



**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**DISERTACIÓN PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE BIOQUÍMICA  
CLÍNICA**

**Identificación de mutaciones en el exón 14 del gen *F8* de presuntas portadoras de  
hemofilia A en tres ciudades del Ecuador, 2015.**

**JENNY MARISOL LEMA HERMOSA**

**KARLA ALEJANDRA RISUEÑO BENÍTEZ**

**DIRECTORA: MSc. Rosa de los Ángeles Bayas-Rea**

**QUITO, 2016**

## DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, JENNY MARISOL LEMA HERMOSA, C.I. 1721071254, autora del trabajo de graduación intitulado: “IDENTIFICACIÓN DE MUTACIONES EN EL EXÓN 14 DEL GEN *F8* DE PRESUNTAS PORTADORAS DE HEMOFILIA A EN TRES CIUDADES DEL ECUADOR, 2015”, previa a la obtención del grado académico de BIOQUÍMICA CLÍNICA en la Facultad de Medicina:

1. Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos del autor.
2. Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través del sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la Universidad.

Quito, 7 de noviembre del 2016



Srta. Jenny Marisol Lema Hermosa

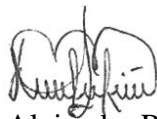
C.I. 1721071254

## DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, KARLA ALEJANDRA RISUEÑO BENÍTEZ, C.I. 1720733771, autora del trabajo de graduación intitulado: “IDENTIFICACIÓN DE MUTACIONES EN EL EXÓN 14 DEL GEN *F8* DE PRESUNTAS PORTADORAS DE HEMOFILIA A EN TRES CIUDADES DEL ECUADOR, 2015”, previa a la obtención del grado académico de BIOQUÍMICA CLÍNICA en la Facultad de Medicina:

1. Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos del autor.
2. Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través del sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la Universidad.

Quito, 7 de noviembre del 2016



Srta. Karla Alejandra Risueño Benítez

C.I. 1720733771

## CERTIFICACIÓN

Certifico que la Disertación de Bioquímica Clínica de las Srtas. Jenny Marisol Lema Hermosa y Karla Alejandra Risueño Benítez sobre el tema “Identificación de mutaciones en el exón 14 del gen *F8* de presuntas portadoras de hemofilia A en tres ciudades del Ecuador, 2015” ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas, por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.



Rosa de los Ángeles Bayas-Rea, MSc.

Directora de la Disertación

Quito, 7 de noviembre del 2016

## **DEDICATORIA**

Dedico la presente disertación a mis respetados profesores, quienes con su sabiduría, tolerancia, experiencia y empatía me motivaron e indujeron en el conocimiento para el cuidado y conservación de la salud de las personas.

Jenny Marisol Lema Hermosa

## **AGRADECIMIENTO**

Numerosas son las personas que han contribuido en mi formación tanto personal como profesional hasta culminarla siempre con sus palabras justas y oportunas en todo momento.

Primeramente, agradezco a Dios por protegerme y bendecirme en todo el transcurso de mi vida. A mi familia, en particular a mi papá, mi mamá y mis hermanos. Especialmente, agradezco a mi hijo quien ha sido mi constante motivación e inspiración para superarme en todos los aspectos de mi vida.

Agradezco a la profesora Marcela Mardones, Directora del proyecto de investigación “Detección de portadoras de hemofilia por biología molecular”, por haberme elegido y brindado un voto de confianza al darme la oportunidad de participar en el mencionado proyecto.

Un agradecimiento cariñoso para Rosa de los Ángeles Bayas-Rea quien dedicó su tiempo, paciencia, sobre todo su apoyo antes, durante y después de presente trabajo.

Asimismo quiero agradecer al Dr. Rommel Montúfar por su apoyo y brindar las facilidades para realizar la parte práctica del presente estudio en el Laboratorio de Ecología y Genética de la Escuela de Ciencias Biológicas.

Finalmente, muchas gracias a las pacientes de las ciudades de Quito, Ambato, Guayaquil y Chone que pertenecen a la FUNDHEC por formar parte del presente trabajo.

Jenny Marisol Lema Hermosa

## TABLA DE CONTENIDOS

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN.....	ii
CERTIFICACIÓN.....	iv
DEDICATORIA.....	v
AGRADECIMIENTOS.....	vi
TABLA DE CONTENIDOS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE ANEXOS.....	xi
RESUMEN.....	xii
ABSTRACT.....	xiv
CAPÍTULO I	
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Justificación.....	1
1.2 Planteamiento del problema.....	4
1.3 Objetivos.....	6
1.3.1. Objetivo general.....	6
1.3.2. Objetivos específicos.....	6
CAPÍTULO II	
2. MARCO TEÓRICO Y CONCEPTUAL.....	7
2.1. Antecedentes.....	7
2.2. MARCO TEÓRICO.....	8
2.2.1. Hemofilia A.....	8
2.2.1.1. Generalidades.....	8

2.2.1.2. Manifestaciones clínicas.....	9
2.2.1.3. Portadoras de hemofilia A.....	10
2.2.2. El gen <i>F8</i> .....	11
2.2.2.1. Tipos de mutaciones a lo largo del gen <i>F8</i> .....	12
2.2.3. El factor de coagulación VIII .....	14
2.2.3.1. Cascada de la coagulación .....	15
2.2.4. Diagnóstico de portadoras de hemofilia A .....	17
2.2.5. Diagnóstico molecular .....	18
2.2.5.1. <i>Southern blot</i> .....	18
2.2.5.2. Reacción en cadena de la polimerasa .....	19
2.2.5.3. Secuenciación .....	20
2.3. MARCO CONCEPTUAL.....	21
 CAPÍTULO III	
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
3.1. Tipo de estudio .....	24
3.2. Tipo de muestreo .....	24
3.3. Tamaño de la muestra .....	24
3.4. Criterios que sustentan la elección de la población y la muestra.....	25
3.4.1. Criterios de inclusión .....	25
3.4.2. Criterios de exclusión .....	25
3.5. Operacionalización de las variables .....	25
3.5.1. Variable dependiente .....	25
3.5.2. Variable independiente .....	25
3.6. Materiales y reactivos .....	27

3.6.1. Materiales .....	27
3.6.2. Reactivos .....	28
3.7. Métodos .....	29
3.7.1. Fase uno .....	29
3.7.2. Fase dos .....	29
3.7.3. Fase tres .....	30
3.8. Control de calidad .....	31
3.9. Amplificación del exón 14 .....	31
3.10. Identificación de las secuencias .....	32
 CAPÍTULO IV	
4. RESULTADOS .....	34
4.1. Control de calidad de las muestras de ADN .....	34
4.2. Amplificación de tres fragmentos del exón 14 .....	35
4.3. Identificación de las secuencias .....	37
 CAPÍTULO V	
5. DISCUSIÓN .....	41
5.1. CONCLUSIONES .....	47
5.2. RECOMENDACIONES .....	48
6. REFERENCIAS .....	49
7. ANEXOS .....	66

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Productos de PCR del gen parcial de la $\beta$ -globina de posibles portadoras de hemofilia A de tres ciudades .....	34
Figura 2.	Producto de PCR del fragmento A del exón 14 de posibles portadoras de hemofilia A de tres ciudades .....	35
Figura 3.	Producto de PCR del fragmento B del exón 14 de posibles portadoras de hemofilia A de tres ciudades .....	36
Figura 4.	Producto de PCR del fragmento C del exón 14 de posibles portadoras de hemofilia de tres ciudades .....	36
Figura 5.	Representación de la alineación de los tres fragmentos del exón 14...	37

## LISTA DE ANEXOS

Anexo 1.	Formulario de consentimiento.....	66
Anexo 2.	Formato de la encuesta .....	68
Anexo 3.	Protocolo de toma de muestra de sangre de posibles portadoras de hemofilia.....	70
Anexo 4.	Almacenamiento y transporte de las muestras.....	72

## RESUMEN

**Introducción:** La hemofilia A es uno de los trastornos hemorrágicos más comunes a nivel mundial. Aunque esta enfermedad está presente en el Ecuador, no se cuenta con datos estadísticos ni moleculares de posibles portadoras de la enfermedad. La hemofilia A se caracteriza por la presencia de hemorragias espontáneas o prolongadas debido a la deficiencia del factor de coagulación VIII, causada por mutaciones en el gen que lo codifica. Las mutaciones de mayor importancia son las inversiones de los intrones 1 o 22 aunque también se mencionan a las mutaciones puntuales que ocurren en varias regiones del gen *F8*. En particular, las mutaciones de mayor relevancia se encuentran en el exón 14, región más grande del gen.

**Objetivo:** El objetivo del presente estudio fue identificar las principales mutaciones presentes en el exón 14 mediante secuenciación a partir de muestras provenientes de mujeres reconocidas como presuntas portadoras de hemofilia A de tres ciudades del Ecuador, 2015.

**Materiales y Métodos:** En el presente estudio se incluyó veintitrés muestras de ADN de posibles portadoras de hemofilia A que fueron negativas para la presencia de las inversiones de los intrones 1 y 22. Las muestras de ADN fueron de tres ciudades, Quito (n = 13), Ambato (n = 6) y Guayaquil (n = 4). Para comprobar la viabilidad de las muestras se amplificó como control el gen parcial de la  $\beta$ -globina humana. Por otro lado, se amplificó tres fragmentos del exón 14 para la detección de las mutaciones mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés). Los productos de PCR obtenidos fueron enviados a MacroGen para su purificación y secuenciación. Las secuencias obtenidas fueron editadas y limpiadas para obtener una secuencia consenso, la misma que se la comparó mediante BLAST con secuencias disponibles en el *GenBank*.

**Resultados:** Todas las muestras de ADN de presuntas portadoras de hemofilia A amplificaron un producto de alrededor 100 pb que corresponden al gen parcial de la  $\beta$ -globina humana. De las veintitrés muestras, veinte amplificaron para el fragmento A, diecisiete para el fragmento B y veintidós para el fragmento C del exón 14 con un producto de PCR de alrededor 1 200 pb, 600 pb y 1 000 pb, respectivamente. Todas las secuencias concetos de los tres fragmentos del exón 14 fueron similares en un 100% con la secuencia de referencia (número de acceso *GenBank* NG\_011403.1), demostrando que no hay variaciones.

**Conclusión:** De acuerdo a los resultados obtenidos, las muestras que amplificaron para los diferentes fragmentos del exón 14 de las presuntas portadoras de hemofilia A no presentaron mutaciones. Sin embargo, esto no descarta la condición de posibles portadoras debido a que pueden tener mutaciones en otras regiones del gen, influyendo en diferentes grados en la severidad de la enfermedad. Por otro lado, la ausencia de mutaciones puede deberse también a la presencia de otra enfermedad relacionada con la deficiencia del FVIII como es la enfermedad de von Willebrand. Por lo que es importante secuenciar todo el gen para dar un diagnóstico definitivo, así como realizar pruebas previas para descartar la presencia de la enfermedad de von Willebrand.

**Palabras claves:** Hemofilia A, factor de coagulación FVIII, mutaciones, exón 14, secuenciación.

## ABSTRACT

**Introduction:** Hemophilia A is one of the most common hemorrhagic disorders worldwide. Although this disease is present in Ecuador, it has no statistic and molecular data about the possible carriers of the disease. Hemophilia A is characterized by the presence of spontaneous or prolonged bleeding due to deficiency of coagulation factor VIII protein that is caused by mutations in the gene encoding it. The most important mutations are inversions of the introns 1 and 22 although point mutations have been documented in several regions of the *F8* gene. In particular, the mutations found in the exon 14, which is the largest region of the gene.

**Objective:** The aim of this study was to identify the main mutations present in exon 14 by sequencing from samples of women who have been recognized as carriers of hemophilia A in three cities from Ecuador, 2015.

**Materials and Methods:** In the present study, twenty-three DNA samples of possible carriers of hemophilia A were included. Those samples were negative for the presence of inversions of introns 1 and 22. The DNA samples were from three cities, Quito (n = 13), Ambato (n = 6), and Guayaquil (n = 4). To check the viability of the samples, the partial human  $\beta$ -globin gene was amplified as a control. On the other hand, three fragments of the exon 14 were amplified to detect the mutations by polymerase chain reaction (PCR). The PCR products obtained were sent to Macrogen for its purification and sequencing. The sequences were edited and cleaned to obtain a consensus sequence, which was compared by BLAST with sequences available in GenBank.

**Results:** All DNA samples from suspected carriers of hemophilia A amplified a 100 bp product for partial human  $\beta$ -globin gene. Of twenty three samples, twenty samples amplified

the fragment A, seventeen for fragment B, and twenty two for fragment C of exon 14 with a PCR product around 1,200 bp, 600 bp, and 1,000 bp, respectively. All consensus sequences of the three fragments of exon 14 were similar to 100% with the reference sequence (GenBank accession number NG\_011403.1), demonstrating that there are no variations.

**Conclusion:** According to the results obtained, the samples that amplified for the three fragments of the exon 14 of possible carriers of hemophilia A did not present mutations. However, this does not discard the condition of possible carriers of hemophilia A due to they may have mutations in other regions of the gene, which may be influencing in different degrees on the severity of the disease. On the other hand, the absence of mutations may be due to the presence of other disease related with factor VIII deficiency, as is the Von Willebrand disease. For that reason, it is important sequence all the *F8* gene to give a definitive diagnosis as well as perform previous test for discard the presence of von Willebrand disease.

**Keywords:** Hemophilia A, coagulation factor VIII, mutations, exon 14, sequencing.

# CAPÍTULO I

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. JUSTIFICACIÓN

Las mutaciones son la fuente principal de variación genética, la misma que puede influir en las características fenotípicas (Audesirk, Audesirk, y Byers, 2013; Solari, 2011), causando enfermedades y trastornos como la hemofilia A (Pierce, 2016). La hemofilia A es considerada como uno de los trastornos hemorrágicos más comunes a nivel mundial, afectando a uno de cada 15 000 habitantes (Organización Mundial de la Salud [OMS], 2012). Esta enfermedad ligada al cromosoma X se caracteriza por hemorragias espontáneas o prolongadas debido a la deficiencia del factor de coagulación VIII (FVIII) (Castillo-González, 2012; Liras, 2015). La deficiencia o disfunción del FVIII se debe principalmente a la presencia de mutaciones importantes a lo largo del gen *F8* (Faridi, Kumar, Husain, y Siddiqi, 2014). Las mutaciones más relevantes son las inversiones de los intrones 1 o 22 aunque también las mutaciones puntuales se relacionan con la enfermedad; por ejemplo, las mutaciones que aparecen en el exón 14 (Faridi et al., 2014; Onori, Hosseinpour, y Hosseinpour, 2011; Onori, Hosseinpour, y Hosseinpour, 2014; Shekari, Ebrahimi, Daraei, y Mansoori, 2016).

Según el Ministerio de Salud Pública [MSP] (2013), la hemofilia A está presente en el Ecuador pero no se cuenta con datos estadísticos exactos y reales que indiquen la situación actual de la enfermedad en el país. Por lo que es necesario tener una línea de diagnóstico fiable. Entre las técnicas de diagnóstico se cuenta con métodos coagulométricos que depende de la deficiencia del factor y manifestaciones clínicas en base a signos y síntomas detectadas

por la presencia de sangrados (Federación Mundial de la Hemofilia [FMH], 2012; Liras, 2015). Sin embargo, estas metodologías no aportan con información suficiente para diagnosticar a mujeres portadoras de la enfermedad (FMH, 2012). Para un diagnóstico definitivo se utiliza diferentes métodos moleculares (Lavaut, 2014; Poggi et al., 2011), técnicas que aún no han sido empleadas en el país. De ahí, la necesidad de diagnosticar a posibles portadoras de hemofilia A en base al secuenciamiento de tres partes del exón 14; en particular, a aquellas portadoras que resulten negativas para pruebas preliminares que determinan la presencia de la inversión en los intrones 1 o 22.

En muchos casos, el diagnóstico de la enfermedad solo se llega a determinar en base a los niveles de FVIII y pruebas genéticas mediante el análisis de mutaciones (FMH, 2012; Konkle, Josephson, y Nakaya, 2014; Lavaut, 2014), en particular, la presencia de las inversiones 1 o 22 (Konkle et al., 2014; Lavaut, 2014; Poggi et al., 2011). Sin embargo, otras mutaciones que ocurren a lo largo del gen *F8* también están relacionadas con los diferentes niveles de severidad de la enfermedad (Al-Allaf et al., 2016; Konkle et al., 2014; Onori et al., 2014). Por lo tanto es importante realizar una revisión más amplia de las mutaciones asociadas con la hemofilia A. Muchas de estas mutaciones son puntuales y pueden generar un codón de terminación (Al-Allaf et al., 2016; Onori et al., 2011; Onori et al., 2014), originando una proteína truncada. De los estudios relacionados con el secuenciamiento del gen *F8*, el mayor número de mutaciones se ha encontrado en el exón 14 (Elmahmoudi et al., 2012; Moses, Ling, Al-Hassan, Karim, y Yussoff, 2012; Onori et al., 2011; Rosset et al., 2013; Shekari et al., 2016; Venceslá, 2010), la región más grande del gen *F8* (Faridi et al., 2014; Ferreira, Corrêa, y Meireles, 2009). Por lo mencionado anteriormente es indispensable un análisis de las mutaciones que puedan estar presentes en el exón 14.

