



Lozano, Magdalena

Estimación de la mezcla génica y la ancestría individual en pacientes con hemofilia a y su relación con el desarrollo del anticuerpo inhibidor neutralizante del factor terapéutico



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.
Atribución - No Comercial - Compartir Igual 2.5
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.5/ar/>

Documento descargado de RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes de la Universidad Nacional de Quilmes

Cita recomendada:

Lozano, M. (2025). *Estimación de la mezcla génica y la ancestría individual en pacientes con hemofilia a y su relación con el desarrollo del anticuerpo inhibidor neutralizante del factor terapéutico. (Tesis de maestría). Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Argentina. Disponible en RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes*
<http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/5714>

Puede encontrar éste y otros documentos en: <https://ridaa.unq.edu.ar>

Estimación de la mezcla génica y la ancestría individual en pacientes con hemofilia a y su relación con el desarrollo del anticuerpo inhibidor neutralizante del factor terapéutico

TESIS DE MAESTRÍA

Magdalena Lozano

lozanomagdalena@gmail.com

Resumen

La hemofilia es una enfermedad hereditaria que afecta la coagulación. Ante un sangrado se activa la cascada de coagulación, que desencadena distintas proteínas, factores de coagulación, para generar un coágulo y frenar así el sangrado. En pacientes con hemofilia encontramos afectados los Factores VIII o IX, la deficiencia de cada uno de ellos se denomina hemofilia A y hemofilia B respectivamente (Gitschier et al., 1984; Yoshitake et al., 1985).

En los casos severos de la enfermedad, la terapia consiste en profilaxis con infusiones intravenosas de concentrados del factor de coagulación deficiente. Una de las complicaciones más graves del tratamiento actual de la hemofilia es la aparición de anticuerpos que neutralizan el factor administrado durante la terapia —conocidos como inhibidores—. Cuando esto sucede, la terapia de reemplazo estándar deja de ser eficaz, lo que obliga a recurrir a tratamientos hemostáticos alternativos, menos eficaces y más costosos (Teitel, 2018; Tomeo et al., 2021).

El fenotipo hemofílico pareciera estar determinado por el genotipo del factor de la coagulación involucrado —i.e., gen del factor VIII (*F8*) en hemofilia A (HA) y del factor IX (*F9*) en hemofilia B (HB)—. Sin embargo, existen otros factores modificadores del fenotipo clínico-bioquímico, dependiente de la población y de la región geográfica, cuya elucidación adquiere vital importancia para proveer de una mejor elección terapéutica, basada en la evidencia a partir del conocimiento de todos los factores desencadenantes de los aspectos que condicionan más severamente la calidad de vida de las personas con hemofilia —e.g., desarrollo de inhibidores de la terapia antihemofílica—.

En este escenario, el Laboratorio de Genética Molecular de la Hemofilia (GMH) de la Academia Nacional de Medicina (ANM) cuenta con una valiosa población de muestras de más de 600 familias estratificadas, definidas por tipo de variante causal (genotipo *F8* o *F9*) —e.g., inversión del intrón 22, *Inv22*, variantes puntuales—, lo que permite la identificación de factores modificadores del fenotipo de segundo orden, de menor potencia predictiva, cuya influencia en el fenotipo bajo análisis se vería enmascarada por el factor de primer orden en poblaciones no

estratificadas. Estas características nos estimulan para elaborar un estudio de ancestría en esta población con el fin de identificar patrones geográficos en torno al desarrollo o no de inhibidores de la terapia. Con este fin se seleccionaron y estudiaron 65 pacientes con HA severa del AMBA, no relacionados biológicamente, previamente *F8*-genotipificados, y estratificados por mutación causal —Inv22—. De los cuales contamos con 34 pacientes con inhibidor y 31 sin inhibidor a la terapia.

Se ajustaron y validaron 30 marcadores informativos de ancestría (AIMs). y finalmente se estudiaron los 60 individuos de la población estratificada por mutación causal —Inv22—, y se estimó la mezcla génica y la ancestría individual en cada caso. Posteriormente, se analizó nuestra serie por análisis estadísticos con Structure y Clumpp, donde se evaluaron las distribuciones de ancestría —europea, americana y africana—. El uso de los AIMs, que indica el origen continental biparental de un individuo, en el caso de la población argentina nos brindó información sobre los componentes euroasiático occidental, subsahariano y nativoamericano. Se evidenció que el mayor aporte genético proviene de la ancestría europea, representando un 63% del total. Este predominio se destaca frente a los menores aportes observados en las ancestrías americana y africana, que registran un 23% y un 12%, respectivamente. Asimismo, al análisis de la existencia de correlación entre el desarrollo del Anticuerpo inhibidor anti FVIII y la ancestría individual, nos lleva a rechazar nuestra hipótesis, ya que la correlación existente entre el desarrollo del Anticuerpo inhibidor anti FVIII y la ancestría individual no ha sido significativa. Sin embargo, esta representa la primera muestra que es analizada su ancestría genética en pacientes con hemofilia de nuestro país, y en el mundo, ya que las otras series estudian la ancestría autopercebida. Consideramos que esto es un aporte no solo a la comunidad de hemofilia en el ámbito nacional, sino también al internacional.



TESIS PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE MAGÍSTER EN
BIOTECNOLOGÍA CON ORIENTACIÓN EN SALUD HUMANA Y
VETERINARIA.

**ESTIMACIÓN DE LA MEZCLA GÉNICA Y LA
ANCESTRÍA INDIVIDUAL EN PACIENTES CON
HEMOFILIA A Y SU RELACIÓN CON EL DESARROLLO
DEL ANTICUERPO INHIBIDOR NEUTRALIZANTE DEL
FACTOR TERAPÉUTICO.**

Magdalena Lozano

Directora: Liliana Rossetti

Codirectora: Marcela Pilloff

Febrero - 2025

Dedicatoria

A mis abuelas: María Rosa y Berta,
mis abuelos: Roberto y Jorge,
las raíces de mi ancestría.

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a Sergio Avena y a Cristina Dejean por haberme dado el lugar de aprender, cuestionarme y crecer en el mundo de la antropología biológica. Este agradecimiento se hace extensivo a mis compañeras y compañeros de laboratorio en la UMaí, con quienes siempre puedo contar para un mate, una charla, un consejo y el favor de guardar una muestra en el freezer: Vale, Julia, Fran, Jessi, Giani y Gaby.

Por otro lado, agradezco a Liliana Rossetti por la oportunidad y la confianza de dejarme acercarme a la ANM, pensar una forma distinta de mirar las muestras, y, principalmente, por la paciencia al explicarme todo el mundo nuevo que significó para mí el desarrollo de la hemofilia. Este agradecimiento se suma al grupo del Laboratorio de Genética Molecular de la Hemofilia que me recibió siempre con una sonrisa y muchísima paciencia: Carlos, Betiana, Pamela y Martín.

Gracias también a los distintos laboratorios de la UNQ, que me vieron crecer y me abrieron sus puertas mucho más adelante para poder terminar mi investigación. Agradezco principalmente a Marcela Pilloff, por las ganas de aceptar acompañar a alguien con una experiencia tan distinta, y la paciencia para resolver problemas simples que para mí eran gigantes. Extiendo este agradecimiento al laboratorio de Virus Emergentes, que me recibió para finalizar los experimentos: Sandra, Milagros, Majo, Mercedes y principalmente a mi papá, Mario, gracias por responderme siempre a todas las preguntas.

En estos agradecimientos, que ya se volvieron familiares, no quiero dejar de mencionar al resto de mi familia y amigos, que me acompañan, escuchan y todavía creen que trabajo con dinosaurios o algo así: a mi mamá Cecilia, a mis hermanos: Lautaro, Victoria y Lorenzo. A mis abuelos que ya no están, pero que fueron parte de este proceso: Jorge, Berta, Roberto y Rosa. A mis tíos y primos, que son demasiados para nombrarlos. A Romina y a Flavia, que ya son familia. Y a Leandro con quien construyo la familia que elegí.

Por último, pero no menos importante, quiero agradecer a mis amigos que me leen, me corrigen, me escuchan practicar para las presentaciones y me sacan todas las dudas con un resumen a mano: Olivia, Clara, Victoria, Pablo y Lucas. Este reconocimiento se suma en particular para Maru, que sin su ayuda no hubiera podido nunca terminar, y principalmente empezar, esta maestría.

Gracias a todos ustedes, porque el aprendizaje no se hace solo, y es imposible lograrlo sin generar comunidad, redes, apoyo. Gracias también a la universidad pública, gratuita y de calidad, que me permitió llegar hasta donde estoy hoy.

Índice

1. INTRODUCCIÓN	11
1.1 Antecedentes: la hemofilia	12
1.1.1 Breve Reseña Histórica	12
1.1.2. El balance hemostático	14
1.1.3 Las diferencias genótípicas en la Hemofilia A. Patrones de Herencia	16
1.1.4 Genética molecular de la Hemofilia A: características del F8 humano y variantes causales	17
1.1.5 Aspectos clínicos y terapéuticos en hemofilia: inhibidores	20
1.2 Herramientas moleculares para el estudio de ancestría	25
1.3 El problema de investigación	26
1.4 Justificación	27
1.5 Pregunta de investigación	28
1.6 Hipótesis	28
1.7 Objetivos generales y específicos	29
1.8 Organización del trabajo	30
2. MARCO TEÓRICO	31
2.1 Antropología Biológica	32
3. MATERIALES y MÉTODOS	37
3.1 Muestreo	38
3.2 Extracción de ADN	39
3.3 Estimación del tipo de variante presente en el F8	40
3.4 Análisis de marcadores genéticos biparentales para estimar la ancestría genética	41
3.4.1. PCR	42
3.4.2 Geles para electroforesis	49
3.5 Estimación de ancestría genética	52
3.6 Análisis Estadístico	54

4. RESULTADOS	55
4.1 PCR-APLP-Múltiplex	56
4.2 PCR-APLP individuales	58
4.3 PCR-RFLP	59
4.4 Ancestría individual	62
4.5 Ancestría poblacional	66
5. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	71
5.1 Conclusiones finales	77
6. BIBLIOGRAFÍA	78
7. ANEXOS	99
ANEXO I	100
ANEXO II	102
ANEXO III	106
ANEXO IV	110
ANEXO V	113

Índice de Figuras y Tablas

Figuras

Figura 1.1: Línea temporal de la Hemofilia.....	14
Figura 1.2: Balance hemostático.....	15
Figura 1.3: Patrón de herencia de la hemofilia.....	17
Figura 1.4: Estructura del gen F8.	18
Figura 1.5: Mutaciones causales de HA en el F8.	19
Figura 1.6: Factores que influyen el riesgo para el desarrollo del inhibidor.	22
Figura 1.7: Desarrollo de anticuerpos contra el FVIII.	24
Figura 1.8: Diseño de cebadores.	26
Figura 3.1: Carga de datos en Excel con el complemento GenALEX.....	52
Figura 4.1: Electroforesis en gel de poliacrilamida de múltiplex 1-A.....	56
Figura 4.2: Electroforesis en gel de poliacrilamida del marcador 10510511.....	58
Figura 4.3: Electroforesis en gel de poliacrilamida del marcador FY*null.....	60
Figura 4.4: Electroforesis en gel de agarosa del marcador WI-7423.....	61
Figura 4.5: Diferentes agrupaciones.....	63
Figura 4.6: Ancestría individual.....	66
Figura 4.7: Ancestría con inhibidor.....	67
Figura 4.8: Ancestrías sin inhibidor.....	68
Figura 4.9: Gráfico de Cajas y Bigotes.....	69

Tablas

Tabla 1.1: Factores de Riesgo no modificables para el desarrollo de inhibidores.....	23
Tabla 3.1: Marcadores utilizados.....	42
Tabla 3.2: Etapas de las PCR para APLP. S.....	43
Tabla 3.3: Etapas de las PCR para RFLP.....	43
Tabla 3.4: Cebadores utilizados en múltiplex.....	46
Tabla 3.5: Cebadores utilizados en PCR-APLP.....	48

Tabla 3.6: Cebadores utilizados en PCR-RFLP.....	49
Tabla 3.7: Composición de los geles de poliacrilamida.....	49
Tabla 3.8: Condiciones de la corrida electroforética PCR-APLP.....	51
Tabla 3.9: Condiciones de la corrida electroforética PCR-RFLP.....	51
Tabla 4.1: Resultados de marcadores mediante múltiplex.....	57
Tabla 4.2: Resultados de marcadores mediante PCR-APLP.....	59
Tabla 4.3: Resultados de marcadores mediante PCR-RFLP.....	61
Tabla 4.4: Análisis de Hardy Weinberg.....	63
Tabla 4.5: Porcentaje de ancestría.....	65
Tabla 4.6: Promedios de ancestría.....	66
Tabla 4.7: Resultados estadísticos.....	70

Abreviaturas

aa: Aminoácidos	INDEC: Instituto Nacional de Estadística y Censos
a.C.: Antes de Cristo	INDEL: Inserción/delección
ADN: Ácido desoxirribonucleico	Inv1: Inversiones del intrón 1
ADNmt: ADN mitocondrial	Inv22: Inversiones del intrón 22
AIM: Marcadores Informativos de Ancestría	IS-PCR: PCR inversa
AMBA: Área Metropolitana de Buenos Aires	ITI: Tratamiento de inducción de inmunotolerancia
ANM: Academia Nacional de Medicina	Mb: Megabase
APC: Células presentadoras de antígenos	mM: Milimolar
ARN: Ácido ribonucleico	mm: Milímetros
CCPa: Concentrado del Complejo Protrombínico Activado	NCBI: National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine
CDC: Centro para el Control y Prevención de Enfermedades	pb: Pares de bases
CSGE: Electroforesis en gel de conformación sensible	PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
dL: Decilitro	PCR-APLP: Polimorfismo en la Longitud de los Productos Amplificados
Dup13: Duplicación en tándem del exón 13	PCR-RFLP: Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción
EAHAD: Asociación Europea para la Hemofilia y Trastornos Afines	PUP: Pacientes previamente no tratados
ED: Días de exposición	rs dbSNP: Código de referencia del polimorfismo de nucleótido único
EDTA: Etilen Diamin Tetra-Acetato	RT-PCR: PCR en tiempo real
<i>F8</i> : Gen del Factor F8	SNP: Single Nucleotide Polymorphism
<i>F9</i> : Gen del Factor F9	SSC: Simple sequence repeat
FIX: Factor IX	SSCP: Polimorfismo de conformación de cadena individual de ADN
FVIII: Factor VIII	STR: Short tandem repeats
GMH: Laboratorio de Genética Molecular de la Hemofilia	UB: Unidades Bethesda
gr.: Gramos	UI: Unidad Internacional
HA: Hemofilia A	VHC: Virus de la hepatitis C
HADB: Base de Datos de Hemofilia A	VIH: Virus de Inmunodeficiencia Humana
HB: Hemofilia B	μl: Microlitro
	χ ² : Chi cuadrado
	°: Grados Centígrados



1. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes: la hemofilia

La hemofilia es una enfermedad genética recesiva ligada al cromosoma X que afecta la coagulación sanguínea y se presenta en 1 de cada 5.000 varones a nivel mundial, se suele asumir que no hay diferencias relacionadas con la región geográfica. Existen dos tipos clínicamente indistinguibles: la hemofilia A (HA), causada por una deficiencia del factor VIII de coagulación (FVIII), y la hemofilia B (HB), causada por la deficiencia del factor IX. La HA es cinco veces más frecuente que la HB, y ambas resultan de mutaciones deletéreas en los genes *F8* y *F9* (Gitschier et al., 1984; Yoshitake et al., 1985).

La hemofilia se clasifica en grave —o severa—, moderada o leve según la cantidad de factor de coagulación presente en el plasma, lo que está estrechamente relacionado con la gravedad de los síntomas. Los casos severos, con niveles de factor por debajo de 1 % del valor normal —<1 UI/dL—, suelen provocar hemorragias espontáneas en músculos o articulaciones. En los casos moderados —1 a 5 UI/dL o 1 a 5%—, las hemorragias espontáneas son menos frecuentes, pero los sangrados prolongados ocurren tras traumatismos o cirugías menores. Por último, en los casos leves —5 a 40 UI/dL o 5 a 40%—, las hemorragias espontáneas son raras, aunque los traumas o cirugías importantes pueden desencadenar episodios graves (Srivastava et al., 2013). Aproximadamente el 40% de los casos son severos, el 10% moderados y el 50% leves (Graw et al., 2005).

En el año 2022 la población estimada de Argentina según el Instituto Nacional de Estadística y Censos (INDEC, 2022) fue de 45.892.285 habitantes, de los cuales 2.858 fueron reportados con Hemofilia según la Encuesta Global Anual realizada por la Federación Mundial de la Hemofilia en el año 2023, 2.468 pacientes con HA y 390 con HB (World Federation of Hemophilia, 2024).

1.1.1 Breve Reseña Histórica

Haciendo un recorrido histórico —Figura 1.1—, podemos encontrar diversas menciones a una enfermedad que si bien todavía no es nombrada como hemofilia, si podemos ver que comparte muchas características con esta. Una de las referencias más antiguas data del siglo III a.C., en el Talmud de Babilonia. En este texto se menciona la posibilidad de

eximir de la circuncisión al tercer hijo varón de una mujer que haya perdido a sus dos primeros hijos por complicaciones hemorrágicas relacionadas con este procedimiento. Encontramos relatos similares en los escritos realizados por Maimonides durante el siglo XII (Burgaleta Alonso de Ozalla, 2024; Schramm, 2014). John Conrad Otto describe una enfermedad similar en 1803. Este médico estadounidense describió un trastorno hemorrágico hereditario en varias familias en las que solo estaban afectados varones, cuya transmisión se produce a través de mujeres portadoras, quienes no manifiestan la enfermedad (Otto, 1996). Sin embargo, fue un médico alemán, Johann Lukas Schönlein y su estudiante Friedrich Hopff, quienes en 1828 utilizaron la palabra "Hemofilia" para describir esta condición (Schönlein, 1828).

La hemofilia ha sido históricamente llamada la "Enfermedad Real" debido a que la Reina Victoria de Inglaterra (1819-1901) era portadora de la enfermedad. No fue hasta el nacimiento de su octavo hijo, Leopold, en 1853, que se descubrió esta condición. Leopold padeció hemofilia, experimentando frecuentes hemorragias a lo largo de su vida, y falleció a los 31 años debido a una hemorragia cerebral tras una caída. Dos de las hijas de la Reina Victoria: Alice y Beatrice, también heredaron la condición y la transmitieron a sus descendientes, lo que llevó a la propagación de la hemofilia en varias casas reales de Alemania, España y Rusia. No hay antecedentes de hemofilia en los familiares de la Reina, por lo que se cree que fue resultado de una nueva mutación en uno de sus progenitores. Dentro de esta historia familiar, uno de los casos más conocidos de hemofilia es el de Alexei Tsarevich, hijo del zar Nicolás II y bisnieto de la Reina Victoria, quien ha sido retratado con su condición en numerosas obras literarias y cinematográficas, y que murió a los 14 años junto a su familia (1904-1918) (Ingram, 1976). Hoy en día, gracias a los avances en el estudio de ADN antiguo, se ha determinado que la "Enfermedad Real" era Hemofilia B, causada por una mutación puntual que afectaba un sitio de *splicing* en el gen *F9* (IVS3-3A>G) (Rogaev et al., 2009).

Desde nuestro país también ha habido avances científicos que ayudaron a comprender mejor esta enfermedad. En 1947, Alfredo Pavlovsky en Buenos Aires descubrió que al mezclar plasma de dos pacientes hemofílicos diferentes, denominados "H1" y "H2", el tiempo de coagulación del plasma receptor se normalizaba temporalmente (Pavlovsky, 1947). Con el tiempo, y después de varias observaciones adicionales, Biggs y sus colegas identificaron una forma distinta de la hemofilia A, a la que llamaron "enfermedad de

Christmas" por el apellido del paciente afectado (Biggs et al., 1952), hoy conocida como hemofilia B.

En 1962, un comité internacional asignó números romanos a los factores proteicos involucrados en el proceso de coagulación, nombrando como factor VIII al que es deficiente en la hemofilia A (Wright, 1962). En 1964, Macfarlane y Ratnoff desarrollaron de manera independiente un modelo de los eventos que conducen a la coagulación sanguínea, conocido como la cascada de coagulación (Davie & Ratnoff, 1964; De Brasi et al., 2001; Macfarlane, 1964). A partir de estas investigaciones y sus resultados, se generalizó el uso de transfusiones para la segunda mitad del siglo XX, mejorando notablemente la esperanza de vida de los pacientes con hemofilia.

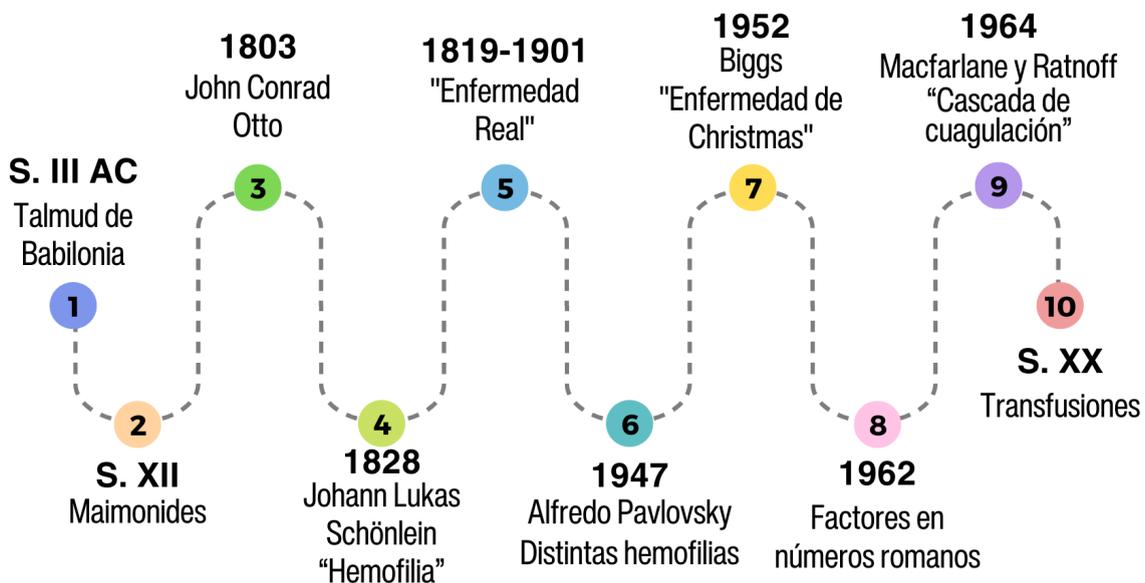


Figura 1.1: Línea temporal de la Hemofilia. Se encuentran detallados eventos relevantes en la historia de la hemofilia: sus primeras descripciones, las primeras menciones con su nombre tal como se la conoce actualmente y los avances en su entendimiento.

1.1.2. El balance hemostático

La coagulación sanguínea es un proceso complejo y altamente regulado que evita la pérdida excesiva de sangre tras una lesión. Este proceso se lleva a cabo a través de una serie de reacciones en cadena, donde las proteínas de coagulación, factores, se activan unas a otras de manera secuencial. Como puede visualizarse en la Figura 1.2, los factores VIII y IX

juegan un papel crucial. El factor IX es activado por el factor XIa y, una vez activado (FIXa), se asocia con el factor VIII activado (FVIIIa) en la superficie de las plaquetas para formar un complejo. Aunque el factor VIII no tiene actividad enzimática por sí mismo, su presencia como cofactor es fundamental para aumentar la eficiencia de la activación del factor X, que es un paso clave en la cascada de coagulación (Páramo et al., 2009; Smith, 2009).

