosis y Hemostasia; entre 2013 y 2017, 107 HTC inscribieron 11.341 sujetos, revelando variantes en el 98.1% de los hombres con Hemofilia B, descubriendo 1914 variantes, incluyendo 431 en el gen F9, con 134 nuevas, además se destacaron como el mayor proyecto de genotipificación de Hemofilia hasta la fecha, contribuyendo a la comprensión de la variación genética en la Hemofilia y los riesgos asociados con la formación de inhibidores (20).

1.2. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

Historia de la Hemofilia

La identificación de un trastorno hemorrágico hereditario ligado al sexo se remonta al siglo II, pero no fue hasta el siglo XVII que se designó como “la enfermedad de la realeza”, afectando principalmente a los varones (21). Este hecho se confirmó en 1803, cuando Otto J. realizó el pedigrí de una extensa familia con individuos afectados, años más tarde, Hopff basándose en antecedentes clínicos e históricos, publicó en 1824 el término “Hemofilia” para abarcar este problema hemorrágico (21,22).

Debido a las limitaciones en la calidad de vida de los pacientes y la tecnología de la época, transcurrió un amplio período hasta mediados del siglo XX para retomar los estudios sobre esta enfermedad, en el año de 1947, el Dr. Alfredo Pavlovskys diferenció la Hemofilia B como una condición médica independiente, también conocida como la "enfermedad de Christmas", en homenaje al primer paciente reconocido con esta condición causada por la deficiencia del Factor IX (7,21,23). Gracias al desarrollo de diversas técnicas de laboratorio, lograron identificar al Factor IX como particularmente afectado en la Hemofilia B y en 1961 se llevó a cabo la estandarización de los factores de coagulación mediante la asignación de números romanos, marcando un paso significativo en la comprensión y manejo de esta condición médica (24).

Finalmente, en un estudio de 1984 se logró ubicar el gen F9 en Xq27.1(22), allanando el camino para la primera caracterización molecular del gen F9 en 1990 por Giannelli et al, quienes describieron 216 mutaciones asociadas a esta condición (3). Esta revelación marcó el inicio de una serie de análisis genéticos continuos desde la década de los 80's hasta la actualidad, con el propósito de rastrear alelos afectados y determinar las mutaciones asociadas a la enfermedad, estas investigaciones han empleado técnicas como el análisis de ligamiento, análisis de mutaciones mediante PCR y secuenciación de Sanger (3).

Epidemiología

La Federación Mundial de Hemofilia ha registrado a nivel global a 29,712 pacientes con HB y se estima que representa entre el 15% y el 20% de todos los casos de Hemofilia (23). La prevalencia al nacer se estima en 5.0 casos por cada 100,000 varones para todas las variantes de severidad de la Hemofilia B y 1.5 casos por cada 10,000 varones para la variante grave, independientemente de la etnia (25).

A pesar de la limitada disponibilidad de datos epidemiológicos específicos sobre la Hemofilia en Ecuador, la prevalencia global de esta enfermedad genética sugiere su probable impacto a nivel local, la influencia de esta condición en el país, al igual que en otras naciones, trasciende los síntomas físicos, planteando desafíos en la calidad de vida de nuestros pacientes, además, el costo asociado con el tratamiento de la Hemofilia puede ser considerable, generando presiones tanto en los individuos afectados y sus familias, como en el sistema de salud en conjunto (26).

En Ecuador, la Hemofilia se clasifica como una enfermedad rara o huérfana y forma parte de un programa especial para el manejo de enfermedades catastróficas, con el objetivo de estandarizar la atención y los protocolos de diagnóstico y tratamiento, el Ministerio de Salud ha considerado esencial la implementación de una Guía de Práctica Clínica para abordar la Hemofilia en todas las etapas de vida, es relevante destacar que, hasta la fecha no se realizan pruebas genéticas para detectar familiares de personas hemofílicas en el país, aunque se recomienda encarecidamente como consejo fundamental (6).

El Ministerio de Salud Pública ecuatoriano trabaja con dieciséis hospitales que ofrecen una atención integral a los pacientes con Hemofilia, a cargo de un equipo multidisciplinario de profesionales de la salud; actualmente, se brinda atención a 763 pacientes, de los cuales 585 tienen hemofilia A, 84 hemofilia B, 89 tienen Von Willebrand y 5 presentan deficiencia de factor XIII, destacando un avance significativo de esta entidad pública es la entrega gratuita de medicamentos para eliminar la necesidad de crioprecipitados y plasmas frescos congelados dado a el alto costo de los medicamentos antihemofílicos, por esta razón, la cobertura proporcionada por el Ministerio de Salud juega un papel vital en el acceso de los pacientes a estos tratamientos (5).

Generalidades de la Hemofilia tipo B

Su característica distintiva radica en la deficiencia del factor IX (FIX) en la cascada de coagulación, una variante específica que se origina por una mutación en el gen que codifica el factor IX, localizado en el cromosoma X; esta alteración sigue un patrón de herencia recesiva ligada al sexo, lo que significa que afecta principalmente a los hombres, los varones con un solo cromosoma X afectado tienen una alta probabilidad de desarrollar la enfermedad, mientras que las mujeres con dos cromosomas X tienen menos posibilidades de mostrar síntomas y, en su mayoría, son portadoras asintomáticas (7)

El Factor IX activado (FIXa), una proteína dependiente de vitamina K, se sintetiza en el hígado y constituye una parte esencial del complejo tenasa, su función principal radica en desencadenar la formación óptima de trombina en el nuevo modelo de la coagulación centrado en células, por lo que la clasificación de la deficiencia de factor IX se realiza en función de su actividad, dividiéndose en leve (5% a 40%), moderada (1% a 5%), o severa (<1%) (7).

Los signos característicos de esta afección incluyen hemorragias prolongadas y la facilidad para desarrollar hematomas en varios tejidos y órganos, la intensidad de estos síntomas varía en relación al nivel de actividad residual de FIX en el paciente (3). Por lo tanto, las mutaciones pueden influir en distintos aspectos, desde la estructura genética hasta las modificaciones posteriores de la proteína FIX (18).

El gen F9 se extiende a lo largo de 34 kb en el brazo largo del cromosoma X, específicamente en la banda Xq27.1 y consta de 8 exones y 7 intrones, la transcripción de los 8 exones da lugar a un ARNm de 2,8 kb, que presenta una región no codificante de 1,4 kb en su extremo 3', el marco de lectura abierto (ORF) del ARNm F9 codifica una proteína precursora que consta de 461 aminoácidos; esta secuencia incluye un péptido señal N-terminal de 1 a 28 aminoácidos y un propéptido de 18 residuos de 29 a 46 aminoácidos, seguidos por una proteína madura de 415 residuos, por otro lado la proteína madura se divide en un dominio Gla de 47 a 92 aminoácidos), 2 dominios similares al factor de crecimiento epidérmico (EGF) de 93 a 171 aminoácidos, una secuencia conectora de 172 a 191 aminoácidos, un péptido de activación de 192 a 226 aminoácidos y 1 dominio de serina proteasa (SP) de 227 a 461 aminoácidos (18).

En detalle, el exón 1 codifica un péptido señal típico destinado a la secreción de proteínas por parte de los hepatocitos, el exón 2 codifica la secuencia propeptídica y el dominio Gla, mientras que el exón 3 codifica la parte final del dominio Gla y una pila helicoidal hidrófoba, los exones 4 y 5 codifican los dos EGF -Dominios similares, el exón 6 codifica el péptido de activación y los exones 7 y 8 codifican el dominio SP catalítico (18).

Factores involucrados en la Hemofilia tipo B

La coagulación sanguínea es un proceso esencial para mantener la integridad de los vasos sanguíneos después de una lesión, este proceso, conocido como cascada de coagulación, implica una serie de reacciones enzimáticas en la que participan diferentes factores de coagulación; la activación de la cascada de coagulación puede ocurrir in vivo, iniciando por la presencia de cargas negativas en el vidrio del tubo de recolección de la muestra, lo que activa el factor XII de la vía intrínseca a continuación, el factor XII activado (XIIa) activa al factor XI, que participa en la activación del factor IX, el factor IXa, junto con el cofactor VIIIa, calcio y fosfolípidos, forma el complejo tenasa, el cual tiene la responsabilidad de transformar el factor X a su forma activa, dando inicio a la cascada de coagulación (7).

La deficiencia del factor IX en la hemofilia B conlleva a una incapacidad para generar trombina y amplificar la fase fluida de la coagulación, lo que resulta en una diátesis hemorrágica en las personas afectadas, la gravedad de la enfermedad varía según la

actividad de coagulación del factor IX en plasma, las formas severas pueden presentar hemorragias espontáneas y repetitivas, mientras que las formas leves pueden ser clínicamente silenciosas hasta que se produzca un evento traumático (21).

La coagulopatía de las personas con Hemofilia es consecuencia de la incapacidad para magnificar, controlar y mantener la generación de trombina debido a la deficiencia del factor VIII o IX; la generación de trombina es un evento de alta importancia biológica y fisiológica, ya que es esencial en la fase fluida de la hemostasia, por lo que, la ausencia de los factores VIII y IX se manifiesta clínicamente con eventos hemorrágicos característicos de la Hemofilia, siendo el principal sitio de sangrado a nivel articular en los casos severos y sin una terapia adecuada e integral, la Hemofilia puede llevar al desarrollo de una artropatía hemofílica crónica, que es la principal causa de morbilidad en esta población (21).

La variabilidad clínica que se observa en los pacientes afectados sugiere que factores adicionales, además de las mutaciones genéticas, también desempeñan un papel en la expresión clínica de la enfermedad (27). Para confirmar el diagnóstico, se realiza una evaluación del sistema hemostático mediante pruebas como el hemograma, TTP, TP, TT, y la medición de factores de coagulación, complementadas con la información de la historia clínica y familiar, estas pruebas serológicas confirman la deficiencia del factor IX y la prolongación del tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPa) (7).

El tratamiento de la Hemofilia B implica la administración del factor IX deficiente, ya sea de manera preventiva para evitar episodios hemorrágicos o en situaciones agudas y la terapia integral adecuada, ya que la falta de tratamiento puede llevar al desarrollo de una artropatía hemofílica crónica, que constituye la principal causa de morbilidad en esta población (21).

Técnicas moleculares

En las últimas dos décadas, se han logrado avances significativos en la comprensión de las bases moleculares de las enfermedades genéticas, incluyendo la Hemofilia tipo B, aunque la enfermedad es causada principalmente por mutaciones en el gen F9 que codifica el factor IX, se ha observado una amplia variabilidad clínica en los pacientes afectados, esto sugiere que otros factores, además de la mutación genética, influyen en el fenotipo clínico de la enfermedad (27).

Las pruebas genéticas precisas son cruciales para comprender y manejar adecuadamente la hemofilia en pacientes y sus familias, aunque la prevalencia de mutaciones múltiples en la hemofilia es baja, puede subestimarse debido a la falta de pruebas genéticas completas en todos los casos, por lo tanto, se enfatiza la importancia de examinar cuidadosamente las mutaciones para confirmar su patogenicidad y evitar diagnósticos erróneos.

Para identificar regiones génicas anormales en pacientes con Hemofilia B, se han desarrollado diversos métodos de análisis genético; dos técnicas de tamización genética ampliamente utilizadas son la Electroforesis en Gel Sensible a la Conformación (CSGE) y la Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia en Condiciones Desnaturalizantes (DHPLC), ambas con una tasa de detección de variantes del 89%, en algunos casos, es necesario complementar estas técnicas con la secuenciación directa de ácidos nucleicos, que ofrece una alta precisión y fiabilidad cercana al 100% en la identificación de mutaciones patogénicas en el gen F9, implicado en la Hemofilia B; la secuenciación directa se basa en la amplificación de las regiones relevantes del gen mediante PCR y la posterior lectura de la secuencia mediante electroforesis capilar, alineándola con la secuencia de referencia para identificar las variantes patogénicas, estos avances en el análisis genético han contribuido significativamente al diagnóstico preciso y la identificación temprana de portadores en familias afectadas por la Hemofilia B (13).

Alteraciones moleculares del Gen F9

Las mutaciones pueden afectar diferentes niveles, desde la estructura génica hasta las modificaciones postraduccionales de la proteína FIX, la variabilidad clínica observada en los pacientes afectados sugiere que otros factores, además de las mutaciones genéticas, también influyen en el fenotipo clínico de la enfermedad (18). El estudio continuo de las mutaciones y la creación de bases de datos como el CHBMP permiten ampliar el conocimiento sobre la enfermedad y mejorar la atención médica de los pacientes con hemofilia tipo B (12).

La generación de una lista completa de mutaciones causantes de la Hemofilia tipo B es de gran importancia para mejorar el conocimiento sobre la enfermedad y su genética. En este sentido, se ha creado el Proyecto sobre Mutaciones en la Hemofilia B (CHBMP) de los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC), esta base de datos

contiene información sobre más de 1000 mutaciones únicas detectadas en pacientes con hemofilia tipo B, incluyendo mutaciones puntuales y pequeñas deleciones o adiciones de nucleótidos, la identificación de mutaciones y su relación con la gravedad de la enfermedad permite un mejor diagnóstico y manejo de la Hemofilia tipo B en pacientes y sus familias (12).