En el país, hasta el momento no se ha reportado estudios moleculares relacionados con la detección de portadoras; en particular, con las mutaciones del exón 14. Por lo tanto, los resultados obtenidos del presente estudio aportarán con información nueva sobre la presencia de mutaciones del exón 14 de portadoras de hemofilia A en el país. Adicionalmente, debido a que es un estudio que no se ha realizado en el país posiblemente se encuentren mutaciones propias de la región que no han sido reportadas aún en la base de datos internacional de la hemofilia A, *Factor VIII Variant Database*. Esta información es importante para identificar regiones claves involucradas con la funcionalidad del gen *F8* y relacionarla con el nivel de severidad de la hemofilia A en el país. Por otro lado, también hay la posibilidad de que no se encuentren mutaciones debido a que se analiza una región específica del gen. Esta información es relevante porque la ausencia de mutaciones puede estar relacionada con otra enfermedad asociada con la deficiencia del FVIII como es la enfermedad de von Willebrand (Morales-De la Vega, Reyes-Maldonado, Martínez-Murillo, y Quintana-González, 2008; Schulman, 2012; van Meegeren et al., 2015). La información molecular es fundamental para corroborar la presencia de la enfermedad y relacionarla con algún nivel de severidad con el fin de dar un tratamiento adecuado.

Finalmente, la información del presente trabajo será importante para autoridades gubernamentales, personal de salud y población en general debido a que los resultados se entregarán a la Fundación de Hemofilia del Ecuador (FUNDHEC). En el caso de encontrar mutaciones, la fundación podrá brindar un asesoramiento genético y tratamiento adecuado a las posibles portadoras de hemofilia A. Por otro lado, si no se encuentran mutaciones la FUNDHEC deberá buscar grupos de apoyo para ampliar la investigación analizando otras regiones importantes o todo el gen. Esto es primordial para minimizar el impacto en la salud, mejorando la calidad de vida de las posibles portadoras de hemofilia A.

## 1.2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La hemofilia A, enfermedad hemorrágica hereditaria que se encuentra ligada al cromosoma X, es causada por mutaciones en el gen del factor de coagulación VIII (Faridi et al., 2014; FMH, 2012; Mazurkiewicz-Pisarek, Plucienniczak, Ciach, y Plucienniczak, 2016). A pesar de ser una enfermedad que se manifiesta solamente en hombres, las mujeres por presentar dos cromosomas X son portadoras de este trastorno, generalmente son asintomáticas (FMH, 2012; Mazurkiewicz-Pisarek et al., 2016). La prevalencia de hemofilia A es baja y varía dependiendo de cada país (Schulman, 2012; Stonebraker, Bolton-Maggs, Soucie, Walker, y Brooker, 2010). En hombres, la prevalencia de hemofilia A se estima que es de 1 en 10 000 casos (García-Chávez y Majluf-Cruz, 2013). En Ecuador, no se cuenta con datos actuales de prevalencia de hemofilia A, en particular; sin embargo, se estima que alrededor de entre 114 a 604 personas presentan la enfermedad (FMH, 2015; MSP, 2013).

El FVIII es codificado por el gen *F8* que se caracteriza por tener una alta tasa de mutación, generando variaciones a nivel de la secuencia, afectando la estructura y función de la proteína (Al-Allfard et al., 2016; Faridi et al., 2014; Nair, Shetty, Chandrakala, y Ghosh, 2014; Venceslá, 2010). Los cambios estructurales son consecuencia de grandes inversiones y de las pequeñas variaciones en la secuencia (Faridi et al., 2014; Nair et al., 2014). Todas las mutaciones desde las grandes inversiones hasta las mutaciones puntuales han sido relacionadas con algún nivel de severidad de la hemofilia A (Hwang, Lim, Kim, Lee, y Kim, 2011; Nair et al., 2014). En especial, las mutaciones puntuales *missense* han sido asociadas con la hemofilia A moderada (Onsori et al., 2014; Qiao et al., 2013; Santacrose et al., 2014); mientras que, las grandes inversiones se han relacionado con la hemofilia A severa (Faridi et al., 2014; Santacrose et al., 2014). Hasta el momento, se reporta

que hay más de 1 000 mutaciones, algunas de ellas presentes en altas frecuencias; mientras que, otras solo se presentan en un único individuo (*Factor VIII Variant Database*, 2015).

Aunque la hemofilia A es uno de los trastornos más estudiados a nivel molecular, en el Ecuador no se ha realizado este tipo de estudios. Las investigaciones relacionadas con la hemofilia se han centrado en factores sociológicos (Taco, 2012), del impacto en la calidad de vida de quienes la padecen (Vintimilla, 2013); así como, en el desempeño educativo, laboral (Mazabanda, 2013) y manejo dental (Cabello, 2013). Además, la información de la enfermedad ha sido dirigida principalmente a los hombres, en menor proporción a las mujeres (FMH, 2012). Tanto en aspectos de diagnóstico como pruebas clínicas, la detección de portadoras se ha limitado a pruebas coagulométricas y manifestaciones clínicas evidenciadas en procedimientos dentales, quirúrgicos y golpes (Konkle et al., 2013). A nivel de pruebas coagulométricas se realiza la medición del tiempo parcial de tromboplastina (TTP, por su sigla en inglés) y cuantificación del FVIII (Konkle et al., 2013; Liras, 2015; Mansouritorghabeh, 2015); sin embargo, en el país no se realiza una prueba molecular para un diagnóstico confirmatorio.

Para llegar a un verdadero diagnóstico es indispensable recurrir a técnicas de biología molecular que confirman si una mujer es portadora o no de hemofilia A. A nivel mundial, la detección de esta enfermedad se basa en el análisis de las inversiones de los intrones 1 y 22; así como, de un tamizaje de las posibles variaciones en todo el gen que codifica el FVIII (Nair et al., 2014; Piloto-Roque, Acanda, Cerveral, y Collazo-Mesa, 2010; You et al., 2010). De los 26 exones del gen *F8*, uno de los de mayor importancia es el exón 14 (Moses et al., 2012; You et al., 2010). Este exón se caracteriza porque presenta tres sitios recurrentes de mutaciones que son responsables principalmente del desplazamiento de marco de lectura (Nakaya, Liang, y Thompson, 2001). Por lo que, estas mutaciones pueden alterar o anular la

funcionalidad de la proteína FVIII, generando los diversos estadios de la enfermedad (Moses et al., 2012). Es así que, las mutaciones puntuales como inserciones o deleciones han sido asociadas con hemofilia A severa o moderada (Moses et al., 2012; Onsoni et al., 2011; Onsoni, et al., 2014) y muchas de ellas son registros nuevos (Moses et al., 2012; Onsoni et al., 2011).

Por todo lo mencionado anteriormente, el presente estudio respondió la siguiente pregunta de investigación: ¿Cuáles son las principales mutaciones en el exón 14 en mujeres reconocidas como presuntas portadoras de hemofilia A de tres ciudades del Ecuador, 2015?

### **1.3. OBJETIVOS**

#### **1.3.1. OBJETIVO GENERAL**

Identificar las principales mutaciones presentes en el exón 14 mediante secuenciación de muestras de posibles portadoras de hemofilia A de tres ciudades del Ecuador, 2015.

#### **1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Describir el tipo de mutaciones presentes en el exón 14 del gen *F8* de presuntas portadoras de hemofilia A mediante el análisis de secuencias.
- Determinar el porcentaje de cada tipo de mutaciones presentes en el exón 14 del gen que codifica el FVIII en portadoras de hemofilia A por medio de estadística descriptiva.
- Analizar las mutaciones del exón 14 del gen *F8* que afectan principalmente al marco de lectura y relacionarlas con la enfermedad.
- Identificar mutaciones nuevas del exón 14 comparándolas con aquellas reportadas en la base de datos internacional de la hemofilia A.

## CAPÍTULO II

### 2. MARCO TEÓRICO Y CONCEPTUAL

#### 2.1. ANTECEDENTES

A nivel mundial, los estudios de la hemofilia A se han centrado en la identificación de las mutaciones de todo el gen que codifica el FVIII (Elmahmoudi et al., 2012; Nair et al., 2014; Santacroce et al., 2014). Las mutaciones pueden afectar estructuralmente a la proteína, entre las mutaciones de mayor importancia se encuentran los grandes rearrreglos y mutaciones puntuales (Faridi et al., 2014; Nair et al., 2014). Las mutaciones puntuales se estima en un 46% de los casos, rearrreglos (inversiones) en 42%, deleciones en 8% y mutaciones no identificadas apenas en un 4% (García-Chávez y Majluf-Cruz, 2013). Para el análisis de mutaciones puntuales se ha secuenciado todo el gen (Nair et al., 2014; Rosset et al., 2013; Venceslá, 2010); sin embargo, la mayoría de las mutaciones se han encontrado en el exón 14 (Elmahmoudi et al., 2012; Moses et al., 2012; Onsori et al., 2011; Rosset et al., 2013; Santacroce et al., 2008; Shekari et al., 2016; Venceslá, 2010). Entre las mutaciones de importancia que se han registrado, la mayoría de ellas son nuevas y causan un desplazamiento del marco de lectura generando un codón de terminación (Al-Allaf et al., 2016; Awidi et al., 2010; Onsori et al., 2011). Este tipo de codones afectan principalmente a la traducción de proteínas causando que el proceso termine anticipadamente y como resultado se obtiene una proteína truncada disfuncional (Nair et al., 2014; Onsori et al., 2011), generando cambios cualitativos y cuantitativos del FVIII (Moses et al., 2012). En el Ecuador, no existen estudios relacionados con la identificación a nivel molecular de mutaciones relacionadas con hemofilia. Los estudios están relacionados con aspectos sociológicos (Taco, 2012), el impacto en la calidad de vida de quienes la padecen

(Vintimilla, 2013), el desempeño educativo, laboral (Mazabanda, 2013), manejo dental (Cabello, 2013; Parra, 2015) o de la presencia de inhibidores (Guerrero, 2016).

## **2.2. MARCO TEÓRICO**

### **2.2.1. Hemofilia A**

#### **2.2.1.1. Generalidades**

La hemofilia es un trastorno hemorrágico que se presenta en bajos porcentajes en la población mundial (OMS, 2012; Stonebraker et al., 2010). Esta enfermedad hereditaria es causada por una deficiencia total o parcial de los factores de coagulación, proteínas que controlan el sangrado (FMH, 2012). De acuerdo a la deficiencia de los factores de coagulación, este trastorno hemorrágico se clasifica en dos tipos, A y B, (Fundación de la hemofilia [FH], 2011; FMH, 2012; Liras, 2015). La hemofilia A o “enfermedad de los reyes” ocurre cuando el defecto se encuentra en el gen que codifica el FVIII; mientras que, la del tipo B o “enfermedad de *Christmas*” es generada por la alteración a nivel del gen codificante del factor IX (FIX) (FMH, 2012). De los dos tipos de hemofilia, la del tipo A es la más frecuente, representando entre el 80 y 85% de la población total de personas con este trastorno (Federación Española de Hemofilia [FEDHEMO], 2014). La prevalencia mundial de hemofilia varía entre países y años (Schulman, 2012; Stonebraker et al., 2010); sin embargo, se estima que es de 1 en 10 000 casos en hombres y se desconoce la cantidad en mujeres (García-Chávez y Majluf-Cruz, 2013). De acuerdo a la Federación Mundial de Hemofilia, un estimado de aproximadamente 400 000 personas presentarían hemofilia (FMH, 2015). En el Ecuador, según el MSP se han registrado 604 pacientes con hemofilia tanto A como B hasta el 2013 (MSP, 2013); sin embargo, esta cifra varió a 114 personas que presentan la enfermedad para el 2014 (FMH, 2015). En el país, no hay datos exactos del

número de personas con hemofilia, en particular, no existen datos epidemiológicos sobre portadoras.

### **2.2.1.2. Manifestaciones clínicas**

Las manifestaciones clínicas ocurren debido a la presencia de mutaciones a lo largo del gen que codifica el FVIII. Las mutaciones o cambios pueden ser puntuales hasta grandes rearrreglos (Faridi et al., 2014; Nair et al., 2014), los cuales afectarán en distintos niveles la funcionalidad o actividad de la proteína, generando las diferentes manifestaciones clínicas de la enfermedad (Kasper, 2008; Nair et al., 2014; Mansouritorghabeh, 2015). Por lo que, las etapas del diagnóstico y la frecuencia con la que se presentan los episodios de sangrado se relacionan con el nivel de actividad del FVIII (FH, 2011). De acuerdo a los niveles del FVIII en la sangre, la enfermedad se clasifica en leve (5%-40%), moderada (1%-5%) o severa (menor al 1%) (FEDHEMO, 2014; FH, 2011; FMH, 2012; Konkle et al., 2014).

La principal manifestación de la hemofilia es la aparición de hemorragias tanto internas como externas, ya sean provocadas o espontáneas, dependiendo de la gravedad de la enfermedad (FMH, 2012; Liras, 2015). Los pacientes que presentan hemofilia leve sufren de hemorragias por cirugías o lesiones graves sin terminar en un problema de sangrado; no obstante, sin un tratamiento pre y post-operatorio tanto en cirugías menores como mayores existen sangrados anormales presentando un diagnóstico tardío (FH, 2011; FMH, 2012). En la hemofilia moderada, las personas que la padecen presentan hemorragias con menos frecuencia después de cualquier procedimiento médico o sin un motivo específico, caracterizándose por la presencia de sangrados prolongados que pueden ser una vez al mes, al año (FEDHEMO, 2012; Konkle et al., 2014) o cada diez años (FEDHEMO, 2012). Finalmente, las personas con hemofilia severa tienen hemorragias frecuentes en músculos o

articulaciones una o dos veces por semana sin una causa aparente. La hemofilia severa puede ser diagnosticada alrededor de los dos primeros años de vida, la misma que se caracteriza con la presencia de dos a cinco episodios hemorrágicos espontáneos cada mes (Konkle et al., 2014; Molina, Chaverri, y Wong, 2014). Las hemorragias consecutivas pueden generar destrucción articular dando resultado una inflamación acompañada de dolor (FMH, 2012). El desgaste produce la restricción de su funcionalidad por el deterioro de huesos, articulaciones que afecta principalmente a nivel de la rodilla, codos, tobillos y en menor frecuencia en hombros, cadera y muñecas (Amador-Medina y Vargas-Ruiz, 2013; Kasper, 2008; Molina et al., 2014). Además, los ojos, riñones, aparato digestivo y genitales pueden verse afectados (FEDHEMO, 2012).

### **2.2.1.3. Portadoras de hemofilia A**

La hemofilia, enfermedad ligada al sexo, es heredada de generación en generación por un gen alterado presente en el cromosoma X (García-Chávez y Majluf-Cruz, 2013; Liras, 2015). Por otro lado, la transmisión de la enfermedad es recesiva ya que pueden existir saltos de generación presentándose mujeres o varones sanos por la recesión de genes (cromosoma X) que pueden aparecer en otra generación posterior (FMH, 2012; Liras, 2015). Los hombres por su dotación XY son quienes padecen de esta enfermedad y pueden transmitir la variante del gen a todas sus hijas y a ninguno de sus hijos (FEDHEMO, 2014; Konkle et al., 2013). Mientras que, las mujeres por su dotación XX son las responsables de transmitir la enfermedad (Liras, 2015) debido a que tienen un 50% de probabilidades de transmitir la variante del gen alterado en cada embarazo (Ferreira et al., 2009; Konkle et al., 2013; Mazurkiewicz-Pisarek et al., 2016). Por lo tanto, una mujer portadora es aquella que hereda una copia del gen alterado de su madre o padre (FEDHEMO, 2014); como resultado, las mujeres portadoras pueden tener hijos e hijas que heredan la variante del gen (FMH, 2012).

Las portadoras de hemofilia pueden ser obligadas o probables. Las portadoras obligadas son todas las hijas de un padre con hemofilia, madres de un hijo con hemofilia, algún familiar que padece de esta enfermedad o que es portadora conocida como una madre, hermana, abuela materna, tía, sobrina o prima y madres de dos o más hijos con esta enfermedad (Lavaut, 2014). Mientras que, las portadoras probables son todas las hijas de una portadora, madres de un hijo enfermo que no tiene familiares con hemofilia, hermanas, madres, abuelas maternas, tías, sobrinas y primas portadoras (Amador-Medina y Vargas-Ruiz, 2013, 2013; FMH, 2012; Lavaut, 2014). Aproximadamente, el 10% de las mujeres portadoras están en riesgo de sangrado, por tanto son portadoras sintomáticas (FMH, 2012; Konkle et al., 2014). Independientemente de la gravedad de esta enfermedad se pueden producir traumatismos importantes (FEDHEMO, 2014).

### **2.2.2. El gen *F8***

El gen que codifica al FVIII es uno de los más grandes y se localiza en la región Xq28 a 1,5 Mb en la porción telomérica distal del brazo largo del cromosoma X (Faridi et al., 2014; Mazurkiewicz-Pisarek et al., 2016). El gen *F8* tiene una longitud de 186 Kb y consta de 26 exones que varían en el tamaño, van desde 69 pb (exón 5) hasta 3,1 Kb (exón 14). Su ARN mensajero está constituido de 9 Kb, el mismo que se traduce en un producto proteico de 2 351 aminoácidos (Sibinga, Das, y Mannucci, 2012). En el producto proteico se diferencia un péptido de señal de 19 aminoácidos y una proteína madura de 2 332 aminoácidos (Castillo-González, 2012; Mazurkiewicz-Pisarek et al., 2016). El gen se caracteriza porque tiene dos regiones, *F8A* y *F8B*, en el intrón 22, el mismo que actúa como promotor bidireccional (Castillo-González, 2012; Mazurkiewicz-Pisarek et al., 2016). Las regiones *F8A* y *F8B* se transcriben en sentido opuesto y en la misma dirección con respecto a la transcripción del gen *F8*, respectivamente (Mazurkiewicz-Pisarek et al., 2016).