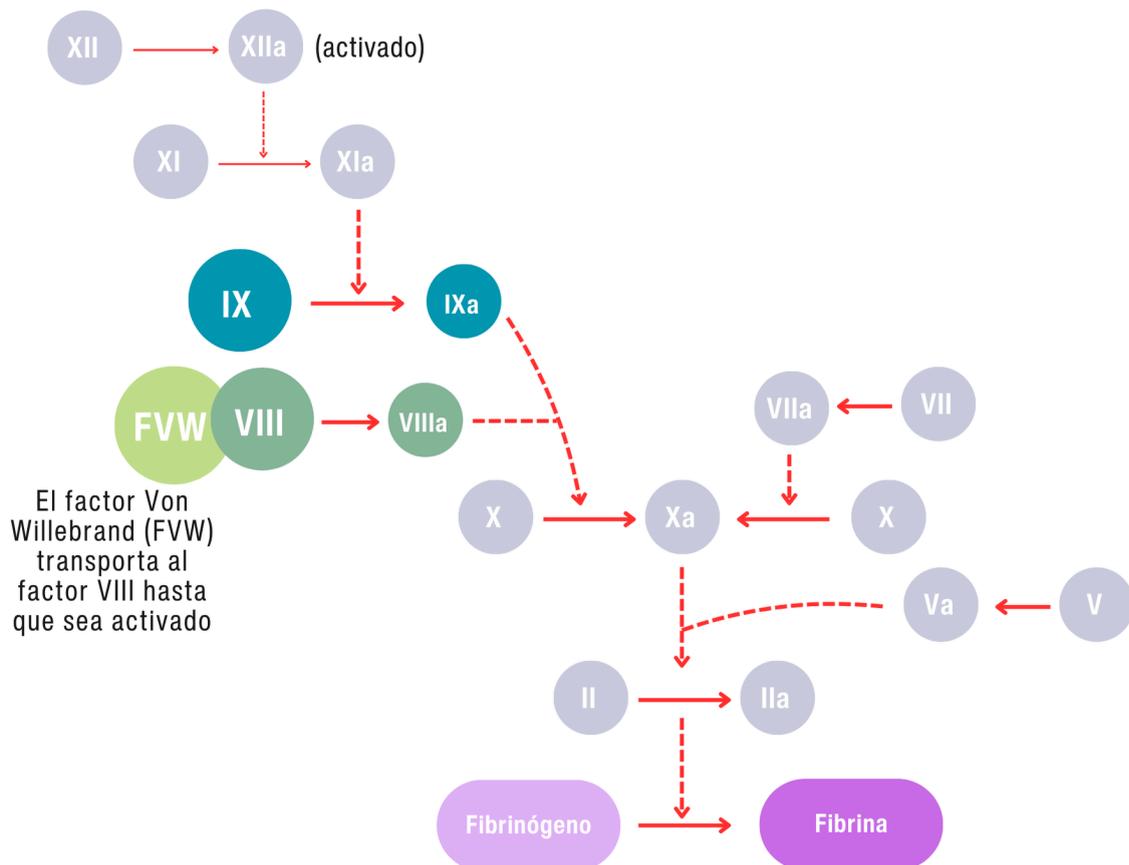


Figura 1.2: Balance hemostático. Esquema simplificado de la reacción en cadena de la activación de los factores que participan en la formación de coágulos sanguíneos. Se destacan los factores VIII y IX, involucrados en la HA y HB, respectivamente (*World Federation of Hemophilia, 2022*).

La interacción entre los factores VIII y IX es, por lo tanto, esencial para la activación del factor X. Ambos se combinan en la superficie de las plaquetas para formar un complejo que, en presencia de calcio y fosfolípidos, activa el factor X. Este paso es crucial, ya que el factor X activado (Xa) es el encargado de convertir la protrombina en trombina, lo que permite que el fibrinógeno se transforme en fibrina, creando una red que estabiliza el coágulo.

En el contexto de la hemofilia, la deficiencia de alguno de estos factores tiene un impacto significativo en el proceso de coagulación. En la hemofilia A, la ausencia o disfunción del factor VIII impide la formación del complejo necesario para activar el factor X, lo que compromete la formación del coágulo. En la hemofilia B, el defecto se encuentra en el factor IX, que también es fundamental para la activación del factor X. En ambos casos, la incapacidad de formar un coágulo funcional conduce a una predisposición a los sangrados característicos observados en la hemofilia.

1.1.3 Las diferencias genotípicas en la Hemofilia A. Patrones de Herencia

Los genes codificantes para estos factores se encuentran en el cromosoma X, lo que implica que la enfermedad es más prevalente en hombres, dado que los mismos tienen un solo cromosoma X en hemicigosis (46, XY), la presencia de una mutación en el gen *F8* o *F9* en su único cromosoma X es suficiente para que desarrollen hemofilia. Por otro lado, las mujeres tienen dos cromosomas X (46, XX), por lo que una mutación en uno de los genes puede estar compensada por una copia funcional del gen en el otro cromosoma X. Esto significa que las mujeres portadoras en heterocigosis de la mutación en uno de sus cromosomas X pueden no presentar la enfermedad, pero sí transmitirla a sus hijos varones. La mutación causal de Hemofilia A suele ser heredada dentro de una familia con más de un probando en el 70 % de los casos leves y moderados, y sólo en un 45 % de los casos severos, siendo el resto de los casos esporádicos (Kasper & Lin, 2007).

Cuando una mujer es portadora, existe un 50 % de probabilidad de que cada uno de sus hijos varones herede la enfermedad y un 50 % de que cada una de sus hijas sea portadora. En el caso de un hombre con hemofilia, todas sus hijas serán portadoras obligadas, mientras que ninguno de sus hijos varones estará afectado, como puede visualizarse en la Figura 1.3 (Kasper & Lin, 2007).

En la mayoría de los casos de hemofilia A severa, los pacientes presentan grandes inversiones cromosómicas en lugar de mutaciones puntuales, afectando principalmente el intrón 1 o el intrón 22 del gen *F8*. Estas inversiones son consecuencia de una reparación errónea de rupturas de doble cadena en el ADN, mediante un proceso de recombinación homóloga no alélica. Otros tipos de alteraciones asociadas a la hemofilia A grave incluyen deleciones, inserciones y mutaciones puntuales de sentido erróneo. Por otro lado, las formas

moderadas o leves de hemofilia A suelen ser causadas por mutaciones sin sentido en el gen *F8* (Kasper & Lin, 2007).

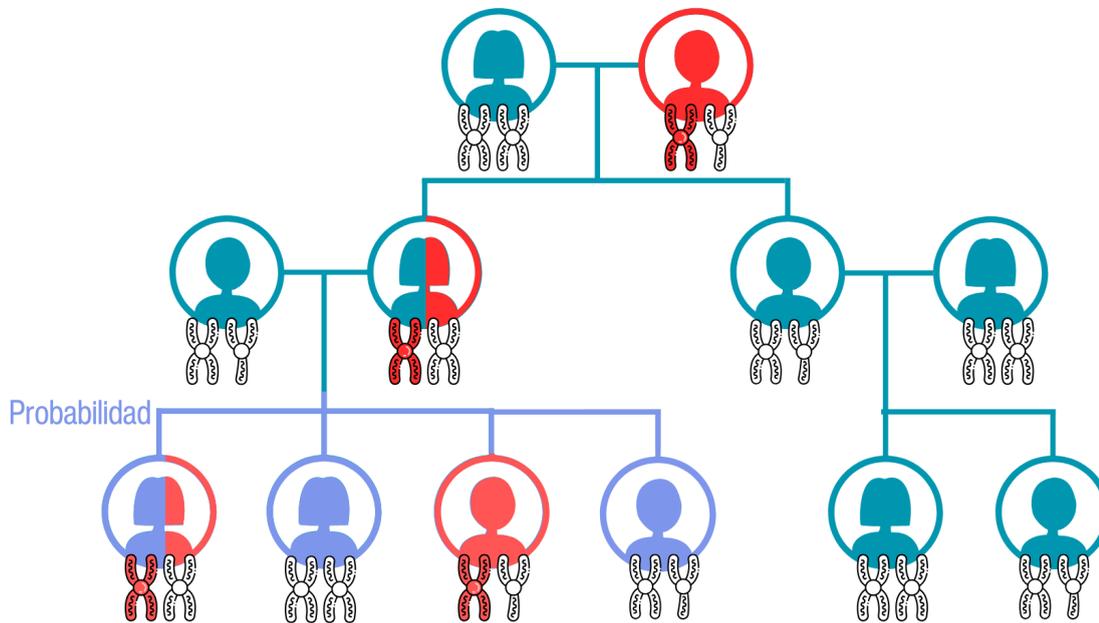


Figura 1.3: Patrón de herencia de la hemofilia. Herencia ligada al sexo, en la primera generación, un cromosoma X con un gen mutante, indicado en rojo, se transmite de un varón afectado de Hemofilia a todas sus hijas (portadoras obligadas) pero a ninguno de sus hijos varones. Las hijas heterocigotas se indican con círculos medio llenos de rojo. En la segunda generación, un cromosoma X con un gen mutante, indicado en rojo, se transmite de una madre heterocigota a la mitad de sus hijos varones y a la mitad de sus hijas, en promedio, como puede observarse en la tercera generación.

1.1.4 Genética molecular de la Hemofilia A: características del *F8* humano y variantes causales

El *F8* se ubica en la última megabase (Mb) del brazo largo del cromosoma X, en la región Xq28. Ha sido el gen de mayor tamaño descrito hasta muchos años después de su aislamiento y caracterización en 1984, el mismo presenta 187 kilobases. Tiene una estructura compleja de 26 exones y 25 intrones. Dentro del intrón 22 se encuentra una secuencia de 9,5 kb denominada int22h-1, del inglés intron 22 *homologous*, pues existen dos copias ubicadas fuera del *F8*, a 500 y 600 kb hacia el telómero Xq, int22h-2 e int22h-3, respectivamente, inversamente orientadas entre sí —Figura 1.4—. Estas copias tienen una homología del 99,9

% y están involucradas en el mecanismo que origina casi el 50 % de las HA severas, la inversión del intrón 22 (Inv22).

La secuencia nucleotídica del ARNm del *F8*, predice una proteína madura de 2.332 residuos de aminoácidos (aa), excluyendo los 19 residuos del péptido señal que lidera la exportación de la proteína y es removido en el factor secretado. Residuos aa FVIII: 1-19 —péptido señal—, 20-1332 —cadena pesada—, 1668-2351 —cadena liviana—. La estructura primaria del FVIII maduro muestra tres tipos distintos de dominios en el orden: NH₂-A1_a1_A2_a2_B_a3_A3_C1_C2-COOH; a1, a2 y a3 son pequeños dominios importantes para la actividad procoagulante (Vehar et al., 1984).

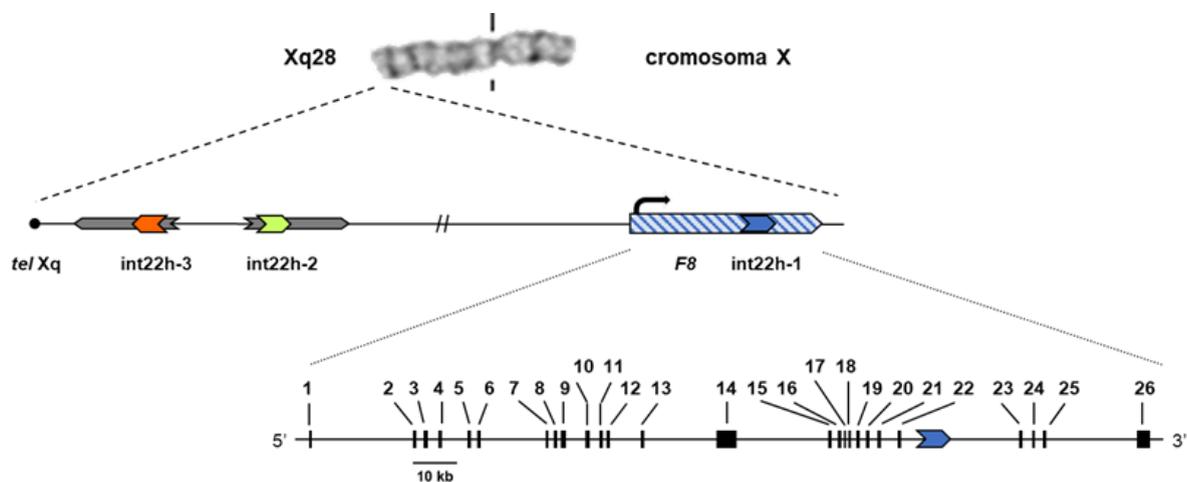


Figura 1.4: Estructura del gen *F8*. Localización cromosómica y características moleculares del gen *F8* humano sobre Xq28. En la parte superior se presenta el cromosoma X humano visible por bandeo G. En el centro se indica la orientación de transcripción del gen *F8* y la orientación y ubicación de las secuencias homólogas *int22h-1*, *int22h-2* e *int22h-3*. En la parte inferior se muestra la orientación del gen, el tamaño y estructura exónica (en escala) del *F8*. Adaptado de Marchione (2018).

El gen *F8*, debido a su gran tamaño y compleja estructura, es propenso a una variedad de defectos moleculares. Entre los más comunes en la hemofilia A severa se encuentran las inversiones del intrón 22 (Inv22) (Lakich et al., 1993; J. Naylor et al., 1993) y del intrón 1 (Inv1) (Bagnall et al., 2002), que representan el 42 % (Antonarakis et al., 1995; C. De Brasi et al., 2000) y el 2 % (Rossetti et al., 2004) de los casos graves, respectivamente. La Inv22, originada mayormente durante la meiosis masculina (Rossiter et al., 1994), se produce a través de un mecanismo de recombinación homóloga no alélica entre la copia intragénica *int22h-1* y las copias teloméricas *int22h-2* o *int22h-3*, generando dos tipos de patrones de inversión —tipo I y tipo II— (Bagnall et al., 2006; C. D. De Brasi & Bowen, 2008; Naylor et al., 1995). A su vez, la recombinación entre *h1* con copias *int22h* igualmente

orientadas puede provocar deleciones o duplicaciones, pero no inversiones (Bagnall et al., 2006). Un polimorfismo de inversión, que genera alelos h123 —80%—, y h132, —20%—, explica la aparición de los distintos tipos de Inv22 (Bagnall et al., 2006). De manera similar, la inversión del intrón 1 ocurre debido a recombinación entre secuencias homólogas repetidas en int1h (Bagnall et al., 2002). Otra mutación frecuente es la duplicación en tándem que incluye el exón 13 (Dup13), responsable del 32 % de los casos leves de hemofilia A en el norte de Italia. La Dup13 genera dos tipos de transcritos, debido a procesos de *splicing* alternativo: uno con el exón duplicado y otro sin alteraciones, este último asociado a una actividad residual de FVIII:C y al fenotipo leve (Acquila et al., 2005).

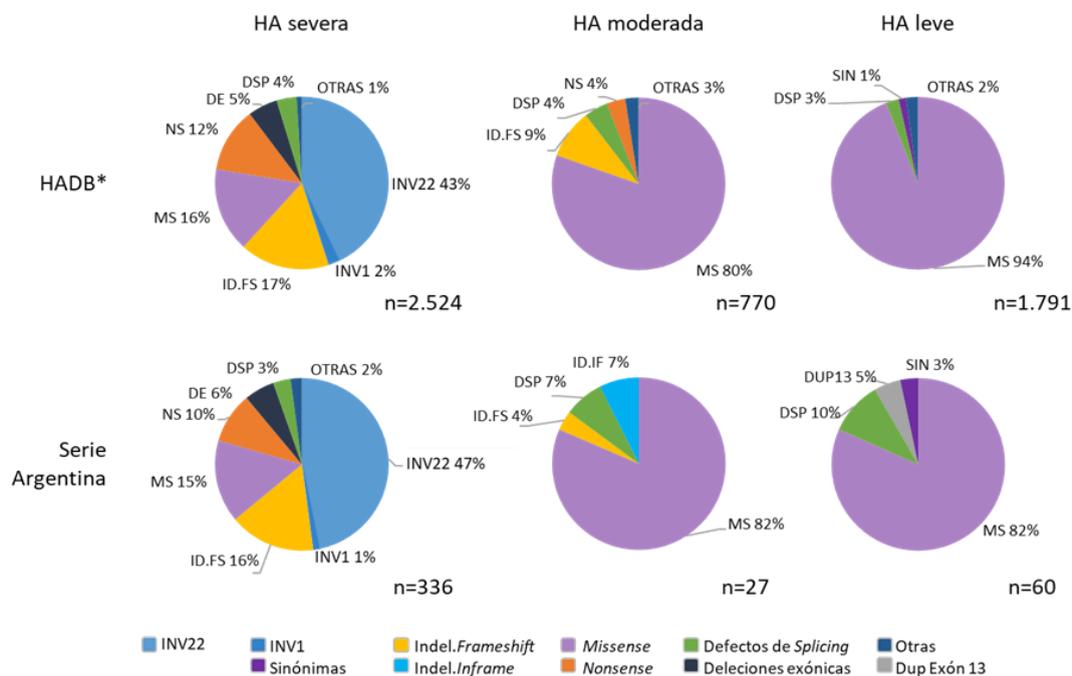


Figura 1.5: Mutaciones causales de HA en el F8. Por columnas se muestran las distintas severidades de HA. En la fila superior se muestra la frecuencia de mutaciones en la HADB, otras: mutaciones con frecuencias menores al <1%, en HA severa: indel.inframe, Inserciones y mutaciones sinónimas; en HA moderada: grandes deleciones, mutaciones sinónimas e indel.inframe; y en HA leve: mutaciones en 5'UTR, indel.inframe, indel.frameshift, nonsense y duplicación inframe del Exón 13. En la fila inferior se muestra la frecuencia de mutaciones observada en familias de nuestra población con HA, otras: en HA severa: indel.inframe y mutaciones sinónimas. *Datos obtenidos de la literatura y de la Base de Datos Internacional de HA (McVey et al., 2020).

En otros casos de hemofilia A, tanto graves como moderados y leves, se detectan diversas mutaciones a lo largo del gen F8, incluidas grandes deleciones parciales o totales. También se observan pequeñas deleciones e inserciones (indel) que pueden mantener (*inframe*) o alterar el marco de lectura (*frameshift*), provocando codones de terminación

prematurados, así como mutaciones puntuales asociadas a cambios deletéreos que afectan la secuencia de aminoácidos (*missense*), crean codones de terminación (*nonsense*) o alteran el correcto procesamiento del ARN mensajero, defectos de *splicing* —Figura 1.5—.

Actualmente, todas las variantes asociadas a HA se encuentran registradas y actualizadas en bases de datos internacionales de libre acceso, como la del gen del FVIII (*F8*), HADB (Base de Datos de Hemofilia A)¹ por parte de la Asociación Europea para la Hemofilia y Trastornos Afines (EAHAD) (McVey et al., 2020).

Es de destacar que la inversión 22 del intrón 22 (Inv22) es la mutación causal de HA severa más común en la población tanto internacional como nacional —Figura 1.5—. En pacientes varones de Argentina la Inv22 tipo 1 representa el 39%, mientras que la Inv22 tipo 2 representa el 8% (Marchione, 2018).

1.1.5 Aspectos clínicos y terapéuticos en hemofilia: inhibidores

El tratamiento de la hemofilia se centra en el control de los episodios de sangrado mediante la administración de los factores de coagulación que el paciente necesita, ajustados a su perfil clínico. La infusión intravenosa de concentrados del factor de coagulación deficiente puede realizarse por administración al momento de una hemorragia para detenerla —tratamiento episódico o a demanda—, o en pequeñas dosis de forma regular —profilaxis— para prevenir eventos. Este último caso es el utilizado en pacientes con hemofilia severa. Los regímenes profilácticos actuales, aunque muy eficaces, no previenen completamente las enfermedades de las articulaciones en una perspectiva a largo plazo (Marchione, 2018).

En los años 1984 y 1985 se aislaron y caracterizaron mediante clonado molecular los genes *F8* (Gitschier et al., 1984; Toole et al., 1984; Vehar et al., 1984; Wood et al., 1984) y *F9* (Yoshitake et al., 1985) lo que permitió la producción *in vitro* del FVIII y FIX con fines terapéuticos. Esta innovación permitió evitar uno de los grandes problemas a los que se enfrentaron los pacientes con Hemofilia a quienes les administraron plasma de personas no hemofílicas: las infecciones con virus como el VIH y el VHC.

La complicación actual más seria asociada al tratamiento de la Hemofilia es el desarrollo de aloanticuerpos que neutralizan el FVIII administrado terapéuticamente

¹ <http://dbs.eahad.org/>

—inhibidor—. Como consecuencia del desarrollo de inhibidor, la terapia de reemplazo tradicional se vuelve inefectiva, y es necesario el cambio a terapias hemostáticas alternativas, usando agentes *bypaseantes* —neologismo derivado del término inglés *bypassing*, agentes que estimulan la coagulación por vías independientes a la del complejo Xasa— como el FVIIa recombinante y el CCPa (Concentrado del Complejo Protrombínico Activado) para controlar las hemorragias severas, los cuales son menos eficientes y más costosos (Teitel, 2018; Tomeo et al., 2021).

Los inhibidores se subclasifican como de alta respuesta (≥ 5 UB/mL) y baja respuesta (< 5 UB/mL), y el título de inhibidor puede cambiar con el tiempo, en algunos casos inhibidores de baja respuesta son transitorios y desaparecen sin tratamiento dentro de los seis meses de la documentación inicial, mientras que otros, permanecen con título bajo o se incrementan en las posteriores exposiciones a productos, y pueden ser completamente suprimidos o erradicados, con un régimen de inducción de inmuno-tolerancia (ITI), tratamiento exitoso en el 60-80 % de los casos. El régimen de ITI implica la administración repetida a largo plazo de altas dosis de FVIII, similar a la profilaxis, para inducir una disminución en la respuesta inmune, lo cual convierte a esta terapia en un proceso muy costoso —alrededor de €60.000 por mes— y que puede tomar varios años para que la tolerancia se establezca (Schep et al., 2018). Actualmente, se estima que entre el 20-30% de los pacientes con hemofilia A severa desarrollan inhibidores, principalmente en los primeros 50 días de exposición al FVIII (EDs, días de exposición). La mayoría de los pacientes previamente no tratados (PUPs, por sus siglas en inglés) desarrollan inhibidores después de los primeros 10-15 EDs, y la incidencia acumulada de inhibidores tiende a estabilizarse después de los 50-75 EDs (Hermans et al., 2012). En pacientes con hemofilia A leve o moderada, la incidencia de inhibidores es menor, entre el 5-7 % (Wight & Paisley, 2003). Sin embargo, el riesgo persiste a lo largo de la vida, dado que estos pacientes generalmente no son tratados con concentrados de FVIII, sino con Desmopresina, una opción más segura y económica para su tratamiento. Los inhibidores en estos casos suelen aparecer tras un tratamiento intensivo asociado a una cirugía (Paul et al., 2023).

Diversos estudios han intentado desentrañar los complejos mecanismos patofisiológicos que conducen al desarrollo de inhibidores del FVIII. A pesar de estos esfuerzos, la etiología exacta de este fenómeno inmunológico aún no está completamente esclarecida. Se considera que el desarrollo de inhibidores es multifactorial, y está

influenciado tanto por factores genéticos, no modificables, como por factores ambientales, modificables —Figura 1.6—. Además de la severidad de la Hemofilia, se han identificado dos factores de riesgo no modificables bien definidos: el tipo de mutación causante en el gen *F8* y los antecedentes familiares de inhibidores. Las mutaciones que impiden la producción endógena de FVIII —mutaciones nulas—, como las grandes deleciones, las mutaciones sin sentido y, teóricamente también, las prevalentes inversiones del intrón 22, están asociadas con un mayor riesgo de desarrollar inhibidores —Tabla 1.1—. Esto sugiere que la introducción de un nuevo antígeno en el sistema inmune del paciente es el principal desencadenante en la formación de inhibidores (Hay, 1999).