Extracción y purificación de ADN

El minikit PureLink de ADN genómico ofrece un rendimiento destacado y una pureza excepcional al procesar diversas muestras como sangre, tejidos, células, bacterias, hisopos y manchas de sangre, este kit optimiza los métodos convencionales de columnas de centrifugado para microcentrífugas con base de sílice, presentando una configuración innovadora que mejora la eficiencia en la unión y liberación del ADN (28).

Cada tipo de muestras se somete a un procedimiento de lisis especializado y utiliza un tampón de lisis optimizado, potenciando la actividad de la proteína K y eliminando la contaminación proteica indicando la pureza del ADN mediante índices de lectura de absorbancia ($\sim 1,9$ para A260/A280 y A260/A230) purificado, mientras que un tampón salino cao trópico asegura la unión estable del ADN a la resina de la columna y finalmente, el ADN se eluye en un tampón bajo en sal para estabilizar el pH durante el almacenamiento permitiendo la secuenciación del ADN genómico extraído, a partir de muestras sanguíneas de tamaño medio (100 ul-1 ml)(29).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica in vitro que amplifica selectivamente una secuencia específica de ADN, replicándola de manera fiel a lo largo de los ciclos repetitivos, utilizando la actividad de la enzima ADN polimerasa, la PCR puede llevarse a cabo con ADN genómico (PCR convencional) o con ADN complementario de ARNm, conocido como RT-PCR. Esta última implica la transcripción inversa, convirtiéndola ARNm en ADN complementario mediante la acción de la transcriptasa inversa (30).

Los elementos esenciales para la PCR incluyen la plantilla (ADN o ADNc), la enzima, oligonucleótidos o cebadores, desoxirribonucleótidos trifosfatos (dNTPs), ion magnesio (Mg⁺), y una solución tampón o agua, esta técnica consta de 3 pasos principales: desnaturalización, hibridación y extensión, por lo que, los termocicladores, fueron diseñados para mantener condiciones constantes de temperatura y tiempo, facilitando la ejecución de la reacción (30).

El ADN, con su estructura de doble hélice, sirve como plantilla para la síntesis de nuevas hebras durante la PCR, la complementariedad entre las bases, establecida por enlaces de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas, garantiza la estabilidad de la doble hélice, cada ciclo de PCR realizada se compone de desnaturalización, donde las cadenas de ADN se separan; hibridación, donde los primers se unen a la secuencia complementaria; y extensión, donde la Taq polimerasa sintetiza nuevas cadenas de ADN (31).

La desnaturalización implica la separación de la doble hélice a 95 °C, seguido por la hibridación a 50-60 °C, donde los primers se alinean con la secuencia objetivo, y la extensión a 72 °C, donde la Taq polimerasa cataliza la síntesis de nuevas cadenas de ADN, por lo cual, la eficiencia de la PCR se verifica al visualizar los amplicones mediante electroforesis en geles de agarosa, separando las moléculas de acuerdo a su tamaño y carga eléctrica (32).

Electroforesis en gel agarosa

La electroforesis se emplea para separar moléculas de ADN, ARN o proteínas según su tamaño y carga eléctrica mediante una corriente eléctrica, las moléculas atraviesan un gel o matriz que actúa como un filtro, permitiendo que las más pequeñas se desplacen con mayor velocidad, esta versátil técnica se aplica en diversos campos, como la ciencia forense, el estudio del genoma humano mediante electroforesis capilar, y la detección de mutaciones genéticas o anomalías en proteínas, además, su uso en diagnóstico clínico y forense destaca su relevancia en aplicaciones prácticas; se realiza comúnmente en una caja con carga positiva en un extremo y carga negativa en el otro, luego de este proceso, la determinación del tamaño molecular se logra comparando la muestra con estándares de tamaño conocidos separados en el mismo gel (33).

Secuenciación de Sanger

El método Sanger genera secuencias de ADN de alta calidad con longitudes que varían entre 500 y 1000 pares de bases. Esta técnica utiliza didesoxi-nucleótidos (ddNTP), modificados y carentes del grupo 3'-OH, para llevar a cabo una terminación enzimática de cadena, la ausencia de este grupo impide la formación de un enlace fosfodiéster por parte de la ADN polimerasa, deteniendo la adición de más nucleótidos y generando secuencias de diversas longitudes de forma aleatoria (34).

En la secuenciación de Sanger, cada ddNTP (ddATP, ddTTP, ddGTP y ddCTP) se incorpora en reacciones separadas de cadena de polimerasa (PCR), la síntesis finalizada cuando un ddNTP se une a una cadena de nucleótidos, y la separación se logra mediante gel de electroforesis en su forma más básica, el fragmento más corto termina en el primer nucleótido desde el extremo 5', estableciendo la secuencia de 5' a 3' de manera progresiva (35).

En contraste, en la secuenciación automatizada de Sanger, cada de ddNTP se etiqueta con un fluoróforo diferente, permitiendo su combinación en una sola reacción, posteriormente, la electroforesis capilar y un ordenador mediante un láser, excitan cada fluoróforo para identificar individualmente cada ddNTP (35).

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo General

Caracterizar a nivel molecular del gen F9 relacionado con la Hemofilia tipo B en sujetos de una familia ecuatoriana.

1.3.2 Objetivos específicos

- Amplificar secuencias del gen del factor IX relacionados con la Hemofilia tipo B mediante técnicas moleculares.
- Secuenciar el gen F9 de la Hemofilia tipo B mediante la secuenciación de Sanger.
- Analizar las secuencias del gen F9 de Hemofilia tipo B mediante programas bioinformáticos.

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

2.1 TIPO DE INVESTIGACIÓN

Es un proyecto de investigación transversal y descriptivo

2.1.1 Enfoque de la investigación

Se considera enfoque mixto tanto cuantitativo porque a través de diferentes métodos se comprobará cuantas mutaciones se presentan en cada individuo y cuantas personas presentan mutaciones asociadas a la coagulopatía en datos estadísticos con técnicas como, PCR, Electroforesis y Secuenciación Sanger y en lo que se refiere a cualitativo es para la respectiva comprobación de hipótesis tanto nula como alternativa a través del método de Fisher que sirve para estudiar si existe asociación entre dos variables cualitativas.

2.1.1.1 Investigación Documental

En este proyecto de investigación, se ha recopilado información de diversas fuentes bibliográficas, tales como artículos de revisión, investigaciones previas, libros y artículos científicos. Estos recursos han contribuido significativamente a contextualizar y actualizar la comprensión de la problemática abordada, proporcionando una sólida base de fundamentos teóricos relevantes.

2.1.1.2 Investigación de Laboratorio

En el laboratorio se llevó a cabo la caracterización molecular del gen F9 para determinar la presencia de mutaciones asociadas a la Hemofilia tipo B mediante técnicas como: Extracción de ADN, PCR, Electroforesis y Secuenciación Sanger.

2.2 SELECCIÓN DEL ÁREA O ÁMBITO DE ESTUDIO

2.2.1 Campo y área

Biología Molecular

2.2.2 Aspecto

Presencia de mutaciones genéticas en fragmentos del gen de cada individuo asociado con la Hemofilia B en una muestra de una familia ecuatoriana.

2.2.3 Delimitación espacial

El proyecto de investigación se ejecutó en sujetos de una familia ecuatoriana.

2.2.4 Delimitación temporal

El proyecto de investigación se elaboró en el período académico septiembre 2023-febrero 2024 en sujetos de una familia ecuatoriana.

2.3 POBLACIÓN Y MUESTRA

El muestreo para este estudio es por conveniencia basándose en un árbol genético hasta la tercera generación que de acuerdo con la teoría genética de Mendel se evidenció los individuos enfermos y posibles portadores; y, por consiguiente, en los criterios de exclusión e inclusión que se establecieron en la investigación, en donde participaron 16 sujetos de la familia ecuatoriana y 4 sujetos como control de las mutaciones.

2.4 CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN

2.4.1 Criterios de inclusión

- ❖ Participantes con relación consanguínea con la familia ecuatoriana.
- ❖ Participantes que tengan en conocimiento el proyecto de investigación.
- ❖ Participantes que hayan firmado el consentimiento informado.

2.4.2 Criterios de exclusión

- ❖ Pacientes diagnosticados con Hemofilia A
- ❖ Pacientes diagnosticados con otro trastorno de coagulación

2.5 DESCRIPCIÓN DE LA INTERVENCIÓN Y PROCEDIMIENTOS PARA LA RECOLECCIÓN DE INFORMACIÓN

En primer lugar, se delimitó el lugar donde se llevó a cabo el estudio, el cual fue el Laboratorio de Docencia de Biología molecular y celular del Campus Querochaca de la distinguida Universidad Técnica de Ambato con la autorización de las autoridades de la Facultad de Ciencias de la Salud.

En relación a ello, se realizó los trámites pertinentes para obtener la aprobación del proyecto de investigación y la aseguración del consentimiento informado (**ANEXO 1**). Posteriormente, se solicitó una reunión con los participantes en el cual se explicó de manera clara y concisa el procedimiento del estudio, se respondieron a sus preguntas y preocupaciones, y finalmente, se les brindó la oportunidad de firmar de manera libre, voluntaria y deliberada, proporcionando su nombre y número de cédula como muestra de su consentimiento.

Dentro de la población de estudio, se logró reclutar 16 sujetos de la familia ecuatoriana y 4 sujetos sin ningún parentesco conocido dado que se trata de una enfermedad rara se decidió utilizar un enfoque de muestreo no probabilístico por conveniencia para la comparación de mutaciones en diferentes genes. Se explicó a los participantes las condiciones para la toma de muestra y se acordó una fecha y hora establecida en donde los participantes pudieron asistir y ser parte de este estudio.

2.5.1 Procedimiento y análisis

2.5.1.1 El procedimiento de la extracción sanguínea se realizó en base a las indicaciones del Manual de toma de muestras en Laboratorio Clínico (36), teniendo en consideración los siguientes pasos:

1. Se colocó un torniquete en la parte superior del brazo con el fin de ejercer presión en la vena.
2. Se limpió el sitio de punción con alcohol antiséptico como medida de asepsia.
3. Se puncionó la vena del brazo con el sistema vacutainer.
4. Se introdujo el tubo tapa lila y se retiró el torniquete.
5. Se recolectó la muestra sanguínea hasta obtener 5 ml de sangre
6. Se retiró el sistema vacutainer y se cubrió la zona de punción.

2.5.1.2 Análisis

❖ La extracción de ADN se llevó a cabo utilizando el kit Genomic DNA Mini kit de PureLink, siguiendo las indicaciones del protocolo (28), a partir de una muestra de sangre. Se aplicó la siguiente técnica:

1. Se colocó un bloque térmico a 55°C.
2. En un tubo de microcentrífuga estéril se agregó 200 ul de muestra de sangre.
3. Se agregó 20 ul de Proteinasa K a la muestra.
4. Se añadió 20 ul de RNasa a la muestra, se mezcló mediante agitación breve y se incubó a temperatura ambiente durante 2 minutos.
5. Se agregó 200 ul de buffer de lisis y se homogeneizó mediante agitación vorticial.
6. Se incubó a 55°C durante 1 hora para promover la digestión de proteínas.
7. Se añadió 200 ul de etanol al 100% y se mezcló mediante agitación durante 5 segundos.
8. Se extrajo del paquete una columna de centrifugación en un tubo de recogida.
9. Se añadió el alisado preparado de 640 ul en la columna de centrifugación.
10. Se centrifugó la columna a 8.500 rpm durante 2 minutos.
11. Se desechó el tubo de recogida y se colocó la columna de centrifugación en un tubo de recogida nuevo.
12. Se agregó 500 ul de wash de lavado 1 preparado con etanol a la columna.
13. Se centrifugó la columna a 8.500 rpm durante 2 minutos, se repitió este paso. En total 2 lavados con wash de lavado 1.
14. Se desechó el tubo de recolección y se colocó la columna de centrifugación en un tubo de recogida nuevo.
15. Se agregó 500 ul de wash de lavado 2 preparado con etanol a la columna.
16. Se centrifugó la columna a máxima velocidad durante 3 minutos, se repitió este paso. En total 2 lavados con wash de lavado 2. Se desechó el tubo de recogida.
17. Se colocó la columna de centrifugación en un tubo de microcentrífuga estéril de 1.5 ml.
18. Se añadió 30 ul de buffer de elución genómica a la columna.
19. Se incubó a temperatura ambiente durante 1 minuto, luego se centrifugó la columna a máxima velocidad durante 1 minuto.
20. Se pipeteo 3 ul del concentrado genómico en el Nanodrop y se procedió a medir en el equipo.