De los 26 exones, el exón 14 es la región codificante más grande, 3,1 Kb, del gen del *F8* (Faridi et al., 2014). El exón se encuentra ubicado en la parte central del mencionado gen (Awidi et al., 2010) y codifica el dominio B del FVIII, el mismo que está entre 741 y 1 648 aminoácidos (Castillo-González, 2012; Pipe, 2009). El dominio B es responsable de varias funciones como síntesis del FVIII principalmente por los hepatocitos, secreción que se produce por el retículo endoplásmico rugoso y el aparato de Golgi (Mazurkiewicz-Pisarek et al., 2016), activación de la proteína resultado del corte de los conectores entre los dominios a1 y A2, a2 y B, y a3-A3 por medio de la protrombina (Devlin, 2009), la unión con los fosfolípidos plaquetarios para formar el complejo tenasa, la inactivación del factor causada por una disociación espontánea del dominio A2 (Castillo-González, 2012) y el aclaramiento de la molécula completa que se produce por medio de un receptor hepático (Pipe, 2009).

#### **2.2.2.1. Tipos de mutaciones a lo largo del gen *F8***

Las mutaciones que ocurren a lo largo del gen *F8* afectan en su expresión, principalmente a nivel de la estructura y función del FVIII (Al-Allaf et al., 2016; Mazurkiewicz-Pisarek et al., 2016; Nair et al., 2014; Venceslá, 2010) y como resultado se da su deficiencia (Onsori et al., 2014). Esta deficiencia puede ser una disminución de la síntesis de la proteína o una síntesis anormal de la misma, generando desórdenes de sangrado congénitos (Mazurkiewicz-Pisarek et al., 2016), los mismos que se manifiestan en diferentes niveles de severidad de la enfermedad. Las mutaciones a lo largo del gen se clasifican en grandes inversiones (Kasper, 2008; Kemball-Cook y Gomez, 2014), inserciones o deleciones que varía desde 1 pb hasta todo un gen y mutaciones puntuales (Kemball-Cook y Gomez, 2014). Los grandes rearrreglos involucran una inversión; en donde, los de mayor importancia son los que ocurren en los intrones 1 o 22 (Faridi et al., 2014; Mazurkiewicz-Pisarek et al.,

2016; Roozafzay, Kokabee, Zeinali, y Karimipoor, 2013; Santacroce et al., 2014). El 50 % de las inversiones ocurren en el intrón 22; mientras que, el 5 % suceden en el intrón 1 (Faridi et al., 2014; Kemball-Cook y Gomez, 2014; Mazurkiewicz-Pisarek et al., 2016; Piloto-Roque et al., 2010); por lo general, este tipo de mutaciones ocurre en la línea germinal de los hombres (Mazurkiewicz-Pisarek et al., 2016). Al generarse este tipo de inversiones se promueve a la formación de un transcrito primario más corto, generando una proteína truncada que lleva a la expresión de la hemofilia A severa (Faridi et al., 2014; Roozafzay et al., 2013; Santacroce et al., 2014).

Por otro lado, las mutaciones puntuales como duplicaciones, inserciones, deleciones o sustituciones (Nair et al., 2014) pueden generar tres diferentes resultados: i) cambio de un codón por otro (mutación *missense*), ii) introducción de un codón de terminación o iii) defectos en a nivel de *splicing* en el ARN mensajero (Kemball-Cook y Gomez, 2014). Las mutaciones puntuales también pueden ocasionar desplazamiento del marco de lectura (Faridi et al., 2014; Onsori et al., 2011); como resultado, este tipo de mutaciones pueden causar cambios de aminoácidos o una proteína no funcional pequeña (Faridi et al., 2014; Onsori et al., 2014). Las mutaciones relacionados con el desplazamiento del marco de lectura pueden generar una forma severa de la enfermedad (Faridi et al., 2014; Konkle et al., 2014; Onsori et al., 2011). Por otro lado, la hemofilia A moderada es producto de mutaciones *missense* como resultado de deleciones (D'Oiron et al., 2008; Onsori et al., 2014; Qiao, Ren, Ren, y Guo, 2013; Rosset et al., 2013); mientras que, la hemofilia A leve está relacionada con variaciones intrónicas serias y mutaciones en la región promotora del FVIII (Konkle et al., 2014; Schulman, 2012). Aproximadamente, el 40% de las mutaciones puntuales son transiciones de dinucleótidos CG a CT o CA que son hipermutables como resultado de una desaminación de la 5-metil citosina (Castillo- González, 2012).

El exón 14 debido a su gran tamaño presenta varias mutaciones que han sido encontradas tanto en pacientes hemofílicos como en portadoras de hemofilia A (Santacroce et al., 2008). En el exón existen tres sitios recurrentes de mutaciones de cambio en las secuencias normales de seis a nueve (A6 a A9). Este exón contiene una secuencia de codones A9 ( $1191 \pm 1194$ ), una secuencia de codones A7 ( $1,269 \pm 1,271$ ) y cuatro sitios de secuencia A6. Dos de ellos han sido asociados con la expresión de la hemofilia A moderadamente grave (Nakaya et al., 2001). Entre las mutaciones que se han reportado en este exón se menciona a las mutaciones *nonsense*, *missense* y *splice-site*, promovidas por deleciones o inserciones (Awidi et al., 2010; Faridi et al., 2014; Rosset et al., 2013; Santacroce et al., 2008). En particular, las mutaciones *nonsense* generan codones de terminación, promoviendo la terminación prematura de la proteína (Faridi et al., 2014).

### **2.2.3. El factor de coagulación VIII**

El FVIII, glicoproteína heterodimérica, es codificado por el gen *F8* que se expresa en diferentes líneas celulares (Castillo-González, 2012). Sin embargo, el factor es sintetizado principalmente en los hepatocitos (Haberichter y Montgomery, 2012; Mazurkiewicz-Pisarek et al., 2016; Terraube, O'Donnell, y Jenkins, 2010) aunque también se lo ha reportado en tejido linfático, células endoteliales y los riñones (Castillo, Uranga, y Zafra, 2012; Mazurkiewicz-Pisarek et al., 2016).

El FVIII es uno de los factores de coagulación más grande con un peso molecular de 293 kDa, el mismo que se encuentra en forma inactiva en el plasma sanguíneo (Mazurkiewicz-Pisarek et al., 2016). El FVIII consta de dos cadenas polipépticas, una pesada y otra liviana, que están unidas entre sí por un puente dependiente de unión metálico divalente como  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Cu}^{2+}$  (D'Oiron et al., 2008; Passarge, 2010). El FVIII es una

glicoproteína multidominio con estructura de dominio A1-a1-A2-a2-B-a3A3-C1-C2 (D'Oiron et al., 2008; Mazurkiewicz-Pisarek et al., 2016). La cadena pesada se compone de los dominios A1-A2-B con una masa molecular variable, dependiendo de qué dominios estén presentes. Si los dominios A1-A2 están presentes, la cadena pesa entre 90 kDa; mientras que, si están presentes los tres dominios A1-A2-B la cadena es de 220 kDa (Castillo-González, 2012). Por otro lado, la cadena liviana está compuesta por los dominios A3-C1-C2, los mismos que están unidos no covalentemente entre sí (Elmahmoudi et al., 2012). La cadena liviana tiene una masa molecular de 76 kDa (Castillo-González, 2012). Los dominios A presentan aproximadamente un 30% de homología entre sí; además, todos estos dominios presentan una homología con la proteína ceruloplasmina y el factor V (FV). Estos dominios están bordeadas por espaciadores cortos (a1, a2 y a3) que contienen los aminoácidos ácido aspártico y glutámico; motivo por el cual, a estos dominios se los denomina regiones ácidas (Sibinga et al., 2012). El dominio B es el único que se caracteriza por no presentar ninguna homología significativa con otra proteína conocida. Mientras que, los dominios C se encuentran estructuralmente relacionados con el dominio C del factor V (Amador-Medina y Vargas-Ruiz, 2013; Faridi et al., 2014). El dominio A3-C1 presenta una interfaz hidrofóbica, formando una estructura fija y no flexible (Summers et al., 2016).

### **2.2.3.1. Cascada de coagulación**

El mecanismo de coagulación se basa en la teoría de cascada (Walsh, 2012). La cascada de coagulación presenta dos vías diferentes: intrínseca y extrínseca (Gómez, Guerra, Dita, Fernández, y Cabrera, 2011; White, Marder, Schulman, Aird, y Bennett, 2012). La vía intrínseca inicia la coagulación con el daño vascular y la interacción de superficies cargadas negativamente con cuatro proteínas plasmáticas: factor XI (FXI), factor XII (FXII), precalicreína (PK, por sus siglas en inglés) y quinínogeno de alto peso molecular (CAPM).

Por otro lado, la vía extrínseca es iniciada por los factores FVIIa y el factor tisular (Walsh, 2012). Ambas vías de la coagulación activan al factor X (FX) que junto con el factor Va (FVa) convierten a la protrombina en trombina seguido de la formación de un coágulo de fibrina que actúa como proteasa y cofactor enzimático (Castillo et al., 2012). Estas vías no pueden funcionar de manera independiente debido a que todos los factores de coagulación se interrelacionan entre sí (Gálvez y Cortés, 2011). Por otro lado, de acuerdo al actual concepto de coagulación, el proceso consta de tres fases consecutivas: i) fase de iniciación, ii) de amplificación y iii) de propagación (White et al., 2012). En las dos últimas fases participan las plaquetas y la trombina (Gómez et al., 2011).

La cascada de coagulación inicia cuando el FVIII atraviesa la membrana de las plaquetas unido de forma no covalente al factor de von Willebrand (FVW) (D'Oiron et al., 2008). El complejo FVIII-FVW regula la respuesta de las plaquetas y la cascada de coagulación. El FVW es una glicoproteína de gran tamaño presente en el plasma sanguíneo (Haberichter y Montgomery, 2012). Este factor se produce en el endotelio, megacariocitos y tejido conectivo interviniendo en la fase inicial de la hemostasia (Haberichter y Montgomery, 2012; Terraube et al., 2010). La función del FVW es la de proteger al FVIII contra la acción proteolítica de la proteína C reactiva (PCA, por sus siglas en inglés) (D'Oiron et al., 2008; Haberichter y Montgomery, 2012). En el proceso, la coagulación de la proteólisis cercana a la región N-terminal por trombina, traslada un péptido del sitio de unión con el FVW lo cual libera al FVIII (Haberichter y Montgomery, 2012). El FVIII libre actúa como cofactor del FIXa para la activación del factor X (FX) (D'Oiron et al., 2008; Terraube et al., 2010). El FVIII se une con el FIXa y membranas fosfolipídicas para formar el complejo Xasa, el mismo que es el responsable de activar el FX (FXa) (Kaufman, Fay, Popolo, y Ortel, 2012). El FXa se une con el FVa para formar el complejo protrombinasa para generar grandes

cantidades de trombina a partir de protrombina (Camire y Bos, 2010; Kaufman et al., 2012). Mientras que, el dominio C2 posee un sitio de unión para la trombina regulando la proteólisis del FVIII, a su vez este factor activa la plasmina conjuntamente con el FIXa o el FXa produciendo su inactivación por medio de proteína C reactiva. Además puede producirse una inactivación de FVIII debido a que es inestable por la disociación del dominio A2 causada por las degradaciones proteolíticas (Castillo-González, 2012; Kemball-Cook y Gomez, 2014).

#### **2.2.4. Diagnóstico de portadoras de hemofilia A**

Para determinar si una mujer es portadora de hemofilia A existen pruebas convencionales y moleculares (García-Chávez y Majluf-Cruz, 2013; Kasper, 2008). Entre las pruebas convencionales más comunes se encuentran la exploración clínica del paciente y de su familia. Entre las pruebas convencionales más utilizadas se menciona el estudio de antecedentes familiares mediante la elaboración de un árbol genealógico y la valoración del FVIII por métodos coagulométricos (Liras, 2015). En la elaboración de un árbol genealógico se debe tener el historial familiar detallado de al menos tres generaciones para desarrollar un diagrama de pedigrí (García-Chávez y Majluf-Cruz, 2013; Mansouritorghabeh, 2015); por medio de este análisis, se determina si una mujer es portadora de hemofilia A (Lavaut, 2014). Por otro lado, el método coagulométrico mide el nivel del FVIII en el plasma (Kasper, 2008; Liras, 2015). Los dos tipos de pruebas dan información sobre los síntomas del paciente, concentración del FVIII y de grado de transmisión por herencia obtenida del historial familiar. Sin embargo, estas pruebas presentan desventajas debido a que no siempre se tiene una información detallada de los antecedentes de la familia. Por esta razón, un diagnóstico molecular constituye la prueba confirmatoria de la enfermedad (Polania, Narváez y, Groot de Restrepo, 2014).

### **2.2.5. Diagnóstico molecular**

Para la detección de portadoras de hemofilia A se realiza un diagnóstico directo e indirecto (Lavaut, 2014). En el diagnóstico directas se menciona *Southern blot*, la amplificación simultánea mediante PCR y secuenciación (Lavaut, 2014; Margaglione et al., 2008; Poggi et al., 2011). Por otro lado, el diagnóstico indirecto se basa en la construcción de haplotipos utilizando diversos marcadores moleculares polimórficos intra y/o extragénicos sobre todo *short tandem repeats* (STR) que pueden o no estar ligados a una mutación, por lo que, no proporcionan información fiable respecto al tipo de mutación causante de la hemofilia (Lavaut, 2014). Varios miembros de la familia deben ser analizados, el grado de información depende de la heterocigocidad de los marcadores que varía entre las poblaciones, por lo que, los polimorfismos a utilizar son usados en base a informes de estudios poblacionales (Katsanis y Katsanis, 2013).

#### **2.2.5.1. Southern blot**

El *Southern blot* es una técnica de hibridización que consiste en transferir el material genético desde un gel de electroforesis a un soporte sólido como una membrana de nylon o nitrocelulosa (Herráez, 2012; Passarge, 2010). El ADN inmovilizado en la membrana de nylon o nitrocelulosa híbrida con una sonda marcada, cadena complementaria (Green y Sambrook, 2012; Herráez, 2012), la misma que es revelada mediante autoradiografía (Herráez, 2012). El *Southern blot* es uno de los métodos de referencia para la determinación de la inversión del intrón 22; sin embargo, la técnica se demora de 8 a 10 días en tener resultados (Rossetti, Radic, Abelleiro, Larripa, y De Brasi, 2011).

### 2.2.5.2. Reacción en cadena de la polimerasa

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) es una técnica que se basa en el análisis molecular del material hereditario mediante la amplificación de una secuencia específica (Krebs, Goldstein, y Kilpatrick, 2014). La PCR es un método muy sensible que trabaja con cantidades muy pequeñas de ADN (Alberts et al., 2015). La PCR consiste en un proceso cíclico que se repite en tres fases: denaturación, alineamiento y extensión (Castillo et al., 2012; McLennan, Bates, Turner, y White, 2012) en donde las condiciones de temperatura y tiempo varían (Green y Sambrook, 2012). En la primera fase, denaturación, las dos cadenas de ADN se separan a altas temperaturas; en la segunda fase, los iniciadores, pequeños segmentos de ADN de cadena sencilla, se unen con sus regiones complementarias de la cadena de ADN y en la tercera fase la *taq* polimerasa incorpora nucleótidos complementarios a la cadena molde (Green y Sambrook, 2012; Krebs et al., 2014).

La PCR es una técnica utilizada para la confirmación de portadoras de hemofilia A mediante la detección de las principales mutaciones como las inversiones del intrón 1 y 22 (Lavaut, 2014; Roozafzay et al., 2013). Para la identificación de las inversiones presentes en el gen *F8* diferentes variantes de la PCR han sido usadas como la *Long-distance* PCR (Bagnall, Giannelli, y Green, 2006) e *inverse shifting* PCR (IS-PCR, sus siglas en inglés) (Roozafzay et al., 2013; Rossetti, Radic, Larripa, y De Brasi, 2008). La *Long-distance* PCR (LH-PCR, sus siglas en inglés) realiza amplificaciones de fragmentos de ADN entre 20 a 50 kb (Foord y Rose, 2016). Esta técnica es útil para la detección de grandes de inversiones y translocaciones, por lo que, es la más empleada para el diagnóstico de hemofilia A severa (Bagnall et al., 2006). Por otro lado, la *inverse shifting* PCR o PCR inversa permite la amplificación específica de sitios de ADN desconocidos que flanquean cualquier segmento

caracterizado del genoma (McLennan et al., 2012). La PCR inversa consiste en la digestión de ADN con endonucleasas de restricción. Los fragmentos como resultado de la digestión enzimática son circularizados para su amplificación por PCR utilizando oligonucleótidos (Green y Sambrook, 2012). La PCR inversa ayuda a identificar todo el ADN estructural, reordenamientos, grandes deleciones, inversiones, translocaciones y duplicaciones. Por ejemplo, esta técnica es útil para un diagnóstico prenatal, facilitando el análisis de pacientes portadoras de hemofilia A (Roozafzay et al., 2013). Si las inversiones no se encuentran, se realiza un análisis para buscar mutaciones a lo largo del gen *F8* (Abdi et al., 2014; Nair et al., 2014; Poggi et al., 2011).