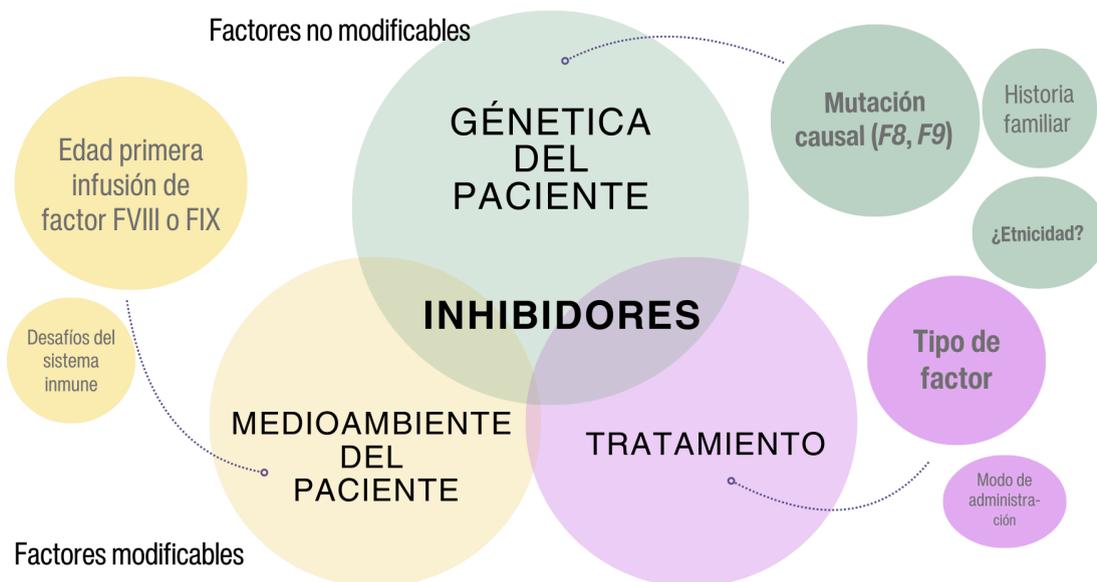


Figura 1.6: Factores que influyen en el riesgo para el desarrollo del inhibidor. Círculo verde: factores no modificables. Círculos amarillo y violeta: factores modificables. Adaptado de Carcao y Goudemand (2018).

Entre los factores de riesgo modificables —Figura 1.6—, considerados desafíos del sistema inmune, se encuentran la edad en la que comienza el tratamiento, así como el régimen y la intensidad de este en las primeras exposiciones, los cuales pueden influir en el desarrollo de inhibidores. Otro factor puede ser el tipo de concentrado de FVIII empleado —por ejemplo, FVIII derivado de plasma frente a FVIII recombinante—. Algunos estudios han señalado una menor incidencia de inhibidores con el uso de concentrados derivados de plasma, aunque esto puede estar relacionado con la existencia de factores de confusión. Además, se han identificado otras variables de riesgo en relación con señales de peligro

inmunológico, como sangrados graves, cirugías, infecciones y vacunaciones, que podrían desencadenar una respuesta inmune inespecífica (Astermark et al., 2013).

Tipo de Mutación		Riesgo de formar inhibidores a nivel mundial (Carcao & Goudemand, 2018)	Riesgo de formar inhibidores en Argentina (n=123) (Marchione et al., 2017)
Nula	Deleciones multidominio	≈75%	87%*
	Mutaciones sin sentido de cadena liviana	30-40%	25%
	Inversión del intrón 22	20-25%	25%*
	Deleciones de dominio único	15-25%	23%
	Pequeñas deleciones/inserciones en zona no A**	15-20%	12%
	Mutaciones sin sentido en cadena pesada	10-20%	24%
No nula	Mutaciones de sentido erróneo del FVIII	<10%	1%*
	Pequeñas inserciones/ deleciones en zona A**	<5%	12%
	Mutaciones en el sitio de corte y empalme	<5%	12%

Tabla 1.1: Factores de Riesgo no modificables para el desarrollo de inhibidores. Se muestran los datos según tipo de mutación, para la población mundial y para la población argentina. *valor P significativo; ** región homopolimérica de nucleótidos Adenina

La generación de anticuerpos anti-FVIII exógeno sigue una respuesta inmune clásica. En este proceso —Figura 1.7—, tras la exposición inicial al FVIII, la proteína es internalizada por células presentadoras de antígenos (APCs), que luego la presentan a las células T helper CD4⁺ en el contexto del complejo HLA tipo II. Ante un entorno proinflamatorio y activador, con un aumento de las señales coestimuladoras, las células T CD4⁺ específicas para el FVIII se activan y diferencian, ayudando a las células B específicas a expandirse y convertirse en células plasmáticas productoras de anticuerpos anti-FVIII, o en células B de memoria (Astermark, 2015). Los anticuerpos anti-FVIII son policlonales, mayormente de tipo IgG, con una alta prevalencia de IgG4 (Irigoyen et al., 2017). Aunque

estos anticuerpos inhibidores reconocen múltiples epítopes, los dominios A2 y/o C2 del FVIII son los objetivos más comunes (Schep et al., 2018).

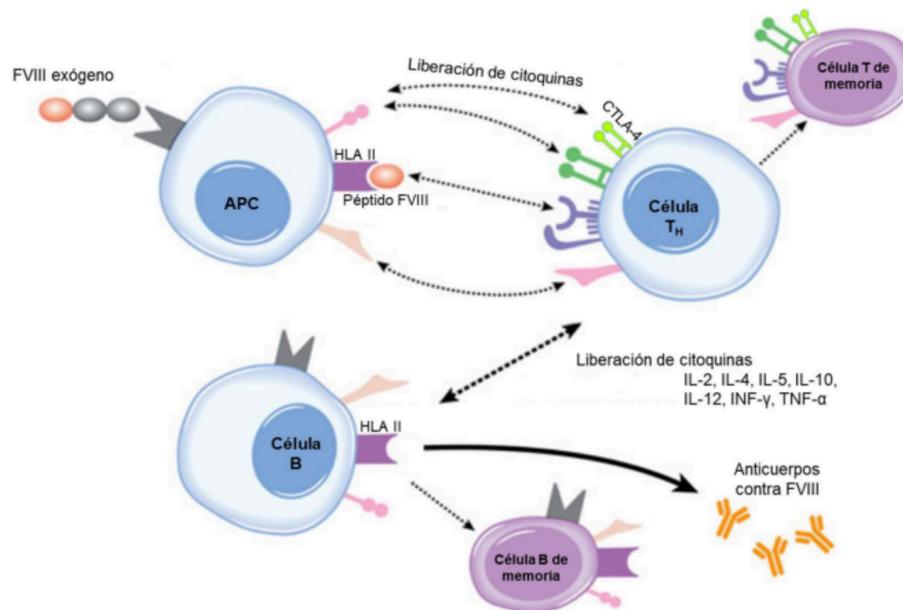


Figura 1.7: Desarrollo de anticuerpos contra el FVIII. Las moléculas de FVIII administradas pueden desencadenar una respuesta inmune, en la cual las células T y B cooperan para producir anticuerpos. Este proceso implica la presentación del FVIII por células especializadas y la activación de células T, lo que conduce a la producción de anticuerpos y células de memoria. Adaptado de Astermark y otros (2014) y Marchione (2018).

El riesgo de desarrollar inhibidores en familias con antecedentes de inhibidores es tres veces mayor que en aquellas sin historia previa, lo que indica una alta concordancia dentro de las familias. De hecho, los gemelos idénticos muestran un grado de concordancia superior al de los hermanos no gemelos (Astermark et al., 2001) y se han reportado asociaciones significativas entre la formación de inhibidor y la presencia de polimorfismos en genes codificantes de citoquinas y otras moléculas inmunoregulatorias: IL10, TNFA, CTLA4, en varios grupos poblacionales (Oldenburg & Pavlova, 2006) con diferentes resultados (Pavlova et al., 2009). Recientemente en nuestro laboratorio de GMH-ANM se analizaron variantes en los genes indicados y se encontró una asociación significativa para la variante *missense* p.Thr17Ala (c.49A>G) en CTLA4 como factor de riesgo de inhibidor en pacientes argentinos con HA severa y no en los otros marcadores, indicando la importancia de recabar información sobre cada grupo poblacional (Marchione et al., 2016, 2017).

Además, se ha observado que ciertos factores del huésped también influyen en el desarrollo de inhibidores, como puede ser la etnicidad. Los pacientes con ascendencia africana con hemofilia A e inversión del intrón 22 tienen un riesgo 2-3 veces mayor de desarrollar inhibidores que los pacientes caucásicos (Gunasekera et al., 2015). Según Viel y otros (2009), la mayor prevalencia de inhibidores en afroamericanos puede explicarse por la falta de coincidencia entre los haplotipos de FVIII de la población afroamericana y los productos terapéuticos utilizados. Sin embargo, otros estudios han mostrado un riesgo aumentado en pacientes afroamericanos con la inversión del intrón 22, incluso cuando sus haplotipos coinciden con las isoformas caucásicas del FVIII, sugiriendo que los mecanismos subyacentes a estas diferencias aún no están completamente comprendidos (Gunasekera et al., 2015). Esto nos demuestra que hay otros factores genéticos relacionados con el huésped que influyen en el desarrollo del inhibidor en HA y nos impulsa a estimar estos parámetros en nuestra región.

1.2 Herramientas moleculares para el estudio de ancestría

La hemofilia es un trastorno hereditario de la coagulación sanguínea causado por mutaciones en los genes que codifican para los factores de coagulación VIII o IX. El diagnóstico y la caracterización de estas mutaciones son fundamentales para comprender la enfermedad y desarrollar terapias adecuadas. En este trabajo, se emplearon diversas técnicas de biología molecular para estimar la mezcla génica y la ancestría individual en pacientes con hemofilia.

En primer lugar, se utilizó la técnica de PCR-APLP (Polimorfismo en la Longitud de los Productos Amplificados) para identificar polimorfismos de nucleótido único (SNP) asociados a la ancestría. En algunos casos, se implementó un enfoque multiplex para analizar múltiples SNP simultáneamente. Se siguió la propuesta de Patiño (2020), que consiste en el diseño de cebadores modificados que reconocen variantes alélicas específicas. Para cada SNP, se utilizaron tres cebadores: uno para el alelo ancestral, otro para el alelo variante y un tercero común a ambos alelos —Figura 1.8—.

Además, se empleó la técnica de PCR estándar para identificar marcadores genéticos específicos asociados a inserciones o deleciones de secuencias Alu. Los productos de PCR se

visualizaron mediante electroforesis en gel para determinar el tamaño de los fragmentos y detectar las diferencias de peso molecular.

Otra técnica utilizada en la identificación de polimorfismos es la digestión enzimática de PCR-RFLPs —polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción—, esta técnica permite observar diferentes patrones de lectura al amplificar alelos de un mismo gen que difieren por la presencia de un sitio de restricción variable. Este método no se basa en un cambio identificable de la expresión de caracteres morfológicos o funcionales, sino en la detección de aquellas variantes de la secuencia del ADN (codificante o no) que tienen como consecuencia la pérdida o ganancia de sitios de restricción (Cabrera & Sánchez, 2001).

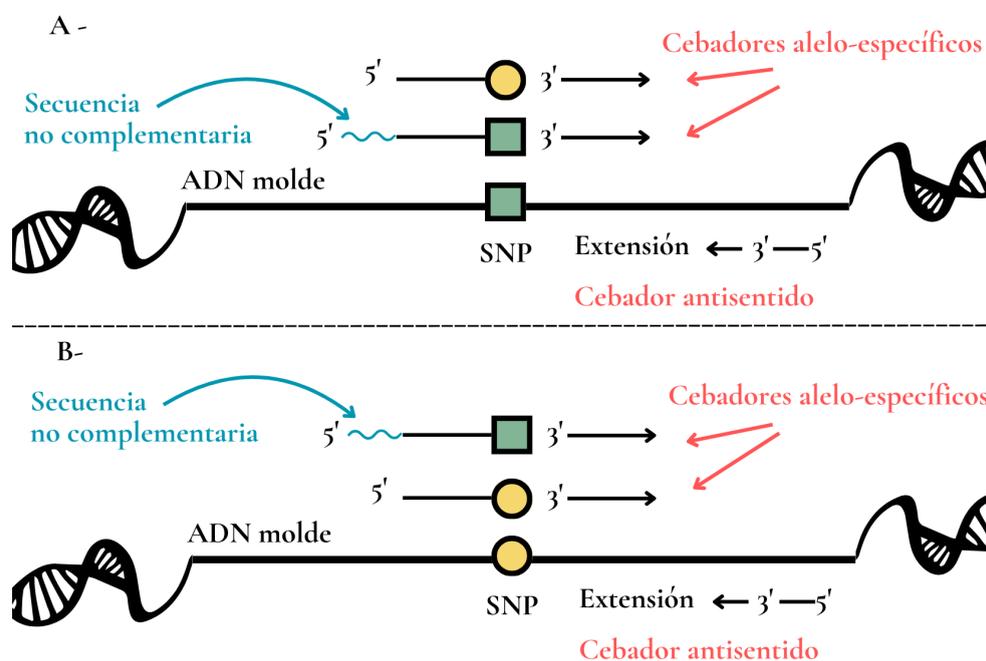


Figura 1.8: Diseño de cebadores. Se detallan los dos cebadores alelos específicos, diseñados para identificar las variantes esperadas, y el cebador antisentido que es igual para los dos anteriores. Modificado de Patiño (2020).

1.3 El problema de investigación

Los pacientes con HA son tratados eficientemente con concentrados de FVIII, permitiendo una expectativa de vida normal, sin embargo, el 20-30% de los casos con HA severa desarrollan anticuerpos neutralizantes —inhibidores— haciendo ineficaz la terapia de reemplazo.

Si bien se ha demostrado que el desarrollo del inhibidor del FVIII es un rasgo multifactorial y la relación más fuerte encontrada es con el tipo de mutación causal. Aquellas mutaciones que previenen la síntesis endógena de factor (*null mutations*), como grandes deleciones, mutaciones nonsense y la recurrente Inv22, están asociadas a un alto/moderado riesgo relativo a desarrollar inhibidor, mientras que mutaciones *missense*, pequeñas deleciones/inserciones y mutaciones que afectan el *splicing*, a un bajo riesgo. Sin embargo, algunos pacientes con mutaciones de alto riesgo no desarrollan el inhibidor, poniendo en evidencia que aún existen factores desconocidos.

Algunos estudios han reportado que personas afrodescendientes mostraron un mayor riesgo de inhibidor que “caucásicos” (Gunasekera et al., 2015; Viel et al., 2009), señalando la importancia que el origen poblacional puede tener entre estos otros factores genéticos.

Con este estado del conocimiento, se hace evidente la necesidad de realizar estudios en poblaciones específicas para estimar cada uno de factores de riesgo de inhibidor en cada región del mundo, caracterizadas por una composición poblacional y una cultura específica subyacente.

1.4 Justificación

Existe numerosa evidencia clínico-epidemiológica que muestra la asociación de determinadas variantes genéticas con indicadores de salud en ciertos grupos, indicando que el conocimiento de la composición de cada población y el origen de la ancestría de los individuos que la componen es de gran utilidad para generar y explorar hipótesis sobre factores de riesgo genéticos y ambientales locales y sus interacciones, de gran impacto en biomedicina (Peprah et al., 2015). Estas diferencias están asociadas a la frecuencia de las variantes genéticas que subyacen a la susceptibilidad de cada enfermedad, condición o indicador de salud. Esa relación puede evidenciarse, muy sucintamente, en los siguientes ejemplos: el grado de componente ancestral europeo en mujeres latinas se relaciona con un riesgo incrementado de cáncer de mama (Fejerman et al., 2014); el componente amerindio se asocia a mayor vulnerabilidad ante el lupus eritematoso (Sanchez et al., 2011; Seldin et al., 2008), el componente ancestral afroamericano en la población americana e hispanolatina se asocia a mayor vulnerabilidad ante la enfermedad renal (Kramer et al., 2017), los melanomas

son más comunes en los europeos, la hipertensión en los subsaharianos y la diabetes tipo II en amerindios (Bertoni, 2011). Park y otros (2017) analizaron las frecuencias de varios tipos de cáncer en distintas poblaciones a nivel mundial, encontrando mayores valores de tumores de próstata en africanos, de mamas en personas de ascendencia europea, y colorectal, esófago y pulmón en asiáticos del este.

La estimación de ascendencia individual mediante AIMs (Marcadores Informativos de Ascendencia, por su sigla en inglés), adquiere gran relevancia en el estudio de la composición poblacional en regiones como Sudamérica, que han atravesado intensos procesos de mestizaje, lo que también tiene implicancia en ciencias de la salud (Russo et al., 2016). Conocer cómo está compuesta la población tiene importancia en biomedicina, ya que la presencia de los aportes autóctonos y subsaharianos nos previene acerca del error de asumir que las patologías con bases genéticas de distribución poblacional diferencial registraron las mismas frecuencias en nuestro país que en Europa (Avena et al., 2006).

Por lo tanto, consideramos fundamental profundizar en el conocimiento sobre el desarrollo del anticuerpo inhibidor. Esto nos permitirá optimizar la selección de tratamientos, adaptándolos a las necesidades individuales de cada paciente y, en consecuencia, mejorar significativamente su calidad de vida.

1.5 Pregunta de investigación

¿Requiere la población argentina, de acuerdo a su mestizaje, tratamientos individualizados para la Hemofilia diferentes a los usados típicamente en las sociedades europeas?

1.6 Hipótesis

Hipótesis principal:

Los pacientes con Hemofilia A severa que desarrollan el anticuerpo inhibidor de la terapia tienen un origen común de sus antepasados, con un mayor aporte africano, diferente a

quienes no desarrollan el anticuerpo inhibidor, cuyos antepasados presentan un origen distinto, con un mayor aporte europeo.

Hipótesis secundaria:

El origen de los antepasados de los pacientes con Hemofilia nos brinda información clave para entender el origen de la diversidad de las mutaciones que generan el fenotipo severo de dicha enfermedad, brindando información que nos permite indagar sobre otros factores que afectan el desarrollo o no del anticuerpo inhibidor de la terapia.

1.7 Objetivos generales y específicos

Objetivo General

Este proyecto tiene como objetivo principal la investigación de factores genéticos predisponentes y la influencia en el desarrollo del anticuerpo inhibidor en pacientes con HA severa. Se propone de esta forma analizar 60 familias argentinas mediante la estimación de la mezcla génica y la ancestría individual de uno de sus miembros, acompañado de un análisis estadístico caso control en pacientes estratificados por la mutación causal recurrente Inv22, para estimar localmente los factores de riesgo de inhibidor en nuestra población.

Estos datos permitirán identificar nuevos marcadores en pacientes argentinos con HA, que podrían modular el fenotipo hemofílico influenciando su potencial régimen terapéutico, conocer el perfil genético específico de cada paciente, y así clasificar a los pacientes en distintos grupos de riesgo, para ayudar al médico a predecir la eficacia de la terapia de reemplazo en cada caso particular.

Objetivos Específicos

- Validar la metodología propuesta —30 AIMS de herencia biparental— para la muestra trabajada.

- Estudiar AIMs en 30 individuos de la población estratificada por mutación causal (Inv22) de pacientes locales con HA severa **sin** desarrollo de anticuerpo inhibidor.
- Estudiar AIMs en 30 individuos de la población estratificada por mutación causal (Inv22) de pacientes locales con HA severa **con** desarrollo de anticuerpo inhibidor.
- Estimar la mezcla génica y la ancestría individual en pacientes con HA, específicamente con la mutación causal Inv22.
- Establecer el tipo de correlación existente entre el desarrollo del anticuerpo inhibidor anti FVIII y la ancestría individual.

1.8 Organización del trabajo

Este capítulo introductorio aborda los antecedentes de la enfermedad hemofílica e incluye una breve referencia a las herramientas moleculares empleadas. Además, se presenta la pregunta de investigación, la justificación, y los objetivos e hipótesis que guían el desarrollo de esta tesis.

En el segundo capítulo, se describe el marco teórico de la antropología biológica, proporcionando los fundamentos necesarios para contextualizar el estudio. El tercer capítulo detalla los materiales y métodos utilizados, especificando tanto los procedimientos realizados en el laboratorio como el análisis informático y estadístico implementado.

El cuarto capítulo expone los resultados obtenidos, tanto para la puesta a punto de la técnica como para el análisis de ancestría individual y poblacional. Finalmente, en el quinto capítulo, se desarrollan las discusiones y se presentan las conclusiones derivadas de esta investigación.

La tesis concluye con la bibliografía citada y los anexos, que incluyen aprobaciones del comité de ética y tablas complementarias con los resultados.



2. MARCO TEÓRICO

2.1 Antropología Biológica

La antropología biológica tiene como fin el estudio de la variabilidad biológica de los seres humanos. Dentro de la misma se encuentran una variabilidad de enfoques como pueden ser los estudios de genética de poblaciones, bioarqueología, biodemografía, como así también de crecimiento y desarrollo.

En particular, desde la antropogenética, el estudio genético de las poblaciones se centra en comparar diferentes grupos a partir de la identificación y la frecuencia de distintos marcadores moleculares. Resulta de particular interés el análisis de marcadores que presentan una distribución diferencial en las distintas poblaciones humanas.

Durante mucho tiempo, dentro de la arqueología existieron múltiples teorías sobre el origen de los hombres anatómicamente modernos, dato que no se podía saldar con la evidencia de restos humanos encontrados hasta ese momento. Con los avances en la genética, Cann, y otros (1987), se propusieron analizar el ADN mitocondrial (ADNmt) de las poblaciones actuales en los distintos continentes, viendo cuánto se diferenciaban unas de otras. El ADNmt se transmite por línea materna, de madres a hijos e hijas, esta característica junto con su tasa de mutación más rápida y mínima recombinación permitieron generar un buen reloj molecular. De esta forma pudieron identificar que los humanos, o al menos las mujeres humanas que transmitieron sus mitocondrias a sus hijas e hijos, provenían de África. Posteriormente, nuevos hallazgos arqueológicos dieron sustento a esta teoría que se denominó “La Eva Mitocondrial”.

Más adelante se pudo analizar el cromosoma Y, logrando hacer este mismo tipo de análisis, pero en el caso de los varones, ya que es heredado de padres a hijos (Jobling & Tyler-Smith, 2003; Karafet et al., 2008; Y Chromosome Consortium, 2002). Estos estudios dieron una información similar a la brindada por el ADNmt, dando mayor sustento a la teoría.

Actualmente, los estudios genéticos han abierto una multiplicidad de caminos posibles. Entre ellos se encuentra el avance en el ADN antiguo —extraer ADN de restos fósiles—, logrando analizar, por ejemplo, el ADN neandertal, por parte del grupo dirigido por el reciente ganador del Premio Nobel (2022): Svante Pääbo (Pääbo, 2014). Estas evidencias permitieron encontrar que compartimos gran parte del genoma, sustentando la teoría que

propone que el *Homo neanderthalensis* y el *Homo sapiens* pudieron tener crías viables, siendo que parte del genoma neandertal vive en nosotros hoy en día (Reilly et al., 2022).