❖ La amplificación del gen F9 a través de la técnica de PCR se realizó mediante la amplificación de 12 pares de primers (**Tabla 1**).

Tabla 1. Primers para amplificación del gen F9

Ubicación	Primer	Secuencia 5'-3'	Tamaño de F. (pb)	Temperatura Ann. (°C)
Promotor	9PA F	ACGAAAAAATTTTCAGAAGCCA	484	55
	9PA R	CCATCAGCAATGTATGAGTGG		
Promotor	9PB F	AAGCTACAGGCTGGAGACAAT	499	55
	9PB R	CCTTTGCTAGCAGATTGTGAA		
Exón A	9A F	AGGCCATTGGAAATAGTCCA	260	55
	9A R	AAAGGCAAGCATACTCAATGT		
Exón B	9B F	CATCACAGATTTTGGCTCCA	347	55
	9B R	TATGCTCTGCATCTGAAGGGT		
Exón C	9C F	CACATAATACCCTTCAGATGC	341	55
	9C R	AATATGGGTTAGAGGGTTGG		
Exón D	9D F	AAAATCAGACTCCCATCCCA	583	55
	9D R	GGTTTTGGTCACACTGAAGTT		
Exón E	9E F	CCCCCAATGTATATTTGACCC	334	55
	9E R	CAAAGGAAGCAGATTCAAGT		
Exón F	9F F	AAATACTGATGGGCCTGCTT	459	55
	9F R	TGGTTAGTGCTGAAACTTGCC		
Exón G	9G F	AATTCATCTGCAAAGCTCACA	401	55
	9G R	TGAAATTATGACCCTTCTGCC		
Exón H	9H1 F	ATGAGATCTTTAACATTGCC	436	55
	9H1 R	GAACCTTTGTAGATCGAAG		
Exón H	9H2 F	TTTGGATCTGGCTATGTAAGT	488	55
	9H2 R	GAAATTCTCCCCTGTAAAG		
UTR 3'	Poly F	AAGAGAACCGTTCGTTTGCA	510	55
	Poly R	AGAACTAAAGGAAGTAGCAAG		

Fuente: Radic, C. P. (2010)

Para la reacción en cadena de la polimerasa se realizó la master mix de acuerdo al protocolo recomendado por Invitrogen™ a los siguientes cálculos (**Tabla 2**).

Tabla 2. Componentes de la Master mix

COMPONENTE	25 ul de mx	CONCENTRACIÓN FINAL
PCR Supermix	22,5 µl	1X
Primer forward	0,5 µl	0,4 µM
Primer reverse	0,5 µl	0,4 µM
ADN	1,5 µl	<500ng

Fuente Thermo Fisher Scientific, (2014)

- ❖ Para la amplificación se utilizó el termociclador Bio-RAD T100 con el protocolo descrito en la (Tabla 3).

Tabla 3. Programa de PCR

PASO		TEMPERATURA °C	TIEMPO
Desnaturalización inicial		94	3 minutos
30 ciclos PCR	Desnaturalización	94	30 segundos
	Anealing	55	30 segundos
	Extensión	72	60 segundos
Extensión final		72	5 minutos

Fuente: Jara, Y. A. P. (2018).

- ❖ Para la electroforesis se utilizó la siguiente técnica. (Figura N°1 y 2)

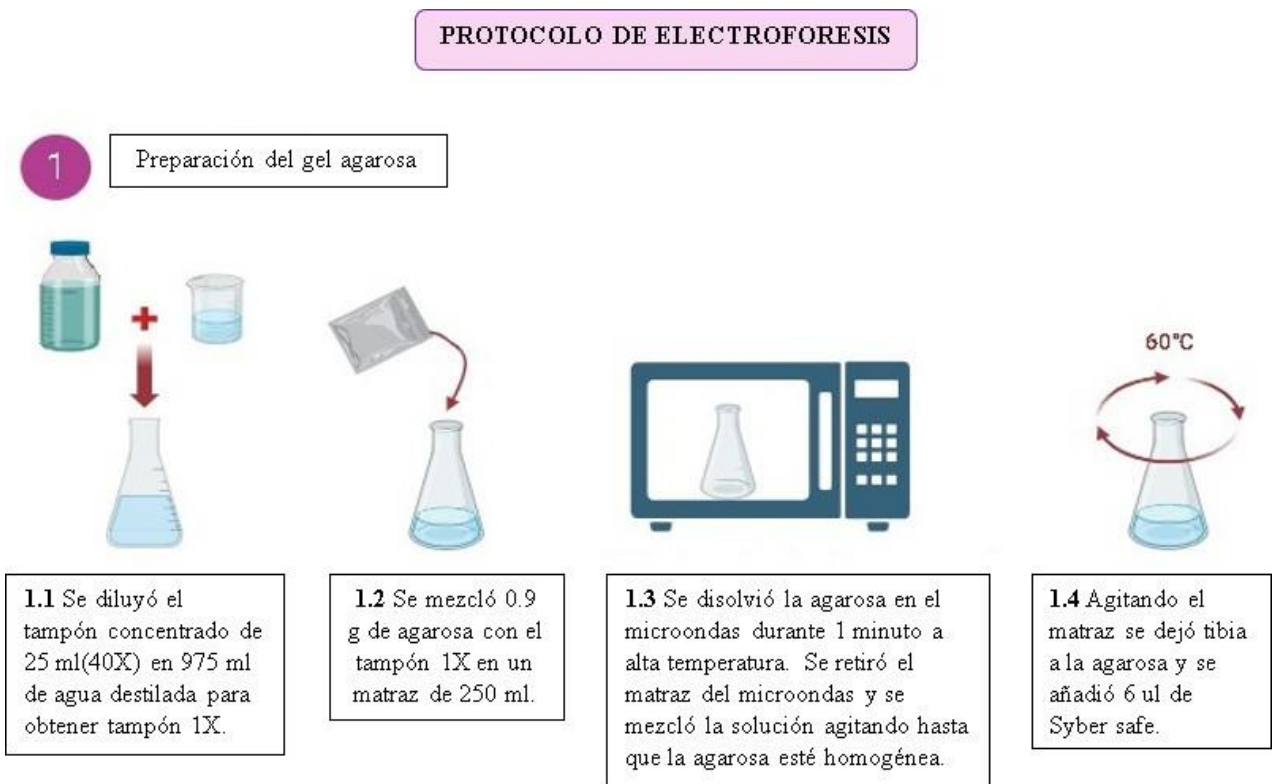


Figura N°1 Elaborado por el autor. Protocolo obtenido de la Fuente EDVOTEX, (2016).

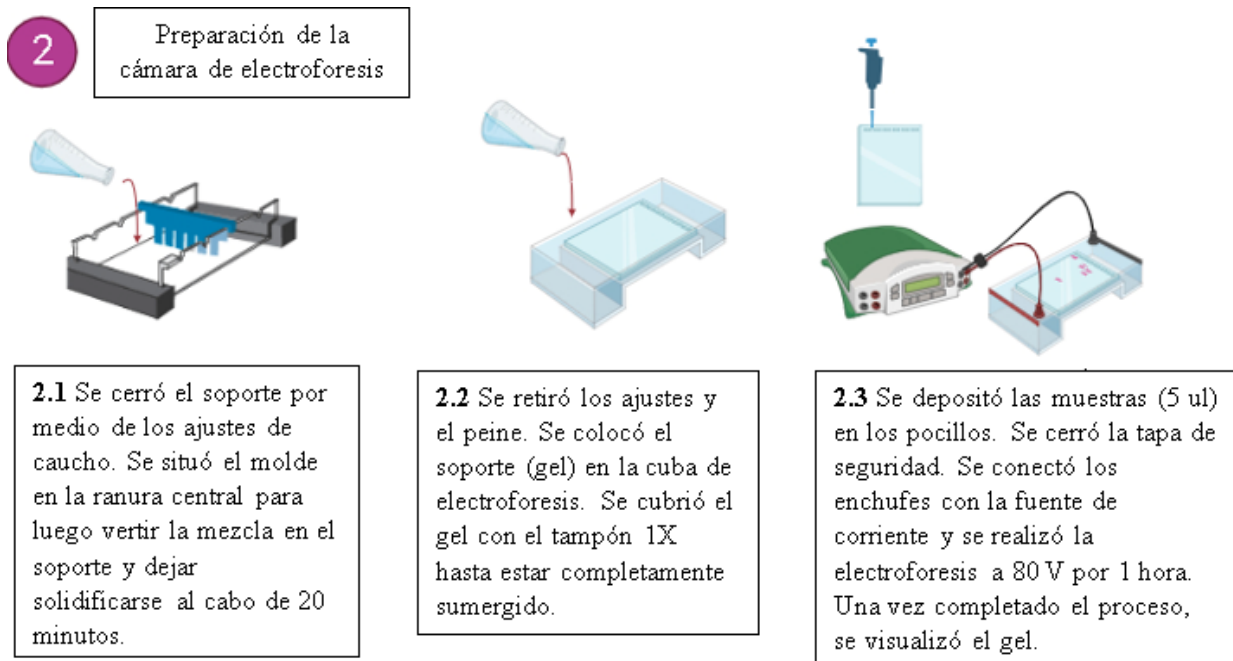


Figura N°2 Elaborado por el autor. Protocolo obtenido de la Fuente EDVOTEX, (2016).

- ❖ Para la secuenciación se envió al servicio de Macrogen, en donde se realizó en primer lugar la purificación de los amplicones y la secuenciación de tipo Sanger con la finalidad de obtener y observar los fragmentos que tienen alteraciones genéticas asociadas con Hemofilia tipo B y así se determinó individuos con la enfermedad y posibles portadores genéticos.

Con los resultados obtenidos de la secuenciación Sanger, se utilizó el programa Geneious Prime versión 2023 que brindó el análisis de la calidad de las secuencias e identificó las variantes que existieron en un amplicón, permitiendo que los resultados fueran posibles de correlacionar entre las secuencias de una manera más rápida y menos costosa.

2.6 MATERIALES

2.6.1 Humanos

Población total de 20 individuos ecuatorianos:

- 16 sujetos con parentesco familiar
- 4 sujetos sin ningún parentesco familiar

2.6.2 Institucionales

Laboratorio de Docencia de Biología molecular y celular del Campus Querochaca de la Universidad Técnica de Ambato

2.6.3 Materiales

- Computador portátil
- Puntas azules de 100 a 1000ul
- Puntas amarillas de 10 a 100ul
- Puntas transparentes libre de ARNasas de 0.5 a 10ul
- Tubos de tapa lila de 5 ML
- Alcohol antiséptico al 70%
- Guantes
- Agujas negras de 22 Gx1
- Algodón
- Torniquete
- Esferos
- Marcador negro
- Mascarillas
- Cofias
- Zapatones
- Sistema vacutainer
- Termociclador
- Vortex
- Transiluminador UV
- Centrífuga
- Microcentrífuga
- Cámara de electroforesis
- Programas bioinformáticos
- Bitácora de trabajo

2.6.4 Reactivos

- Kit de extracción de ADN, Invitrogen PureLink genomic DNA mini kit
- Kit de reactivos para PCR, Invitrogen PureLink PCR SuperMix

Después de la firma de consentimientos informados y de la obtención de las muestras de sangre de los participantes, se realizó la extracción de ADN de las 20 muestras, logrando obtener concentraciones de ADN en el rango de 15.1 a 48.4 ng/dL, las cuales fueron medidas en el equipo Nanodrop, (**Tabla 4**), a su vez se realizó una corrida electroforética de los ADN extraídos para evidenciar que las muestras elegidas no estuvieran degradadas (**Figura N°4**).

Tabla 4. Muestras elegidas en base a la concentración de ADN.

Muestras	Conc. ADN
AM5	46.7 ng/dL
JM0	32.7 ng/dL
WM6	24.9 ng/dL
BM5	32.3 ng/dL
KO2	23.2 ng/dL
DM9	26.1 ng/dL
J177	21.6 ng/dL
ET8	16.7 ng/dL
CI5	19.6 ng/dL
RM9	16.2 ng/dL
EM0	48.4 ng/dL
AC7	30.5 ng/dL
NM3	26.3 ng/dL
JV10	37.1 ng/dL
AM9	24.2 ng/dL
JV0	22.3 ng/dL
K17	15.1 ng/dL
J179	27.1 ng/dL
JS4	23.7 ng/dL
VC0	22.5 ng/dL

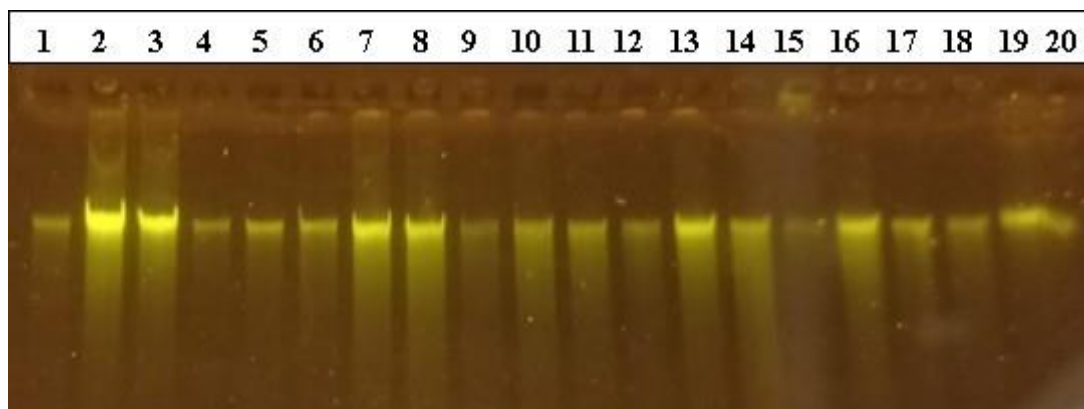


Figura N°4. Corrida electroforética de los ADN extraídos

De cada muestra incluida en el estudio, se amplificó mediante la técnica de PCR convencional, un total de 12 regiones pertenecientes al gen F9: Promotor A (9PA), Promotor B (9PB), Exón A (9A), Exón B (9B), Exón C (9C), Exón D (9D), Exón E (9E), Exón F (9F), Exón G (9G), Exón H1 (9H1), Exón H2 (9H2) y UTR 3' Poly (9Poly), identificando que a lo largo de todo el gen F9 hubo variaciones genéticas en cada región.