### **2.2.5.3. Secuenciación**

La secuenciación es una modificación de la PCR que se basa en obtener las secuencias específicas presentes en un fragmento de ADN conociendo el orden exacto de los nucleótidos (Peña-Castro, Gregorio-Ramírez, y Barrera-Figueroa, 2013; Pierce, 2016). Esta técnica consiste en el bloqueo de la síntesis de una nueva cadena de ADN para lo cual se usa dideoxinucleótidos (ddNTPs), deoxinucleótido modificados, para completar el nucleótido específico utilizando como molde una cadena sencilla de la región de la cual se desea obtener la secuencia (Castillo et al., 2012). Estos ddNTPs se añaden en bajas concentraciones y son marcados con fluoróforos. Los productos que resultan se diferencian entre sí por un nucleótido, los mismos que son migrados utilizando gel de poliacrilamida desnaturalizante mediante electroforesis capilar (Pierce, 2016). Los resultados son visualizados como cromatogramas (Green y Sambrook, 2012).

El secuenciamiento básico se basa en dos métodos: de Sanger y Maxam-Gilbert. Estos métodos se diferencian en la manera como se obtienen los fragmentos de ADN (Herráez,

2012). La técnica de Sanger conocida como método enzimático o dideoxi de terminación de la cadena consiste en la síntesis de las cadenas de ADN por medio de cuatro reacciones siendo una para cada base (Green y Sambrook, 2012; Pierce, 2016), mientras que, el método de Maxam-Gilbert conocido también como de degradación química utiliza materiales químicos para cortar el ADN a nivel de las bases específicas dando lugar a fragmentos que varían en tamaño (Herráez, 2012).

La secuenciación es utilizada en el diagnóstico molecular y evolución de enfermedades genéticas (Peña-Castro et al., 2013; Rodríguez-Santiago y Armengol, 2012). La técnica permite detectar todos los tipos de variación genómica, incluyendo mutaciones puntuales, pequeñas inserciones, deleciones, inversiones, traslocaciones o duplicaciones (Huston-Katsanis et al., 2013; Moses et al., 2012). Para el análisis de la hemofilia A, la secuenciación presenta una alta sensibilidad que ha permitido la detección directa de las mutaciones presentes en el gen *F8* (Elmahmoudi et al., 2012; Huston-Katsanis et al., 2013; Moses et al., 2012; Nair et al., 2014; Onori et al., 2011; Onori et al., 2014; Santacroce et al., 2014).

### **2.3. MARCO CONCEPTUAL**

**Asesoría genética.-** Información que se le brinda a las personas afectadas por trastornos genéticos para ayudarlas a que comprendan su enfermedad y otros aspectos que podrían afectar su decisión de tener una familia (FEDHEMO, 2014).

**Codón.-** Tripleta de nucleótidos en una molécula de ARNm que codifica un aminoácido en particular (Passarge, 2010).

**Cromosoma.-** Estructuras formadas por cromatina que contienen a los genes (Passarge, 2010).

**Delección.-** Pérdida de uno o más nucleótidos de una secuencia de ADN (Pierce, 2016).

**Desplazamiento del marco de lectura.-** Mutación causada por la inserción o delección de un número de nucleótidos en una secuencia de ADN (Passarge, 2010).

**Exón.-** Región codificante de la secuencia polipeptídica que se encuentra en el ARN mensajero (Brooker, 2012).

**Gen.-** El gen es una secuencia de ADN que contiene la información hereditaria de los organismos (Krebs et al., 2014, Passarge, 2010).

**Inserción.-** Introducción de nucleótidos adicionales interpuestos en la secuencia del ADN que alargan la cadena (Passarge, 2010).

**Intrón.-** Fragmentos del gen que se encuentran separando los distintos exones y no codifican aminoácidos (Passarge, 2010).

**Inversión.-** Dos segmentos de nucleótidos de hebras complementarias se invierten y se intercambian mediante dos giros de 180° (Passarge, 2010).

**Mutación.-** Una mutación es el cambio en la secuencia de ADN que puede ser espontánea o producida por mutágenos (Krebs et al., 2014).

**Mutación silenciosa.-** Mutación que produce una alteración de un nucleótido creando un codón sinónimo, el cual codifica para el mismo aminoácido (Pierce, 2016).

**Mutación *missense*.-** Mutación que cambia un codón por otro por el intercambio de un aminoácido (Passarge, 2010).

**Mutación *nonsense*.**- Mutación terminadora en la que no hay información que codificar o existe un codón de terminación (Passarge, 2010).

**Portadora.**- Mujer que presenta un gen afectado por hemofilia y lo hereda a sus hijos. Estas pueden ser madres, hermanas o mujeres parientes de varones con hemofilia (FMH, 2012).

**Pruebas genéticas.**- Pruebas que se utilizan para identificar si una persona tiene un gen defectuoso que presente un trastorno que es heredado a sus descendientes (FMH, 2012).

## CAPÍTULO III

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Tipo de estudio

El tipo de estudio fue descriptivo, transversal y exploratorio dado que se pensaba describir las mutaciones presentes en el exón 14 del gen *F8* en mujeres diagnosticadas como presuntas portadoras de hemofilia A de tres ciudades, Quito, Ambato y Guayaquil, del Ecuador mediante secuenciamiento. El estudio fue transversal porque la toma de muestra fue en el periodo de abril a mayo del 2015. Finalmente, la presente investigación fue exploratoria porque se buscó la presencia de mutaciones en el exón 14 del gen *F8*.

#### 3.2. Tipo de muestreo

El presente estudio formó parte del proyecto titulado “Detección de portadoras de hemofilia por biología molecular” con código L13296, el cual fue financiado por la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE). Para el proyecto, se empleó un muestreo dirigido debido a que la toma de muestras fue de mujeres identificadas previamente como posibles portadoras de cuatro ciudades, Ambato, Chone, Guayaquil y Quito. Para lo cual, se tuvo la colaboración de la FUNDHEC, institución que se encargó de coordinar y convocar a las posibles portadoras de hemofilia A.

#### 3.3. Tamaño de la muestra

El tamaño de la muestra del presente estudio dependió, principalmente, del número de muestras negativas que resultaron del análisis de las inversiones de los intrones 1 y 22 llevado a cabo por el proyecto mencionado anteriormente. De acuerdo a este criterio se tomó

veintitrés muestras que resultaron negativas para las inversiones de los mencionados intrones. Las muestras negativas fueron de tres ciudades, Quito (n = 13), Ambato (n = 6) y Guayaquil (n = 4). Las muestras de Chone fueron descartadas del estudio debido a presentaron problemas de amplificación para las inversiones 1 y 22.

### **3.4. Criterios que sustentan la elección de la población y muestra**

#### **3.4.1. Criterios de inclusión**

En el estudio se incluyeron todas las muestras de portadoras de hemofilia A que arrojaron resultados negativos para la inversión del intrón 1 o del intrón 22.

#### **3.4.2. Criterios de exclusión**

Para el estudio, se excluyeron todas las muestras de portadoras de hemofilia A que arrojaron resultados positivos para la inversión del intrón 1 o del intrón 22. Además, se excluyeron del análisis las muestras que presentaron problemas de amplificación de las inversiones de los intrones 1 o 22. Tomando en consideración el último criterio se excluyeron todas las muestras de la ciudad de Chone.

### **3.5. OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES**

**3.5.1. Variable dependiente:** portadoras de hemofilia A.

**3.5.2. Variable independiente:** mutaciones del exón 14.

<b>VARIABLE DEPENDIENTE</b>	<b>DEFINICIÓN</b>	<b>TIPO DE VARIABLE</b>	<b>DIMENSIÓN</b>	<b>INDICADORES</b>	<b>ESCALA DE MEDIDA</b>	<b>INSTRUMENTOS DE MEDIDA</b>
Portadoras de hemofilia A	Mujer con 40-60% de la cantidad normal de factor de coagulación con hemorragias anormales (FMH, 2012).	Cualitativa	Presente Ausente	Frecuencia relativa Número de portadoras inscritas para estudio	Nominal	Secuenciamiento con presencia de mutaciones positivas
<b>VARIABLE INDEPENDIENTE</b>	<b>DEFINICIÓN</b>	<b>TIPO DE VARIABLE</b>	<b>DIMENSIÓN</b>	<b>INDICADORES</b>	<b>ESCALA DE MEDIDA</b>	<b>INSTRUMENTOS DE MEDIDA</b>
Mutaciones en el exón 14	Cambio en la secuencia de ADN que puede ser espontánea o producida por mutágenos (Krebs et al., 2014).	Cualitativa	Presente Ausente	Frecuencia relativa <u># Pacientes positivas</u> # Portadoras	Nominal	Secuenciamiento del exón 14

### 3.6. MATERIALES Y REACTIVOS

#### 3.6.1. Materiales

<b>Materiales de oficina</b>	
<b>Material</b>	<b>Descripción</b>
Cuadernos de laboratorio	
Esferos	Varios colores
Regla	
Grapadora	
Perforadora	
Marcadores para vidrio	Punta fina, varios colores
Hojas a cuadros	Paquete por 50 hojas A4
Archivador	
Copias	
Impresiones	
Anillados	
<b>Materiales de laboratorio</b>	
Guantes de látex	Caja de 100 unidades
Guantes de nitrilo	Caja de 100 unidades
Mandil	
Papel absorbente	
Guardianes	
Fundas negras	Paquete por 10
Fundas rojas	Paquete por 10

Botellas autoclavables	
Juego de tres pipetas F2 Kit	1-10 $\mu$ l, 10-100 $\mu$ l; 100-1 000 $\mu$ l
Tubos <i>ependorf</i>	1,5 ml por 500
Tubos PCR	0,2 ml por 1 000 (tapa plana)
Tubera con tapa	96 x 0,2 ml
Caja plástica con tapa	100 x 1,5 ml
Puntas con filtro	10 $\mu$ l x 1 000
Puntas amarillas	200 $\mu$ l x 1 000
Puntas azules	1 000 $\mu$ l x 1 000
Juego de gradillas para tubos <i>ependorf</i>	5 unidades
Cámara de electroforesis horizontal	Pequeña

### 3.6.2. Reactivos

Reactivos	Descripción
<i>Taq</i> polimerasa	<i>GoTaq (R) Flexi DNA</i> , 500U PROMEGA ADN polimerasa INVITROGEN
Agarosa	Grado analítico 100 gr PROMEGA
<i>Primer</i> 14AF	5'GAGAACCTCTAACAGAACGT 3'
<i>Primer</i> 14AR	5'CTGTTGGACCATTTCATGT 3'
<i>Primer</i> 14BF	5'TATGCTCCAGTACTTCAAGA 3'
<i>Primer</i> 14BR	5'AGATGAGAAGAGTTGTCTTG 3'
<i>Primer</i> 14CF	5'ATTGCAAAGGTATCATCATT 3'
<i>Primer</i> 14CR	5'AGCAGAGCAAAGGAATAACC 3'
<i>Primer</i> $\beta$ -globina PC03	5'ACACAACCTGTGTTCACTAGC 3'

<i>Primer β-globina PC04</i>	5'CAACTTCATCCACGTTTACC 3'
Marcador de peso molecular	<i>Ladder</i> 100 pb por 100 aplicaciones INVITROGEN
dNTPs	100 mM, 4 x 25 μmol INVITROGEN
<i>Buffer</i> TAE 10X	1 litro
Agua grado molecular	50 ml PROMEGA
DMSO	5%

### 3.7. MÉTODOS

#### 3.7.1. Fase uno

Esta fase consistió en la elaboración del formato del consentimiento informado y de la encuesta, las mismas que fueron elaboradas por la directora del proyecto. Primero, se buscó la aprobación del formato de consentimiento informado por el comité de ética de la PUCE, el mismo que se detalla en el Anexo 1. Por otro lado, la encuesta consistió en preguntas para obtener los datos necesarios de las participantes del estudio específicamente tipo de hemofilia, árbol genealógico y presencia de sangrados (Anexo 2). Finalmente, se desarrolló un cronograma de actividades con las fechas y lugares en donde se realizó la toma de muestras sanguíneas para el proyecto, el mismo que se detalla en la siguiente fase.

#### 3.7.2. Fase dos

Para la toma de muestras, se realizaron salidas a cuatro ciudades del Ecuador. Las ciudades fueron Quito, Ambato, Chone y Guayaquil, las mismas que fueron visitadas el 11 de abril, 25 de abril, 9 de mayo y 16 de mayo del año 2015, respectivamente. En cada salida se realizó un listado de todas las mujeres probables portadoras de hemofilia tanto

A como B en el programa Excel. Las posibles portadoras de la enfermedad se caracterizaron porque presentaban antecedentes familiares con hemofilia. Estos datos sirvieron para la elaboración del árbol genealógico como parte del proyecto.

### **3.7.3. Fase tres**

La toma de muestra del proyecto se realizó mediante prácticas óptimas de flebotomía con el fin de reducir el riesgo al que se encuentran expuestos tanto el paciente como el personal de salud. Además, la toma de muestras se realizó en base a lineamientos de calidad, planificación que incluyeron un lugar adecuado, identificación correcta de los pacientes y muestras, almacenamiento y transporte de la muestra reportados por Demar (s.f.; ver Anexo 3 y 4). Después de la toma de muestras, éstas fueron transportadas al Banco de Sangre del Hospital Eugenio Espejo, las mismas que se mantuvieron en refrigeración hasta el momento de su procesamiento. Las muestras fueron procesadas en el Laboratorio de Diagnóstico Molecular y Citogenética de la Escuela de Bioanálisis.

NOTA.- El presente estudio solamente utilizó las muestras que resultaron negativas para el análisis de las inversiones de los intrones 1 y 22 del proyecto denominado “Detección de portadoras de hemofilia por biología molecular” con código L13296. Por cuestiones de formato en el texto de la disertación se incluyen las fases uno, dos y tres que corresponden al proyecto. No se incluye los procedimientos para extracción de ADN ni amplificación de las inversiones 1 y 22 mediante *Long-PCR* debido a que esa parte de la metodología corresponde exclusivamente al proyecto.

Los análisis moleculares de la presente investigación se llevaron a cabo en el laboratorio de Ecología y Genética de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

### 3.8. Control de calidad

Para el control de calidad interno se usó los *primers* PCO3 5'ACACAACCTGTGTTCACTAGC3' y PCO4 (5'CAACTTCATCCACGTTACACC'3 reportados por Saiki et al. (1988) para la amplificación del gen parcial de la  $\beta$ -globina humana localizada en el cromosoma 11. La reacción de PCR se realizó de acuerdo a lo reportado por Yaghobi et al. (2005). El volumen de reacción fue de 20  $\mu$ l, la misma que contenía 50 ng de ADN, 2,0 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200  $\mu$ M de dNTPs, 0,3  $\mu$ M de cada *primer forward* y *reverse* y 0,5 U de *GoTaq*® polimerasa (Promega).

Las condiciones de PCR fueron las reportadas por Saiki et al. (1988) con ligeras modificaciones. Las condiciones fueron las siguientes: una denaturación inicial de 95°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de denaturación a 94°C por 30 segundos, *annealing* a 59°C por 40 segundos y una extensión a 72°C por 30 segundos con un ciclo de extensión final a 72°C por 10 minutos. Los productos de PCR migraron en gel de agarosa al 3 % teñido con bromuro de etidio para su posterior visualización mediante UV.

Para la amplificación del exón 14 se utilizó un control positivo y negativo que validaron los resultados obtenidos de la PCR. El control positivo se obtuvo de la amplificación de una paciente que padece hemofilia A que fue únicamente para control de PCR; mientras que, como controles negativos se usó agua o los reactivos usados para la extracción de ADN como el *buffer* de rehidratación.

### 3.9. Amplificación del exón 14

La amplificación del exón 14 se realizó mediante PCR para lo cual se utilizó tres pares de *primers* descritos por Arruda et al. (1995). Los *primers* amplifican tres regiones

del exón 14. Las secuencias de los *primers* fueron las siguientes: 14AF 5'GAGAACCTCTAACAGAACGT3', 14AR 5'CTGTTGGACCATTTCATGT 3', 14BF 5'TATGCTCCAGTACTTCAAGA 3', 14BR 5'AGATGAGAAGAGTTGTCTTG 3', 14CF 5'ATTGCAAAGGTATCATCATT 3' y 14CR 5'AGCAGAGCAAAGGAATAACC 3'. La reacción de PCR se realizó de acuerdo a lo reportado por Onson et al. (2011). El volumen de reacción fue de 25 µl, la misma que contenía 50 ng de ADN, *buffer* de PCR 1X, 2,0 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de dNTPs, 0,3 µM de cada *primer forward* y *reverse*, DMSO al 5% y 0,5 U de *Taq* polimerasa (Invitrogen).