El estudio de ADN en poblaciones actuales también ha crecido y tomado sus ramificaciones. Por un lado, sigue siendo importante el análisis de los marcadores uniparentales —ADNmt y Cromosoma Y—, ya que nos brindan información sexo-específica. En el caso del ADNmt, el primero en ser estudiado, se han definido distintos haplogrupos denominados con las letras del abecedario, cuya característica es contener ciertas variantes —inserciones, deleciones y/o mutaciones— respecto a una secuencia mitocondrial de referencia. Estos haplogrupos presentan distintas frecuencias en distintas regiones del planeta, y a su vez se han clasificado en sub-haplogrupos y haplotipos, más específicos². De esta forma se ha identificado el Macro-haplogrupo L originario de África subsahariana, mientras que en Europa uno de los haplogrupos más frecuentes es el H (Behar et al., 2012; van Oven & Kayser, 2009).

Entre estos estudios podemos destacar los que se elaboraron con el fin de conocer a los primeros pobladores de América: a través de muestras de sangre de poblaciones actuales los análisis de ADNmt definieron cuatro haplogrupos para sudamérica —A, B, C, D—, provenientes de Asia, donde existen también otros haplogrupos —por ejemplo M, F, E— además de los mencionados, evidenciando así un ingreso de solo algunos de los haplogrupos asiáticos en Sudamérica (Bodner et al., 2012; Brandini et al., 2018; Llamas et al., 2016; Perego et al., 2009; Tamm et al., 2007), incluso se pudo diferenciar al menos dos de las rutas tomadas dentro del continente, diferenciando los grupos que poblaron el Amazonas respecto a los que poblaron los Andes (Gómez-Carballa et al., 2018).

De igual manera, se ha analizado el cromosoma Y, de herencia paterna. Los haplogrupos también se han denominado con las letras del abecedario³, destacando el haplogrupo Q para América (Bailliet et al., 2009; Bisso-Machado et al., 2011; Bortolini et al., 2003; Jota et al., 2011). A modo de ejemplo, gracias a estos estudios, que son únicamente de herencia paterna, se ha podido estudiar genéticamente la población asiática de la región que va del Caspio al Pacífico, encontrando que un 8% comparte el mismo antepasado, probablemente Genghis Khan (Zerjal et al., 2003).

² La clasificación de cada haplogrupo y sus variantes puede verse detallada en el siguiente la página de Phylotree: <https://www.phylotree.org/tree/index.htm>.

³ La clasificación de cada haplogrupo y sus variantes puede verse detallada en el siguiente la página de Phylotree: <https://www.phylotree.org/Y/tree/index.htm>

Por otro lado, sumado a estas líneas de investigación mencionadas, encontramos dentro de la antropología biológica trabajos con marcadores genéticos biparentales. Es decir, de herencia tanto materna como paterna. Los marcadores biparentales nos brindan resultados que indican la ancestría de los distintos antepasados, lo que nos permite abordar el estudio de la estructura poblacional (Alexander et al., 2009; Li et al., 2008; Pritchard et al., 2000).

Se han utilizado diversas herramientas moleculares para llevar a cabo estos estudios: como técnicas de fluorescencia, PCR en tiempo real (RT-PCR), y polimorfismo de conformación de cadena individual de ADN (SSCP). Estas permiten estudiar la estructura poblacional de una ciudad al aportar información sobre la ancestría de diversos linajes. Entre los marcadores biparentales, los microsatélites, también conocidos como STRs (*short tandem repeats*) o SSC (*simple sequence repeat*), destacan como identificadores genéticos únicos. Estos marcadores se han aplicado en estudios de ancestría debido a las diferencias en las frecuencias de sus repeticiones en diversas poblaciones (Crossetti et al., 2008; Marcat et al., 2024; Silva et al., 2012).

Es de destacar que recientemente las tecnologías avanzadas han permitido la inclusión de una mayor cantidad de marcadores bialélicos, como los chips de ADN, que pueden analizar numerosas muestras simultáneamente. Este enfoque de análisis poblacional es altamente eficaz, aunque sus costos y requerimientos de equipos especializados limitan su accesibilidad (Huerta-Chagoya et al., 2019).

Buscando métodos que abaraten costos encontramos los Marcadores Informativos de Ancestría. Estos reflejan el origen continental de los ancestros biparentales de un individuo. Cada AIM tiene el poder de informarnos un origen continental determinado. Estos marcadores son SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*), e INDELS (Inserción/delección) seleccionados para maximizar la diferencia absoluta en la frecuencia alélica entre dos poblaciones ancestrales (Patiño, 2020).

La implementación de AIMS implica analizar 30 marcadores bialélicos, de herencia biparental, considerando que esta es una cantidad aceptable para la determinación del origen continental de la ancestría individual (Ruiz-Linares et al., 2014; Ruiz-Narváez et al., 2011; Russo et al., 2016). Dichos marcadores presentan frecuencias diferenciales entre las tres poblaciones que se consideran parentales para Argentina: nativa americana, europea —principalmente Italia y España— y africana-subsahariana y han sido seleccionados considerando la base de datos genómicos HapMap Fase III, tomando como criterio una

diferencia mayor del 40% entre una parental respecto a las otras dos, siendo a su vez la diferencia entre éstas menor al 5%, evitando así el enmascaramiento. Gracias a la distribución diferencial de sus frecuencias, los marcadores permiten calcular el grado de aporte de cada parental en la población receptora.

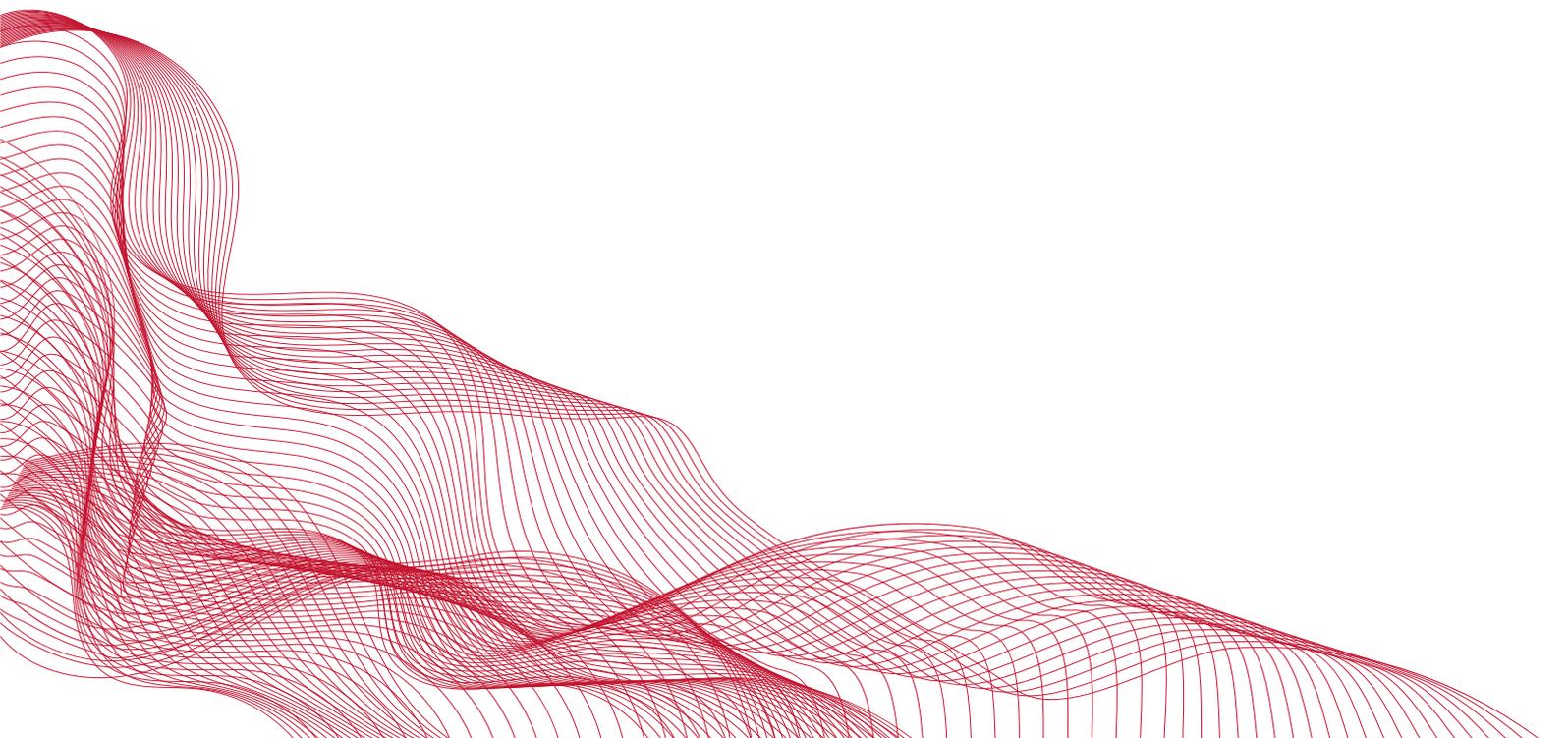
De los 30 marcadores propuestos por Patiño (2020), 29 se identificaron mediante el análisis de secuencias de ADN en los que se observan cambios puntuales de una base nucleotídica, mientras que el marcador restante corresponde a una mutación de inserción/delección de una secuencia Alu de 300 pares de bases. Las inserciones Alu ocurren como resultado de un evento mutacional único, y su estado ancestral es conocido. Esto permite, al igual que los SNPs, diferenciar variantes que presentan una distribución diferenciada entre distintas poblaciones humanas (Gómez Pérez et al., 2007). La inserción de la apo-lipoproteína A1 (código Genbank: rs3138522), generada por el gen APOA1, está relacionada con el metabolismo lipídico, promoviendo la movilización de colesterol de los tejidos hacia el hígado para su excreción. Esta variante con la inserción es predominante en la mayoría de las poblaciones fuera de África y en algunas subsaharianas (Doldan, 2014).

Entre los SNPs seleccionados, muchos están estrechamente asociados con la pigmentación de la piel y evidencian variaciones en la expresión de proteínas (EURO, SLC24A5, ROPN11, WI-11153, TYR192, WI-11909, códigos Genbank: rs734780, rs1426654, rs2278354, rs17203, rs1042602, rs695). Estos SNPs han sido documentados en estudios de ancestría y etnicidad en diferentes poblaciones globales (Lee et al., 2010; Pizarro et al., 2019; Shriver et al., 2003). En poblaciones afroamericanas, estos marcadores han sido usados para examinar fenotipos relacionados con el envejecimiento en adultos (TYR192, LPL, Genbank: rs1042602, rs285, Reiner et al., 2005), en estudios de mezcla poblacional (DRD2 Genbank: rs1800498, Kang et al., 2011), y como indicadores en estudios de asociación genética, incluyendo diabetes tipo 2 y enfermedad renal terminal (WI-7423, Genbank: rs2816, Keene et al., 2008) y la incidencia de hipertensión en mujeres jóvenes en relación con herencia genética e índice de masa corporal (KLHL29, Genbank: rs2288697, Taylor et al., 2010).

En poblaciones italiana y mexicana, ciertos SNPs (CYP19-E2, Genbank: rs4646) se han tipificado en estudios sobre cáncer de mama (Beltran-Sarmiento et al., 2016; Cocca et al., 2016) y también han mostrado relevancia en farmacogenómica (Bonifaz-Peña et al., 2014). Por otra parte, los polimorfismos en genes como el GC receptor de vitamina D (Genbank:

rs7041) se han relacionado con distintas enfermedades en poblaciones asiáticas (Wang et al., 2018), europeas (Miller et al., 2018), e iraníes (Nazemisalman et al., 2019), así como en estudios de ancestría en poblaciones multiétnicas (Lee et al., 2010). Además, el marcador FY*null (Genbank: rS2814778) está casi fijado en numerosas poblaciones africanas subsaharianas y generalmente ausente en Europa, Asia y América, se considera una ventaja adaptativa que ofrece resistencia contra el parásito *Plasmodium vivax*, causante de una forma grave de malaria (Mansilla, 2010). Para el resto de los polimorfismos, aunque no se conoce su función biológica, se eligieron debido a que, al igual que los anteriores, cumplen con la condición de presentar diferencias alélicas superiores al 40 % entre una población parental y las otras dos —euroasiática, nativo americana y afro-subsahariana—.

A partir de los avances y enfoques descriptos, podemos concluir que la antropología biológica, en particular la perspectiva de la antropogenética, ha permitido profundizar el entendimiento de la variabilidad biológica de los seres humanos mediante el análisis de marcadores genéticos. Estos estudios constituyen herramientas fundamentales para esclarecer aspectos históricos y demográficos de las poblaciones humanas, además de abrir nuevas posibilidades en la investigación de ancestría y estructura poblacional. Cabe destacar que el conocimiento de la composición genética de una población tiene un potencial significativo en la práctica médica, ya que permite identificar factores de riesgo específicos en relación con patologías de base genética, cuya prevalencia puede variar entre diferentes grupos humanos.



3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Muestreo

Las muestras de sangre periférica que fueron utilizadas corresponden a aquellas obtenidas a propósito de la oferta de diagnóstico molecular y detección de portadoras en familias afectadas por HA y son tomadas por el médico hematólogo de la Fundación de la Hemofilia, una vez obtenido un consentimiento informado. Se certifica que la información que pueda surgir del análisis genético, será utilizada en forma anónima, solo en el contexto del estudio científico y no será usada para fines no científicos bajo ninguna circunstancia. Se mantendrá la confidencialidad de toda la información de este estudio según pautas de la legislación nacional e internacional vigente. El nombre de los pacientes cuyas muestras de sangre han sido utilizadas solidariamente, no será almacenado en ningún registro ni revelado en ninguna publicación o presentación de los resultados del estudio. Se seguirán estrictamente las pautas éticas internacionales. Todo el proceso ha sido analizado y aprobado por el Comité de Ética de la Academia Nacional de Medicina, se adjunta en el Anexo I el consentimiento informado y el Anexo II los documentos respaldatorios de su aprobación.

Hasta julio de 2023, nuestra serie incluye estudios genéticos-moleculares de más de 1300 muestras de ADN genómico, correspondientes a probandos y miembros en riesgo de 610 familias con HA. Estas están clasificadas como severas —449—, moderadas —56— y leves —105—. Los porcentajes de las series de pacientes argentinos con hemofilia se alinean perfectamente con los estimados a partir de las series internacionales compiladas en bases de datos específicas. La información sobre las variantes de los genes del *F8* se recopila en bases de datos internacionales de acceso libre, tales como las desarrolladas por el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) de los EE.UU., llamadas CDC Hemophilia Mutation Project⁴; y por la Asociación Europea para la Hemofilia y Trastornos Afines⁵ para los genes del *F8* (n=3052).

Para este estudio se seleccionaron 65 individuos no relacionados biológicamente de pacientes argentinos ya estudiados en cuanto a la mutación causal en el *F8*. De cada paciente se computa la información bioquímica —tipo y título de inhibidor; FVIII:C— y clínica —historias de sangrado, tipo y protocolos terapéuticos, ITI, etc.—, y se realiza el estudio de genotipificación del *F8*. De esta forma se seleccionaron pacientes con HA severa, en

⁴ CHAMPS, URL: [//www.cdc.gov/ncbddd/hemophilia/champs.html](http://www.cdc.gov/ncbddd/hemophilia/champs.html)

⁵ EAHAD, URL: [//dbs.eahad.org/](http://dbs.eahad.org/)

particular con la inversión del intrón 22 (Inv22). Esta decisión está ligada a la posibilidad de seleccionar la mutación que presenta mayor recurrencia en HA severa, 47% —Figura 1.5—, y es considerada de alto riesgo de formar inhibidores en la población argentina, 25% —Tabla 1.1—. De ese modo la población estudiada queda estratificada y definida por tipo de variante causal HA (Inv22), lo que permite la identificación de factores modificadores del fenotipo de segundo orden, de menor potencia predictiva - ancestría-, cuya influencia en el fenotipo bajo análisis se vería enmascarada por el factor de primer orden en poblaciones no estratificadas.

Además se consideró únicamente a pacientes que residan en la Ciudad Autónoma de Buenos Aires y el conurbano bonaerense —AMBA, Área Metropolitana de Buenos Aires—, esto se relaciona con la posibilidad de comparar los resultados de ancestría con muestras ya trabajadas previamente (Avena et al., 2012; Avena et al., 2001; Fejerman et al., 2005; Martínez Marignac et al., 2004; Patiño, 2020).

Finalmente, con el fin de comparar la ancestría entre la población que desarrolla inhibidores a la terapia y quienes no lo hacen, del total de 65 individuos se seleccionaron 31 que no generaron ninguna reacción al tratamiento, mientras que 34 presentaron una reacción negativa al tratamiento.

3.2 Extracción de ADN

Para la extracción de ADN se utilizó el protocolo propuesto por Lahiri y Nurnberger (1991) a partir de leucocitos de sangre periférica por el método de salting out y precipitación alcohólica.

El proceso experimental se dividió en tres etapas. Se partió de 2-5 ml de sangre periférica de sangre entera anticoagulada con Etilen Diamin Tetra-Acetato (EDTA) (5 %). En primer lugar, se realizaron lavados de los glóbulos blancos, lisando los glóbulos rojos por hipotonía, mediante el agregado de T10E10⁶. Luego el pellet de leucocitos obtenido se sometió a una digestión enzimática con 50 µl de Proteinasa K (Promega, USA) concentración 20 µg/µl y 4,5 ml de Buffer PK⁷, para generar la lisis de membranas celulares y liberar el ADN genómico, se incubó durante toda la noche —aproximadamente 16 horas— en estufa a

⁶ T10E10: Tris-HCl 10 mM, EDTA 10 mM

⁷ Buffer PK: Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 5 mM, SDS 0,5 %

37°C. Finalmente, el producto de lisis celular se desproteinizó por el agregado de 1,6 ml de solución sobresaturada de NaCl (6 M) por cada 4,5 ml de volumen de la digestión con PK, se mezcló por inversión, se incubó 15 minutos en heladera (4°C) y se centrifugó por 20 minutos a 4000 g. Se recuperó el sobrenadante y por precipitación con etanol absoluto se obtuvo el ADN. Una vez seco, el ADN fue resuspendido en un volumen variable (50-300 µl) de T10E1⁸ acorde a la cantidad de ADN obtenido y almacenado a bajas temperaturas.

La concentración, calidad y pureza de las muestras de ADN se evaluaron por electroforesis en gel de agarosa y espectrofotometría UV (260/280 nm).

3.3 Estimación del tipo de variante presente en el *F8*

Algoritmo de análisis molecular en Hemofilia A: todas las variantes pueden ser detectadas y caracterizadas a través de un algoritmo de diagnóstico diseñado en el laboratorio GMH-ANM; que nos permite determinar el genotipo en el gen del Factor 8 (*F8*), integrando ordenadamente distintos procedimientos de biología molecular en HA definida para cada rango de severidad. Primero se caracterizan las inversiones recurrentes (Inv22 e Inv1) en los pacientes con HA severa, mediante una técnica basada en PCR-inversa (IS-PCR) sobre el gen *F8* siguiendo los protocolos descritos por Rossetti et al. (2008) y Abelleiro et al. (2016); luego, por amplificación de todas las regiones codificantes se determina la presencia de deleciones por ausencia de señales PCR-exón específicas (38 amplímeros), en varones hemocigotas en *F8*. Las variantes pequeñas se caracterizan mediante secuenciación de Sanger, en nuestro caso, anteponiendo una técnica de *screening* la técnica de electroforesis en gel de conformación sensible (CSGE), que nos permite reducir de manera considerable los costos del estudio (Rossetti et al., 2007).

Aquellos pacientes con HA severa que resultaron informativos a través de la técnica de IS-PCR para la Inv22, fueron sujetos de este estudio.

⁸ T10E1: Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM

3.4 Análisis de marcadores genéticos biparentales para estimar la ancestría genética

Para estimar la mezcla génica en nuestra población, se seleccionaron 30 marcadores bialélicos autosómicos con frecuencias alélicas distintivas en las poblaciones parentales —nativa americana, europea y africana—; en la Tabla 3.1 se encuentran detallados junto con su código de identificación y las frecuencias alélicas para cada población. Estos marcadores fueron identificados a partir de la base de datos HapMap Fase III, considerando una diferencia mayor al 40% en la frecuencia alélica entre una población y las otras dos. La mayoría de los marcadores corresponden a polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs), mientras que uno corresponde a una inserción/delección de una secuencia Alu — APO, rs3138522—.

rs dbSNP	% EURO	% AMER	% AFRI
7211306 (OGFOD3)	0,280	0,900	0,290
13069719 (FOXP1)	0,850	0,090	0,840
2288697 (KLHL29)	0,030	0,850	0,010
2065982 (AMER1)	0,060	0,810	0,090
1426654 (SLC24A5)	1,000	0,050	0,020
8009244 (DLGAP5)	0,890	0,910	0,140
12469563 (AMER4)	0,030	0,760	0,000
16897585 (AMER2)	0,000	0,780	0,000
596985 (ROR1)	0,970	0,990	0,130
5025718 (NOTCH2)	0,870	0,880	0,030
2384319 (KIF3C)	0,070	0,830	0,060
4646 (CYP19-E2)	0,280	0,740	0,330
2278354 (ROPN1L)	0,900	0,240	0,280
1871534 (SLC39A4)	0,010	0,030	0,950
2763 (WI-9231)	0,140	0,540	0,120
984303 (PTPRO)	1,000	0,980	0,210
2695 (WI-11909)	0,880	0,180	0,800
734780 (EURO)	0,080	0,730	0,740
9290363 (MECOM)	0,090	0,100	0,880
10510511	0,020	0,920	0,000

3870336 (DAG1)	0,090	0,940	0,090
2042314	0,150	1,000	0,140
3138522 (APO)	0,960	0,966	0,69
7041 (GC*S)	0,607	0,542	0,069
1800498 (DRD2)	0,614	0,031	0,146
2816 (WI-7423)	0,476	0,058	0,000
17203 (WI-11153)	0,133	0,819	0,785
285 (LPL)	0,492	0,442	0,971
2814778 (FY*NULL)	0,000	0,000	0,999
1042602 (TYR192)	0,449	0,034	0,005

Tabla 3.1: Marcadores utilizados. Se detallan los marcadores seleccionados con código de referencia del polimorfismo de nucleótido único (rs dbSNP) en la base de datos NCBI (National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine⁹) y frecuencias alélicas en las parentales (% Ancestría).

3.4.1. PCR

La determinación por PCR-APLP se realizó utilizando en la mezcla de reacción 4µl de buffer de reacción Green Promega (5X), 0,8µl de Cl₂Mg 25 mM, 0,45µl de la mezcla de cebadores de cada múltiplex, 0,08µl de una mezcla de los cuatro desoxirribonucleótidos trifosfato 10 mM, 0,06µl de GoTaq Polimerasa Promega y 14µl de agua calidad biología molecular para completar 20µl de volumen final de reacción. A cada tubo se le agregaron 0,5µl de ADN genómico (50ng/µl) y para cada set de cebadores se estableció una concentración óptima. Las distintas PCR-APLP cumplieron la configuración de etapas detallada en la Tabla 3.2.

Etapas	Temperatura (°C)	Ciclos	Tiempo
Desnaturalización inicial	94	1	5 minutos
Desnaturalización	94	30-35	1 minuto
Hibridación	Variable		1 minuto
Polimerización	72		1 minuto

⁹ <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>

Extensión final	72	1	5 minutos
-----------------	----	---	-----------

Tabla 3.2: Etapas de las PCR para APLP. Se detallan las etapas, temperatura en grados centígrados, cantidad de ciclos y el tiempo de cada etapa.