La amplificación de la primera región, Promotor A (9PA) de 484 pb (**Figura N°5**), arrojó que solo una muestra no amplifica para esta región como se detalla en la **Tabla 5**, paciente que no tiene ningún vínculo con la familia de estudio.

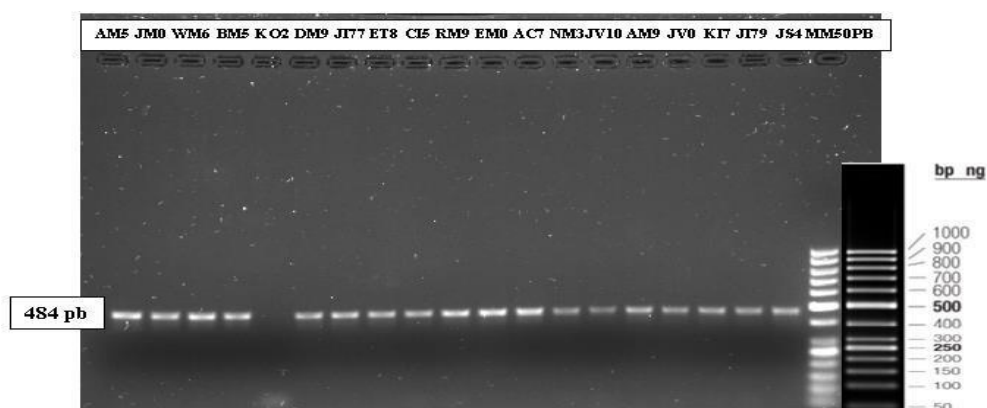


Figura N°5. Electroforesis de la región 9PA.

Tabla 5. Resultados de amplificación de la región 9PA.

Muestras	Amplificación
AM5	Si
JM0	Si
WM6	Si
BM5	Si
KO2	No
DM9	Si
JI77	Si
ET8	Si
CI5	Si
RM9	Si
EM0	Si
AC7	Si
NM3	Si
JV10	Si
AM9	Si
JV0	Si
KI7	Si
JI79	Si
JS4	Si
VC0	Si

La amplificación de la segunda región, Promotor B (9PB) de 499pb (**Figura N°6**) arrojó que solo una muestra no amplifica para esta región como se detalla en la **Tabla 6**, este paciente no tiene ningún vínculo con la familia de estudio.

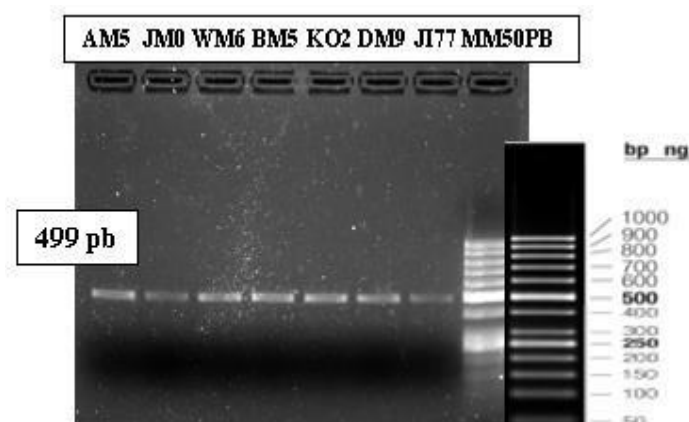


Figura N°6. Electroforesis de la región 9PB.

Tabla 6. Resultados de amplificación de la región 9PB.

Muestras	Amplificación
AM5	Si
JM0	Si
WM6	Si
BM5	Si
KO2	Si
DM9	Si
JI77	Si
ET8	Si
CI5	No
RM9	Si
EM0	Si
AC7	Si
NM3	Si
JV10	Si
AM9	Si
JV0	Si
KI7	Si
JI79	Si
JS4	Si
VC0	Si

La amplificación de la tercera región, 9A de 260 pb (**Figura N°7**) arrojó que solo una muestra no amplifica para esta región como se detalla en la **Tabla 7**, este paciente tiene un vínculo con la familia de estudio

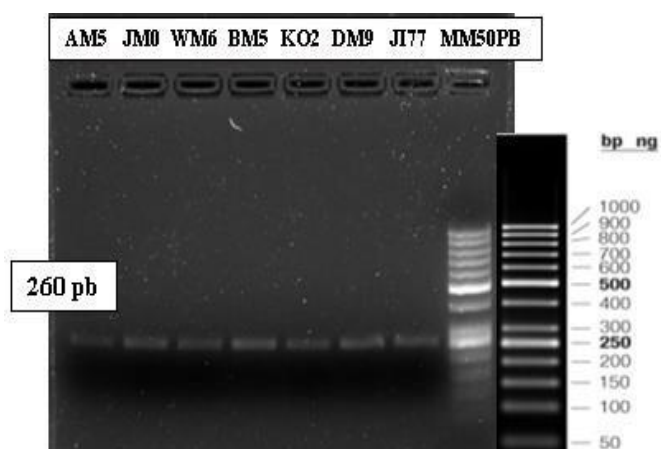


Figura N°7. Electroforesis de la región 9A.

Tabla 7. Resultados de amplificación de la región 9A.

Muestras	Amplificación
AM5	Si
JM0	Si
WM6	Si
BM5	Si
KO2	Si
DM9	Si
JI77	Si
ET8	Si
CI5	Si
RM9	Si
EM0	Si
AC7	Si
NM3	Si
JV10	Si
AM9	Si
JV0	No
KI7	Si
JI79	Si
JS4	Si
VC0	Si

La amplificación de la cuarta región, 9B de 347pb (**Figura N°8**) arrojó que dos muestras no se amplificaron para esta región como se detalla en la **Tabla 8**, estos pacientes tienen un vínculo con la familia de estudio, este hallazgo sugiere una posible variación en esta región, ya que ha sido reportada en las literaturas como una variante relevante en la Hemofilia B.

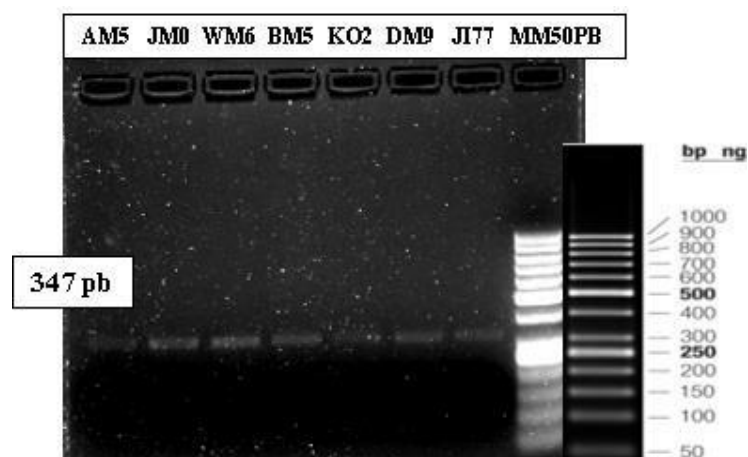


Figura N°8 Electroforesis de la región 9B.

Tabla 8. Resultados de amplificación de la región 9B.

Muestras	Amplificación
AM5	Si
JM0	Si
WM6	Si
BM5	Si
KO2	Si
DM9	Si
JI77	Si
ET8	Si
CI5	Si
RM9	No
EM0	Si
AC7	Si
NM3	Si
JV10	No
AM9	Si
JV0	Si
KI7	Si
JI79	Si
JS4	Si
VC0	Si

La amplificación de la quinta región, 9C de 341pb (**Figura N°9**) arrojó que seis muestras no amplificaron para esta región como se detalla en la **Tabla 9**, estos pacientes tienen un vínculo con la familia de estudio, este hallazgo sugiere una posible variación en esta región, ya que ha sido reportada en las literaturas como una variante relevante en la Hemofilia B.

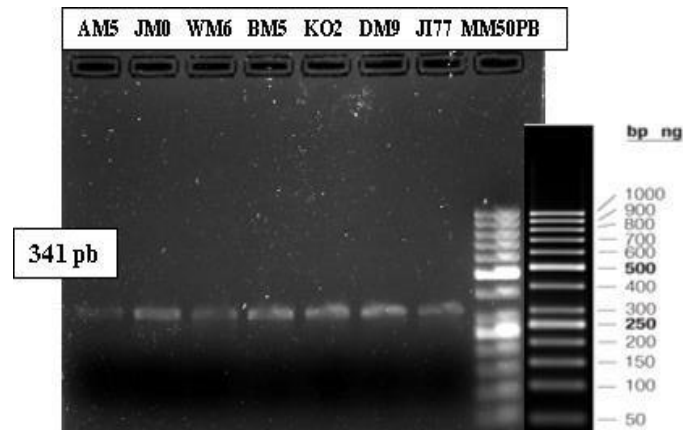


Figura N°9 Electroforesis de la región 9C.

Tabla 9. Resultados de amplificación de la región 9C.

Muestras	Amplificación
AM5	Si
JM0	Si
WM6	Si
BM5	Si
KO2	Si
DM9	Si
JI77	Si
ET8	Si
CI5	Si
RM9	No
EM0	Si
AC7	No
NM3	Si
JV10	No
AM9	No
JV0	Si
KI7	Si
JI79	No
JS4	Si
VC0	No

La amplificación de la sexta región, 9D de 583pb (**Figura N°10**) reveló que cinco muestras no amplificaron para esta región como se detalla en la **Tabla 10**, tres de estos pacientes están vinculados a la familia de estudio, mientras que los dos restantes no comparten ningún lazo consanguíneo entre sí ni con la familia de estudio, este hallazgo sugiere un posible cambio genético en esta región entre los tres pacientes con vínculo familiar, ya que varias literaturas mencionan que existen variantes genéticas asociadas a la Hemofilia B en dicha región.

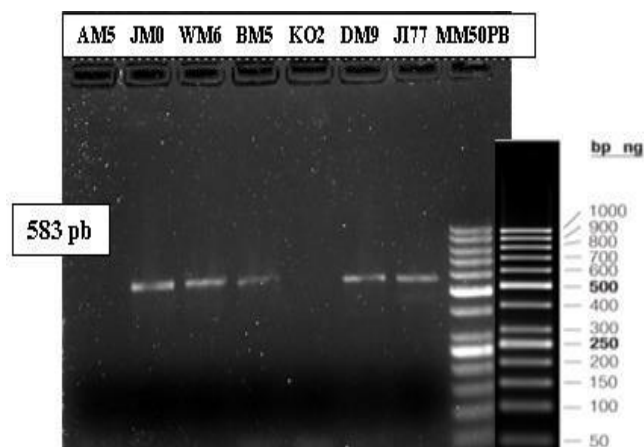


Figura N°10 Electroforesis de la región 9D.

Tabla 10. Resultados de amplificación de la región 9D.

Muestras	Amplificación
AM5	No
JM0	Si
WM6	Si
BM5	Si
KO2	No
DM9	Si
JI77	Si
ET8	No
CI5	Si
RM9	Si
EM0	Si
AC7	Si
NM3	Si
JV10	No
AM9	Si
JV0	No
KI7	Si
JI79	Si
JS4	Si
VC0	Si

La amplificación de la séptima región, 9E de 334pb reveló que once muestras no amplificaron para esta región como se detalla en la **Tabla 11**, nueve de estos pacientes están vinculados a la familia de estudio, mientras que los dos restantes no comparten ningún lazo consanguíneo entre sí ni con la familia de estudio, este hallazgo sugiere la posibilidad de cambios genéticos en esta región entre los nueve pacientes con vínculo familiar, ya que varias literaturas mencionan que existen variantes genéticas asociadas a la Hemofilia B en dicha región.