Las condiciones de PCR fueron las descritas por Onson et al. (2011), las mismas que fueron las siguientes: una denaturación inicial de 94°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de denaturación a 94°C por 20 segundos, *annealing* a 55°C por 30 segundos para el fragmento A del exón 14 y 58°C para las otras regiones de exón, 14B y 14C, y una extensión a 72°C por 90 segundos, seguidos de un ciclo de extensión final a 72°C por 10 minutos. Los productos de PCR del exón 14 fueron visualizados con luz UV en gel de agarosa al 1,5% teñido previamente con bromuro de etidio. Los productos de la amplificación del exón 14 fueron enviados a Macrogen, Seúl-Corea, para su purificación y secuenciación tanto con el *primer forward* como *reverse*.

### **3.10. Identificación de las secuencias**

Una vez que se obtuvo las secuencias tanto *forward* como *reverse* fueron editadas y limpiadas para su posterior alineación manual con el *software Clustal W* implementado en el programa MEGA 6 (Tamura, Stecher, Peterson, Filipski, y Kumar, 2013) con el fin

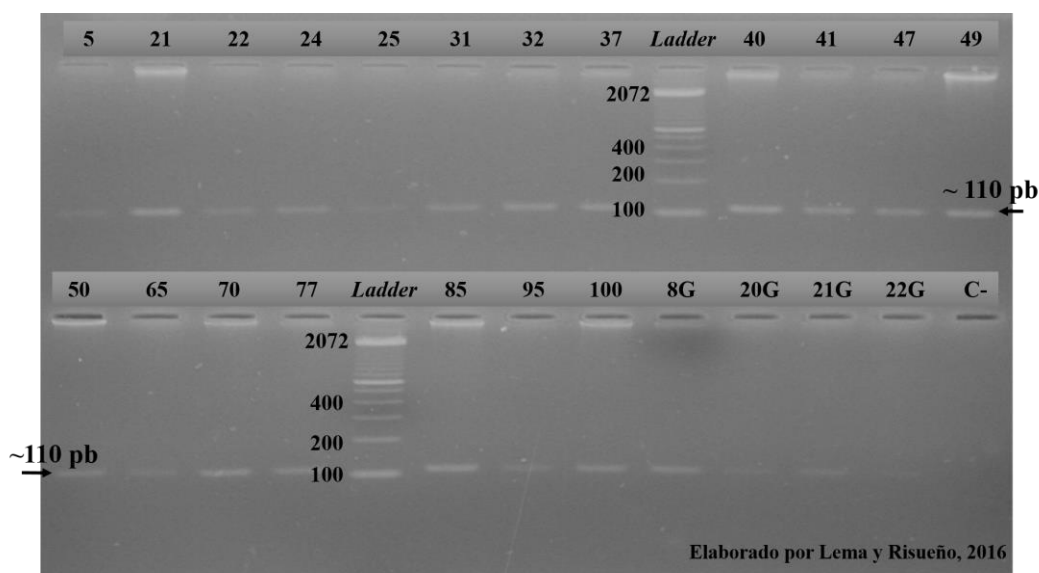
de obtener una secuencia consenso. La secuencia fue comparada con aquellas disponibles en el *GenBank* utilizando la herramienta BLAST (Altschul et al., 1997).

## CAPÍTULO IV

### 4. RESULTADOS

#### 4.1. Control de calidad de las muestras de ADN

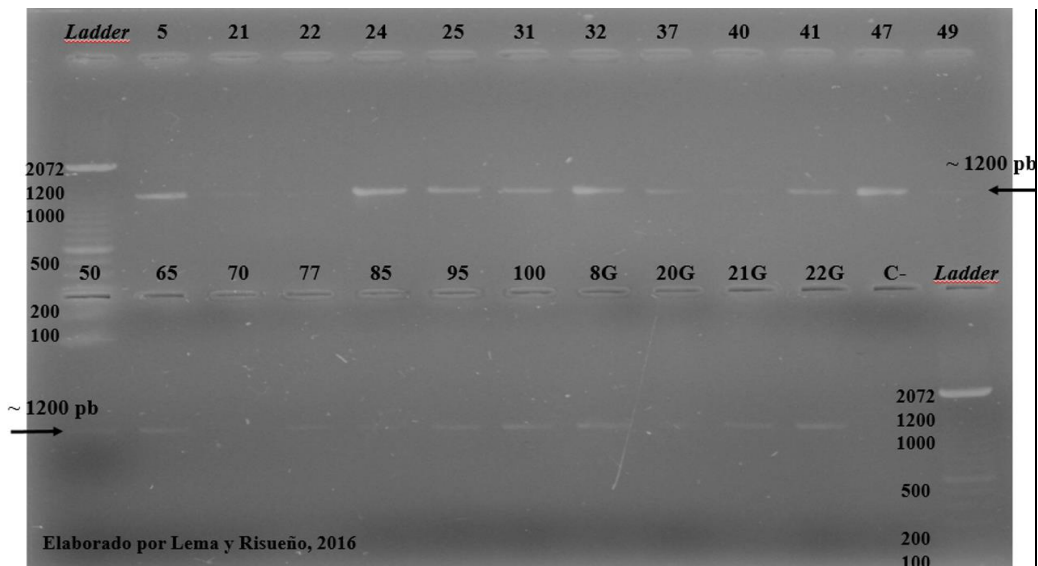
Las veintitrés muestras de ADN amplificaron para el gen parcial de la  $\beta$ -globina humana. Como resultado se obtuvo un producto de alrededor 100 pb (Figura 1), confirmando que las muestras no presentan inhibidores por lo que se procedió a la amplificación de los tres fragmentos del exón 14.



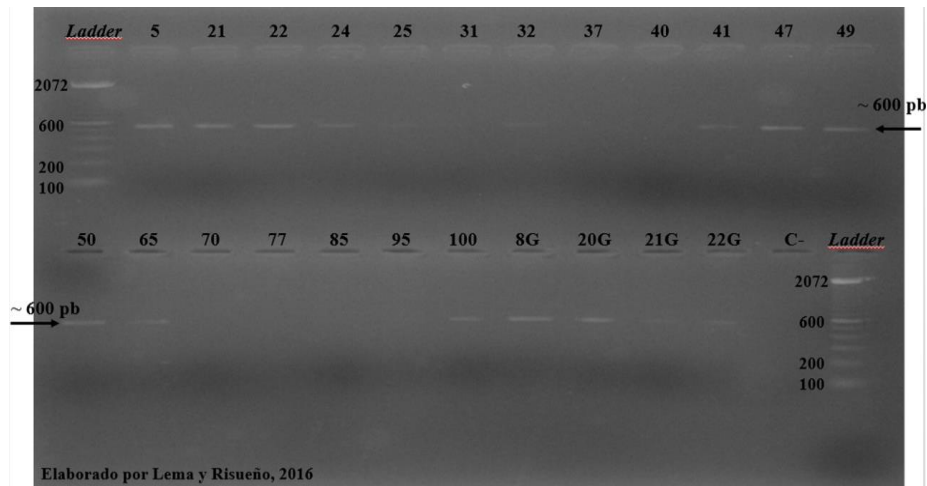
**Figura 1. Productos de PCR del gen parcial de la  $\beta$ -globina de posibles portadoras de hemofilia A de tres ciudades.** La figura indica el tamaño del producto de PCR para veintitrés muestras de posibles portadoras de hemofilia A. Parte superior, carriles 1-8 y 10-13: muestras de la ciudad de Quito, carril 9: ladder de 100 pb (Invitrogen). Parte inferior, carril 1: muestra de la ciudad de Quito, carriles 2-4 y 6-8: muestras de la ciudad de Ambato, carril 5: ladder de 100 pb (Invitrogen), carriles 9-12: muestras de la ciudad de Guayaquil, carril 13: C- (control negativo).

## 4.2. Amplificación de tres fragmentos del exón 14

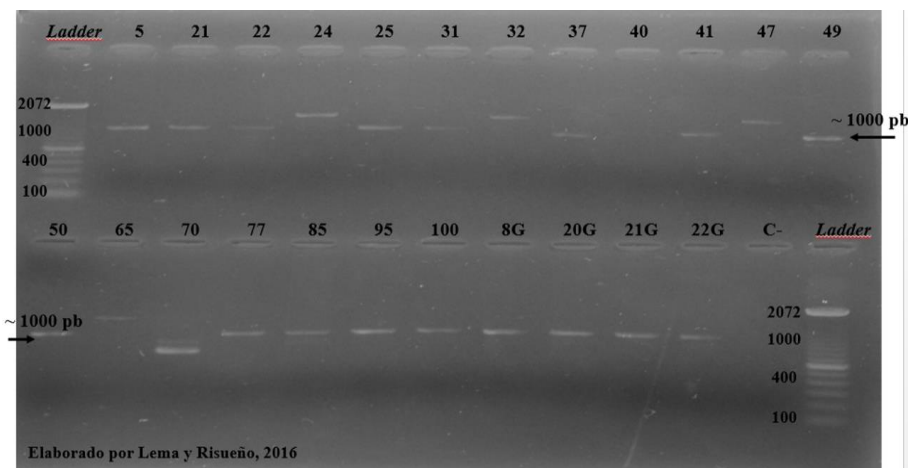
Como resultado de la amplificación del exón 14 se obtuvieron tres fragmentos de diferentes tamaños, para el fragmento A se amplificó un producto de alrededor 1 200 pb, mientras que, para los fragmentos B y C el producto fue de aproximadamente 600 pb y 1 000 pb, respectivamente. De las veintitrés muestras, veinte amplificaron para la exón 14A (Figura 2), diecisiete para el fragmento B (Figura 3) y veintidós para el fragmento C (Figura 4).



**Figura 2. Producto de PCR del fragmento A del exón 14 de posibles portadoras de hemofilia A de tres ciudades.** La figura muestra el tamaño del producto de PCR para veinte muestras de posibles portadoras de hemofilia A. Parte superior, carril 1: *ladder* de 100 pb (Invitrogen), carriles 2-13: muestras de la ciudad de Quito. Parte inferior, carril 1: muestra de la ciudad de Quito, carriles 2-7: muestras de la ciudad de Ambato, carriles 8-11: muestras de la ciudad de Guayaquil, carril 12: C- (control negativo), carril 13: *ladder* de 100 pb (Invitrogen).



**Figura 3. Producto de PCR del fragmento B del exón 14 de posibles portadoras de hemofilia A de tres ciudades.** La figura detalla el tamaño del producto de PCR para diecisiete muestras de posibles portadoras de hemofilia A. Parte superior, carril 1: *ladder* de 100 pb (Invitrogen), carriles 2-13: muestras de la ciudad de Quito. Parte inferior, carril 1: muestra de la ciudad de Quito, carriles 2-7: muestras de la ciudad de Ambato, carriles 8-11: muestras de la ciudad de Guayaquil, carril 12: C- (control negativo), carril 13: *ladder* de 100 pb (Invitrogen).

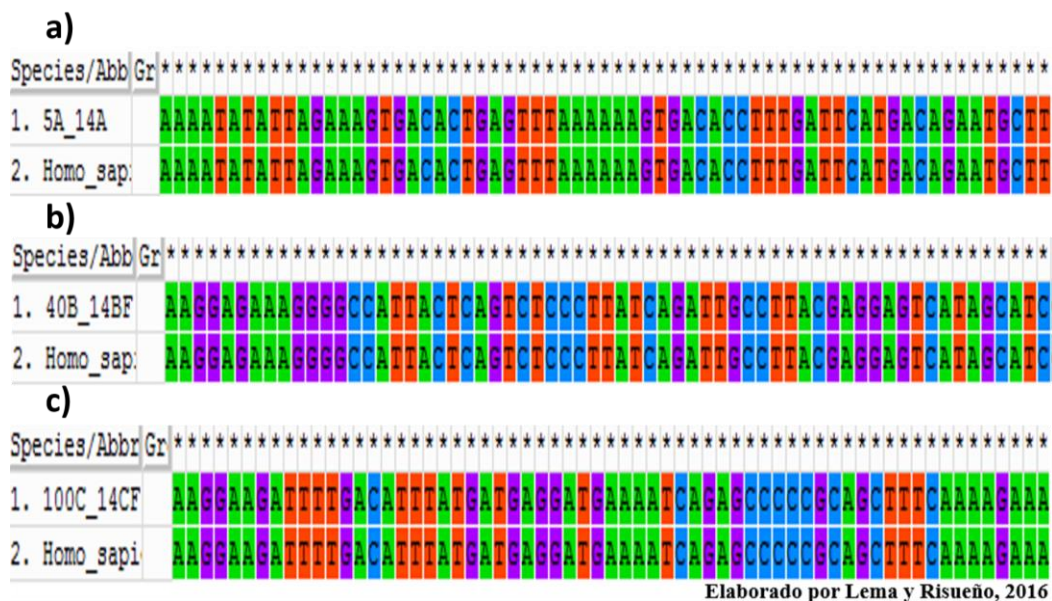


**Figura 4. Producto de PCR del fragmento C del exón 14 de posibles portadoras de hemofilia de tres ciudades.** La figura muestra el tamaño del producto de PCR para veintidós muestras de posibles portadoras de hemofilia A. Parte superior, carril 1: *ladder* de 100 pb (Invitrogen), carriles 2-13: muestras de la ciudad de Quito. Parte inferior, carril 1: muestra de la ciudad de Quito, carriles 2-7: muestras de la ciudad

de Ambato, carriles 8-11: muestras de la ciudad de Guayaquil, carril 12: C- (control negativo), carril 13: *ladder* de 100 pb (Invitrogen).

### 4.3. Identificación de las secuencias

Las secuencias de los tres fragmentos del exón 14 presentaron una similitud del 100% con la secuencia de referencia que corresponde al factor VIII del cromosoma X presente en humanos (número de acceso *GenBank* NG\_011403.1). En las figuras 5 se presentan una parte de los alineamientos de los tres fragmentos A, B y C del exón 14. Los fragmentos A, B, C se ubicaron en las posiciones 9 6046-9 7202 pb, 9 7778-9 8197 pb y 9 8201-9 9138 pb, respectivamente.



**Figura 5. Representación de la alineación de los tres fragmentos del exón 14.** La figura indica que las secuencias obtenidas del presente estudio fueron idénticas con la secuencia de referencia (número de acceso *GenBank* NG\_011403.1). a) representa la alineación parcial del fragmento A del exón 14 para lo cual se usó la secuencia 5A. b) representa la alineación parcial del fragmento B del exón 14 para lo cual se usó la secuencia de la muestra 40B. c) representa la alineación parcial del fragmento C del exón 14 para lo cual se usó la secuencia de la muestra 100B. (\*) indica que los nucleótidos son idénticos.

Las secuencias completas encontradas en el presente estudio se detallan a continuación:

**FRAGMENTO**

**A**

AGGTCTATGGATTCTGGGGTGCCACAACCTCAGACTTTCGGAACAGAGGCATGACCGCCTTACTGAAGGTTT  
CTAGTTGTGACAAGAACAACCTGGTGATTATTACGAGGACAGTTATGAAGATATTTTCAGCATACTTGCTGAGT  
AAAAACAATGCCATTGAACCAAGAAGCTTCTCCCAGAATTCAAGACACCCTAGCACTAGGCAAAAGCAAT  
TTAATGCCACCACAATTCCAGAAAATGACATAGAGAAGACTGACCCTTGGTTTGCACACAGAACACCTATG  
CCTAAAATACAAAATGTCTCCTCTAGTGATTTGTTGATGCTCTTGCGACAGAGTCCTACTCCACATGGGCTA  
TCCTTATCTGATCTCCAAGAAGCCAAATATGAGACTTTTTCTGATGATCCATCACCTGGAGCAATAGACAGT  
AATAACAGCCTGTCTGAAATGACACACTTCAGGCCACAGCTCCATCACAGTGGGGACATGGTATTTACCCC  
TGAGTCAGGCCTCCAATTAAGATTAATGAGAACTGGGGACAACAGAGTTGAAGAACTT  
GATTTCAAAGTTTCTAGTACATCAAATAATCTGATTTCAACAATTCCATCAGACAATTTGGCAGCAGGTACT  
GATAATACAAGTTCCTTAGGACCCCCAAGTATGCCAGTTCATTATGATAGTCAATTAGATAACCACTCTATTT  
GGCAAAAAGTCATCTCCCCTTACTGAGTCTGGTGGACCTCTGAGCTTGAGTGAAGAAAATAATGATTCAA  
GTTGTTAGAATCAGGTTTAATGAATAGCCAAGAAAGTTCATGGGGAAAAAATGTATCGTCAACAGAGAGT  
GGTAGGTTATTTAAAGGGAAAAGAGCTCATGGACCTGCTTTGTTGACTAAAGATAATGCCTTATTCAAAGT  
TAGCATCTCTTTGTTAAAGACAAACAAAACCTTCCAATAATTCAGCAACTAATAGAAAGACTCACATTGATG  
GCCATCATTATTAATTGAGAATAGTCCATCAGTCTGGCAAAATATATTAGAAAGTGACACTGAGTTTAAA  
AAAGTGACACCTTTGATTCATGACAGAATGCTTATGGACAAAAATGCTACAGCTTTGAGGCTAAATCATAT  
GTCAAATAAAACTACTTCAT