La determinación por PCR-RFLP se realizó utilizando en la mezcla de reacción 3µl de buffer de reacción Green Promega (5X), 1µl de Cl₂Mg 25 mM, 0.6µl de la mezcla de cebadores correspondientes, 0.07µl de una mezcla de los cuatro desoxirribonucleótidos trifosfato 10 mM, 0,07µl de GoTaq Polimerasa Promega y 8.26µl de agua calidad biología molecular para completar 15µl de volumen final de reacción. A cada tubo se le agregaron 2µl de ADN genómico (50ng/µl) y para cada set de cebadores se estableció una concentración óptima. Las distintas PCR-RFLP cumplieron la configuración de etapas detallada en la Tabla 3.3.

Etapas	Temperatura (°C)	Ciclos	Tiempo
Desnaturalización inicial	94	1	5 minutos
Desnaturalización	94	33	45 segundos
Hibridación	Variable		45 segundos
Polimerización	72		45 segundos
Extensión final	72	1	10 minutos

Tabla 3.3: Etapas de las PCR para RFLP. Se detallan las etapas, temperatura en grados centígrados, cantidad de ciclos y el tiempo de cada etapa.

Modificando levemente la propuesta de Patiño (2020) —Figura 1.8—, decidimos analizar estos 30 marcadores a través de utilizar 7 PCR-APLP-Múltiplex, 7 PCR-APLP y 8 PCR-RFLP. Las múltiplex originalmente desarrolladas por la autora eran 4 grupos de entre 4 y 5 marcadores cada una. Sin embargo, durante la puesta a punto de la técnica observamos que la resolución obtenida no era adecuada, por lo que optamos por dividir los grupos para mejorar la exactitud en los resultados.

Las múltiples propuestas mantienen la denominación del I al IV, dividiéndolas en A y B cada una de ellas. En la Tabla 3.4 se encuentran detallados los marcadores con sus códigos de referencia del polimorfismo de nucleótido único (rs dbSNP, por su sigla en inglés), los cebadores —indicando F para *Foward* y R para *Reverse*—, la secuencia de cada cebador en

sentido 5'-3', el tamaño del amplicón esperado, concentración de cebador y por último la temperatura de hibridación y la cantidad de ciclos por PCR.

PCR- APLP - Múltiplex						
dbSNP rs	Marcador	Cebador	Secuencia (5' - 3')	Tamaño del amplicón	Concentración cebador 20x	T° de hibridación / cantidad de ciclos
Múltiplex I-A						
7211306	OGFOD3	F1/G	ATGTATAATCTcGGCAAAC G	70	5 µM	52° / 35 ciclos
		F2/A	attta ATGTATAATCTcGtCAAAC A	75	5 µM	
		R	AACATTAtACACaCAGGACC		10 µM	
13069719	FOXP1	F1/C	TTAGCATGGACCATTTTT CAC	81	4 µM	
		F2/T	tatat TTAGCATGtACCATTTTT CAT	86	4 µM	
		R	GATTACCGAGGATATTTTAGG		4 µM	
Múltiplex I-B						
2288697	KLHL29	F1/A	TGGATAGATCCTaCAGACA A	95	20 µM	52° / 35 ciclos
		F2/G	ttaat TGGATAGATCCTaCAGACAG	100	15 µM	
		R	ACTCACTAATAaTCTTAGGG		15 µM	
2065982	AMER1	F1/C	TTCAAGTTCTTCC tAAGGAAAC	155	6 µM	
		F2/T	aatat TTCAAGTTCTTCC tAAGGAAAT	160	6 µM	
		R	CAAGATGGGATTTCTT aCCTGCC		6 µM	
Múltiplex II-A						
1426654	SLC24A5	F1/A	TGTCTCAGGATGTTaCAGGC A	81	5 µM	52° / 35 ciclos
		F2/G	ttagat TGTCTCAGGATGTTaCAGGC G	87	5 µM	
		R	AT g TACCTAGGagAGCAGTA		5 µM	
8009244	DLGAP5	F1/G	TATTACCCATCTTAGCAAG G	100	9 µM	
		F2/A	tatat TATTACCCATCTT aCAAGA	105	5 µM	

		R	GCCAATGCTTTTTTGACACC		5 µM	
Múltiplex II-B						
1246956 3	AMER4	R1/C	ACCCACCCtATGAGATAAAA G	166	15 µM	52° / 35 ciclos
		R2/T	cttac ACCCACCCtATGAGATAAAA A	171	15 µM	
		F	CAAAGTATTA a TGTTCCGTAA		15 µM	
1689758 5	AMER2	F1/G	CAAGGCAATTATCTT g TTCC G	201	9 µM	
		F2/A	ttatt a CAAGGCAATTATCTT g TTCC A	207	5 µM	
		R	ATTAGCATCTCCTTCGCAGC		5 µM	
Múltiplex III-A						
596985	ROR1	F1/T	CTCAT g ATCAGCTGCCTAT G T	71	4 µM	60° / 35 ciclos
		F2/C	ttatat CTCAT g ATCAGCT G tCTAT G C	77	4 µM	
		R	GACAGCCCCTGATTGGAGAG		4 µM	
5025718	NOTCH2	R1/T	CCAGAgCTCACTAGCTCT C A	100	5 µM	
		R2/C	aatta CCAGA A CTCACTAGCTCT C G	105	5 µM	
		F	ACACCCTGATAGCCTGGGAC		5 µM	
Múltiplex III-B						
4646	CYP19-E2	F2/C	TGTGAACAGGAtCAGATGAC C	181	10 µM	60° / 35 ciclos
		F1/A	ttata TGTGAACAGGAtCAGATGAC A	186	10 µM	
		R	AGAAGGCT g aTCAGTACCCA		10 µM	
2278354	ROPN1L	F1/G	GAAGCGCAAGGC a tGAAG G G	220	5 µM	
		F2/T	aataa GAAGCGCAAGGC a tGAAG G T	225	5 µM	
		R	GACACTAGATTCTGCTGGGC		5 µM	
Múltiplex IV						
1871534	SLC39A4	R1/C	CAGGACAGCaTCCCCAGTG A G	80	4 µM	65° / 35 ciclos
		R2/G	aatata CAGGACAGCaTCCCtAGTGA C	86	4 µM	
		F	GCTGCA a GGGGGTCACCCAC		4 µM	

2763	WI-9231	F1/G	CACTTGCCCCACAT t TCAGAC G	130	15 μM
		F2/C	ttaata CACTTGCCCCACAT t TCAGAC C	136	15 μM
		R	CACCCCTGCCA t TCTCCTGG		15 μM
984303	PTPRO	F1/G	TGCTC g TCTTCATGCACCC G	151	4 μM
		F2/A	taagt TGCTC g TCTTCATGCACCC A	156	4 μM
		R	g GGGGTGCAG g GCTGTTCATT		4 μM

Tabla 3.4: Cebadores utilizados en múltiplex. Se detallan los cebadores utilizados para cada marcador dentro de las distintas múltiplex, junto con el tamaño esperado para cada amplicón, la concentración de cebadores para una preparación 20 veces concentrada, y la temperatura y cantidad de ciclos para su PCR. En letras rojas se indica la base alelo específica. En letras minúsculas y negrita se indican las bases adicionadas para diferenciar los amplicones por tamaño.

En la Tabla 3.5 se encuentran detallados los marcadores PCR-APLP que no se incorporaron a una múltiplex. Se mantiene la propuesta de Patiño (2020), sumando el marcador KIF3C que la autora había incorporado en la múltiplex III, pero nosotros decidimos separarlo. La tabla contempla los mismos datos que la anterior: los marcadores con sus códigos de referencia del polimorfismo de nucleótido único (rs dbSNP, por su sigla en inglés), los cebadores —indicando F para *Foward* y R para *Reverse*—, la secuencia de cada cebador en sentido 5’-3’, el tamaño del amplicón esperado, concentración de cebador y por último la temperatura de hibridación en grados celsius y la cantidad de ciclos por PCR.

PCR-APLP						
dbSNP rs	Marcador	Cebador	Secuencia (5’- 3’)	Tamaño del amplicón	Concentración cebador 20x	T° de hibridación / cantidad de ciclos
2384319	KIF3C	F1/G	GTGTTTTGTTTTCTTTAA t TGGC G	143	15 μM	60° / 35 ciclos
		F2/T	Atta GTGTTTTGTTTTCTTTAA t TG GCT	147	15 μM	
		R	AAAATTGCTAAGG t AAGGCT		15 μM	
2695	WI-11909	F1/G	ATTTGTGTTGGGTGG a CAAG G	47	9 μM	65° / 35 ciclos

MATERIALES Y MÉTODOS

		F2/A	atatt ATTTGTGTTGGGTGGaCA AGA	52	5 µM	
		R	GTCCTCCTCTGAGATTTTCTG		5 µM	
734780	EURO	F1/T	aattatt GCCCAGCAGTGGtTA TCACT	107	5 µM	65° / 35 ciclos
		F2/C	GCCCAGCAGTGGGTATCAC C	100	9 µM	
		R	GGGAGAGGCAC g AGGGgAT		5 µM	
9290363	MECOM	R1/G	AAGTGAGAAAGTGTGTCTT C	130	9 µM	54° / 30 ciclos
		R2/T	taatta AAGTGAGAAAGTGTaTCT TA	135	5 µM	
		F	ATTACAGGTGAAGGGTATTC		5 µM	
10510511	***	F1/A	CCAGGAATCAAGTCGCCTTA A	71	9 µM	54° / 35 ciclos
		F2/C	ataatt CCAGaAATCAAGTCGa CTTAC C	77	5 µM	
		R	AGGGAAGTGAT g TACCTACA		5 µM	
3870336	DAG1	F1/T	CTGGGTACCATAGAC g ACAT T	60	9 µM	54° / 35 ciclos
		F2/C	atatta CTGAGTACCATAGAC g A CAC	66	5 µM	
		R	TGAaGAGaCCTTGACTGCCT		5 µM	
2042314	***	F1/A	CAAGACCTTAAAgCCTATGG A	111	9 µM	54° / 35 ciclos
		F2/G	attaa CAAGACCTTAAATCCTAT GGG	116	5 µM	
		R	CCT g GCTCTAGCTCTCATAT		5 µM	

Tabla 3.5: Cebadores utilizados en PCR-APLP. Se detallan los cebadores utilizados para cada marcador dentro de las distintas múltiplex, junto con el tamaño esperado para cada amplicón, la concentración de cebadores para una preparación 20 veces concentrada, y la temperatura en grados celsius y cantidad de ciclos para su PCR. En letras rojas se indica la base alelo específica. En letras minúsculas y negrita se indican las bases adicionadas para diferenciar los amplicones por tamaño.

Por último, en la Tabla 3.6 se encuentran detallados los marcadores que se identificaron mediante PCR-RFLPs e indel (Patiño, 2020). La tabla menciona los marcadores con sus

códigos de referencia del polimorfismo de nucleótido único (rs dbSNP, por su sigla en inglés), la secuencia de cada cebador en sentido 5'-3' —un *Forward* y un *Reverse* en cada caso—, la temperatura de *melting*, la enzima utilizada para su digestión junto con la temperatura necesaria para optimizar este proceso, y el tamaño de los fragmentos esperados para cada caso. El primero de los casos es una inserción/delección de una secuencia Alu, por lo que no se ha realizado la digestión con ninguna enzima.

PCR-RFLPs e Indel						
dbSNP rs	Marcador	Secuencia (5' - 3')	T° de <i>melting</i>	Enzima	T° de digestión	Tamaño del fragmento
3138522	APO	AAGTGCTGTAGGCCATTTAGATTAG	60	-	indel	110 /410
		AGTCTTCGATGACAGCGTATACAGA				
7041	GC*S	AGATCTGAAATGGCTATTATTTTGC	60	HaeIII	37 °	200/ 121+79
		GGAGGTGAGTTTATGGAACAGC				
1800498	DRD2	TGGGGGTGTGAAGAAAAGAG	60	aTaq I	65	70 / 40+30
		TTTAGTAGCAGAGGAAGGAGTGG				
2816	WI-7423	CTCCTTGGCAGGGATTTGT	60	Sma I	25°-30°	80 / 46+34
		CTGGTATCCACGGTGCAAG				
17203	WI-11153	CTTCAAATTGCTTTAAGTAC	49	Bsa A I	37 °	45 / 28+17
		ATCCAACAGTCAAGGTCTAC				
285	LPL	GCTTAATTCTCAATTCAATG	50	PvuII	37°	189 / 149+40
		CTTTAGACTCTTGTCAGGT				
2814778	FY*NULL	AGGCTTGTGCAGGCAGTG	54	Sty I	37°	223= 82+77+62 (-)/ 82+65+62+ 12 (+)
		GGCATAGGGATAAGGGAC				
1042602	TYR192	TTATGTGTCAATGGATGCAC	58	Mbo I	37°	69 / 32+37
		GCTTCATGGGCAAAATCAAT				

Tabla 3.6: Cebadores utilizados en PCR-RFLP. Se detallan los cebadores utilizados para cada marcador dentro de las PCR-RFLP, junto con la enzima y las temperaturas, en grados celsius, para su correcta digestión. Además se encuentran detallados los tamaños de los fragmentos esperados tanto si corta como cuando no corta la enzima.

3.4.2 Geles para electroforesis

Se emplearon geles de poliacrilamida al 10% y 12% por su alto poder resolutivo, para la separación de los productos de PCR-APLP, incluyendo FY-null, ya que permiten discriminar diferencias muy pequeñas de peso molecular, como las indicadas en la Tabla 3.8.

Se utilizaron geles de agarosa en distintos porcentajes para separar los fragmentos de restricción generados por la digestión enzimática de los productos de PCR-RFLP —Tabla 3.9—.

Preparación de los geles:

Para preparar los geles de poliacrilamida, se mezclaron los reactivos en las proporciones indicadas en la Tabla 3.7. Los geles de agarosa se prepararon disolviendo la cantidad correspondiente de agarosa en TBE 1X.

Componentes	Gel 10%	Gel 12%
H ₂ O	4,5 ml.	4 ml.
TBE 10X	0,8 ml.	0,8 ml.
Poliacrilamida	2,66 ml.	3,2 ml
APS (20mg/100ul de TBE 10x)	40 µl.	40 µl.
TEMED	20 µl.	20 µl.

Tabla 3.7: Composición de los geles de poliacrilamida. Se detallan los componente para un gel en cada grado de concentración: 10% y 12%

Condiciones de electroforesis:

En la Tabla 3.8 se detallan las condiciones de la corrida electroforética para geles de poliacrilamida, tiempo de corrida, voltaje y alelos posibles de identificar en cada caso. En todos los casos se utilizan vidrios de 0.75 mm.

Múltiplex/APLP	% de	Voltios y Tiempo de	Alelos posibles
----------------	------	---------------------	-----------------

	Poliacrilamida	corrida (en minutos)	
Múltiplex I-A	12%	110V 70'	OGFOD3 (75-70 pb) FOXP1 (86-81 pb)
Múltiplex I-B	10%	110V 90'	KLHL29 (95-100 pb) AMER1 (155-160 pb)
Múltiplex II-A	10%	110V 70'	SLC24A5 (81-87 pb) DLGAP (100-105 pb)
Múltiplex II-B	10%	110V 110'	AMER4 (166-171 pb) AMER 2 (201-207 pb)
Múltiplex III-A	10%	110V 60'	ROR1 (77-71 pb) NOTCH2 (100-105 pb)
Múltiplex III-B	10%	110V 110'	CYP19 (181-186 pb) ROPNIL (220-225 pb)
Múltiplex IV	10%	110V 70'	SLC39A4 (80-86 pb) WI9232 (130-136 pb) PTPRO (151-156 pb)
KIF3C	10%	110V 90'	Alelo 1: 143-G Alelo 2: 147-T
10510511	12%	110V 70'	Alelo 1: 71-A Alelo 2: 77-C
DAG1	12%	110V 90'	Alelo 1: 60-A(T) Alelo 2: 66-G
MECOM	10%	110V 90'	Alelo 1: 130-G Alelo 2: 135-T
WI-11909	12%	110V 60'	Alelo 1: 47-G Alelo 2: 52-A
2042314	10%	110V 90'	Alelo 1: 111-A Alelo 2: 116-G
EURO	10%	110V 90'	Alelo 1: 100-C Alelo 2: 107-T

Tabla 3.8: Condiciones de la corrida electroforética PCR-APLP. Se detalla la puesta a punto de las corridas electroforéticas. Se indica para cada Múltiplex/APLP la concentración de acrilamida necesaria, el voltaje y el tiempo necesario, junto con los alelos esperados.

En el caso de las PCR-RFLP se realizó la digestión con las enzimas, tal como se señaló en la tabla 3.6, generando de esta forma un patrón donde uno de los alelos presenta la

banda completa, mientras que el otro alelo es el que se encuentra cortado por la enzima. Para el caso de las corridas de electroforesis en geles se realizaron todas en agarosa, a excepción de FY*null, que requiere de mayor resolución y por eso se realizó en poliacrilamida. Las concentraciones y tiempos de corrida en cada caso, se muestran en la tabla 3.9.

PCR-RFLP	% de Agarosa	Voltios y Tiempo de corrida (en minutos)	Alelos posibles
APO	1.5 %	100 V 40'	Alelo 1: 410 Alelo 2: 110
DRD2	3 %	100 V 45'	Alelo 1: 70 Alelo 2: 40-30
WI-7423	3 %	100 V 45'	Alelo 1: 80 Alelo 2: 46-34
WI-11153	3 %	100 V 45'	Alelo 1: 28-17 Alelo 2: 45
LPL	2 %	100 V 45'	Alelo 1: 189 Alelo 2: 149-40
TYE192	3 %	100 V 45'	Alelo 1: 69 Alelo 2: 32-37
GC*S	2 %	100 V 50'	Alelo 1: 200 Alelo 2: 121-79
FY*null	12% (poliacrilamida)	110V 60'	Alelo 1: 82+77+62 (-) Alelo 2: 82+65+62+12 (+)

Tabla 3.9: Condiciones de la corrida electroforética PCR-RFLP. Se detalla la puesta a punto de las corridas electroforéticas para PCR-RFLP. Se indica para cada marcador la concentración de agarosa necesaria, el voltaje y el tiempo necesario, junto con los alelos esperados. El caso de FY*null es realizado en poliacrilamida.

Visualización y análisis:

Los geles se tiñeron con GelRed, se visualizaron bajo luz ultravioleta y se documentaron utilizando el sistema de adquisición de imágenes ImageQuant.

3.5 Estimación de ancestría genética

Las estimaciones se realizaron con distintos programas. Para el cálculo de las frecuencias alélicas de los marcadores en la muestra se utilizó el complemento de Microsoft Excel GenAIEx 6.5 (Peakall & Smouse, 2012). Con el cual, además, se evaluó que estos se encuentren en equilibrio de Hardy – Weinberg. Según este principio, las frecuencias alélicas y genotípicas permanecen constantes de generación tras generación, en ausencias de factores microevolutivos. Se evalúa el grado de ajuste entre los individuos observados y los esperados, mediante un test de χ^2 (chi cuadrado). Se considera que, si el valor de p es menor a 0,05, las diferencias encontradas son estadísticamente significativas. El límite de significancia para un grado de libertad surge de restar el número de genotipos menos el de alelos. Los marcadores utilizados son bialélicos —resultando 3 genotipos—, por lo cual tendremos siempre un grado de libertad, correspondiendo la probabilidad del 5% a un valor de χ^2 de 3,84.

Dentro de un archivo de Microsoft Excel, se introducen los genotipos de cada individuo en columnas para cada SNP, indicando cada alelo en una columna, dando a cada alelo un número, a modo de ejemplo si el genotipo es AC, se coloca A=1, C=2. En los casos de no contar con el genotipo por falta de amplificación de la muestra se coloca 0 en las celdas vacías, a modo de ejemplo se puede visualizar la Figura 3.1.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
	60	728	4	60	307	64	297	1	728	
Prueba Hemofilia		60		AMBA	EURO	AMER	AFRO			
Sample	Pop		OGFOD3		FOXP1		KLHL29		AMER1	
1	1	1	2	2	1	1	2	2	1	2
2		1	2	2	1	1	2	2	1	2
3		1	1	2	1	2	2	2	1	2
4		1	2	2	1	2	1	2	1	2

Figura 3.1: Carga de datos en Excel con el complemento GenALEX. Se detalla el ejemplo de la correcta carga de datos para la exportación

En el mismo archivo se coloca toda la información pertinente al análisis a realizar: en la primera fila se escribe el número de marcadores, número total de individuos, número de poblaciones —población de estudio junto a las parentales—, número de individuos población 1, número de individuos población 2, número de individuos población 3, etc., y finalmente rango de individuos. En la siguiente fila de la primera columna escribimos el nombre del proyecto, luego el nombre de la población a estudiar y las parentales según corresponda.

Al finalizar la carga de todos los datos, con el complemento GenALEX, se exporta para poder utilizarlo en Structure 2.3.4 (Pritchard et al., 2000). Las muestras cargadas son las de la muestra a estudiar, junto a la comparación con poblaciones parentales nativo-americana, euroasiática y afro subsahariana, obtenidas de la base de datos “1000 genomas”, discriminando los datos con respecto a la mezcla génica proveniente de su origen:

- De ciudades cosmopolitas:
 - 307 muestras de origen europeo
 - 297 de África suroccidental subsahariana
- Del panel del proyecto de diversidad del genoma humano HGDP-CEPH (Human Genome Diversity Project):
 - 64 individuos nativoamericanos provenientes de poblaciones indígenas Pima, Maya, Piapoco, Curripaco, Karitiana y Surui

El cálculo de las ancestrías individuales se realizó con el programa Structure 2.3.4, originalmente descrito por Pritchard y otros (2000). Dentro de este programa se crea un nuevo proyecto, copiando los datos correspondientes e importando el documento que se creó con GenALEX. Structure nos permite correr simulaciones de agrupación en distintas cantidades de poblaciones asumidas, en nuestro caso asumimos 2, 3, 4 y 5 poblaciones, y se corren tres veces para cada asunción.

A partir de los datos generados en Structure se termina de analizar la información en el programa Structure Harvester (Earl & Vonholdt, 2012). Este nos permite seleccionar estadísticamente la mejor asunción entre las realizadas previamente (Evanno et al., 2005).

Con la información de la mejor asunción de poblaciones, finalizamos con los porcentajes de ancestría mediante CLUMPP (Kopelman et al., 2015), el mismo toma la información de Structure Harvester y analiza los porcentajes de cada muestra para cada una de las poblaciones estimadas, generando un promedio de las tres corridas para el caso esperado. De esta forma se visualiza la ancestría individual, en porcentajes sobre el total de la población estudiada.

3.6 Análisis Estadístico

El análisis estadístico de las muestras se llevó a cabo con el software InfoStat (v. 2020) (Di Rienzo et al., 2003). Las pruebas estadísticas utilizadas incluyeron la prueba T de Student, la prueba de mediana y la prueba de rangos de Wilcoxon, para comparar las ancestrías entre los dos grupos de estudio: pacientes con inhibidor y pacientes sin inhibidor.

Primero, se evaluó si las distribuciones de ancestría —europea, americana y africana— siguen una distribución normal en ambos grupos de manera gráfica utilizando un gráfico de cajas (*box plot*), y mediante la prueba de Shapiro-Wilks. En caso de que se cumpliera el supuesto de normalidad para cada ancestría se aplicó la prueba T de Student, que permite comparar medias entre dos muestras con distribución normal para evaluar si estas son estadísticamente iguales.

Cuando las muestras no presentaron distribución normal, se optó por la prueba de mediana, la cual permite evaluar si existen diferencias significativas entre las medianas de dos muestras independientes. Adicionalmente, y como método de verificación, se aplicó la prueba de Wilcoxon-Mann-Whitney, adecuada para comparar medias y/o medianas en conjuntos independientes que no siguen una distribución normal.

Debido a que se realizó al menos una prueba de hipótesis para cada ancestría, se aplicó la corrección de Bonferroni y se utilizó un nivel de significación de 0,017.