Tabla 11. Resultados de amplificación de la región 9E.

Muestras	Amplificación
AM5	No
JM0	Si
WM6	Si
BM5	Si
KO2	Si
DM9	Si
J177	No
ET8	No
CI5	No
RM9	No
EM0	Si
AC7	Si
NM3	No
JV10	No
AM9	Si
JV0	No
KI7	No
J179	No
JS4	Si
VC0	No

La amplificación de la octava región, 9F de 459pb (**Figura N°11**) reveló la ausencia de amplificación en 3 muestras, como se detalla en la **Tabla 12**, destacando que estas muestras están vinculadas a la familia de estudio, este hallazgo sugiere un posible cambio genético en esta región, ya que varias fuentes literarias mencionan la alta presencia de mutaciones genéticas asociadas a la Hemofilia B en dicha región, mientras que las 17 muestras que sí amplificaron fueron sometidas a secuenciación.

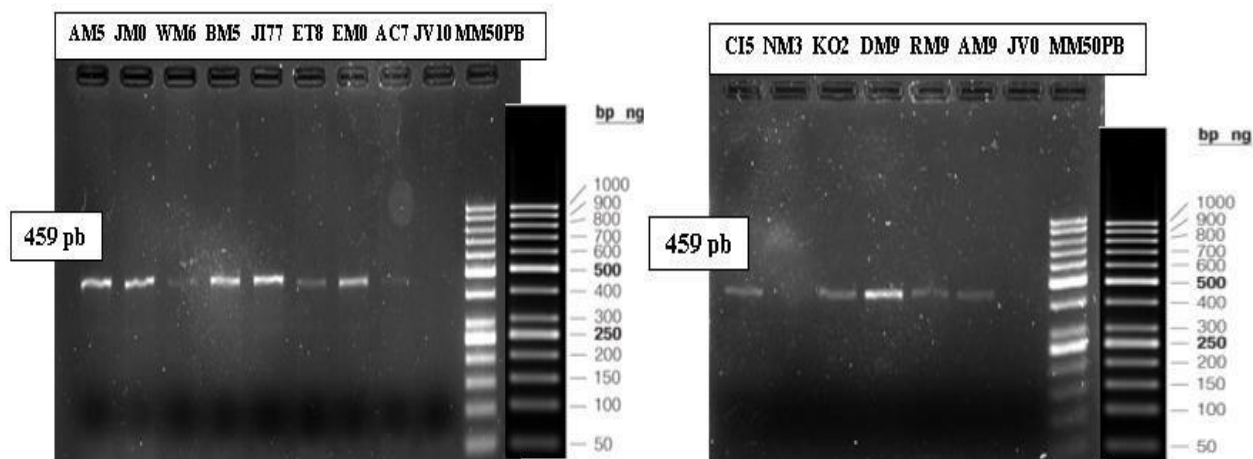


Figura N°11. Electroforesis de la región 9F.

Tabla 12. Resultados de amplificación de la región 9F.

Muestras	Amplificación
AM5	Si
JM0	Si
WM6	Si
BM5	Si
KO2	Si
DM9	Si
JI77	Si
ET8	Si
CI5	Si
RM9	Si
EM0	Si
AC7	Si
NM3	No
JV10	No
AM9	Si
JV0	No
KI7	Si
JI79	Si
JS4	Si
VC0	Si

La amplificación de la novena región, 9G de 401pb (**Figura N°12**) reveló que una muestra no amplificó para esta región como se detalla en la **Tabla 13**, este paciente fue diagnosticado con la coagulopatía y comparte un vínculo con la familia de estudio, este hallazgo sugiere una posible variación genética en esta región.

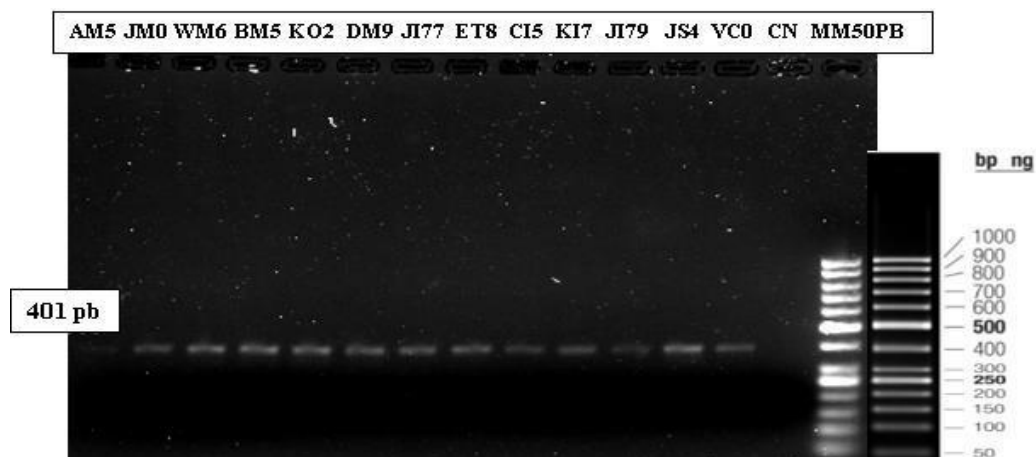


Figura N°12 Electroforesis de la región 9G.

Tabla 13. Resultados de amplificación de la región 9G.

Muestras	Amplificación
AM5	Si
JM0	Si
WM6	Si
BM5	Si
KO2	Si
DM9	Si
JI77	Si
ET8	Si
CI5	Si
RM9	Si
EM0	Si
AC7	Si
NM3	Si
JV10	No
AM9	Si
JV0	Si
KI7	Si
JI79	Si
JS4	Si
VC0	Si

La amplificación de la décima región, 9H1 de 436pb (**Figura N°13**) reveló que una muestra no amplificó para esta región como se detalla en la **Tabla 14**, destacando que este paciente fue diagnosticado con la coagulopatía y están vinculado a la familia de estudio, este hallazgo sugiere un posible cambio genético en esta región, ya que varias literaturas mencionan que existen mutaciones genéticas asociadas a la Hemofilia B en dicha región.

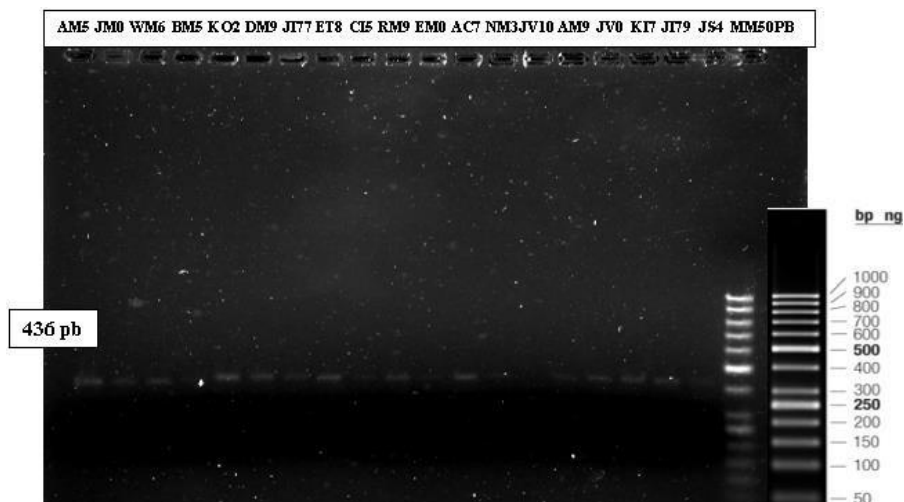


Figura N°13. Electroforesis de la región 9H1.

Tabla 14. Resultados de amplificación de la región 9H1.

Muestras	Amplificación
AM5	Si
JM0	Si
WM6	Si
BM5	Si
KO2	Si
DM9	Si
JI77	Si
ET8	Si
CI5	Si
RM9	Si
EM0	Si
AC7	Si
NM3	Si
JV10	No
AM9	Si
JV0	Si
KI7	Si
JI79	Si
JS4	Si
VC0	Si

La amplificación de la undécima región, 9H2 de 488pb (**Figura N°14**) reveló que tres muestras no amplificaron para esta región como se detalla en la **Tabla 15**, destacando que estas muestras están vinculadas a la familia de estudio, este hallazgo sugiere un posible cambio genético en esta región, ya que varias fuentes literarias mencionan la alta presencia de mutaciones genéticas asociadas a la Hemofilia B en dicha región, mientras que las 17 muestras que sí amplificaron fueron sometidas a secuenciación.

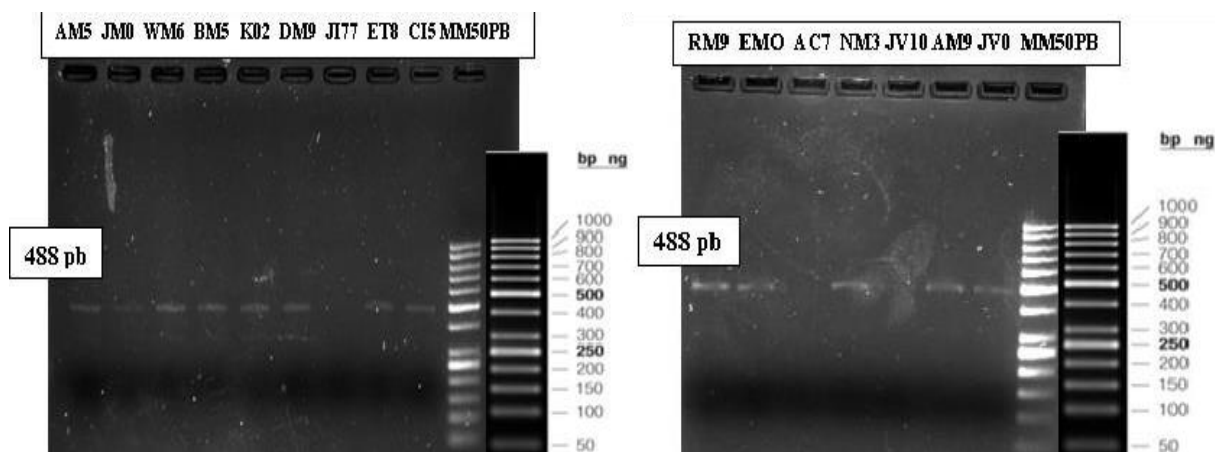


Figura N°14. Electroforesis de la región 9H2.

Tabla 15. Resultados de amplificación de la región 9H2.

Muestras	Amplificación
AM5	Si
JM0	Si
WM6	Si
BM5	Si
KO2	Si
DM9	Si
JI77	No
ET8	Si
CI5	Si
RM9	Si
EM0	Si
AC7	Si
NM3	Si
JV10	No
AM9	Si
JV0	Si
KI7	Si
JI79	No
JS4	Si
VC0	Si

La amplificación de la duodécima región, Poly (**Figura N°15**) reveló que ocho muestras no amplificaron para esta región como se detalla en la **Tabla 16**, siete de estos pacientes están vinculados a la familia de estudio, mientras que un paciente no comparte ningún vínculo familiar, este hallazgo sugiere la posibilidad de cambios genéticos en esta región entre los siete pacientes con vínculo familiar, ya que varias literaturas mencionan que existen variantes genéticas asociadas a la Hemofilia B en dicha región.

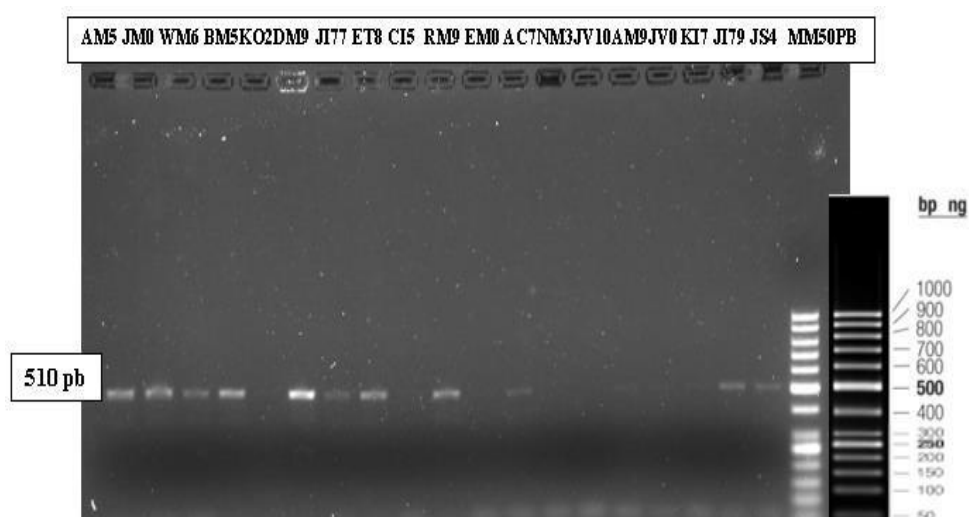


Figura N°15. Electroforesis de la región Poly.