**FRAGMENTO**

**B**

AAACACACAGCTCATTCTCAAAAAAAGGGGAGGAAGAAAACCTTGGAAAGGCTTGGGAAATCAAACCAAGC  
AAATTGTAGAGAAATATGCATGCACCACAAGGATATCTCCTAATACAAGCCAGCAGAATTTTGTACGCAA  
CGTAGTAAGAGAGCTTTGAAACAATTCAGACTCCCACTAGAAGAAACAGAACTTGAAAAAAGGATAATTG  
TGGATGACACCTCAACCCAGTGGTCCAAAAACATGAAACATTTGACCCCGAGCACCCCTCACACAGATAGAC  
TACAATGAGAAGGAGAAAGGGGCCATTACTCAGTCTCCCTTATCAGATTGCCTTACGAGGAGTCATAGCAT  
CCCTCAAGCAAATAGATCTCCATTACCCATTGCAAAGGTATCATCATTTCCATCTATTAGACCTATA

**FRAGMENTO**

**C**

CTGACCAGGGTCCTATTCCAAGACAACCTTTCTCATCTTCCAGCAGCATCTTATAGAAAGAAAGATTCTGGG  
GTCCAAGAAAGCAGTCATTTCTTACAAGGAGCCAAAAAATAACCTTTCTTTAGCCATTCTAACCTTGG  
GATGACTGGTGATCAAAGAGAGGTTGGCTCCCTGGGGACAAGTGCCACAAATTCAGTcACATACAAGAAAG  
TTGAGAACACTGTTCTCCCGAAACCAGACTTGCCCAAAACATCTGGCAAAGTTGAATTGCTTCCAAAAGTT  
CACATTTATCAGAAGGACCTATTCCCTACGGAAACTAGCAATGGGTCTCCTGGCCATCTGGATCTCGTGGA  
AGGGAGCCTTCTTCAGGGAACAGAGGGAGCGATTAAGTGGAATGAAGCAAACAGACCTGGAAAAGTTCCC  
TTTCTGAGAGTAGCAACAGAAAGCTCTGCAAAGACTCCCTCCAAGCTATTGGATCCTCTTGCTTGGGATAA  
CCACTATGGTACTCAGATACCAAAAAGAAGAGTGGAATCCCAAGAGAAGTCACCAGAAAAACAGCTTTT  
AAGAAAAAGGATACCATTTTGTCCCTGAACGCTTGTGAAAGCAATCATGCAATAGCAGCAATAAATGAGG  
GACAAAATAAGCCCGAAATAGAAGTCACCTGGGCAAAGCAAGGTAGGACTGAAAGGCTGTGCTCTCAAAA  
CCCACCAGTCTTGAAACGCCATCAACGGGAAATAACTCGTACTACTCTTCAGTCAGATCAAGAGGAAATTG

ACTATGATGATACCATATCAGTTGAAATGAAGAAGGAAGATTTTGACATTTATGATGAGGATGAAAATCAG  
AGCCCCGCAGCTTTCAAAGAAAACACGACACTATTTTATTGCTGCAGTGGAGAGGCTCTGGGATTATGG  
GATGAGTAGCTCCCCACA

## CAPÍTULO V

### 5. DISCUSIÓN

La identificación de mutaciones en el exón 14 del gen *F8* ha sido estudiada en varias poblaciones a nivel mundial (Moses et al., 2012; Nair et al., 2014; Onsoni et al., 2011; Onsoni et al., 2014; Shekari et al., 2016). El exón 14 codifica para el dominio B del FVIII, el mismo que contiene pocas regiones que son funcionales (Faridi et al., 2014). Este dominio es de gran importancia porque cumple con varias funciones como de síntesis y secreción del FVIII, unión con los fosfolípidos plaquetarios, inactivación y el aclaramiento de la molécula completa (Castillo-González, 2012). Por lo tanto, las mutaciones en este exón pueden afectar las regiones funcionales, generando el fenotipo de hemofilia A. En el Ecuador no hay estudios relacionados con el análisis de mutaciones a pesar de la importancia de la misma con la expresión de los diferentes niveles de severidad de la enfermedad.

La presente investigación constituye uno de los primeros estudios realizados en el país. Sin embargo, en este estudio no fue posible encontrar mutaciones en los tres fragmentos del exón 14 analizados. Similar a otros estudios en donde no reportan mutaciones a nivel del exón 14 al secuenciar los 26 exones del gen *F8* (Al-Allaf et al., 2016; Chetta et al., 2008). Por otro lado, otros estudios han analizado las regiones codificantes y promotoras de todo el gen sin encontrar ninguna mutación a nivel del exón 14 (Poggi et al., 2011). En contraste a la presente investigación, diferentes estudios mencionan la existencia de mutaciones en el exón 14 (Abdi et al., 2014; Casaña et al., 2008; Green, Bagnall, Waseem, y Giannelli, 2008; Khanum, Collins, Harris, y Bowen, 2014; Margaglione et al., 2008; Nair et al., 2014; Liang, Wei, Liao, y Zhou, 2015;

Santacroce et al., 2014; Shekari et al., 2016), las mismas que estarían asociadas a diferentes niveles de severidad de la enfermedad. Además, muchas de las mutaciones reportadas en el exón 14 son nuevas (Awidi et al., 2010; Moses et al., 2012; Nair et al., 2014; Onori et al., 2011; Onori et al., 2014; Pavlova et al., 2009; Qiao et al., 2013).

Por lo general, la detección de mutaciones en el gen *F8* se la realiza cuando las pacientes son negativas para la presencia de las inversiones 1 y 22. Las mutaciones a nivel del exón 14 tienen algún impacto en el fenotipo de la enfermedad, en especial, las deleciones o *missense* que están relacionadas con la hemofilia severa (Moses et al., 2012; Onori et al., 2011) o moderada (Casaña et al., 2012; Onori et al., 2014; Qiao et al., 2013; Rosset et al., 2013), respectivamente. Abdi et al. (2014) identificaron seis mutaciones puntuales en el exón 14, de las cuales dos fueron nuevas y una de cambio de sentido o *missense*, asociada con la enfermedad debido a que afecta a la estructura de la proteína. Similar resultado fue reportado por Moses et al. (2012) en donde se encontraron cuatro mutaciones nuevas que alteraron la estructura de la proteína causando el fenotipo de hemofilia A severa. Por otro lado, en el estudio de Elmahmoudi et al. (2012) de las nueve mutaciones puntuales identificadas en el exón 14, ocho fueron nuevos registros, relacionadas principalmente con hemofilia A severa y moderada. Finalmente, una nueva mutación de sentido erróneo en el exón 14 fue asociada con hemofilia A moderada (Onori et al., 2014). Continuamente se reportan mutaciones, varias son nuevas, las mismas que se encuentran registradas en la base de datos internacional de la hemofilia A (*Factor VIII Variant Database*, 2016).

En contraste a otros estudios, la presente investigación se centró solo en el exón 14 por ser la región más grande del gen. Sin embargo, varios estudios han reportado mutaciones relacionadas con diferentes niveles de la enfermedad en otras regiones del

gen *F8*, en particular, en regiones asociadas con los dominios A y C (Nair et al., 2014). En la base de datos internacional al menos la mitad de las mutaciones puntuales ocurren en el dominio A, el mismo que es importante para la actividad del FVIII (Faridi et al., 2014). Por otro lado, las mutaciones que ocurren en el dominio C puede afectar la unión del factor de von Willebrand (FVW), así como la interacción con los fosfolípidos (Faridi et al., 2014; Nair et al., 2014). Varios estudios reportan mutaciones puntuales en el exón 23 (Al-Allaf et al., 2016; Liang et al., 2015; Poggi et al., 2011), las mismas que pueden afectar al marco de lectura generando un codón de terminación causando hemofilia severa (Al-Allaf et al., 2016) o afectar a codones que generan hemofilia A moderada (Liang et al., 2015; Poggi et al., 2011). Otro estudio reporta la presencia de mutaciones de cambio por inserciones o deleciones en los exones 1-13 y 25, la mayoría de las mutaciones reportadas conducen a fenotipos hemorrágicos severos debido a que no se produce la proteína o se encuentra incompleta (Elmahmoudi et al., 2012). Por otro lado, mutaciones puntuales presentes en el exón 16 promueven cambios en la estructura de la proteína, alterando la función de la misma lo que puede causar hemofilia A leve a moderada (Chetta et al., 2008; Faridi, Husain, Siddiqi, Kumar, y Bamezai, 2011). Finalmente, el secuenciamiento de las regiones promotoras así como intrónicas es importante porque las deleciones en esas regiones han sido asociadas con hemofilia A (Castaman et al., 2011; Hwang et al., 2011; Pezeshkpoor et al., 2013; Roth, Marschalek, Oldenburg, Oyen, y Schneppenheim, 2011). Las mutaciones intrónicas son raras pero son las responsables de que se de un *splicing* anormal en el ARN mensajero generando la hemofilia moderada (Castaman et al., 2011; Pezeshkpoor et al., 2013).

Sin embargo, no siempre la presencia de mutaciones está relacionada con cambio estructural o funcional de las proteínas. Por lo tanto, en el análisis de mutaciones se puede

encontrar mutaciones silenciosas, las mismas que no van afectar al aminoácido. Como por ejemplo, las mutaciones encontradas en el exón 26 que no afectaron a la estructura de la proteína debido a que se mantiene el aminoácido correspondiente (Polania et al., 2014). La presencia de mutaciones que afectan a la estructura y funcionalidad del FVIII altera el proceso de coagulación, generando el fenotipo de hemofilia (Faridi et al., 2014). Por todo lo mencionado, mutaciones que se encuentran en otros exones, así como en regiones intrónicas también son responsables del fenotipo de la enfermedad. Por lo tanto, aunque no se detectó mutaciones en el exón 14 no significa que las posibles portadoras de hemofilia A no tengan la variante del gen. Las mutaciones que afectan los diferentes niveles de la enfermedad no están relacionadas exclusivamente al exón 14 aunque es el más grande. Las mutaciones puntuales pueden estar relacionadas con regiones funcionales de los dominios A o C; por lo tanto, las posibles portadoras de hemofilia A en el país pueden tener mutaciones en diferentes regiones del gen *F8*, las mismas que son las responsables directas de la enfermedad. No obstante, también hay que considerar que la presencia de mutaciones no necesariamente afecta la funcionalidad de las proteínas.

La disminución de los niveles del FVIII es detectado al momento de realizar la determinación de los factores de coagulación por métodos coagulométricos (Morales-De la Vega et al., 2008). Dependiendo de los porcentajes se cataloga a la hemofilia como severa (< 1%), moderada (1 al 5%) o leve (5 al 40 %) (FMH, 2012; Konkle et al., 2014). Por lo tanto, las muestras que presentaban una disminución del FVIII fueron consideradas como posibles portadoras de hemofilia A. Sin embargo, bajos niveles del FVIII no son exclusivos de la presencia de hemofilia, también se les asocia con otro fenotipo clínico parecido a la hemofilia A leve, conocido como la enfermedad de von Willebrand (Schulman, 2012; van Meegeren et al., 2015). Esta enfermedad se caracteriza por una

unión defectuosa del FVIII con el FVW, promoviendo la disminución de los niveles del FVIII (Bustamante, 2011). Esta disminución del FVIII afectan la vía intrínseca de la coagulación sanguínea impidiendo la participación del FVIII en la hemostasia frente a la presencia de lesiones (Morales-De la Vega et al., 2008). La enfermedad de von Willebrand debe ser determinada en conjunto con la hemofilia A leve (Konkle et al., 2014), por lo que, las dos enfermedades deben ser diferenciadas previamente (Schulman, 2012) antes de realizar un análisis molecular de posibles portadoras de hemofilia A. La presencia de la enfermedad von Willebrand, tipos 1, 2 y 3, se la confirma con la deficiencia de la actividad coagulante del FVIII conjuntamente con la deficiencia del FVW (Jiang et al., 2012), cofactor de ristocetina y agregación plaquetaria inducida por ristocetina (Jiang et al., 2012; Padilla-Romo y Jaloma-Cruz, 2015), así como, el tiempo de sangrado y TTP que se encuentran prolongados, análisis de multímeros con la pérdida del peso molecular (Jiang et al., 2012). En particular, la enfermedad de von Willebrand del tipo 2B puede ser diferenciada de hemofilia A mediante un análisis de frotis sanguíneo, en el cual se puede apreciar plaquetas grandes y agregados plaquetarios que son el aspecto clave para su diagnóstico (Hatta et al., 2015).

Las pruebas coagulométricas del FVIII no permite discriminar entre hemofilia A y la enfermedad de von Willebrand, tipo 1 y 3. Desde hace años se ha visto está confusión por lo que se necesita de análisis moleculares complementarios para el diagnóstico de las mencionadas enfermedades. Varios estudios han reportado casos de personas diagnosticadas con la enfermedad de von Willebrand con algún nivel de hemofilia (Morales-De la Vega et al., 2008; Polania et al., 2014). Uno de los estudios realizados por Schneppenheim et al. (1996) incluyeron pacientes diagnosticados previamente con hemofilia A; como resultado de la detección molecular, la enfermedad responsable de los

bajos niveles del FVIII fue la de von Willebrand. Los autores identificaron los defectos moleculares específicos en el dominio de unión de FVIII/FVW, los mismos que se encuentran en el exón 18 del gen *FVW*. Otro estudio menciona que de acuerdo al diagnóstico clínico una familia presentaba las dos enfermedades, hemofilia A y von Willebrand. Por medio de un análisis molecular detectaron dos mutaciones en los exones 14 y 26; sin embargo, estas mutaciones no afectaron a la estructura y funcionalidad de la proteína del FVIII, descartando así la presencia de hemofilia A, motivo por el cual, se infirió como único diagnóstico a la enfermedad de von Willebrand (Polania et al., 2014). Por esta razón, al no encontrar mutaciones en todo el gen en pacientes presuntas portadoras de hemofilia A es necesario buscar otros defectos de la coagulación (Daidone et al., 2016). De todo lo mencionado anteriormente, la disminución del FVIII de las posibles portadoras de hemofilia A no necesariamente está relacionadas con la mencionada enfermedad, por lo que, puede ser otra enfermedad asociada con defectos de coagulación como la de von Willebrand.

## 5.1. CONCLUSIONES

En Ecuador, el presente estudio, fue el primero en buscar mutaciones presentes en el exón 14 del gen *F8* que codifica el factor de coagulación VIII. La disfuncionalidad de la proteína FVIII genera alteraciones del tipo sanguíneo que son hereditarias, manifestándose con el fenotipo de hemofilia A. Esta disfuncionalidad es resultado de la presencia de mutaciones en regiones funcionales a nivel del exón 14 que codifica el dominio B del FVIII, expresándose en las diferentes manifestaciones de la enfermedad. Sin embargo, en el presente estudio no se encontraron mutaciones en el exón 14 de las muestras provenientes de posibles portadoras de hemofilia A de las ciudades de Quito, Ambato y Guayaquil.

Aunque no se detectó mutaciones en el exón 14 no significa que las posibles portadoras de hemofilia A no tengan la variante del gen debido a que las mutaciones pueden encontrarse en otras regiones del gen *F8*. Por otro lado, también hay que considerar la presencia de otra enfermedad relacionada con la deficiencia del FVIII. Por esta razón, no se descarta la presencia de la enfermedad de von Willebrand, enfermedad que presenta los síntomas similares al de la hemofilia A leve, en las posibles portadoras de hemofilia A.

La posible presencia de la enfermedad de von Willebrand se debe principalmente a que se tomó muestras que presentaban una disminución del FVIII que fueron consideradas como posibles portadoras de hemofilia A; sin embargo, no se realizó previamente una prueba adicional para descartar la presencia de esta enfermedad.

## 5.2. RECOMENDACIONES

La hemofilia A, especialmente, la leve puede ser confundida con la enfermedad de von Willebrand por lo que se sugiere realizar las pruebas convencionales necesarias que permitan diferenciar las dos enfermedades. Descartando la presencia de la enfermedad de von Willebrand se recomienda continuar con el análisis molecular para determinar mutaciones del gen *F8* relacionados con la hemofilia A.

Al no encontrar mutaciones a nivel del exón 14 en el análisis se sugiere realizar futuros estudios a nivel molecular. En particular es recomendable secuenciar todo el gen *F8* para buscar mutaciones relacionadas con la hemofilia A debido a que las mutaciones que afectan los diferentes niveles de la enfermedad no están relacionadas exclusivamente al exón 14. En el caso de no encontrar mutaciones a nivel del gen *F8* se recomienda analizar el gen *FVW* que codifica el factor de von Willebrand.

Finalmente, se recomienda que las muestras para realizar pruebas moleculares en lo posible sean procesadas inmediatamente después de la extracción de sangre.