4. RESULTADOS

Este capítulo presenta los resultados de la puesta a punto de la técnica y el análisis de ancestría individual y poblacional utilizando 30 marcadores genéticos. Se propone un enfoque ligeramente modificado de la técnica propuesta por Patiño (2020), combinando tres metodologías diferentes: 7 PCR-APLP-Múltiplex, 7 PCR-APLP y 8 PCR-RFLP.

4.1 PCR-APLP-Múltiplex

Durante la puesta a punto de la múltiplex I, notamos que la visualización de las bandas era dificultosa, por lo que se tomó la decisión de diferenciarla en dos —múltiplex I-A y I-B—. De esta forma se ganó resolución para la observación correcta de los resultados. A su vez, se tomaron decisiones sobre el porcentaje de acrilamida a utilizar y el tiempo de corrida. Lo mismo fue realizado con el resto de las múltiplex, diferenciándolas en A y B, a excepción de la múltiplex IV, tal como está detallado en la tabla 3.4.

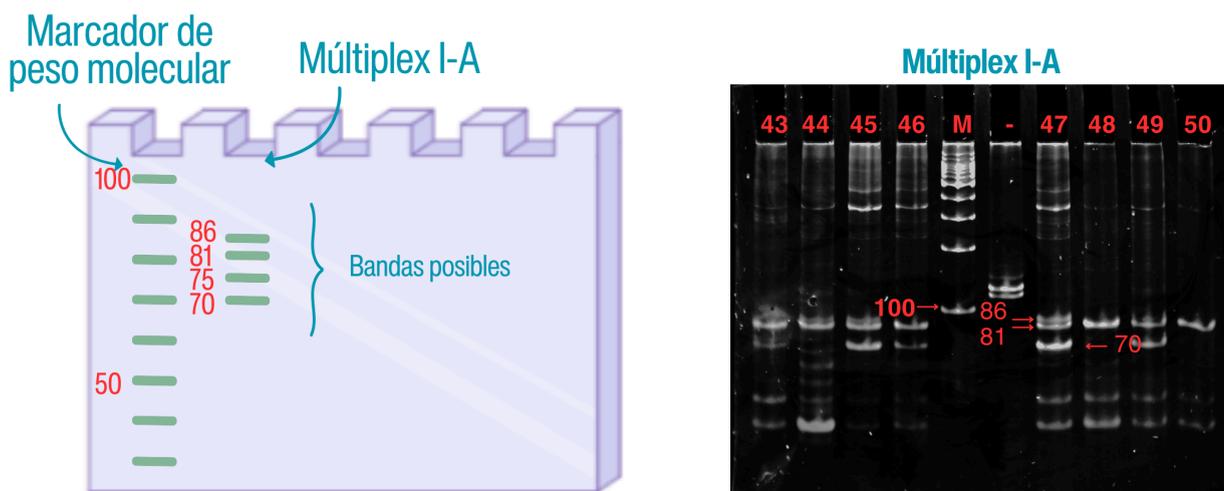


Figura 4.1: Electroforesis en gel de poliacrilamida de múltiplex 1-A. Izquierda: Electroforesis en gel de poliacrilamida, con las bandas esperadas para múltiplex 1: OGFOD3 (75-70 pb), FOXP1 (86-81 pb). Derecha: Electroforesis en gel de poliacrilamida con la muestra 47, en donde se puede visualizar que la misma es heterocigota para FOXP1, contando con ambos alelos (bandas de 86 pb y 81 pb) mientras que para OGFOD3 es homocigota para el alelo 2 (banda de 70 pb). Para tomar de referencia, se encuentra un marcador de peso molecular (M) con la banda de 100 pb señalada.

Para el caso de la múltiplex I-A, los marcadores analizados son OGFOD3, con dos alelos posibles: la banda de 75 pb representa al alelo 1, mientras que la banda de 70 pb representa al alelo 2. Por otro lado se encuentra también FOXP1, con dos alelos posibles: la banda de 81 pb. Indica el alelo 1, mientras que el alelo 2 está representado por la banda de 86

pb., como puede verse en la figura 4.1. Cabe destacar que los resultados posibles para cada marcador son homocigota para alguno de los dos alelos, o heterocigota, con la presencia de ambos. A forma de ejemplificar los alelos posibles está representado un heterocigota para cada marcador. En cada panel de reacciones se incluyeron controles de amplificación, positivos y negativos.

Los resultados completos para cada marcador pueden verse en la tabla del Anexo III, a modo de resumen se presenta en la Tabla 4.1 la cantidad de muestras que pudieron ser analizadas, la cantidad homocigota para el primer alelo, la cantidad homocigota para el alelo 2. En los casos en que no se logró amplificación, se repitió la PCR una segunda vez y en algunos casos una tercera vez con el marcador por separado de la múltiplex.

Marcador		N. muestras analizadas	N. homocigota alelo 1	N. homocigota alelo 2	N. heterocigota
MI-A	OGFOD3	48	1	31	16
	FOXP1	60	42	1	17
MI-B	KLHL29	63	4	36	23
	AMER1	60	8	25	27
MII-A	SLC24A5	54	8	15	31
	DLGAP5	50	8	21	21
MII-B	AMER4	61	9	27	25
	AMER2	64	4	33	27
MIII-A	ROR1	64	40	7	17
	NOTCH2	64	36	6	22
MIII-B	CYP19-E2*1	43	1	38	4
	ROPN1L	64	24	6	34
MIV	SLC39A4	52	0	40	12
	WI-9231*1	47	4	28	15
	PTPRO	50	46	0	4

Tabla 4.1: Resultados de marcadores mediante múltiplex. Resumen de los resultados para cada marcador de múltiplex, con la cantidad de muestras que pudieron ser analizadas y la cantidad homocigotas —para cada alelo— y heterocigotas en cada caso.

4.2 PCR-APLP individuales

Los marcadores KIF3C, 10510511, DAG1, MECOM, WI-11909, 2042314 y EURO se han estudiado mediante la técnica PCR-APLP de forma individual, pero al igual que en los casos de las múltiplex se han puesto a punto para mejorar la resolución de las bandas posibles, modificando el tiempo, los voltios y el porcentaje de poliacrilamida, estas características pueden verse en la Tabla 3.5.

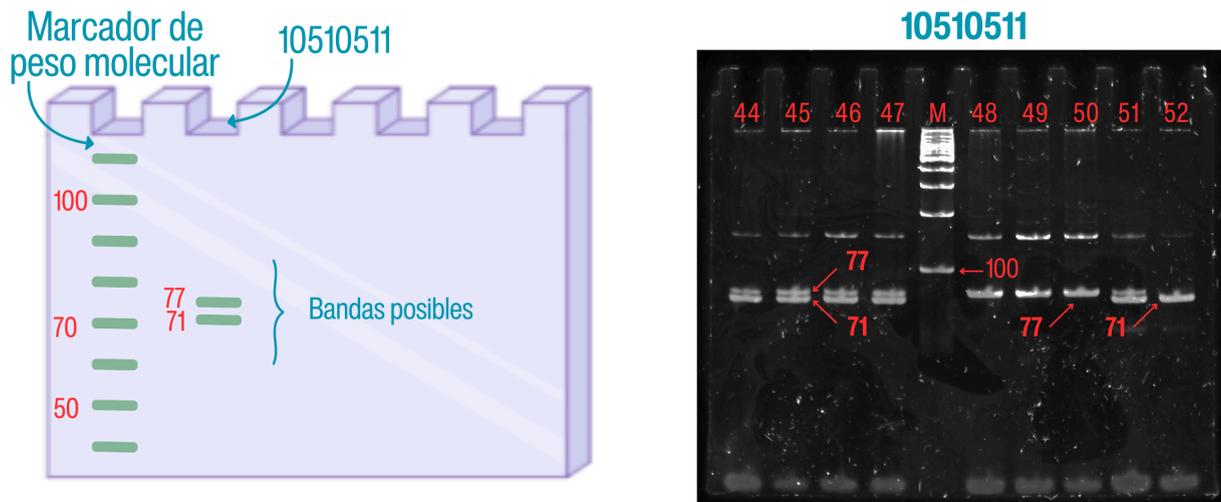


Figura 4.2: Electroforesis en gel de poliacrilamida del marcador 10510511. Izquierda: Electroforesis en gel de poliacrilamida, con las bandas esperadas para el marcador 10510511 (77 y 71 pb). Derecha: Electroforesis en gel de poliacrilamida con la muestra 45, en donde se puede visualizar que la misma es heterocigota contando con ambos alelos (bandas de 77 pb y 71 pb) mientras que la muestra 50 es homocigota para el alelo 2 (banda de 77 pb) y la muestra 52 es homocigota para el alelo 1 (banda de 71 pb). Para tomar de referencia, se encuentra un marcador de peso molecular (M) con la banda de 100 pb señalada.

A modo de ejemplo, podemos ver en la figura 4.2 el gel correspondiente al marcador 10510511, del lado izquierdo el modelo con las bandas esperadas para dicho marcador, mientras que en el lado derecho puede visualizarse el gel para las muestras 44-52, donde se señala la muestra 45 siendo heterocigota para los dos alelos (71 y 77 pb), mientras que la muestra 50 está señalada con su única banda, indicando que es homocigota para el alelo 2 (77 pb). Por otro lado, la muestra 52 está marcada por ser homocigota para el alelo 1 (71 pb). Por último está indicado las 100 pb de la escalera para tener de referencia.

Los resultados completos se encuentran en el Anexo IV, a modo de resumen se presenta la Tabla 4.2 indicando para cada marcador la cantidad de muestras que pudieron analizarse, la cantidad de muestras homocigotas para cada alelo y la cantidad de heterocigotas. En los casos

en que no se logró que la muestra de una amplificación, se repitió la PCR una segunda vez. En los casos de WI-11909, Euro y KIF3C, se repitió una tercera PCR para las muestras no amplificadas, logrando sumar algunos resultados más.

Marcador	N. muestras analizadas	N. homocigota alelo 1	N. homocigota alelo 2	N. heterocigota
KIF3C	57	3	34	20
10510511	63	9	25	29
DAG1	64	18	9	37
MECOM	57	4	43	10
WI-11909	37	13	4	20
2042314	51	6	16	29
EURO	46	4	24	18

Tabla 4.2: Resultados de marcadores mediante PCR-APLP. Resumen de los resultados para cada marcador, con la cantidad de muestras que pudieron ser analizadas y la cantidad homocigotas —para cada alelo— y heterocigotas en cada caso.

4.3 PCR-RFLP

Los marcadores APO, GC*S, DRD2, WI-7423, WI-11153, LPL, FY*NULL y TYR192 se han estudiado mediante la técnica mediante PCR-RFLP. En la mayoría de los casos la corrida electroforesis se realizó en agarosa, las condiciones específicas de cada marcador pueden verse en las Tablas 3.6 y 3.9.

Queremos destacar el caso particular de FY*null. La enzima con la que se trabaja —Sty I— genera un patrón diferente a los previamente analizados, en este caso, corta siendo positivo como negativo, pero genera un patrón de bandas diferente en cada caso. Como puede visualizarse en la figura 4.3, en los casos en que FY*null es positivo, las bandas esperadas son de 82, 65, 62 y 12 pares de bases, mientras que el patrón de bandas cuando es negativo es de 82, 77 y 62 pares de bases.

En el caso de este marcador no se logró visualizarlo correctamente pese a realizar diversas pruebas con tiempos diferentes de digestión enzimática, ya que notamos un patrón

de bandas que excedía el esperado, pudiendo indicar que la enzima podría estar trabajando de más. Se probó dejando las muestras a 37° —temperatura ideal para su funcionamiento— por 3, 6, 8 y 12 horas, pero en los primeros cortes temporales la digestión no estaba completa, por lo que no se notaban cambios, a las 12 horas ya se encontraba el patrón inespecífico. También se probó en cada uno de estos tiempos de digestión, distintos tiempos de corrida y diversas concentraciones de geles de poliacrilamida, con la intención de identificar si el problema era una cuestión de resolución, pero tampoco se pudo analizar el patrón encontrado. Ante esta situación se tomó la decisión de descartar este marcador, considerando la posibilidad de una contaminación en los cebadores, y contando con 29 marcadores posibles para ser usados tanto en la ancestría individual como poblacional.

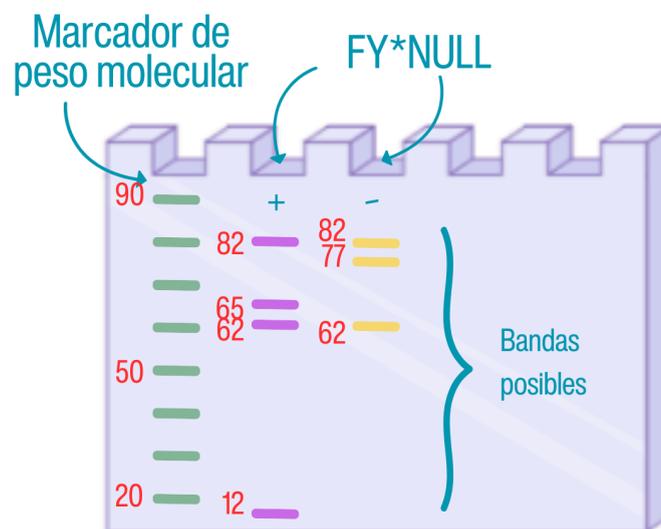


Figura 4.3: Electroforesis en gel de poliacrilamida del marcador FY*null. Patrón de bandas esperado para FY*null, indicando el patrón positivo y negativo en cada caso.

Los resultados completos del resto de los marcadores se encuentran en el Anexo V, a modo de resumen se presenta la Tabla 4.3 indicando para cada marcador la cantidad de muestras que pudieron analizarse, la cantidad de muestras homocigotas para cada alelo y la cantidad de heterocigotas. A excepción de FY*null como ya se mencionó, no se repitieron las PCR-RFLP ya que en la primera corrida pudo analizarse la gran mayoría de las muestras, superando las 60 que era nuestro objetivo.

Marcador	N. muestras analizadas	N. homocigota alelo 1	N. homocigota alelo 2	N. heterocigota
----------	------------------------	-----------------------	-----------------------	-----------------

APO	61	55	0	6
DRD2	62	13	25	24
WI-7423	65	1	35	29
WI-11153	62	16	26	20
LPL	62	17	17	28
TYE192	65	11	26	28
GC*S	61	8	30	23

Tabla 4.3: Resultados de marcadores mediante PCR-RFLP. Resumen de los resultados para cada marcador, con la cantidad de muestras que pudieron ser analizadas y la cantidad homocigotas —para cada alelo— y heterocigotas en cada caso.

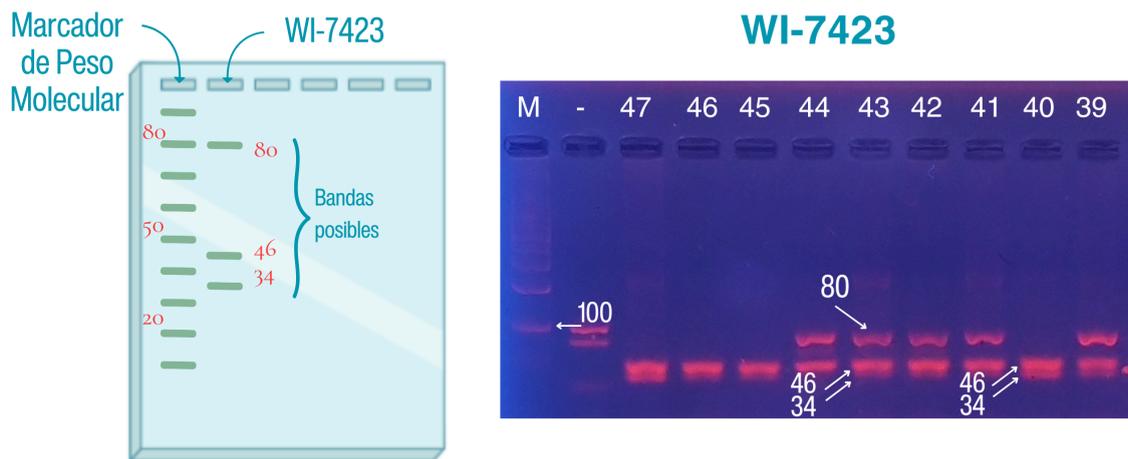


Figura 4.4: Electroforesis en gel de agarosa del marcador WI-7423. Izquierda: Gel de agarosa, con las bandas esperadas para el marcador WI-7423 (80, 46 y 34 pb). Derecha: Gel de agarosa con la muestra 43, en donde se puede visualizar que la misma es heterocigota contando con ambos alelos (bandas de 80 pb y 46 + 34 pb) mientras que la muestra 40 es homocigota para el alelo 2 (banda de 46 pb y 34 pb). Para tomar de referencia, se encuentra un marcador de peso molecular (M) con la banda de 100 pb señalada.

A modo de ejemplo de las PCR-RFLP realizadas, podemos ver en la Figura 4.4 el marcador WI-7423, el mismo fue digerido con la enzima Sma I a 25° *overnight*, y luego corrido en un gel de agarosa al 3% durante 45 minutos. Del lado izquierdo de la figura se visualiza el modelo esperado, para una muestra heterocigota, presentando los dos alelos —alelo 1 de 80 pb y alelo 2 de 46 y 34 pb—. Del lado izquierdo podemos visualizar la

corrida del gel, en donde se encuentra marcada la muestra 43 que muestra la presencia de ambos alelos, mientras que la muestra 40 es homocigota para el alelo 2.

4.4 Ancestría individual

Una vez realizadas todas las lecturas de las corridas de electroforesis, se sistematizó la información de cada individuo en una tabla, disponible en los anexos III, IV y V, con sus resultados para cada marcador. A su vez, se realizó para cada marcador el análisis de Hardy Weinberg con el complemento GenAlex para Microsoft Excel, para analizar que se encuentren en equilibrio. Como se puede ver en la Tabla 4.4 este análisis marcó que dos de los marcadores utilizados —MECOM y WI-11153— no se encontraban en equilibrio. Las diferencias, indicaron un desequilibrio de Hardy- Weinberg con un valor de $p < 0.05$. Es por esto que dichos marcadores fueron eliminados del análisis de ancestría.

Marcador	χ^2	P	Signif
OGFOD3	0,556	0,456	ns
FOXP1	0,309	0,578	ns
KLHL29	0,198	0,656	ns
AMER1	0,005	0,943	ns
SLC24A5	0,961	0,327	ns
DLGAP5	1,368	0,242	ns
AMER4	0,411	0,521	ns
AMER2	1,089	0,297	ns
ROR1	3,091	0,079	ns
NOTCH2	0,566	0,452	ns
KIF3C	0,052	0,819	ns
CYP19-E2*1	3,009	0,083	ns
ROPN1L	0,701	0,402	ns
SLC39A4	0,907	0,341	ns
WI-9231*1	0,783	0,376	ns
PTPRO	0,091	0,763	ns
WI-11909	1,026	0,311	ns
EURO	0,013	0,908	ns

MECOM	6,400	0,011	*
rs10510511	0,103	0,749	ns
rs3870336	3,293	0,070	ns
rs2042314	1,703	0,192	ns
APO	0,179	0,672	ns
GC*S	1,301	0,254	ns
DRD2	2,035	0,154	ns
WI-7423	1,452	0,228	ns
WI-11153	5,756	0,016	*
LPL	0,436	0,509	ns
TYR192	0,186	0,666	ns
OGFOD3	0,036	0,850	ns

Tabla 4.4: Análisis de Hardy Weinberg. Se indica el χ^2 (chi-cuadrado) para cada marcador. Siendo ns no significativo, mientras que * indica un $P < 0,05$.

Para terminar de confirmar que la mejor forma de agrupación es en tres poblaciones, y que la muestra analizada no es una muestra aislada y separada de las tres poblaciones parentales —euroasiáticas, americanas y africanas—, se realizó la comparación con Structure Harvest y Clumpp, programas complementarios. Primero analizamos la ancestría para cada individuo —tanto de las parentales como de nuestra muestra— asumiendo que existen dos, tres, cuatro y cinco poblaciones. Para cada asunción se repitió tres veces el estudio. Luego, con todos estos datos, identificamos cuál de todos estos agrupamientos es el que tiene un mejor Delta K, es decir, cuál representa mejor la agrupación de la muestra. Como podemos ver en la Figura 4.5, la mejor forma de agrupar a las poblaciones es considerando tres poblaciones en total.

K	Reps	Mean LnP(K)	Stdev		Ln''(K)	Delta K
			LnP(K)	Ln'(K)		
2	3	-17941.83333	0.47258	NA	NA	NA
3	3	-15220.06667	0.49329	2721.76667	2713.66667	5501.17800
4	3	-15211.96667	1.24231	8.10000	94.36667	75.96066
5	3	-15298.23333	118.40990	-86.26667	NA	NA

Figura 4.5: Diferentes agrupaciones. Indicada con un resaltado, se encuentra la mejor de las agrupaciones posibles: tres poblaciones (K=3).

El programa Clumpp genera un promedio entre las tres corridas para la estimación de tres poblaciones diferentes. De esta forma accedemos a la ancestría individual de cada paciente, en porcentajes diferenciados para cada población estimada —euroasiáticas, americanas y africanas—. Como podemos ver en la tabla 4.5.

ID	EURO	AMER	AFRO
1	0,5753	0,2033	0,2213
2	0,6697	0,2193	0,1110
3	0,6714	0,2136	0,1150
4	0,6717	0,3217	0,0067
5	0,6860	0,3103	0,0037
6	0,5560	0,3163	0,1277
7	0,4485	0,2321	0,3195
8	0,4834	0,3193	0,1973
10	0,4481	0,2658	0,2861
11	0,3872	0,3424	0,2704
12	0,3310	0,4179	0,2511
13	0,6048	0,1831	0,2121
14	0,5478	0,2371	0,2151
15	0,3447	0,3867	0,2687
16	0,2350	0,4490	0,3160
17	0,8317	0,1636	0,0047
18	0,6523	0,2550	0,0927
19	0,7602	0,1898	0,0500
20	0,4967	0,1923	0,3110
21	0,7391	0,2196	0,0413
22	0,7243	0,1730	0,1027
23	0,6860	0,2583	0,0557
24	0,8393	0,1561	0,0047
25	0,6830	0,2810	0,0360
26	0,5113	0,3387	0,1500
27	0,8046	0,1361	0,0594
28	0,6975	0,1984	0,1040
29	0,4123	0,2710	0,3167
30	0,6940	0,2940	0,0120
31	0,5514	0,2493	0,1993
32	0,5657	0,2950	0,1393

33	0,7582	0,1864	0,0554
34	0,7943	0,0917	0,1140
35	0,4539	0,1523	0,3938
36	0,4729	0,2151	0,3121
37	0,5219	0,2524	0,2257
38	0,3403	0,3583	0,3013
39	0,6663	0,2723	0,0613
40	0,6657	0,2210	0,1133
41	0,7269	0,1794	0,0937
42	0,8121	0,1729	0,0150
43	0,7107	0,0614	0,2280
44	0,3947	0,2323	0,3730
45	0,6613	0,2240	0,1147
46	0,7573	0,2263	0,0163
47	0,6127	0,3700	0,0173
48	0,8087	0,1773	0,0140
49	0,7660	0,0550	0,1790
50	0,8677	0,0810	0,0513
51	0,7028	0,2935	0,0037
52	0,4879	0,3388	0,1733
53	0,7636	0,2221	0,0143
54	0,5130	0,3390	0,1480
55	0,6370	0,3223	0,0407
56	0,9060	0,0843	0,0097
57	0,8757	0,1203	0,0040
58	0,6620	0,3127	0,0253
59	0,7403	0,2413	0,0183
60	0,8286	0,1507	0,0207
61	0,9183	0,0297	0,0520

Tabla 4.5: Porcentaje de ancestría. Se detallan las 60 muestras analizadas con 27 Marcadores

De esta forma se pudo determinar los porcentajes de ancestría para cada paciente. Del total de 65 muestras que contamos originalmente, se definió eliminar 5 que no mostraban amplificación, resultando en 60 muestras con 27 individuos que no presentan reacción a la terapia, mientras que 33 sí generan anticuerpos inhibidores de la terapia. Las muestras eliminadas fueron la 9, 62, 63, 64 y 65 —Figura 4.6—.