Tabla 16. Resultados de amplificación de la región Poly.

Muestras	Amplificación
AM5	Si
JM0	Si
WM6	Si
BM5	Si
KO2	No
DM9	Si
JI77	Si
ET8	Si
CI5	No
RM9	Si
EM0	No
AC7	Si
NM3	No
JV10	No
AM9	No
JV0	No
KI7	No
JI79	Si
JS4	Si
VC0	No

En cuanto a las regiones del Promotor A (PA), Promotor B (PB), solo un paciente no amplificó para estas regiones teniendo en cuenta que no forma parte del vínculo familiar, en cambio, en las regiones 9A, 9G y 9H1 solo un paciente no presentó amplificación siendo parte del vínculo familiar, por otro lado, se observó que en la región B, dos pacientes del vínculo familiar no amplifican para esta región, mientras que, en la región C, seis pacientes del vínculo familiar no amplifican para esta región, de la misma manera se observó que cinco pacientes no amplificaron para la región D, siendo tres de ellos parte de la familia de estudio y los otros dos pacientes no, en la región E, más de la mitad de las 20 muestras, específicamente 11 pacientes no amplificaron para esta región, en el caso de la región F, tres pacientes de la familia de estudio no amplificaron; asimismo, en la región H2 se observó que tres miembros de la familia tampoco amplificaron para esta región, y en la región Poly ubicado en el UTR 3' ocho pacientes no amplificaron, siendo 7 pacientes asociados a la familia y uno restante que no comparte vínculo familiar, por lo que, se puede sugerir la realización de primers que puedan flanquear un poco más arriba o más abajo de la región de interés con el fin de confirmar si en realidad existió una alteración en las regiones que no amplificaron con nuestras muestras de estudio.

De acuerdo con los resultados mencionados previamente, se evidenció que el 75 % de los 16 pacientes pertenecientes a la familia de estudio presentan ausencia de amplificación en al menos una región, independientemente del sexo del paciente, en donde los resultados más relevantes fueron que, en primer lugar se observó a una paciente integrante de la familia ecuatoriana la ausencia de amplificación de la región F, y en segundo lugar que el paciente de la familia que fue diagnosticado con Hemofilia B tiene una variación genética a lo largo del gen F9, tomando en cuenta que las 12 regiones no estuvieron afectadas lo que representaría un 100% de gen sano, este paciente presenta afectación en 9 regiones, lo que representaría un 75% de variación en el gen F9, ya debido a la falta de amplificación para las regiones 9B, 9C, 9D, 9E, 9F, 9G 9H1, 9H2 y Poly.

Además, 3 de los 4 pacientes que aseguraron no tener un vínculo sanguíneo con la familia de estudio ni de haber tenido herencia familiar de alguna coagulopatía no amplificaron para las regiones 9PA, 9PB, 9B, 9D, 9E y Poly, por lo que, se descartaron para la comparación entre un paciente sano de un paciente enfermo o portador del gen anómalo que puede estar relacionado con la Hemofilia B, por lo que, se logró observar que el cuarto paciente (control), es decir, paciente sin ninguna asociación sanguínea y de coagulopatías aparentemente presenta un gen sano por sus amplificaciones en todas las

regiones del gen F9 a diferencia del paciente con Hemofilia B ya mencionado.

En base a la revisión de la literatura, las regiones 9F, 9H1 y 9H2 son las más propensas a presentar mutaciones asociadas al Hemofilia B, por tal razón, se escogieron para la secuenciación de tipo Sanger debido a las limitantes económicas y se envió las muestras al servicio de Macrogen para analizar la variabilidad mutacional conocida en estas regiones, además fue una herramienta muy útil en este estudio, nos brindó información sobre la calidad de las secuencias como se detalla en las **Tablas 17, 18 y 19**, evidenciándose en la **Figura N°16**.

Tabla 17. Calidad de las secuencias de las regiones F.

Muestra	Primer	%HQ
AM5	9F F	95.70%
	9F R	99.70%
JM0	9F F	97.10%
	9F R	99.50%
BM5	9F F	97.40%
	9F R	99.70%
KO2	9F F	97.30%
	9F R	99.70%
DM9	9F F	93.30%
	9F R	99.70%
JI77	9F F	94.90%
	9F R	100%
ET8	9F F	97.90%
	9F R	100%
CI5	9F F	96.30%
	9F R	100%
EM0	9F F	97.10%
	9F R	100%
AC7	9F F	95.20%
	9F R	98.40%
AM9	9F F	85.90%
	9F R	100%
KI7	9F F	95.60%
	9F R	100%
JI79	9F F	98.10%
	9F R	99.70%
JS4	9F F	94.90%
	9F R	99.70%
VC0	9F F	97.70%
	9F R	99.20%
WM6	9F F	98.20%
	9F R	100%
RM9	9F F	94.40%
	9F R	99%

Tabla 18. Calidad de las secuencias de las regiones H1.

Muestra	Primer	%HQ
AM5	9H1 F	98.90%
	9H1 R	98%
JM0	9H1 F	99.20%
	9H1 R	98.90%
BM5	9H1 F	99.20%
	9H1 R	99.40%
KO2	9H1 F	99.70%
	9H1 R	99.70%
DM9	9H1 F	99.20%
	9H1 R	99.20%
JI77	9H1 F	100%
	9H1 R	99.40%
ET8	9H1 F	100%
	9H1 R	99.40%
CI5	9H1 F	100%
	9H1 R	99.40%
EM0	9H1 F	99.20%
	9H1 R	98.90%
AC7	9H1 F	98.60%
	9H1 R	99.40%
AM9	9H1 F	99.20%
	9H1 R	99.70%
KI7	9H1 F	89.90%
	9H1 R	98.90%
JI79	9H1 F	97.20%
	9H1 R	98.10%
JS4	9H1 F	98.90%
	9H1 R	99.40%
VC0	9H1 F	99.40%
	9H1 R	98.60%
NM3	9H1 F	100%
	9H1 R	97.50%
JV0	9H1 F	98.10%
	9H1 R	99.40%
WM6	9H1 F	99.70%
	9H1 R	99.40%

Tabla 19. Calidad de las secuencias de las regiones H2.

Muestra	Primer	%HQ
AM5	9H2 F	98.30%
	9H2 R	99.30%
JM0	9H2 F	99%
	9H2 R	99.30%
BM5	9H2 F	99.50%
	9H2 R	99.30%
KO2	9H2 F	98.80%
	9H2 R	98.80%
DM9	9H2 F	99.50%
	9H2 R	99%
ET8	9H2 F	99.30%
	9H2 R	99%
CI5	9H2 F	98.30%
	9H2 R	98.80%
EM0	9H2 F	99.50%
	9H2 R	98.80%
AC7	9H2 F	99.10%
	9H2 R	97.10%
AM9	9H2 F	98.80%
	9H2 R	99%
VC0	9H2 F	99.30%
	9H2 R	99.50%
NM3	9H2 F	99.30%
	9H2 R	98.80%
JV0	9H2 F	99%
	9H2 R	97.60%
RM9	9H2 F	99.30%
	9H2 R	99%

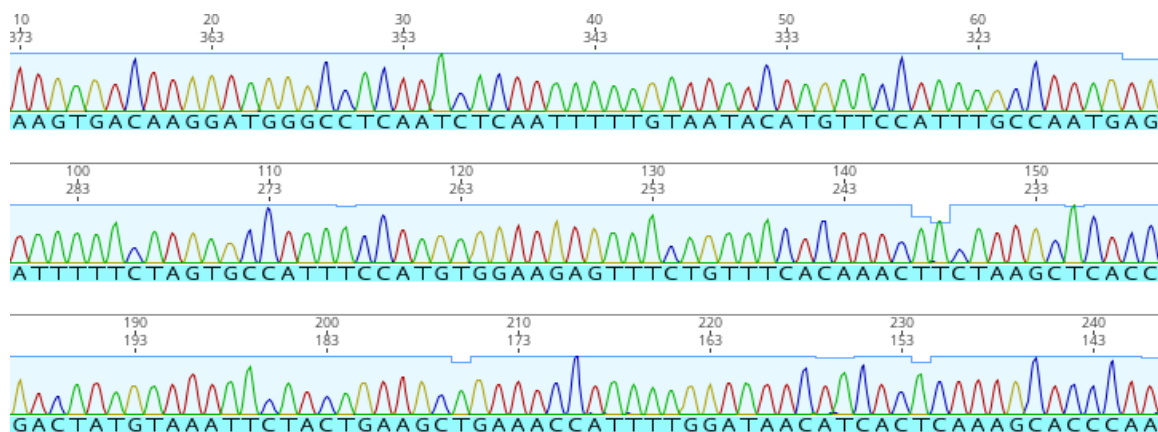


Figura N°16. Calidad de las secuencias de ADN

Finalmente, mediante el software Geneious Prime versión 2023 se realizaron los análisis bioinformáticos de los resultados de la secuenciación de las regiones F, H1 y H2. En la región F, se identificó que una paciente asociada a la familia de estudio presenta una mutación puntual, evidenciada en la **Figura N°17** como g. 25386G>A, clasificada en la literatura como una variante missense que afecta al aminoácido p.Thr194Ala, sin cambiar la estructura de la proteína que causa la enfermedad.



Figura N°17. Mutación puntual de la región 9F cambio de G>A resaltado con azul

Por otro lado, la secuenciación de la región H1, no reveló ninguna mutación (**Figura N°18**). Asimismo, al secuenciar la región H2, todas las muestras se alinearon con la secuencia de referencia (RefSeq: NG_007994.1) y no se observó ninguna mutación en esta región (**Figura N°19**).



Figura N°18. Secuenciación de la región 9H1 sin mutaciones genéticas

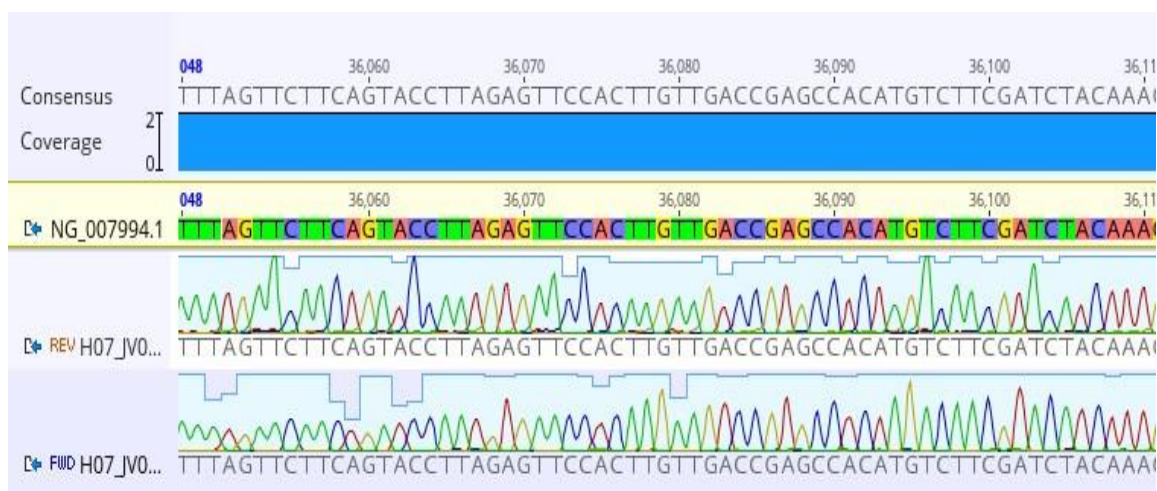


Figura N°19. Secuenciación de la región 9H2 sin mutaciones genéticas

3.2 DISCUSIÓN

En este estudio a pesar del reducido número de muestras se analizaron un total de 20 muestras, de las cuales 16 pertenecían a una familia ecuatoriana objeto de estudio con un paciente diagnosticado con Hemofilia B y las otras cuatro muestras que no tienen asociación familiar ni herencia de esta enfermedad.

Con respecto a los resultados específicos, se amplificaron 12 regiones del gen F9 y se observaron variaciones genéticas en cada región, para la región del Promotor A, Promotor B, 9D 9E y Poly no presentaron amplificación en tres de los pacientes que no tenían vínculo familiar, mientras que, para las regiones 9A, 9B, 9C, 9D, 9E, 9F, 9G, 9H1, 9H2 y Poly los 16 pacientes pertenecientes a la familia de estudio presentan ausencia de amplificación en al menos una región independientemente del sexo del paciente, en cuanto a estas observaciones varios científicos aseguran que al no amplificar estos fragmentos estarían directamente relacionados con alteraciones en el gen que está asociado a la Hemofilia B, sin embargo, no se confirmó estas alteraciones debido a que el grupo poblacional que se eligió pertenecientes y no pertenecientes a la familia de estudio no amplifican para las mismas zonas en algunos casos, por lo tanto no se asegura que exista mutaciones como tal en las regiones del gen F9, más bien en el caso de los pacientes que no comparten un vínculo consanguíneo con la familia de estudio se podría asociar a que su no amplificación se debió a una presencia de algunas impurezas que pudieron inhibir las actividades enzimáticas para llevar a cabo la amplificación como también lo sugieren Serrato A. y colaboradores (38), por lo que, se sugiere como una recomendación asertiva, el rediseño primers o cebadores que puedan flanquear un poco

más arriba o más abajo de la región de interés con el fin de confirmar si en realidad existió una alteración en las regiones que no amplificaron con nuestras muestras de estudio.