## 6. REFERENCIAS

- Abdi, M., Zamani-Fodil, F., Fodil, M., Aberkane, M., Touhami, H., Saidi-Mehtar, N., ...  
Boudjema, A. (2014). First molecular analysis of *F8* gene in Algeria: identification of two novel mutations. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*, 20(7), 741-748. doi: 10.1177/1076029613513321
- Al-Allaf, F., Taher, M., Abduljaleel, Z., Athar, M., Ba-hammam, F., Abdulla, M., ...  
Owaidah, T. (2016). Mutation Screening of the Factor VIII Gene in Hemophilia A in Saudi Arabia: Two Novel Mutations and Genotype-Phenotype Correlation. *Journal of Molecular and Genetic Medicine*, 10(2), 1-11. doi: 10.4172/1747-0862.1000211
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2015). *Molecular Biology of the Cell* (6ta. Ed.). New York: Garland Science.
- Amador-Medina, L., & Vargas-Ruiz, A. (2013). Hemofilia. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 51(6), 638-643. Recuperado de <http://www.medigraphic.com/pdfs/imss/im-2013/im136i.pdf>
- Arruda, V., Pieneman, W., Reitsma, P., Deutz-Terlouw, P., Annichino-Bizzacchi, J., Briët, E., & Costa, F. (1995). Eleven Novel Mutations in the Factor VIII Gene from Brazilian Hemophilia A Patients. *Blood*, 86(8), 3015-3020. Recuperado de <http://www.bloodjournal.org/content/bloodjournal/86/8/3015.full.pdf?sso-checked=true>

- Altschul, S., Madden, T., Schäffer, A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, *25*, 3389-3402. PMID: PMC146917
- Audesirk, T., Audesirk, G., & Byers, B. (2013). *Biología: la vida en la tierra con fisiología* (9a. Ed.). México, México: Pearson Educación.
- Awidi, A., Ramahi, M., Alhattab, D. Mefleh, R., Dweiri, M., Bsoul, N., ... Fauori, S. (2010). Study of mutations in Jordanian patients with haemophilia A: identification of five novel mutations. *Haemophilia*, *16*(1), 136-142. doi: 10.1111/j.1365-2516.2009.02081.x
- Bagnall, R., Giannelli, F., & Green, P. (2006). Int22h-related inversions causing hemophilia A: A novel insight into their origin and a new more discriminant PCR test for their detection. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, *4*(3), 591-598. doi: 10.1111/j.1538-7836.2006.01840.x
- Brooker, R. (2012). *Genetics Analysis & Principles* (4a. Ed.). New York: McGraw-Hill
- Bustamante, G. (2011). Enfermedad de von Willebrand. *Revista de Actualización Clínica Investiga*, *4*, 169-172. Recuperado de [http://www.revistasbolivianas.org.bo/pdf/raci/v4/v4\\_a04.pdf](http://www.revistasbolivianas.org.bo/pdf/raci/v4/v4_a04.pdf)
- Cabello, M. (2013). *Protocolo de atención a pacientes hemofílicos durante la consulta odontológica* [Disertación de pregrado]. Recuperado de <http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/3361/1/704%20Maria%20Fernanda%20Cabello.pdf>

- Camire, R., & Bos, M. (2010). The molecular basis of factor V and VIII procofactor activation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 7(12), 1951-1961. doi: 10.1111/j.1538-7836.2009.03622.x
- Casaña, P., Cabrera, N., Cid, A., Haya, S., Beneyto, M., Espinós, C., ... Aznar, A. (2008). Severe and Moderate Hemophilia A: Identification of 38 New Genetic Alterations. *Haematologica*, 93, 1091-1094. doi: 10.3324/haematol.12344
- Castaman, G., Giacomelli, S., Mancuso, M., D'Andrea, G., Santacroce, R., ... Rodeghiero, F. (2011). Deep intronic variations may cause mild hemophilia A. *Journal of Thrombosis and haemostasis*, 9(8), 1541-1548. doi: 10.1111/j.1538-7836.2011.04408x
- Castillo, V., Uranga, R., & Zafra, G. (2012). *Genética clínica* (6ª Ed.). México: El Manual Moderno.
- Castillo-González, D. (2012). Hemofilia II. Aspectos moleculares y de genética poblacional. *Revista Cubana Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 28(2), 111-119. Recuperado de <http://scielo.sld.cu/pdf/hih/v28n2/hih02212.pdf>
- Chetta, M., Drmanac, A., Santacroce, R., Grandone, E., Surrey, S., Fortina, P., & Margaglione, M. (2008). Identification of FVIII gene mutations in patients with hemophilia A using new combinatorial sequencing by hybridization. *Indian Journal of Human Genetics*, 14(2), 55-64. doi: 10.4103/0971-6866.44106
- Daidone, V., Pontara, E., Boscaro, F., Cattini, M., Milan, M., & Casonato, A. (2016). Haemostatic patterns and bleeding scores of a genetically characterised Italian

family with combined haemophilia A and type 1 von Willebrand disease. *Blood Coagulation and Fibrinolysis*. doi: 10.1097/MBC.0000000000000583

Demar. (s.f.). *Manual de Flebotomia*. Recuperado de <http://www.reactivosdemar.com.mx/docs/manuales/manual%20de%20flebotomia.pdf>

Devlin, T. (2009). *Bioquímica: libro de texto con aplicaciones clínicas* (4a Ed.). España: Reverté.

D'Oiron, R., Pipe, S., & Jacquemin, M. (2008). Mild/moderate haemophilia A: new insights into molecular mechanisms and inhibitors development. *Haemophilia*, 14(3), 138-146. doi: 10.1111/j.1365-2516.2008.01730.x

Elmahmoudi, H., Khodjet-el-khil, H., Wigren, E., Jlizi, A., Zahra, K., Pellechia, D., & Gouider, E. (2012). First report of molecular diagnosis of Tunisian hemophiliacs A: Identification of 8 novel causative mutations. *Diagnostic Pathology*, 7(93), 1-7. doi: 10.1186/1746-1596-7-93

*Factor VIII Variant Database*. (2015). Recuperado el 1 de septiembre del 2015 de <http://www.factorviii-db.org>

Faridi, N., Husain, N., Siddiqi, M., Kumar, P., & Bamezai, R. (2011). Identification of Missense Mutations in Exon 16 of Factor VIII Gene in Mild and Moderate Cases with Hemophilia A. *Thrombosis and Hemostasis*, 17(4), 358-361. doi: 10.1177/1076029610366436

- Faridi, N., Kumar, P., Husain, N., & Siddiqi, M. (2014). Factor VIII genetic mutations and protein alterations in hemophilia A: A review. *Clinical Reviews and Opinions*, 6(1), 1-10. doi: 10.5897/CRO11.015
- Federación Española de Hemofilia [FEDHEMO]. (2014). *Hemofilia*. Recuperado de <http://fedhemo.com/que-es-la-hemofilia/>
- Federación Mundial de la Hemofilia [FMH]. (2012). *Portadoras y mujeres con hemofilia*. Recuperado de <http://www1.wfh.org/publications/files/pdf-1532.pdf>
- Federación Mundial de la Hemofilia [FMH]. (2015). *Report on the Annual Global Survey 2014*. Recuperado de <http://www1.wfh.org/publications/files/pdf-1627.pdf>
- Fundación de la Hemofilia [FH]. (2011). *Guía de tratamiento de la hemofilia*. Recuperado de <http://www.hemofilia.org.ar/archivos/pdfs/GuiaTratamientoHemofilia.pdf>
- Ferreira, S., Corrêa, G., & Meireles, S. (2009). As bases moleculares da hemofilia A. *Revista de Associação Médica Brasileira*, 55(2), 213-219. doi: 10.1590/S0104-42302009000200029
- Foord, O., & Rose, E. (2016). Long-distance PCR. *Genome Research*, 3, S149-S5161. Recuperado de <http://genome.cshlp.org/content/3/6/S149.full.pdf+html>
- Gálvez, C., & Cortés, L. (2011). Coagulación y sangrado masivo: nuevos conceptos fisiopatológicos. *Medicina Universidad Pontificia Bolivariana*, 30(2), 163-169. Recuperado de <https://revistas.upb.edu.co/index.php/Medicina/article/view/922/833>

- García-Chávez, J., y Majluf-Cruz, A. (2013). Hemofilia. *Gaceta Médica de México*, 149, 308-321. Recuperado de <http://www.medigraphic.com/pdfs/gaceta/gm-2013/gm133j.pdf>
- Green, M., y Sambrook, J. (2012). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (4a Ed.). Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Green, P., Bagnall, R., Waseem, N., & Giannelli, F. (2008). Haemophilia A mutations in the UK: results of screening one-third of the population. *British Journal of Haematology*, 143(1), 115-128. doi: 10.1111/j.1365-2141.2008.07310.x
- Gómez, R., Guerra, T., Dita, L., Fernández, J., & Cabrera, M. (2011). Teoría celular de la coagulación: de las cascadas a las membranas celulares. *MediSur*, 9(2), 65-75. Recuperado de <http://www.redalyc.org/pdf/1800/180020299011.pdf>
- Guerrero, C. (2016). *Valoración de inhibidores de factor VIII de coagulación en pacientes hemofílicos* [Disertación de pregrado]. Recuperado de <http://repo.uta.edu.ec/bitstream/123456789/19054/2/Valoraci%C3%B3n%20de%20Inhibidores%20de%20factor%20VIII%20de%20coagulaci%C3%B3n%20en%20pacientes%20hemof%C3%ADlicos.pdf>
- Haberchter, S., y Montgomery, R. (2012). Structure and Function of von Willebrand Factor. En V. Marder, W. Aird, J. Bennett, S. Schulman y G. White (Eds.), *Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice* (6a Ed.). California: Wolters Kluwer.
- Hatta, K., Kunishima, S., Sukanuma, H., Tanaka, N., Ohkawa, N., & Shimizu, T. (2015). A family having type 2B von Willebrand disease with a novel VWF p.R1308S

mutation: Detection of characteristic platelet aggregates on peripheral blood smears as the key aspect of diagnosis. *Thrombosis Research*, 136(4), 813-817. doi: 10.1016/j.thromres.2015.08.004

Herráez, A. (2012). *Biología molecular e ingeniería genética* (2a Ed.). España: Elsevier.

Hwang, S., Lim, J., Kim, H., Lee, H., & Kim, H. (2011). Identification of a share F8 mutations in the Korean patients acquires hemophilia A. *The Korean Journal of Hematology*, 46(1), 49-51. doi: 10.5045/kjh.2011.46.1.49

Invitrogen (2014). *PlatinumTaq DNA Polymerase*. Recuperado de [https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/Platinum\\_Taq\\_DNA\\_Polymerase\\_UG.pdf](https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/Platinum_Taq_DNA_Polymerase_UG.pdf)

Jiang, L., Cao, Y., Wang, X., Ding, Q., Xu, G., Zhang, L., ... Xi, X. (2012). The phenotypic and genotypic diagnosis of three Chinese patients with von Willebrand disease. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi*, 51(10), 788-792. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23290978>

Kaufman, R., Fay, F., Popolo, L., & Ortel, T. (2012). Factor V and Factor VIII. En V. Marder, W. Aird, J. Bennett, S. Schulman y G. White (Eds.), *Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice* (6a Ed.). California: Wolters Kluwer.

Khanum, F., Collins, P., Harris, W., & Bowen, R. (2014). Characterization of F8 defects in haemophilia A in Pakistan: investigation of correlation between mutation type and the *in vitro* thrombin generation assay. *Haemophilia*, 20(2), 287-293. doi: 10.1111/hae.12272

- Kasper, C. (2008). *Trastornos hereditarios de los factores de coagulación plasmáticos y su manejo*. Recuperado de <http://www1.wfh.org/publication/files/pdf-1114.pdf>
- Katsanis, S., & Katsanis, N. (2013). Molecular genetic testing and the future of clinical genomics. *Nature Reviews Genetics* 14(6), 415-426. doi: 10.1038/nrg3493
- Kemball-Cook, G., y Gomez, K. (2014). Molecular basis of hemophilia A. En C. Lee, E. Berntorp, y K. Hoots. (Eds.), *Textbook of Hemophilia*. Recupedado de <http://site.ebrary.com/lib/puce/detail.action?docID=10868002>
- Krebs, J., Goldstein, E., & Kilpatrick, S. (2014). *Lewin's genes XI* (11a Ed.). Estados Unidos: Jones and Barlett.
- Konkle, B., Josephson, N., & Nakaya, S. (2014). *Hemophilia A*. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1404/>
- Lavaut, K. (2014). Importancia del diagnóstico de portadoras en familias con antecedentes de hemofilia. *Revista Cubana Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 30(2), 108-113. ISSN 0864-0289
- Liang, W., Wei, H., Liao, N., & Zhou, J. (2015). Relationship between genotypes and clinical phenotypes in patients from 7 hemophilia A families. *Chisene Journal of Contemporary Pediatrics*, 17(9), 903-907. doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2015.09.003
- Liras, A. (2015). Guía básica de *Hemofilia. Manifestaciones clínicas, diagnóstico y tratamiento*. Recuperado de <http://eprints.ucm.es/30233/7/Liras%20esping.pdf>

- McLennan, A., Bates, A., Turner, P., y White, M. (2012). *Molecular Biology* (4a Ed.). New York: Garland Science.
- Mansouritorghabeh, H. (2015). Clinical and Laboratory Approaches to Hemophilia A. *Iranian Journal of Medical Sciences*, 40(3), 194-205. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4430880/pdf/ijms-40-194.pdf>
- Margaglione, M., Castaman, G., Morfini, M., Rocino, A., Santagostino, E., Tagariello, G., ... AICE-Genetics Study Group. (2008). The Italian AICE-Genetics Hemophilia A Database: Results and correlation with clinical phenotype. *Haematologica*, 93(5), 722-728. doi: 10.3324/haematol.12427
- Mazabanda, D. (2013). *Características clínico-epidemiológicas de los pacientes hemofílicos y su relación con el desempeño educativo/laboral* [Disertación de pregrado]. Recuperado de <http://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/3694/1/Tesis%20Final%20Hemofilia.pdf>
- Mazurkiewicz-Pisarek, A., Plucienniczak, G., Ciach, T., & Plucienniczak, A. (2016). The factor VIII protein and its function. *Acta Biochimica Polonica*, 63(1), 11-16. doi: 10.18388/abp.2015\_1056.
- Ministerio de Salud Pública [MSP]. (2013). *Día de la hemofilia: el Gobierno destinó en 2013 más de \$ 4 millones para atención de esta enfermedad*. Recuperado de <http://www.salud.gob.ec/dia-mundial-de-la-hemofilia-el-gobierno-destino-en-2013-mas-de-4-millones-para-atencion-de-esta-enfermedad/>

- Molina, A., Chaverri, F., & Wong, O. (2014). Generalidades de la artropatía hemofílica. *Revista Clínica de la Escuela de Medicina UCR – HSJD*, 4(5), 18-25. Recuperado de <http://revistas.ucr.ac.cr/index.php/clinica/article/viewFile/15964/15356>
- Morales-De la Vega, A., Reyes-Maldonado, E., Martínez-Murillo, C., & Quintana-González, S. (2008). Enfermedad de von Willebrand tipo 2N “Normandy”. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 46(1), 55-62. Recuperado de <http://www.medigraphic.com/pdfs/imss/im-2008/im081i.pdf>
- Moses, E. J., Ling, S. P., Al-Hassan, F. M., Karim, F. A., & Yusoff, N. M. (2012). Identification of Novel Mutations in Exon 14 of the *F8* Gene in Malaysian Patients with Severe Hemophilia A. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 27(2), 207-208. doi: 10.1007/s12291-011-0161-z
- Nair, P., Shetty, S., Chandrakala, S., & Ghosh, K. (2014). Mutations in Intron 1 and Intron 22 Inversion Negative Haemophilia A Patients from Western India. *PloS One*, 9(5), e97337. doi: 10.1371/journal.pone.0097337
- Nakaya, S., Liu, M., & Thompson, A. (2001). Some factor VIII exon 14 frameshift mutations cause moderately severe haemophilia A. *British Journal of Haematology*, 115, 977-982. doi: 10.1046/j.1365-2141.2001.03173.x
- Onsori, H., Hosseinpour, M., & Hosseinpour, A. (2011). A novel mutation (4040-4045 nt. delA) in exon 14 of the factor VIII gene causing severe hemophilia A. *Indian Journal of Human Genetics*, 17(3), 232-234. doi: 10.4103/0971-6866.92095
- Onsori, H., Hosseinpour, M., & Hosseinpour, A. (2014). A Novel Missense Mutation, E1623G, in the Human Factor VIII Gene Associated with Moderate Haemophilia

A. *Iranian Red Crescent Medical Journal*, 16(1), 1-3. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3964430/pdf/ircmj-16-6727.pdf>

Organización Mundial de la Salud [OMS] (2012). *Unidos para combatir las enfermedades raras*. Recuperado de <http://www.who.int/bulletin/volumes/90/6/12-020612/es/>

Padilla-Romo, M., & Jaloma-Cruz, A. (2015). Algoritmo diagnóstico para la enfermedad de von Willebrand (EvW) en población mexicana. *Gaceta Médica de México*, 151, 399-402. Recuperado de [http://www.anmm.org.mx/GMM/2015/n3/GMM\\_151\\_2015\\_3\\_399-402.pdf](http://www.anmm.org.mx/GMM/2015/n3/GMM_151_2015_3_399-402.pdf)

Parra, L. (2015). *Patologías bucodentales y alteraciones asociadas prevalentes en pacientes hemofílicos que acuden al circuito de salud N° 23 D01 C05 “Augusto Egas” de Santo Domingo de los Tsáchilas en el período julio-diciembre 2014* [Disertación de pregrado]. Recuperado de <http://dspace.unach.edu.ec/bitstream/51000/868/1/UNACH-EC-ODONT-2015-0009.pdf>

Passarge, E. (2010). *Genética: Texto y atlas* (3a Ed.). España: Médica Panamericana.