Ancestría individual

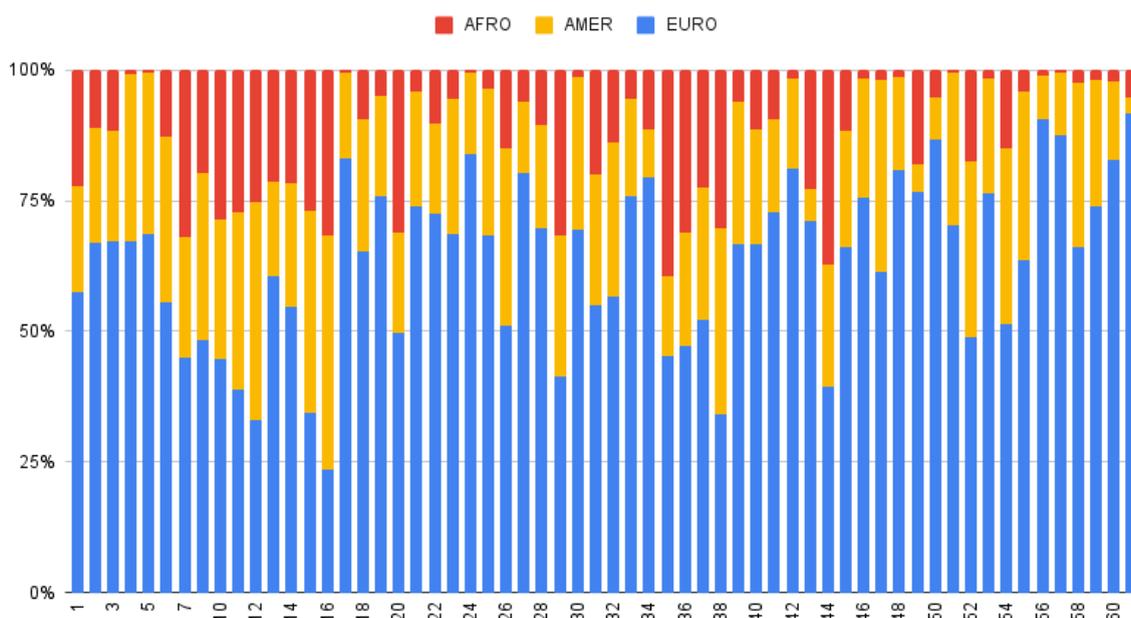


Figura 4.6: Ancestría individual, realizada a partir de 27 AIMs.

4.5 Ancestría poblacional

Las muestras fueron clasificadas posteriormente entre las que no presentan problemas con la terapia: 1, 2, 4, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 14, 16, 17, 18, 22, 27, 41, 43, 46, 47, 48, 50, 53, 54, 55, 56, 58 y 60. Dando un total de 27 muestras. Y las que sí desarrollan anticuerpos neutralizantes de la terapia, que presentan un total de 33 muestras: 3, 5, 13, 15, 19, 20, 21, 23, 24, 25, 26, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 42, 44, 45, 49, 51, 52, 57, 59, 61. En la Tabla 4.6 se encuentran los promedios de ancestría para estos subgrupos.

Subgrupos	EURO	AMER	AFRO
60 muestras (total)	0,6356133333	0,2345483333	0,12984
33 muestras que desarrollan anticuerpos inhibidores de la terapia	0,6356363636	0,2271060606	0,1372545455
27 muestras que no desarrollan anticuerpos inhibidores de la terapia	0,6355851852	0,2436444444	0,1207777778

Tabla 4.6: Promedios de ancestría. Se detallan los promedios de ancestría para el total de la las muestras y para los grupos poblacionales estudiados

El análisis de los promedios de ancestría en cada grupo poblacional evidencia que el mayor aporte genético proviene de la ancestría europea, representando un 63% del total. Este predominio se destaca frente a los menores aportes observados en las ancestrías americana y africana, que registran un 23% y un 12%, respectivamente —Tabla 4.6—. Estos resultados sugieren una composición genética donde prevalece la contribución europea, mientras que las influencias americana y africana son menos pronunciadas, aunque igualmente relevantes en la estructura genética de la población evaluada.

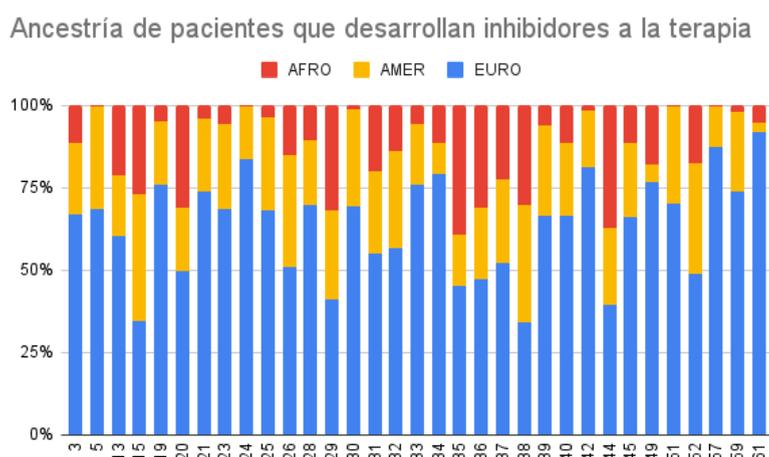


Figura 4.7: Ancestría con inhibidor. Ancestría individual de pacientes que desarrollan inhibidores a la terapia, realizada a partir de 27 AIMs.

Por otro lado, el análisis específico de los 33 pacientes que desarrollaron anticuerpos inhibidores en respuesta a la terapia indica que el componente europeo sigue siendo el predominante, representando el 63% de la ancestría total de este subgrupo. Este resultado subraya una contribución significativa de la ancestría europea en estos individuos, mientras que los componentes americano y africano están presentes en menores proporciones, con un 22% y un 13% respectivamente. Estos datos, representados en la Figura 4.7, permiten observar con claridad la distribución de ancestría individual entre los pacientes con inhibidores, facilitando un análisis visual de las variaciones en la composición genética en este grupo específico.

Por último, se presenta el análisis de los 27 pacientes que no desarrollaron inhibidores tras la terapia, quienes también mantienen una tendencia similar a la observada en las otras subpoblaciones. En este grupo, el componente europeo es nuevamente el más alto, alcanzando un 63% del total, seguido por un aporte americano del 24% y un menor aporte africano, que representa el 12% de la ancestría. La figura 4.8 ilustra de manera detallada esta

distribución de ancestría individual en el grupo de pacientes sin inhibidores, destacando los aportes ancestrales europeo, americano y africano.

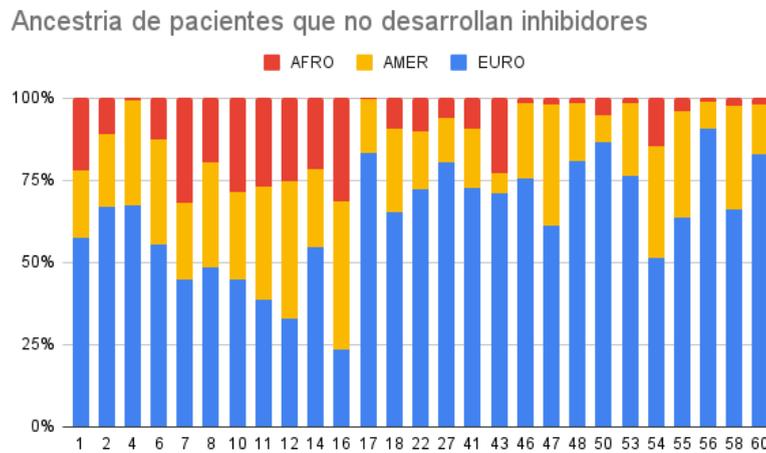


Figura 4.8: Ancestrías sin inhibidor. Ancestría individual de pacientes que no desarrollan inhibidores a la terapia, realizada a partir de 27 AIMS.

Al realizar el análisis estadístico de los resultados obtenidos, se utilizó el software InfoStat (versión 2020) para evaluar la distribución y comparabilidad de las ancestrías europea, americana y africana en ambas subpoblaciones de pacientes. Los análisis de evaluación de los supuestos indicaron que las ancestrías europea y americana se distribuyen normalmente en ambas poblaciones, como se ilustra en la figura 4.9. Sin embargo, en el caso de la ancestría africana, la distribución no se ajusta a la normalidad en ninguna de las poblaciones. Esto se debe a que la mayoría de los pacientes presentan una proporción muy baja de ancestría africana, mientras que una minoría exhibe una proporción significativamente mayor, lo cual desplaza la distribución hacia la derecha.

Para las ancestrías europea y americana la prueba T de Student aplicada sugiere que no se puede rechazar la hipótesis nula, lo cual indica que las medias entre ambas subpoblaciones no presentan diferencias estadísticamente significativas, como se indica en la Tabla 4.7.

En cuanto a la ancestría africana, la prueba de medianas y la prueba no paramétrica de Wilcoxon-Mann-Whitney fueron consistentes, indicando que tampoco se puede rechazar la hipótesis nula de igualdad en la mediana de la ancestría africana entre ambas subpoblaciones, como se indica en la Tabla 4.7.

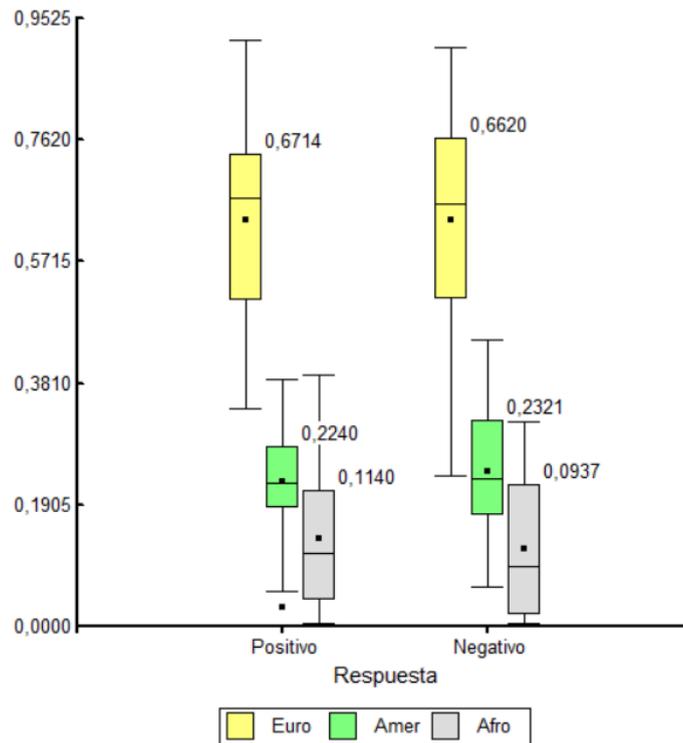


Figura 4.9: Gráfico de Cajas y Bigotes. Donde las muestras Positivas son las que presentan inhibidores, mientras que las Negativas no tienen inhibidores.

En forma de resumen, la Tabla 4.7 presenta los resultados detallados para cada grupo de ancestría, incluyendo los valores de la media y la mediana, el estadístico utilizado en cada caso, y el valor de P. Es importante señalar que las tres ancestrías están interrelacionadas en cada individuo, por lo que no pueden considerarse como variables completamente independientes en el análisis. Para ajustar adecuadamente el nivel de significancia en función de esta interdependencia, se utilizó un valor de P corregido (0.05/3) en la interpretación de las pruebas con el fin de garantizar una toma de decisiones estadísticamente robusta respecto a la hipótesis nula.

Subgrupos		Media	Mediana	T/W	P
EURO	Positivo	0,6356	0,6714	-0,001	0,99
	Negativo	0,6356	0,662		
AMER	Positivo	0,2271	0,224	0,69	0,49
	Negativo	0,2436	0,2321		
AFRO	Positivo	0,1373	0,114	792,5	0,64

	Negativo	0,1208	0,0937		
--	-----------------	--------	--------	--	--

Tabla 4.7: Resultados estadísticos. Se detallan los resultados de los estadísticos T de Student para las ancestrías Europeas y Americanas, y Wilcoxon-Mann-Whitney para la ancestría Africana de cada subgrupo, siendo Positivo los pacientes que reaccionan con anticuerpos inhibidores a la terapia, y Negativo los pacientes que no desarrollan inhibidores. Se detalla a su vez el valor de P, la Media y la Mediana.



5. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El conocimiento sobre la ancestría poblacional representa un área de investigación con un potencial significativo en medicina, ya que permite abordar cuestiones complejas relacionadas con la salud y las enfermedades desde una perspectiva más integral. Aunque la mayor parte de la variabilidad genética humana se debe a diferencias individuales, una pequeña pero importante fracción corresponde a variaciones entre poblaciones (Jakobsson et al., 2008; Rosenberg et al., 2002). Estas variaciones genéticas interpoblacionales han demostrado tener implicancias relevantes en la predisposición a ciertas enfermedades. En algunos casos, dichas variaciones genéticas se han vinculado con mayores riesgos de padecer enfermedades específicas, como diversos tipos de cáncer, entre ellos, el de mama (Bonilla et al., 2015; Haryono et al., 2015; Tamayo et al., 2023; Ziv et al., 2006), y el de próstata (Beebe-Dimmer et al., 2008; Peprah et al., 2015; Robbins et al., 2007; A. Wang et al., 2023), así como con enfermedades cardiovasculares, como la hipertensión (Keaton et al., 2021; Zhu & Cooper, 2007), entre otras.

En relación con la hemofilia, diversos estudios realizados en los Estados Unidos han destacado una disparidad significativa en la incidencia de anticuerpos inhibidores de la terapia entre pacientes pertenecientes a diferentes grupos étnicos. En particular, se ha documentado que los pacientes hemofílicos afrodescendientes tienen una mayor probabilidad de desarrollar estos inhibidores en comparación con otros grupos, como los caucásicos, aunque las causas subyacentes de esta diferencia no están completamente esclarecidas (Gunasekera et al., 2015; Kempton et al., 2023; Pratt et al., 2023).

Según la Fundación Mundial de la Hemofilia, la etnicidad puede considerarse un factor de riesgo genético no modificable en el desarrollo de inhibidores. Este organismo señala que, a nivel mundial, las personas no caucásicas tienen un riesgo entre 1,9 y 4,7 veces mayor de desarrollar inhibidores a la terapia, lo que resalta una problemática global que aún carece de una comprensión integral (Carcao & Goudemand, 2018).

Estudios específicos sobre pacientes con hemofilia A han proporcionado datos más detallados acerca de la relación entre el origen étnico y el desarrollo de inhibidores. Miller y colaboradores (2012), llevaron a cabo un análisis que reveló una disparidad notable: el 37,1% de los pacientes afrodescendientes estudiados presentaban inhibidores, en contraste con el 19,6% de los pacientes blancos. Este hallazgo no solo destaca una diferencia significativa entre ambos grupos, sino que también subraya la necesidad de investigar los mecanismos subyacentes que podrían explicar esta variabilidad. De manera similar, Johnsen y

colaboradores (2022) analizaron una muestra diversa y observaron una tendencia comparable. En su estudio, el 30,8% de los pacientes negros desarrollaron inhibidores, frente al 19,2% de los pacientes blancos. Estos resultados corroboran la existencia de disparidades consistentes en estas diferentes cohortes de pacientes, lo que sugiere que no se trata de un fenómeno aislado, sino de una tendencia recurrente.

Al igual que estos últimos, Ahmed y Pratt (2023), toman su muestra del repositorio de investigación llamado “Mi vida, nuestro futuro”, que fue realizado a partir de los datos de la comunidad de hemofilia en los Estados Unidos. La base de datos no solo consiste en la información clínica de pacientes hemofílicos, sino también en la secuencia de ADN con la determinación del tipo de mutación genética asociada a algún trastorno hemorrágico —Hemofilia A, B, enfermedad de von Willebrand, etc.— generando un repositorio de mucha utilidad para el estudio de la enfermedad. Es de destacar que esta base de datos contempla tanto el dato de raza como el de etnicidad a partir de cómo es autopercebida por los pacientes. En este caso, los autores mencionan que al comparar la raza o etnia con el desarrollo del inhibidor, este también brinda un mayor riesgo de generar anticuerpos inhibidores de la terapia en pacientes negros.

Pero nos preguntamos, ¿y si esta diferencia no está dada en una mayor predisposición genética, sino en los tipos de tratamientos disponibles? Como se planteó en los antecedentes, Viel y otros (2009) indican que la mayor prevalencia de inhibidores en pacientes afroamericanos podría estar asociada con una discrepancia entre los haplotipos del factor VIII (FVIII) predominantes en esta población y las variantes presentes en los productos terapéuticos diseñados principalmente para haplotipos caucásicos. Esta incompatibilidad podría influir en la respuesta inmunológica, favoreciendo la formación de anticuerpos inhibidores. Sin embargo, investigaciones más recientes han señalado que el riesgo elevado de desarrollar inhibidores persiste incluso en pacientes afroamericanos con inversión del intrón 22, aun cuando sus haplotipos coinciden con las isoformas caucásicas del FVIII (Gunasekera et al., 2015).

Es importante señalar que, en los estudios mencionados previamente, la categorización racial se basa en la autopercepción de los pacientes, lo que introduce un grado significativo de imprecisión para su uso comparativo. Aunque el concepto de raza puede resultar controvertido desde una perspectiva antropológica, su uso sigue siendo común en investigaciones realizadas en Estados Unidos (Avena et al., 2024). Nosotros no queremos

dejar de destacar que las clasificaciones raciales en general, y las autoadscribidas en particular, suelen estar influenciadas por múltiples factores culturales, sociales y personales, con frecuencia desvinculados de las características genéticas subyacentes.

En este contexto, resulta fundamental considerar otras variables que podrían influir en la asimilación diferente de las terapias para hemofilia en los distintos grupos poblacionales, como pueden ser las desigualdades en el acceso a medicamentos, la calidad de la atención médica, el nivel educativo y las oportunidades laborales disponibles. Estos factores socioeconómicos pueden desempeñar un papel crucial en la definición de estas categorías raciales, y deben ser analizados para descartar explicaciones alternativas a las diferencias observadas.

Con el fin de superar estas limitaciones, en el presente estudio se incorpora un análisis genético de ancestría individual y poblacional en pacientes con hemofilia A y la mutación causal Inv22. Este enfoque no solo permite una comprensión más precisa de las relaciones entre los orígenes genéticos de los pacientes y el desarrollo de inhibidores, sino que también representa un avance significativo en comparación con los métodos basados únicamente en la autoadscripción. Cabe destacar que este es el primer trabajo de este tipo realizado tanto a nivel nacional como internacional, marcando un hito en la investigación sobre hemofilia y su relación con la ancestría genética. Al analizar directamente los marcadores genéticos, se busca arrojar luz sobre las posibles conexiones entre la ancestría y la respuesta a la terapia, contribuyendo así al desarrollo de tratamientos más efectivos y equitativos para la población hemofílica.

Esto plantea una pregunta central para nuestra investigación: si tomamos como válidos estos estudios previos que sugieren una relación entre la ancestría y el desarrollo de inhibidores a la terapia hemofílica, ¿podría este fenómeno observarse también en una sociedad como la nuestra, caracterizada por un amplio mestizaje? La población argentina es el resultado de complejos procesos históricos de diversidad genética, que combinan componentes europeos, nativos americanos y africanos en proporciones variables según las regiones del país. Por ejemplo, Seldin et al. (2007) calcularon un aporte promedio del 19% nativo americano y un 2% subsahariano en la región pampeana, este análisis fue logrado con el estudio de 78 SNPs en 94 individuos. Por otro lado, Di Fabio Rocca y otros (2016) estimaron la mezcla génica en Ciudad de Salta, determinando un aporte mayoritario de la parental americana (50,2%), seguido por el aporte europeo (46,3%) y subsahariano (3,5%).

Pero, ¿qué sucede en particular dentro del AMBA? Avena y otros (2001) indicaron para la ciudad de Buenos Aires un componente africano de entre 1 y 3,3%, utilizando 9 sistemas eritrocitarios. Por otro lado, Martínez-Marignac et al. (2004) analizaron con 5 marcadores una muestra de la ciudad de La Plata, reportando un 4% de aporte africano. Fejerman y otros (2005) utilizaron 12 AIMS específicos para africanos en una muestra de 90 personas de la Ciudad de Buenos Aires, indicando un aporte promedio de 2,2%. La estimación de la proporción de ancestría genética llevada a cabo por Avena y otros (2012), en 168 individuos de la ciudad de Buenos Aires realizada a partir de 99 SNPs, evidenció un aporte promedio del 79% del componente europeo, 17% nativo americano y 4% para el componente subsahariano. En concordancia, Patiño (2020) encuentra entre un 3,4% y 4,5% de aporte subsahariano para una muestra de la Ciudad de Buenos Aires con la utilización de 30 y 25 AIMS, respectivamente.

A partir de todos los datos recabados hasta ahora, podemos asegurar que la sociedad argentina en general, y la población de AMBA en particular, es una sociedad producto de grandes procesos de mestizaje. A partir de los estudios que realizamos en las muestras de pacientes con Hemofilia del AMBA, se logró identificar que este proceso es similar a los reportados para la población general, dando un mayor porcentaje de aporte Europeo (63,5%), y en menor medida nativo americano (23,4%) y africano (12,9%). En un primer análisis podemos notar que nuestras muestras tienen los componentes minoritarios sobreestimados, esto se debe principalmente a no haber podido utilizar los 30 marcadores propuestos, y principalmente, a la no utilización del marcador FY*null. Este último es de gran utilidad para la discriminación de ancestría africana en la población. Por otro lado, hubo dos marcadores —WI-11153 y MECOM— que al analizarlos no se encontraron en equilibrio de Hardy Weinberg, esto nos estaría indicando que en dichos marcadores está actuando algún factor externo, por lo que tuvimos que descartarlos. Como ya se ha mencionado, otros estudios (Patiño, 2020; Russo et al., 2016) han demostrado que el número recomendado de marcadores a utilizar es 30, ya que con menos que estos los aportes minoritarios suelen presentarse sobreestimados.

De todas formas, para el fin de nuestra investigación, conocer que estos aportes africanos existieron es suficiente para poder preguntarnos si efectivamente hay una diferencia entre quienes producen inhibidores a la terapia y quienes no. En pos de responder esto, clasificamos nuestra muestra en estos dos grupos: 33 personas con hemofilia que desarrollan el inhibidor, y 27 que no lo desarrollan. Tomando los datos producidos por la academia

estadounidense, cabría esperar que la muestra se clasifique mostrando una mayoría de ascendencia africana entre quienes sí desarrollaron el inhibidor de la terapia. Pero al analizar los datos las diferencias entre las muestras no es significativa, por lo que podemos afirmar que la ancestría no es un indicador fiable para identificar mayor probabilidad de desarrollar inhibidores en la población del AMBA argentino.