Se logró evidenciar que el paciente diagnosticado con esta coagulopatía presenta mutaciones en el gen F9 debido a que diversas regiones de su gen no se amplificaron, siendo las regiones 9B, 9C, 9D, 9E, 9G 9H1, 9H2, Poly y 9F principalmente afectada, como se menciona en los estudios realizados por Radic C, Green PM e investigadores, la región B codifica el propéptido, los sitios de unión de la carboxilasa dependiente de vitamina K, y junto con la región C codifican el dominio Gla; la región D codifica para el primer dominio del factor de crecimiento epidérmico, el exón E codifica para el segundo dominio del factor de crecimiento epidérmico; el exón F codifica para el péptido de activación, que se libera del factor resultando en la cadena liviana y pesada del FIXa, las regiones G y H codifican para el dominio catalítico de la proteína del factor X a Xa (2,10), por ende, en este paciente se confirma la deficiencia del Factor FIX porque las mutaciones en el gen F9 impiden no solo la producción del factor IX sino de más proteínas como asegura el autor Acosta M (7) y dicho por Srivastava A. e investigadores en caso de que no se produzca amplificación en una región o varios tramos en concreto durante la PCR, puede sospecharse de una gran delección de ADN (25). Además, se observó que dentro del vínculo familiar una paciente del sexo femenino no amplificó para la región F, lo que coincide que dentro del vínculo familiar existe herencia de Hemofilia B debido a que estudios realizados por Parrado Y. y Radic C. mencionan que las mujeres portadoras a pesar de que pueden ser asintomáticas, dependiendo si la mutación o inactivación al azar del cromosoma X afectan a la producción del factor IX pueden presentar raramente evidencia fenotípica de la enfermedad (2,13), a lo que el autor Miller C. hace referencia a este tipo de pacientes femeninas como hemofílicas (37).

Además, en nuestra investigación identificamos una alteración g.25386G>A, que afecta al aminoácido p.Thr194Ala, siendo una mutación ya reportada por estudios realizados por Parrado Y. y bases internacionales que mencionan que esta mutación de tipo missense benigna debido a que la alteración no cambia la estructura de la proteína que causa la enfermedad, pero se asocia a una herencia de posible portadora para su descendencia (13), puesto que la madre de esta paciente no presentó amplificación en la región F, la cual ha sido reportada como una región muy variante en mutaciones.

En esta investigación, a pesar del limitado número de muestras y las dificultades que se tuvieron para conseguirlas, se han obtenido resultados relevantes, ya que pueden servir en futuras investigaciones de la Hemofilia B. Este estudio ha servido para conocer la herencia genética desde la segunda hasta la tercera generación presente en la familia ecuatoriana gracias a la caracterización molecular del gen F9, obteniendo datos que pueden contribuir a la base genética sobre la enfermedad en esta población, mejorar el diagnóstico y permitir un tratamiento más personalizado y eficaz, lo que a su vez podría influir en futuras políticas de salud pública.

Finalmente, este es el proyecto pionero de Biología Molecular de caracterización del gen F9 asociado a la Hemofilia B de gran relevancia para mejorar la atención médica y la calidad de vida de los pacientes con esta coagulopatía en Ecuador, y tiene el potencial de impulsar avances en la investigación y terapias relacionadas con esta enfermedad en el país y se recomienda la realización de un estudio con más profundidad acerca de esta coagulopatía y de las mutaciones posibles en las regiones que no pudieron ser secuenciadas.

CAPITULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 CONCLUSIONES

Se logró exitosamente la caracterización molecular del gen F9, a pesar de que representó un desafío considerable, ya que la aplicación de tecnologías moleculares requirió un meticuloso seguimiento de los protocolos establecidos, sin embargo, la minuciosidad inherente al proceso, desempeñó un papel crucial en el análisis de las muestras, contribuyendo de manera significativa a la comprensión de la variabilidad mutacional de la Hemofilia B en la familia ecuatoriana.

Este análisis molecular permitió evidenciar por medio de la técnica de PCR y electroforesis que existe variaciones genéticas a lo largo del gen F9 en la familia ecuatoriana, por ende, esta rara condición fue compartida de generación a generación afectando a un individuo que fue diagnosticado con Hemofilia B.

Se secuenció las regiones F, H1 y H2 debido a su destacada variabilidad genética, respaldada por la evidencia bibliográfica, mediante la secuenciación de tipo Sanger, que demostró ser altamente eficiente en la determinación de fragmentos de la secuencia de nucleótidos del genoma de un individuo, así como en el análisis de las variaciones puntuales.

Se logró identificar en una paciente femenina una mutación de tipo missense en la región F del gen, ya reportada en bases internacionales, mediante el uso del programa bioinformático Geneious Prime Trial versión 2023, proporcionando un aseguramiento de calidad integral de las secuencias, fortaleciendo así la confiabilidad de los resultados obtenidos.

4.2 RECOMENDACIONES

Incluir un mayor número de muestras de pacientes diagnosticados con la coagulopatía y genotipo severo y así correlacionar genotípica y fenotípicamente esta enfermedad.

Secuenciar las todas las muestras que no fueron analizadas por el método Sanger, para confirmar las mutaciones genotípicas que pueden presentar las demás regiones.

Integrar varias poblaciones del Ecuador que presenten esta coagulopatía para realizar una comparación entre ellas en cuanto a mutaciones en el gen F9 y determinar si en el país estas poblaciones presentan mutaciones similares.

4.3 BIBLIOGRAFÍA:

1. Ministry of Health Chile. Hemophilia clinical guide [Internet]. 2013 [cited 2023 Jun 11]. Available from: https://www.minsal.cl/sites/default/files/Guia_Hemofilia.pdf
2. Radic CP. UNIVERSITY OF BUENOS AIRES Faculty of Natural Sciences [Internet]. 2010 [cited 2023 Nov 15]. Available from: https://bibliotecadigital.exactas.uba.ar/download/tesis/tesis_n4794_Radic.pdf
3. Goodeve AC. Hemophilia B: Molecular pathogenesis and mutation analysis. Vol. 13, *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. Blackwell Publishing Ltd; 2015. p. 1184–95.
4. García J, Majluf A. Hemophilia. *Mexico Gazette* [Internet]. 2013 Nov 21 [cited 2023 Jul 24].
5. MSP Ecuador. Ministry of Public Health of Ecuador. 2016 [cited 2023 Jul 24]. Ministry of Public Health Hemophilia. Available from: <https://www.salud.gob.ec/17-de-abril-dia-mundial-de-la-hemofilia/>
6. Ministry of Public Health of Ecuador. Diagnosis and treatment of congenital hemophilia [Internet]. Quito; 2016 [cited 2023 Jun 10]. Available from: https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2017/03/MSP_Gu%C3%ADa_hemofilia-cong%C3%A9nita_230117_D-3-1.pdf
7. Acosta-Aragón MA, Álvarez-Mina AR, Velásquez-Paz JC, Vizcaíno-Carruyo JC. Hemophilia B or Christmas disease. *Medicine and Laboratory* [Internet]. 2020 Sep 29 [cited 2023 Jun 10];24(4):273–89.
8. Coffin D, Gouider E, Konkle B, Hermans C, Lambert C, Diop S, et al. The World Federation of Hemophilia World Bleeding Disorders Registry: insights from the first 10,000 patients. *Res Pract Thromb Haemost*. 2023 Nov 1;7(8).
9. Ndoumba-Mintya A, Diallo YL, Tayou TC, Mbanya DN. Optimizing Haemophilia Care in Resource-Limited Countries: Current Challenges and Future Prospects. Vol. 14, *Journal of Blood Medicine*. Dove Medical Press Ltd; 2023. p. 141–6.
10. Green PM, Montandon AJ, Bentley DR, Ljung R, Nilsson IM, Giannelli F. The incidence and distribution of CpG ^ TpG transitions in the coagulation factor IX gene. A fresh look at CpG mutational hotspots [Internet]. Vol. 18, *Nucleic Acids Research*. 1990. Available from: <https://academic.oup.com/nar/article/18/11/3227/1049107>
11. Rallapalli PM, Kemball-Cook G, Tuddenham EG, Gomez K, Perkins SJ. An interactive mutation database for human coagulation factor IX provides novel insights into the phenotypes and genetics of hemophilia B. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2013 Jul;11(7):1329–40.
12. Li T, Miller CH, Payne AB, Hooper WC. The CDC hemophilia B mutation project mutation list: A new online resource. *Mol Genet Genomic Med*. 2013 Nov 1;1(4):238–45.

13. Parrado Jara Y. Molecular characterization of the F9 gene and genotype-phenotype correlation in a sample of patients with Hemophilia B in Colombia. [Internet]. 2018 [cited 2023 Jul 24].
14. Yi S, Yang Q, Zuo Y, Li M, Luo J, Qin Z, et al. A novel missense mutation in F9 gene causes hemophilia B in a family with clinical variability. *Blood Coagulation and Fibrinolysis*. 2019 Mar 1;31(2):121–6.
15. Huang L, Li L, Lin S, Chen J, Li K, Fan D, et al. Molecular analysis of 76 Chinese hemophilia B pedigrees and the identification of 10 novel mutations. *Mol Genet Genomic Med*. 2020 Nov 1;8(11).
16. El-Kamah GY, Mosaad RM, Taher MB, Amr KS. Defining the molecular pathology and consequent phenotypes in Egyptian HB patients. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 2021 Dec 1;19(1).
17. Agrawal N, Kumar R, Masih S, Srivastava P, Singh P, Jaiswal SK, et al. Molecular analysis of severe hemophilia B in Indian families: Identification of mutational hotspot and novel variants. *Int J Lab Hematol*. 2021 Feb 29;44(1):186–92.
18. Shen G, Gao M, Cao Q, Li W. The Molecular Basis of FIX Deficiency in Hemophilia B. Vol. 23, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI; 2022.
19. Dericquebourg A, Fretigny M, Chatron N, Tardy B, Zawadzki C, Chambost H, et al. Whole F9 gene sequencing identified deep intronic variations in genetically unresolved hemophilia B patients. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2022 Apr;21(4):828–37.
20. Johnsen JM, Fletcher SN, Dove A, McCracken H, Martin BK, Kircher M, et al. Results of genetic analysis of 11 341 participants enrolled in the My Life, Our Future hemophilia genotyping initiative in the United States. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2022 Sep 1;20(9):2022–34.
21. México. Hemophilia consensus in Mexico. *Gac Med Villahermosa* [Internet]. 2021 [cited 2023 Jun 11].
22. Castaldo G, Nardiello P, Bellitti F, Santamaria R, Rocino A, Coppola A, et al. Haemophilia B: From Molecular Diagnosis to Gene Therapy. *Clin Chem Lab Med*. 2003 Jan 25;41(4).
23. Eva M, Castellano M. Recommendations for the treatment of hemophilia B Royal Coordinator VICTORIA EUGENIA FOUNDATION. 2020.
24. Ingram GI. The history of haemophilia. *J Clin Pathol*. 1976 Jun 1;29(6):469–79.
25. Srivastava A, Santagostino E, Dougall A, Kitchen S, Sutherland M, Pipe SW, et al. WFH Guidelines for the Management of Hemophilia, 3rd edition. *Haemophilia*. 2020 Aug 3;26(S6):1–158.
26. Cedillo-Prado J, Córdova-Serrano R. Gene Therapy as a Treatment for Hemophilia. 593 Digital Publisher CEIT. 2023 Sep 3;8(5):5–16.