Pavlova, A., Brondke, H., Müsebeck, J., Pollmann, H., Srivastavas., & Oldenburg, J. (2009). Molecular mechanisms underlying hemophilia A phenotype in seven females. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 7(6), 976-982. doi: 10.1111/j.1538-7836.2009.03346.x

- Peña-Castro, J., Gregorio-Ramírez, O., & Barrera-Figueroa, B. (2013). Los métodos experimentales que permiten el estudio de las macromoléculas de la vida: historia, fundamentos y perspectivas. *Educación química*, 24(2), 237-246. ISSN 0187-893-X
- Pezeshkpoor, B., Zimmer, N., Marquardt, N., Nanda, I., Haaf, T., Budde, U., ... El Maarri, O. (2013). Deep intronic 'mutations' cause hemophilia A: application of next generation sequencing in patients without detectable mutation in *F8* cDNA. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 11(9), 1679-1687. doi: 10.1111/jth.12339
- Pierce, B. (2016). *Genética: Un enfoque conceptual* (5a Ed.). Madrid, España: Médica Panamericana.
- Piloto-Roque Y., Acanda, A., Cervera., Clark, Y., & Collazo-Mesa, T. (2010). Haplotipo del gen del factor VIII en el diagnóstico molecular de la hemofilia A. Estudio de una familia. *Revista Cubana Habanera de Ciencias Médicas*, 9(1), 12-18. Recuperado de <http://scielo.sld.cu/pdf/rhcm/v9n1/rhcm04110.pdf>
- Pipe, S. (2009). Functional roles of the factor VIII B domain. *Haemophilia*, 15(6), 1187-1196. doi: 10.1111/j.1365-2516.2009.02026.x
- Poggi, H., Honorato, J., Romeo, E., Zúñiga, P., Quiroga, T., & Lagos, M. (2011). Análisis de las inversiones del intrón 1 y 22 y secuenciación del gen *F8* para el diagnóstico genético-molecular de hemofilia. *Revista Médica de Chile*, 139(2), 189-196. doi: 10.4067/S0034-98872011000200008
- Polania, D., Narváez, D., y Groot de Restrepo, H. (2014). Genética molecular de la hemofilia A en una familia colombiana con diagnóstico de enfermedad de von

willebrand y de hemofilia A. *Revista Medicina*, 47 (15), 674-680. doi: 10.1016/j.ame-re.2014.07.040

Promega (2014). *GoTaq (R) Flexi DNA Polimerase*. Recuperado de <https://worldwide.promega.com/~media/files/resources/protocols/product%20information%20sheets/g/gotaq%20flexi%20dna%20polymerase%20m829.pdf>

Qiao, S., Ren, H., Ren, J., & Guo, X. (2013). Compound heterozygous hemophilia A in a female patient and the identification of a novel missense mutation, p. Met1093Ile. *Molecular Medicine Reports*, 9(2), 466-470. doi: 10.3892/mmr.2013.1841

Rodríguez-Santiago, B., & Armengol, L. (2012). Tecnologías de secuenciación de nueva generación en diagnóstico genético pre- y postnatal. *Diagnóstico prenatal*, 23(2), 56-66. doi: 10.1016/j.diapre.2012.02.001

Roofzafzay, N., Kokabee, L., Zeinali, S., & Karimipoor, M. (2013). Evaluation of intron 22 and intron 1 inversions of the *factor 8* gene using an inverse shifting PCR method in severe haemophilia A patients. *ScienceAsia Journal*, 39, 174-178. doi: 10.2306/scienceasia1513-1874.2013.39.174

Rosset, C., Vieira, A., Sinigaglia, M., Gorziza, R., Salzano, F., & Bandinelli, E. (2013). Detection of new mutations and molecular pathology of mild and moderate haemophilia A patients from southern Brazil. *Haemophilia*, 19(5), 773-781. doi: 10.1111/hae.12172

Rossetti, L., Radic, C., Larripa, I., & De Brasi, C. (2008). Developing a new generation of test for genotyping hemophilia-caustive rearrangements involving *int22h* and

*inht1h* hotspots in the factor VIII gene. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 6, 830-836. doi: 10.1111/j.1538-7836.2008.02926.x

Rossetti, L., Radic, C., Abelleiro, M., Larripa, I., & De Brasi, C. (2011). Eighteen Years of Molecular Genotyping the Hemophilia Inversion Hotspot: From Southern Blot to Inverse Shifting-PCR. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(10), 7271-7285. doi: 10.3390/ijms12107271

Roth, L., Marschalek, R., Oldenburg, J., Oyen, F., & Schneppenheim, R. (2011). Characterization of two novel large F8 deletions in patients with severe haemophilia A and factor VIII inhibitors. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 105(2), 279-284. doi: 10.1160/TH10-09-0570

Saiki, R., Gelfand, S., Stoffel, S., Scharf, S., Higuchi, R., Horn, G., ... Erlich, H. (1988). Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science*, 239(4839), 487-491. doi: 10.1126/science.2448875

Santacroce, R., Aquila, M., Belvini, D., Castaldo, G., Garagiola, I., Giacomelli, S., ... The AICE-Genetics study Group. (2008). Identification of 217 unreported mutations in the *F8* gene in a group of 1410 unselected Italian patients with hemophilia A. *Journal of Human Genetics*, 53, 275-284. doi: 10.1007/s10038-007-0238-y

Santacroce, R., Leccese, A., Trunzo, R., Lassandro, G., Giordano, P., Ettore, C., ... Margaglione, M. (2014). Identification of ten Novel Mutations in Factor VIII Gene: A Study of A Cohort of 52 Haemophilia A Patients. *Journal of Genetics and Genome Research*, 1(1), 1-5. ISSN: 2378-3648

- Schneppenheim, R., Budde, U., Krey, S., Drewke, E., Bergmann, F., Lechier, E., Oldenburg, J., & Schwaab, R. (1996). Results of a screening for von Willebrand disease type 2N in patients with suspected haemophilia A or von Willebrand disease type 1. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 76(4), 598-602. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8903002>
- Schulman, S. (2012). Hemofilia leve. *Federacion mundial de hemofilia*, 41, 1-9. Recuperado de <http://www1.wfh.org/publication/files/pdf-1193.pdf>
- Shekari, M., Ebrahimi, A., Daraei, S., & Mansoori, S. (2016). Genotyping of Intron Inversions and Point Mutations in Exon 14 of the FVIII Gene in Iranian Azeri Turkish Families with Hemophilia A. *Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion*, 1-6. doi: 10.1007/s12288-016-0699-2
- Sibinga, S., Das, P., & Mannucci, P. (2012). *Coagulation and blood transfusión* (2a Ed.). Estados Unidos: Springer Science Business Media, B.V.
- Solari, A. (2011). *Genética humana: fundamentos y aplicaciones en medicina* (4ta. Ed.). Buenos Aires, Argentina: Médica Panamericana.
- Stonebraker, J. S., Bolton-Maggs, P., Soucie, J., Walker, I., y Brooker, M. (2010). A study of variations in the reported hemophilia A prevalence around the world. *Clinical haemophilia*, 16, 20-32. doi: 10.1111/j.1365-2516.2009.02127.x
- Summer, R., Meek, S., Healey, J., Brown, H., Parker, E., Kempton, C., Doering, C., & Lllollar, P. (2016). Factor VIII A3 domain substitution N1922S results in hemophilia A due to domain-specific misfolding and hyposecretion of functional protein. *Blood*, 117(11), 3190-3198. doi: 10.1182/blood-2010-09-307074

- Taco, M. (2012). *Estrategia social para el mejoramiento de la calidad de vida de los pacientes con hemofilia de la Fundación Hemofílica Ecuatoriana* [Disertación de pregrado]. Recuperado de <http://repositorio.puce.edu.ec/handle/22000/6342>
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, *30*, 2725-2729. doi: 10.1093/molbev/mst197
- Terraube, V., O'Donnell, J., y Jenkins, P. (2010). Factor VIII and vonWillebrand factor interaction: biological, clinical and therapeutic importance. *Haemophilia*, *16*(1), 3-13. doi: 10.1111/j.1365-2516.2009.02005.x
- van Meegeren, M., Mancini, T., Schoormans, S., van Haren, B., van Duren, C., Diekstra, A., ... van Heerde, W. (2015). Clinical phenotype in genetically confirmed von Willebrand disease type 2N patients reflects a haemophilia A phenotype. *Haemophilia*, *21*(5), 375-383. doi: 10.1111/hae.12733
- Venceslá, A. (2010). *Análisis Molecular del gen F8 de la coagulación: Identificación de marcadores polimórficos y mutaciones en pacientes españoles con Hemofilia A* [Disertación de posgrado]. Recuperado de [https://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=19&cad=rja&uact=8&ved=0CEEQFjAIOApqFQoTCNfwq8\\_S1scCFcOMkAod-9IOWQ&url=http%3A%2F%2Fdiposit.ub.edu%2Fspace%2Fbitstream%2F2445%2F36074%2F1%2FAVG\\_TESIS.pdf&usg=AFQjCNFJoJOQb\\_a01WCO8tArO65ZEZoCNg&sig2=SLfOXNdx\\_so4jDSol1ZhbaQ&bvm=bv.101800829,d.Y2I](https://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=19&cad=rja&uact=8&ved=0CEEQFjAIOApqFQoTCNfwq8_S1scCFcOMkAod-9IOWQ&url=http%3A%2F%2Fdiposit.ub.edu%2Fspace%2Fbitstream%2F2445%2F36074%2F1%2FAVG_TESIS.pdf&usg=AFQjCNFJoJOQb_a01WCO8tArO65ZEZoCNg&sig2=SLfOXNdx_so4jDSol1ZhbaQ&bvm=bv.101800829,d.Y2I)

- Vintimilla, A. (2013). *Estudio de enfermedad de von willebrand y hemofilia en el cantón Cuenca, Ecuador: calidad de vida*. [Disertación de pregrado]. Recuperado de <http://dspace.uazuay.edu.ec/bitstream/datos/2768/1/09837.pdf>
- Walsh, P. (2012). The Role of Platelets in Blood Coagulation. En V. Marder, W. Aird, J. Bennett, S. Schulman y G. White (Eds.), *Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice* (6a Ed.). California: Wolters Kluwer.
- White, G., Marder, V., Schulman, S., Aird, W., & Bennett, J. (2012). Overview of Basic Coagulation and Fibrinolysis. En V. Marder, W. Aird, J. Bennett, S. Schulman y G. White (Eds.), *Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice* (6a Ed.). California: Wolters Kluwer.
- Yaghobi, R., Behzad-Behdahani, A., Sabani, F., Roustae, M., Alborzi, A., Ramzi, M., & Nourani, H. (2005). Comparative analysis of a double primer PCR assay with plasma, leukocytes and antigenemia for diagnosis of active human cytomegalovirus infection in bone marrow transplant patients. *Bone Marrow Transplantation*, 35, 595-599. doi: 10.1038/sj.bmt.1704797
- You, C. W., Son, H. S., Kim, H. J., Woo, E. J., Kim, S. A., & Baik, H. W. (2010). Mutation analysis of factor VIII in Korean patients with severe hemophilia A. *International Journal of Hematology*, 91(5), 784-791. doi: 10.1007/s12185-010-0593-x

## 7. ANEXOS

**Anexo 1. Formulario de consentimiento.** El presente formulario fue el que se presentó al momento de la toma de muestra.

He sido invitado a participar en la investigación “**Detección de portadoras de hemofilia por biología molecular**”.

En familias con hemofilia el diagnóstico de portadoras es importante al dar un adecuado consejo genético en mujeres jóvenes que piensan en tener una familia. Cuando no existe antecedente de hemofilia en la familia y se ve afectado el hijo varón se trata una mutación de Novo, es decir que por alguna razón ese hijo se concibió con mutación afectando al gen sea del factor VIII o IX, sin que antes se hubiera encontrado esta enfermedad.

En el 90% la bibliografía se describe que las madres son portadoras. El descubrir su situación como portadoras nos reflejará una situación más real y de datos certeros con el que podrá contar la Fundación Hemofílica Ecuatoriana con respecto al estudio de hemofilia en el país.

Entiendo que me extraerán una muestra de sangre. He sido informada que los riesgos son mínimos y que pueden incluir el volver a tomar la muestra si no se la pudo obtener en forma adecuada para el trabajo en el laboratorio. Se me ha proporcionado el nombre del investigador que puede ser fácilmente contactado usando el nombre y la dirección que se me ha dado de la persona.

He leído la información proporcionada o me ha sido leída. He tenido la oportunidad de preguntar sobre ella y se me han contestado satisfactoriamente las preguntas que he realizado. Consiento voluntariamente participar en esta investigación como participante

y entiendo que tengo el derecho a negarme de no querer participar en la investigación, sin que afecte de ninguna manera mi cuidado médico.

**Nombre del Participante o Representante Legal (en caso de que el paciente sea un menor de edad):** \_\_\_\_\_

**Firma del Participante**\_\_\_\_\_

**Fecha**\_\_\_\_\_

He leído con exactitud o he sido testigo de la lectura exacta del documento de consentimiento informado para el potencial participante quien ha tenido la oportunidad de hacer preguntas. Confirmando que el paciente ha dado consentimiento libremente.

**Nombre del Investigador**\_\_\_\_\_

**Firma del Investigador**\_\_\_\_\_

**Fecha**\_\_\_\_\_

Ha sido proporcionada al participante una copia de este documento de Consentimiento Informado

**Anexo 2. Formato de la encuesta para obtener información de la salud del paciente**

**INFORMACIÓN ADICIONAL Y VOLUNTARIA**

**1. Indique el tipo de hemofilia y el porcentaje que presenta el familiar.**

-----  
-----

**2. Árbol genealógico**

**Si se requiere mayor espacio puede ser realizado en la página de atrás**

**3. ¿En qué casos de su vida diaria ha presentado sangrados?**

- Por extracciones dentales**
- Operaciones**
- Partos**
- Menorragia**
- Otros -----**

**4. ¿Se ha realizado la prueba coagulométrica para portadoras?**

- Si      fecha:.....**
- No**

**5. Si en nuestro estudio, detectamos positividad en la mutación buscada y se requiere realizar con su ADN una prueba llamada secuenciación, sin tomarle otra muestra ¿Estaría de acuerdo?**

- Si**
- No**

**GRACIAS POR SU COLABORACIÓN**

### **ANEXO 3. Protocolo de toma de muestra de sangre de posibles portadoras de hemofilia (Demar, s.f.)**

#### **Obtención de la muestra**

**A) Identificación del paciente:** Nombre completo, fecha de nacimiento, edad, datos para su localización, número de teléfono, fecha de recolección, código para tubos.

**B) Preparación del lugar y equipo:** Sitio adecuado, silla limpia y confortable, lugar con iluminación totalmente limpio, materiales necesarios para extracción: mandil, guantes, torniquete, agujas y cápsula vacutainer, torundas de algodón, alcohol, curitas, tubos lilas con anticoagulante EDTA y tubo celeste con anticoagulante citrato sódico, tubos *ependorf*, centrifuga, pipetas pasteur, *cooler*.

**C) Extracción de sangre mediante vacutainer:** La muestra debe tomarse correctamente y bajo las condiciones favorables para evitar errores, incluye identificación del paciente, el sitio a puncionar y el volumen a colectar.

- Selección del sitio a puncionar mediante la palpación, evitar áreas con hematoma, fístulas, quemaduras, escoriaciones de la piel o cicatrices.
- El paciente debe tener el antebrazo arrimado en el asiento, brazo estirado sin el codo flexionado.
- Seleccionar los tubos a utilizar y colocarlos a un lado.
- Colocar el torniquete de 5 a 10 cm por arriba del sitio seleccionado. Se debe tener en cuenta que no se debe mantener el torniquete por más de 1 minuto, para evitar la hemoconcentración.
- Solicitar al paciente que haga puño y palpar la vena con el dedo más sensible tomando en cuenta el rebote, dirección, tamaño y profundidad de la vena.

- Descontaminación del área de punción con alcohol utilizando algodón y con movimientos circulares del interior al exterior. Se debe tener presente que una vez realizada la descontaminación, no debe volver a tocar el área venosa
- Destapar la aguja y chequear que esta no se encuentre virada o chueca y embolarla en la cápsula de vacutainer.
- Fijar la vena en el paciente.
- El bisel de la aguja debe encontrarse hacia arriba y colocarlo en un ángulo de 15°.
- Sujetar la cápsula meter y empujar el tubo para la recolección de la muestra.
- Aflojar el torniquete para que la sangre fluya mejor y remueva la aguja del brazo con movimiento suave al terminar de recolectar.
- Presione el algodón sobre el sitio de la punción aplicando una presión adecuada y no excesiva para evitar la formación de hematoma por 1 minuto.
- Una vez recolectada la muestra invertir los tubos de 8 a 10 veces para mezclar bien la sangre con el anticoagulante.
- Colocar un curita en el sitio de punción.
- Desechar material cortopunzante en el guardián.
- Las muestras de tubo celeste fueron centrifugadas y separado el plasma.

#### **Anexo 4. Almacenamiento y transporte de las muestras (Demar, s.f.)**

##### **Almacenamiento de las muestras**

- Muestras de tubo celeste deben ser almacenadas en la congeladora a  $-4^{\circ}\text{C}$  y muestras de tubo lila refrigeradas hasta su transporte.

##### **Transporte de las muestras**

- Una vez colectadas las muestras sanguíneas deben ser llevadas pronto al laboratorio para ser procesadas.