27. Shetty S, Bhavé M, Ghosh K. Challenges of multiple mutations in individual patients with haemophilia. Vol. 86, *European Journal of Haematology*. 2011. p. 185–90.
28. PureLink. PureLink® Genomic DNA Kits For purification of genomic DNA. 2012.
29. Thermo Fisher Scientific Inc. Invitrogen™ Minikit de ADN genómico PureLink™ [Internet]. 2024 [cited 2023 Dec 19]. Available from: <https://www.fishersci.es/shop/products/invitrogen-purelink-genomic-dna-mini-kit-3/p-4926470#:~:text=El%20minikit%20de%20DNA%20gen%C3%B3mico,liberarlo%20de%20forma%20m%C3%A1s%20eficiente.>
30. Moreno Rangel J, Mérida F ula, Maria Bolivar A, Rojas A, Garcia-Lugo P, et al. PCR and PCR-Multiplex: critical parameters and standardization protocol. 2014;3(1):25–33.
31. Villegas VE, Sánchez MC, Chuaire L. Polymerase chain reaction and molecular diagnostics. Vol. 40. Jul-Sep; 2009.
32. Mas E, Poza J, Ciriza J, Zaragoza P, Osta Clementina Rodellar R. Basics of the Polymerase Chain Reaction (PCR). 2001.
33. Montalvo C, Lugo M. ELECTROPHORESIS: FUNDAMENTALS, ADVANCES AND APPLICATIONS. 2007 [cited 2024 Jan 6]; Available from: <https://www.fishersci.es/shop/products/invitrogen-purelink-genomic-dna-mini-kit-3/p-4926470#:~:text=El%20minikit%20de%20DNA%20gen%C3%B3mico,liberarlo%20de%20forma%20m%C3%A1s%20eficiente.>
34. Camargo Mancipe AJ, Valero González KN, Gómez Rodriguez AM, Camargo Mancipe DF, Suárez Martínez CF, Cuy Chaparro LE. Fundamentals and biomedical applications of the main sequencing technologies: a literature review. *Health Research Journal University of Boyacá*. 2020 Nov 11;7(2).
35. Sanger F, Coulson AR. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol*. 1975 May;94(3):441–8.
36. Kneip M. *Clinical Laboratory Sample Collection Manual*. 2019;
37. Miller CH. *The Clinical Genetics of Hemophilia B (Factor IX Deficiency)*. Vol. 14, *Application of Clinical Genetics*. Dove Medical Press Ltd; 2021. p. 445–54.
38. Serrato Díaz A, Flores Rentería L, Aportela Cortez J, Sierra Palacios E. PCR: polymerase chain reaction [Internet]. 2014.

4.4 ANEXOS

ANEXO 1. Consentimiento informado

10. Anexos:

**CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA RECOLECCIÓN, USO Y ALMACENAMIENTO
DE MUESTRAS BIOLÓGICAS Y DATOS PERSONALES**

Título del estudio:

Caracterización molecular del gen F9 relacionado con la Hemofilia tipo B en sujetos de una familia ecuatoriana.

Nombre, dirección y teléfono del Investigador Principal:

Morán Erazo Angie Gabriela, Ambato, 0999593472

A. HOJA DE INFORMACIÓN:

Estimado señor(a), le estamos solicitando que autorice la recolección y uso de muestras de sanguíneas necesarias durante la realización del estudio "Caracterización molecular del gen F9 relacionado con la Hemofilia tipo B en sujetos de una familia ecuatoriana".

Su participación es completamente voluntaria; puede ACEPTAR O NO ACEPTAR participar en el estudio, sin que ello le provoque inconveniente alguno en su atención médica.

Lea toda la información que se le ofrece en este documento y haga todas las preguntas que necesite al investigador que se lo está explicando, antes de tomar una decisión. También lo alentamos a consultarlo con su familia, amigos y médico de cabecera.

1. ¿Por qué se realiza este estudio?

- ❖ El propósito de esta investigación es: determinar la presencia de mutaciones del gen F9 del factor XI como factores causantes de la Hemofilia tipo B en una persona diagnosticada y en sus familiares como posibles portadores para obtener un análisis molecular.

2. ¿Qué pasará si participo de estudio que me indica?

Luego de que firme este Consentimiento Informado, realizaremos las siguientes actividades con usted:

- a. Obtendremos 5ml de sangre en una oportunidad a través de la punción de una vena del brazo, tomando todas las medidas de asepsia requeridas para estos casos.

3. ¿Qué estudios harán con mis datos/muestras?

- 1) Nombres completos para identificar la muestra sanguínea
- 2) Extracción de ADN a partir de las muestras sanguíneas
- 3) Reacción en cadena de polimerasa, PCR convencional
- 4) Electroforesis en gel de agarosa
- 5) Secuenciación Sanger

4. ¿Qué riesgos podría tener si participo?

Los riesgos asociados con la toma de muestras de sangre de su brazo son el dolor momentáneo y la posibilidad de un hematoma (moretón) y, en raros casos infección, en la zona de la extracción.

También hay algún riesgo potencial para su privacidad, a pesar de que se tomarán todas las medidas necesarias para mantener la privacidad de su identidad y la confidencialidad de sus datos personales.

5. ¿Qué se sabe de este tipo de estudios?

- 1) La extracción de ADN es una técnica en la cual se obtiene ADN a partir de células sanguíneas con el fin de estudiarlo, analizarlo o manipularlo por lo que esta técnica no requiere otro esfuerzo mayor que solo flebotomía del paciente
- 2) La PCR convencional o reacción en cadena de polimerasa es una herramienta tecnológica para la amplificación de fragmentos de ADN que se obtuvo de la técnica de extracción, sin llevar a cabo otro procedimiento para la recolección de una muestra biológica.
- 3) La electroforesis en gel agarosa es una herramienta más utilizada para el análisis y separación de moléculas según la movilidad de estas en un campo eléctrico a partir del ADN que se obtuvo de la técnica de la extracción, esta prueba tampoco requiere de otro procedimiento para la recolección de una muestra biológica.

6. ¿Cuánto tiempo me tomará participar en el estudio?

Está previsto que su participación dure 30 minutos máximo 1 hora.

7. ¿Tendré beneficios por participar?

Es probable (aunque no seguro) que usted no se beneficie con los resultados de este estudio; esperamos que sí sea útil para que los investigadores sepan más sobre la Hemofilia B en el futuro.

8. ¿Me darán información sobre los resultados del estudio, luego de su finalización?

Se le realizará la entrega oficial de los resultados de manera escrita al finalizar la investigación.

9. ¿Qué gastos tendré si participo del estudio?

Usted no tendrá gasto alguno relacionado a los procedimientos y materiales necesarios para esta investigación. También se le cubrirán los gastos médicos que requiera en caso de sufrir algún daño o lesión relacionada con la investigación. No se cubrirán estudios ni medicamentos que no estén relacionados con el estudio.

10. ¿Qué pasará si sufro algún evento adverso mientras participo en el estudio?

El investigador Morán Erazo Angie Gabriela será responsable de los daños que usted pueda sufrir en su salud como consecuencia de su participación en el estudio. Si durante el transcurso del mismo usted sufre un daño físico, una lesión o una consecuencia en su salud relacionada con el estudio, se le proveerá toda la asistencia médica inmediata y necesaria para su tratamiento. Los costos de dicha asistencia estarán a cargo del investigador.

Si esto ocurriera, comuníquese de inmediato con el investigador, quien le dirá cómo debe proceder.

De todas formas, con la firma de este consentimiento informado usted no renuncia a los derechos que posee de acuerdo con el Código Civil y las leyes ecuatorianas en materia de responsabilidad por daños.

11. ¿Puedo dejar de participar en cualquier momento, aún luego de haber aceptado?

Usted es libre de retirar su consentimiento para participar en esta investigación en cualquier momento, sin que esto lo perjudique en su atención médica posterior; simplemente deberá notificar al investigador de su decisión verbal y por escrito.

Luego de que retire su consentimiento, no se podrán obtener datos sobre Ud. y su salud, pero toda la información obtenida con anterioridad sí será utilizada.

12. ¿Puedo retirar mi consentimiento para la utilización de muestras biológicas, aún luego de haber aceptado?

Si usted ha dado su autorización para almacenar sus muestras biológicas (tejido/células/sangre) para estudios a realizarse en el futuro, puede cambiar de opinión en cualquier momento. Debe notificar al investigador del estudio en forma oral o por escrito sobre su decisión.

13. ¿Cómo mantendrán la confidencialidad de mis datos/muestras?

Los datos, al igual que las muestras estarán debidamente identificadas a través de un código en donde anonimice sus nombres y permita la identificación de las muestras de cada sujeto de estudio.

14. ¿Dónde y cuánto tiempo almacenarán mis datos/muestras? ¿Cómo las destruirán luego de su utilización?

Sus muestras/datos se almacenarán en el laboratorio del Campus de Querochaca de la Universidad Técnica de Ambato. Sus muestras/datos se conservarán durante 6 meses. Después de este período serán destruidos con los métodos que cumplan con los procedimientos pertinentes vigentes en la institución.

Se le pedirá que indique si desea que las muestras no utilizadas sean destruidas o que se las vuelva anónimas en el caso que no lo sean (o sea, se les retire toda información que pueda relacionarlas con usted) para su posterior utilización en otra investigación. Recuerde que, si sus muestras son anónimas o están anonimizadas o disociadas, el investigador no podrá destruirlas si usted así lo requiere, ya que no es posible relacionar la/el muestra/dato con usted.

Toda información que se haya obtenido hasta el momento en que retire su consentimiento será usada, pero no se obtendrá ningún otro dato.

15. ¿Puedo ser retirado del estudio aún si yo no quisiera?

El investigador, el Comité Ética para la investigación en Seres Humanos (CEISH), pueden decidir retirarlo si consideran que es lo mejor para usted. También pueden decidir retirarlo por las siguientes causas: Si usted ha sido diagnosticado con Hemofilia A o con otro trastorno de coagulación.

16. ¿Me pagarán por participar?

No se le pagará por su participación en este estudio. Sólo se le cubrirán los viáticos por traslados a y desde el Hospital (si aplica) y desayuno en caso de tener que concurrir a las visitas en ayunas, los que le serán reembolsados ante la presentación del comprobante correspondiente.

17. ¿Cómo mantendrán la confidencialidad de mis datos personales? ¿Cómo harán para que mi identidad no sea conocida?

Los datos que lo identifiquen serán tratados en forma confidencial como lo exige la Ley. Salvo para quienes estén autorizados a acceder a sus datos personales, usted no podrá ser identificado y para ello, se le asignará un código compuesto por las primeras letras del nombre

COMITÉ DE ÉTICA PARA INVESTIGACIÓN EN SERES HUMANOS CEISH-FCS-UTA

F C S
FACULTAD DE CIENCIAS
DE LA SALUD

y los cuatro últimos dígitos de la célula. En caso de que los resultados de este estudio sean publicados en revistas científicas o presentados en congresos u otros eventos académicos-científicos, su identidad no será revelada.

El titular de los datos personales (o sea usted) tiene la facultad de ejercer el derecho de acceso a los mismos en forma gratuita hasta seis meses de haber concluido este estudio.

18. ¿Los resultados genéticos que obtengan de mis muestras biológicas, pueden ser usados con un fin distinto al que aquí se explica?

No. Los resultados obtenidos netamente solo son con fines prácticos de investigación.

19. ¿Quiénes tendrán acceso a mis datos personales?

Como parte del estudio, el Investigador Principal y todo el equipo de investigación tendrán acceso a los resultados de sus estudios, como las pruebas de laboratorio y estudios de biología molecular. También pueden ser revisados por el Comité Ética de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Técnica de Ambato.

20. ¿A quiénes puedo contactar si tengo dudas sobre el estudio y mis derechos como participante del mismo?

a. **Sobre el estudio:** contactar al Investigador Principal: Angie Gabriela Morán Erazo en la Universidad Técnica de Ambato o al teléfono 0999593472.

b. **Sobre sus derechos como participante en el estudio de investigación:**

Contactar al Comité Ética para la Investigación con Seres Humanos de la UTA.

COMITÉ DE ÉTICA PARA INVESTIGACIÓN EN SERES HUMANOS CEISH-FCS-UTA

F C S
FACULTAD DE CIENCIAS
DE LA SALUD

B. HOJA DE FIRMAS DEL CONSENTIMIENTO INFORMADO

1. Título del estudio:

Caracterización molecular del gen F9 relacionado con la Hemofilia tipo B en sujetos de una familia ecuatoriana.

2. Nombre, dirección y teléfono del Investigador Principal:

Morán Erazo Angie Gabriela, Ambato, 0999593472

UTILICE EL SIGUIENTE CUADRO EN CASO DE PERSONAS ADULTAS LEGALMENTE COMPETENTES PARA FIRMAR ESTE CONSENTIMIENTO INFORMADO

YO, _____

- ❖ He recibido una explicación satisfactoria sobre el procedimiento del estudio, su finalidad, riesgos, beneficios y alternativas.
- ❖ He quedado satisfecho/a con la información recibida, la he comprendido, se me han respondido todas mis dudas y comprendo que mi participación es voluntaria.
- ❖ Doy mi consentimiento para el procedimiento propuesto y conozco mi derecho a retirarlo cuando lo desee, con la única obligación de informar mi decisión al investigador responsable del estudio.

FECHA DD/MM/AAAA	NOMBRES COMPLETOS DEL PARTICIPANTE	N° DE CÉDULA	FIRMA

DATOS DE LA PERSONA QUE REALIZA EL PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN DEL CONSENTIMIENTO INFORMADO

FECHA DD/MM/AAAA	NOMBRES COMPLETOS DEL RESPONSABLE Y FUNCIÓN	N° DE CÉDULA	FIRMA

Título del Estudio: Caracterización molecular del gen F9 relacionado con la Hemofilia tipo B en sujetos de una familia ecuatoriana

Investigador Principal: Angie Gabriela Morán Erazo

Versión N. º: 1