En cuanto a los objetivos propuestos, hemos logrado validar la metodología propuesta, logrando poner a punto 29 de los 30 marcadores elegidos. Planificamos a futuro continuar con el trabajo de la puesta a punto del único marcador que no pudimos analizar, esperando contar con los recursos y la posibilidad de llevarlo a cabo. Se ha logrado estimar la ancestría individual en pacientes con HA, específicamente con la mutación causal Inv22, dentro del AMBA, y se ha podido analizar 33 individuos de esta muestra que además desarrollan inhibidores de la terapia, junto con 27 que no los desarrollan. Todo lo mencionado nos lleva a rechazar nuestra hipótesis, ya que la correlación existente entre el desarrollo del anticuerpo inhibidor anti FVIII y la ancestría individual no ha sido significativa.

En conclusión, la ancestría individual y la mezcla génica de pacientes de HA con la mutación causal Inv22 dentro del AMBA, no muestra una diferencia en los aportes africanos, nativos americanos ni europeos respecto a quienes desarrollan o no el inhibidor. Esto nos indica que para la muestra analizada la enfermedad no se expresa de forma diferente según las distintas ancestrías. Este hallazgo plantea la posibilidad de que existan otros factores genéticos, epigenéticos o inmunológicos que contribuyen a estas diferencias, los cuales aún no se comprenden por completo. Además, estas observaciones subrayan la necesidad de explorar con mayor profundidad los mecanismos moleculares y las interacciones genético-ambientales que podrían influir en la inmunogenicidad del tratamiento en diferentes grupos poblacionales. Esperamos continuar indagando en las relaciones genéticas que se presentan en el desarrollo del inhibidor de la terapia para poder brindar mejores experiencias con los tratamientos a quienes padecen esta enfermedad. Abordar estas cuestiones podría no sólo optimizar los tratamientos para poblaciones específicas, sino también contribuir al desarrollo de estrategias terapéuticas más equitativas y efectivas a nivel global.

5.1 Conclusiones finales

- Se logró poner a punto la metodología para caracterizar 29 de los 30 marcadores genéticos propuestos, optimizando su análisis y visualización.
- Se analizaron un total de 60 muestras de pacientes con hemofilia mediante el uso de 27 AIMs alcanzando resultados representativos para esta población específica.
- Los resultados obtenidos no evidenciaron diferencias significativas en la composición de ancestría entre las subpoblaciones analizadas, es decir, entre quienes desarrollan inhibidores a la terapia y quienes no lo hacen.
- No se identificó evidencia que permita establecer una relación entre la ancestría africana y la mayor probabilidad de desarrollar inhibidores, lo que sugiere la necesidad de explorar otros factores.
- Este estudio constituye el primer análisis genético de ancestría realizado en pacientes con hemofilia provenientes del AMBA y, además, representa el primer análisis de este tipo a nivel mundial. Los resultados obtenidos aportan datos novedosos sobre la composición genética de esta población y contribuyen a ampliar el conocimiento sobre la diversidad genética en pacientes con hemofilia.



6. BIBLIOGRAFÍA

- Abelleyro, M. M., Rossetti, L. C., Curto, M. de L. Á., Radic, C. P., Marchione, V. D., & De Brasi, C. D. (2016). F8 intron 22 inversions and SNP rs73563631 in unrelated families with severe haemophilia A: clinical features and gene testing implications. *Thrombosis and Haemostasis*, *115*(3), 678-681. <https://doi.org/10.1160/TH15-08-0643>
- Acquila, M., Pasino, M., Lanza, T., Molinari, A. C., Rosano, C., & Bicocchi, M. P. (2005). Exon skipping partially restores factor VIII coagulant activity in patients with mild hemophilia A with exon 13 duplication. *Haematologica*, *90*(7), 997-999.
- Ahmed, A. E., & Pratt, K. P. (2023). Race, ethnicity, F8 variants, and inhibitor risk: Analysis of the «My Life Our Future» hemophilia A database. *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH*, *21*(4), 800-813. <https://doi.org/10.1016/j.jtha.2022.12.017>
- Alexander, D. H., Novembre, J., & Lange, K. (2009). Fast model-based estimation of ancestry in unrelated individuals. *Genome Research*, *19*(9), 1655. <https://doi.org/10.1101/gr.094052.109>
- Antonarakis, S. E., Rossiter, J. P., Young, M., Horst, J., de Moerloose, P., Sommer, S. S., Ketterling, R. P., Kazazian, H. H., Jr, Négrier, C., Vinciguerra, C., Gitschier, J., Goossens, M., Girodon, E., Ghanem, N., Plassa, F., Lavergne, J. M., Vidaud, M., Costa, J. M., Laurian, Y., ... Inaba, H. (1995). Factor VIII gene inversions in severe hemophilia A: results of an international consortium study. *Blood*, *86*(6), 2206-2212.
- Astermark, J. (2015). FVIII inhibitors: Pathogenesis and avoidance. *Blood*, *125*(13), 2045-2051. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-08-535328>
- Astermark, J., Berntorp, E., White, G. C., Kroner, B. L., & MIBS Study Group. (2001). The Malmö International Brother Study (MIBS): Further support for genetic predisposition to inhibitor development in hemophilia patients. *Haemophilia: The Official Journal of the World Federation of Hemophilia*, *7*(3), 267-272. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2516.2001.00510.x>
- Astermark, J., Dolan, G., Hilberg, T., Jiménez-Yuste, V., Laffan, M., Lassila, R., Lobet, S., Martinoli, C., & Perno, C.-F. (2014). Managing haemophilia for life: 4th Haemophilia Global Summit. *Haemophilia: The Official Journal of the World Federation of Hemophilia*, *20 Suppl 5*, 1-20. <https://doi.org/10.1111/hae.12468>

- Astermark, J., Donfield, S. M., Gomperts, E. D., Schwarz, J., Menius, E. D., Pavlova, A., Oldenburg, J., Kessing, B., DiMichele, D. M., Shapiro, A. D., Winkler, C. A., Berntorp, E., & Hemophilia Inhibitor Genetics Study (HIGS) Combined Cohort. (2013). The polygenic nature of inhibitors in hemophilia A: Results from the Hemophilia Inhibitor Genetics Study (HIGS) Combined Cohort. *Blood*, *121*(8), 1446-1454. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-06-434803>
- Avena, S. A., Goicoechea, A. S., Dugoujon, J. M., Slepoy, M. G., Slepoy, A. S., & Carnese, F. R. (2001). Análisis antropogenético de los aportes indígena y africano en muestras hospitalarias de la Ciudad de Buenos Aires. *Revista Argentina de Antropología Biológica*, *3*, 79-99.
- Avena, S. A., Russo, M. G., Lozano, M., & Di Fabio Rocca, F. (2024). El uso de categorías raciales en la biomedicina argentina. Un análisis de publicaciones nacionales e internacionales. *Revista Uruguaya de Antropología y Etnografía*, *9*(2).
- Avena, S., Goicoechea, A. S., Rey, J., Dugoujon, J. M., Dejean, C. B., & Carnese, F. R. (2006). Mezcla genica en una muestra poblacional de la Ciudad de Buenos Aires. *Medicina*, *66*(2), 113-118.
- Avena, S., Via, M., Ziv, E., Pérez-Stable, E. J., Gignoux, C. R., Dejean, C., Huntsman, S., Torres-Mejía, G., Dutil, J., Matta, J. L., Beckman, K., Burchard, E. G., Parolin, M. L., Goicoechea, A., Acreche, N., Boquet, M., Ríos Part, M. D. C., Fernández, V., Rey, J., ... Fejerman, L. (2012). Heterogeneity in genetic admixture across different regions of Argentina. *PloS One*, *7*(4), e34695. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034695>
- Bagnall, R. D., Giannelli, F., & Green, P. M. (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: JTH*, *4*(3), 591-598. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2006.01840.x>
- Bagnall, R. D., Waseem, N., Green, P. M., & Giannelli, F. (2002). Recurrent inversion breaking intron 1 of the factor VIII gene is a frequent cause of severe hemophilia A. *Blood*, *99*(1), 168-174. <https://doi.org/10.1182/blood.v99.1.168>
- Bailliet, G., Ramallo, V., Muzzio, M., García, A., Santos, M. R., Alfaro, E. L., Dipierri, J. E., Salceda, S., Carnese, F. R., Bravi, C. M., Bianchi, N. O., & Demarchi, D. A. (2009).

- Brief communication: Restricted geographic distribution for Y-Q* paragroup in South America. *American Journal of Physical Anthropology*, 140(3), 578-582. <https://doi.org/10.1002/ajpa.21133>
- Beebe-Dimmer, J. L., Levin, A. M., Ray, A. M., Zuhlke, K. A., Machiela, M. J., Halstead-Nussloch, B. A., Johnson, G. R., Cooney, K. A., & Douglas, J. A. (2008). Chromosome 8q24 markers: Risk of early-onset and familial prostate cancer. *International Journal of Cancer*, 122(12), 2876-2879. <https://doi.org/10.1002/ijc.23471>
- Behar, D. M., van Oven, M., Rosset, S., Metspalu, M., Loogväli, E.-L., Silva, N. M., Kivisild, T., Torroni, A., & Villems, R. (2012). A “Copernican” Reassessment of the Human Mitochondrial DNA Tree from its Root. *American Journal of Human Genetics*, 90(4), 675. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2012.03.002>
- Beltran-Sarmiento, E., Floriano-Sánchez, E., Bandala, C., Lara-Padilla, E., & Cárdenas-Rodríguez, N. (2016). Association of CYP8A1 (Prostacyclin I2 synthase) polymorphism rs5602 with breast cancer in Mexican woman. *American Journal of Cancer Research*, 6(2), 341.
- Bertoni, B. (2011). Admixture Mapping and Genetic Technologies: Perspectives from Latin America. En S. Gibbon, R. V. Santos, & M. Sans (Eds.), *Racial Identities, Genetic Ancestry, and Health in South America: Argentina, Brazil, Colombia, and Uruguay* (pp. 103-120). Palgrave Macmillan US. https://doi.org/10.1057/9781137001702_5
- Biggs, R., Douglas, A. S., Macfarlane, R. G., Dacie, J. V., Pitney, W. R., & Merskey, null. (1952). Christmas disease: A condition previously mistaken for haemophilia. *British Medical Journal*, 2(4799), 1378-1382. <https://doi.org/10.1136/bmj.2.4799.1378>
- Bisso-Machado, R., Jota, M. S., Ramallo, V., Paixão-Côrtes, V. R., Lacerda, D. R., Salzano, F. M., Bonatto, S. L., Santos, F. R., & Bortolini, M. C. (2011). Distribution of Y-chromosome Q lineages in Native Americans. *American Journal of Human Biology: The Official Journal of the Human Biology Council*, 23(4), 563-566. <https://doi.org/10.1002/ajhb.21173>
- Bodner, M., Perego, U., Huber, G., Fendt, L., Roeck, A., Zimmermann, B., Olivieri, A., Gómez-Carballa, A., Lancioni, H., Angerhofer, N., Bobillo, M., Corach, D.,

- Woodward, S., Salas, A., Achilli, A., Torroni, A., Bandelt, H.-J., & Parson, W. (2012). Rapid coastal spread of First Americans: Novel insights from South America's Southern Cone mitochondrial genomes. *Genome research*, 22, 811-820. <https://doi.org/10.1101/gr.131722.111>
- Bonifaz-Peña, V., Contreras, A. V., Struchiner, C. J., Roela, R. A., Furuya-Mazzotti, T. K., Chammas, R., Rangel-Escareño, C., Uribe-Figueroa, L., Gómez-Vázquez, M. J., McLeod, H. L., Hidalgo-Miranda, A., Parra, E. J., Fernández-López, J. C., & Suarez-Kurtz, G. (2014). Exploring the distribution of genetic markers of pharmacogenomics relevance in Brazilian and Mexican populations. *PloS One*, 9(11), e112640. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112640>
- Bonilla, C., Bertoni, B., Hidalgo, P. C., Artagaveytia, N., Ackermann, E., Barreto, I., Cancela, P., Cappetta, M., Egaña, A., Figueiro, G., Heinzen, S., Hooker, S., Román, E., Sans, M., & Kittles, R. A. (2015). Breast cancer risk and genetic ancestry: A case-control study in Uruguay. *BMC Women's Health*, 15(1), 11. <https://doi.org/10.1186/s12905-015-0171-8>
- Bortolini, M.-C., Salzano, F. M., Thomas, M. G., Stuart, S., Nasanen, S. P. K., Bau, C. H. D., Hutz, M. H., Layrisse, Z., Petzl-Erler, M. L., Tsuneto, L. T., Hill, K., Hurtado, A. M., Castro-de-Guerra, D., Torres, M. M., Groot, H., Michalski, R., Nymadawa, P., Bedoya, G., Bradman, N., ... Ruiz-Linares, A. (2003). Y-Chromosome Evidence for Differing Ancient Demographic Histories in the Americas. *American Journal of Human Genetics*, 73(3), 524. <https://doi.org/10.1086/377588>
- Brandini, S., Bergamaschi, P., Cerna, M. F., Gandini, F., Bastaroli, F., Bertolini, E., Cereda, C., Ferretti, L., Gómez-Carballea, A., Battaglia, V., Salas, A., Semino, O., Achilli, A., Olivieri, A., & Torroni, A. (2018). The Paleo-Indian Entry into South America According to Mitogenomes. *Molecular Biology and Evolution*, 35(2), 299-311. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx267>
- Burgaleta Alonso de Ozalla, C. (2024). La coagulopatía que dió origen a “la enfermedad real”. *RIECS: Revista de Investigación y Educación en Ciencias de la Salud*, 9(1), 88-92.
- Cabrera, J. L., & Sánchez, Á. H. (2001). *Texto ilustrado de biología molecular e ingeniería genética: Conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencias de la salud*. Elsevier España.

- Cann, R. L., Stoneking, M., & Wilson, A. C. (1987). Mitochondrial DNA and human evolution. *Nature*, 325(6099), 31-36. <https://doi.org/10.1038/325031a0>
- Carcao, M., & Goudemand, J. (2018). Los inhibidores en la hemofilia: Información básica (Quinta edición). *Federación Mundial de Hemofilia (FMH)*, 7, 1-21.
- Cocca, M., Bedognetti, D., Bianca, M. L., Gasparini, P., & Giroto, G. (2016). Pharmacogenetics driving personalized medicine: Analysis of genetic polymorphisms related to breast cancer medications in Italian isolated populations. *Journal of Translational Medicine*, 14, 22. <https://doi.org/10.1186/s12967-016-0778-z>
- Crossetti, S. G., Demarchi, D. A., Raimann, P. E., Salzano, F. M., Hutz, M. H., & Callegari-Jacques, S. M. (2008). Autosomal STR genetic variability in the Gran Chaco native population: Homogeneity or heterogeneity? *American Journal of Human Biology: The Official Journal of the Human Biology Council*, 20(6), 704-711. <https://doi.org/10.1002/ajhb.20798>
- Davie, E. W., & Ratnoff, O. D. (1964). WATERFALL SEQUENCE FOR INTRINSIC BLOOD CLOTTING. *Science (New York, N.Y.)*, 145(3638), 1310-1312. <https://doi.org/10.1126/science.145.3638.1310>
- De Brasi, C., Candela, M., Cermelj, M., Slavutsky, I., Larripa, I., Bianco, R. P., & De Tezanos Pinto, M. (2000). Intron 22 factor VIII gene inversions in Argentine families with severe haemophilia A. *Haemophilia: The Official Journal of the World Federation of Hemophilia*, 6(1), 21-22. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2516.2000.00365.x>
- De Brasi, C. D., & Bowen, D. J. (2008). Molecular characteristics of the intron 22 homologs of the coagulation factor VIII gene: An update. *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH*, 6(10), 1822-1824. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2008.03094.x>
- De Brasi, C., Larripa, I. B., & Pérez Bianco, R. (2001). Genética de la Hemofilia A y B. En *Hemofilias. Prado SA* (pp. 55-66).
- Di Fabio Rocca, F., Albeza, M. V., Postillone, M. B., Acreche, N., Lafage, L., Parolín, M. L., Dejean, C. B., Carnese, F. R., & Avena, S. (2016). Historia poblacional y análisis antropogenético de la ciudad de Salta. *Andes*, 27, 00-00.

- Di Rienzo, J., Casanoves, F., Balzarini, M., Gonzalez, L., Tablada, M., & Robledo, C. (2003). InfoStat Statistical Software. En *Universidad Nacional de Córdoba, Argentina*.
- Doldan, P. (2014). *Patrones de elección del cónyuge y marcadores genéticos. Un análisis bioantropológico* [Tesis de Licenciatura en Cs. Biológicas]. Universidad Maimónides.
- Earl, D., & Vonholdt, B. (2012). Structure Harvester: A website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, 4, 1-3. <https://doi.org/10.1007/s12686-011-9548-7>
- Evanno, G., Regnaut, S., & Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: A simulation study. *Molecular Ecology*, 14(8). <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x>
- Fejerman, L., Ahmadiyeh, N., Hu, D., Huntsman, S., Beckman, K. B., Caswell, J. L., Tsung, K., John, E. M., Torres-Mejia, G., Carvajal-Carmona, L., Echeverry, M. M., Tuazon, A. M. D., Ramirez, C., COLUMBUS Consortium, Gignoux, C. R., Eng, C., Gonzalez-Burchard, E., Henderson, B., Le Marchand, L., ... Ziv, E. (2014). Genome-wide association study of breast cancer in Latinas identifies novel protective variants on 6q25. *Nature Communications*, 5, 5260. <https://doi.org/10.1038/ncomms6260>
- Fejerman, L., Carnese, F. R., Goicoechea, A. S., Avena, S., Dejean, C. B., & Ward, R. H. (2005). African ancestry of the population of Buenos Aires. *American Journal of Physical Anthropology*, 128(1), 164-170. <https://doi.org/10.1002/ajpa.20083>
- Gitschier, J., Wood, W.I., Wion, K.L., Chen, E.Y., Eaton, D.H., Vehar, G.A., Capon, D.J., & Lawn, R.M. (1984). Characterization of the human factor VIII gene. *Nature*, 312, 326-330.
- Gómez Pérez, L., Alfonso Sánchez, M. A., Pérez Miranda, A. M., Martínez de Pancorbo Gómez, M., Peña Garcia, J. A., Gómez Pérez, L., Alfonso Sánchez, M. A., Pérez Miranda, A. M., Martínez de Pancorbo Gómez, M., & Peña Garcia, J. A. (2007). Utilidad de las inserciones Alu en los estudios de mestizaje. *Antropo*, 14, 28-36.
- Gómez-Carballa, A., Pardo-Seco, J., Brandini, S., Achilli, A., Perego, U. A., Coble, M. D., Diegoli, T. M., Álvarez-Iglesias, V., Martínón-Torres, F., Olivieri, A., Torroni, A., & Salas, A. (2018). The peopling of South America and the trans-Andean gene flow of

- the first settlers. *Genome Research*, 28(6), 767-779. <https://doi.org/10.1101/gr.234674.118>
- Graw, J., Oldenburg, J., Schneppenheim, R., Spannagl, M., & Schwaab, R. (2005). Haemophilia A: from mutation analysis to new therapies. *Nat. Rev. Genet.*, 6, 488-501.
- Gunasekera, D., Ettinger, R. A., Nakaya Fletcher, S., James, E. A., Liu, M., Barrett, J. C., Withycombe, J., Matthews, D. C., Epstein, M. S., Hughes, R. J., Pratt, K. P., & Personalized Approaches to Therapies for Hemophilia (PATH) Study Investigators. (2015). Factor VIII gene variants and inhibitor risk in African American hemophilia A patients. *Blood*, 126(7), 895-904. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-09-599365>
- Haryono, S. J., Datasena, I. G. B., Santosa, W. B., Mulyarahardja, R., & Sari, K. (2015). A pilot genome-wide association study of breast cancer susceptibility loci in Indonesia. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP*, 16(6), 2231-2235. <https://doi.org/10.7314/apjcp.2015.16.6.2231>
- Hay, C. R. (1999). Why do inhibitors arise in patients with haemophilia A? *British Journal of Haematology*, 105(3), 584-590. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.1999.01396.x>
- Hermans, C., Astermark, J., & De Moerloose, P. (2012). Exposure to factor VIII and prediction of inhibitor development: Exposure days vs. danger days, or both? *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH*, 10(10), 2194-2196. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2012.04871.x>
- Huerta-Chagoya, A., Moreno-Macías, H., Fernández-López, J. C., Ordóñez-Sánchez, M. L., Rodríguez-Guillén, R., Contreras, A., Hidalgo-Miranda, A., Alfaro-Ruíz, L. A., Salazar-Fernandez, E. P., Moreno-Estrada, A., Aguilar-Salinas, C. A., & Tusié-Luna, T. (2019). A panel of 32 AIMS suitable for population stratification correction and global ancestry estimation in Mexican mestizos. *BMC Genetics*, 20(1), 5. <https://doi.org/10.1186/s12863-018-0707-7>
- INDEC. (2022). *Censo Nacional de Población, Hogares y Vivienda. Argentina*. <https://www.censo.gob.ar/>
- Ingram, G. I. (1976). The history of haemophilia. *Journal of Clinical Pathology*, 29(6), 469-479. <https://doi.org/10.1136/jcp.29.6.469>

- Irigoyen, M. B., Primiani, L., Felippo, M., Candela, M., de Bracco, M. M. E., & Galassi, N. V. (2017). IgG subclasses of FVIII inhibitors in an argentine cohort of severe hemophilia A patients: Analysis by flow cytometry. *International Journal of Laboratory Hematology*, 39(6), 569-576. <https://doi.org/10.1111/ijlh.12696>
- Jakobsson, M., Scholz, S. W., Scheet, P., Gibbs, J. R., VanLiere, J. M., Fung, H.-C., Szpiech, Z. A., Degnan, J. H., Wang, K., Guerreiro, R., Bras, J. M., Schymick, J. C., Hernandez, D. G., Traynor, B. J., Simon-Sanchez, J., Matarin, M., Britton, A., van de Leemput, J., Rafferty, I., ... Singleton, A. B. (2008). Genotype, haplotype and copy-number variation in worldwide human populations. *Nature*, 451(7181), 998-1003. <https://doi.org/10.1038/nature06742>
- Jobling, M. A., & Tyler-Smith, C. (2003). The human Y chromosome: An evolutionary marker comes of age. *Nature Reviews. Genetics*, 4(8), 598-612. <https://doi.org/10.1038/nrg1124>
- Johnsen, J. M., Fletcher, S. N., Dove, A., McCracken, H., Martin, B. K., Kircher, M., Josephson, N. C., Shendure, J., Ruuska, S. E., Valentino, L. A., Pierce, G. F., Watson, C., Cheng, D., Recht, M., & Konkle, B. A. (2022). Results of genetic analysis of 11 341 participants enrolled in the My Life, Our Future hemophilia genotyping initiative in the United States. *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH*, 20(9), 2022-2034. <https://doi.org/10.1111/jth.15805>
- Jota, M. S., Lacerda, D. R., Sandoval, J. R., Vieira, P. P. R., Santos-Lopes, S. S., Bisso-Machado, R., Paixão-Cortes, V. R., Revollo, S., Paz-Y-Miño, C., Fujita, R., Salzano, F. M., Bonatto, S. L., Bortolini, M. C., Santos, F. R., & Genographic Consortium. (2011). A new subhaplogroup of native American Y-Chromosomes from the Andes. *American Journal of Physical Anthropology*, 146(4), 553-559. <https://doi.org/10.1002/ajpa.21519>
- Kang, G., Gao, G., Shete, S., Redden, D. T., Chang, B.-L., Rebbeck, T. R., Barnholtz-Sloan, J. S., Pajewski, N. M., & Allison, D. B. (2011). Capitalizing on admixture in genome-wide association studies: A two-stage testing procedure and application to height in African-Americans. *Frontiers in Genetics*, 2, 11, 00011. <https://doi.org/10.3389/fgene.2011.00011>
- Karafet, T. M., Mendez, F. L., Meilerman, M. B., Underhill, P. A., Zegura, S. L., & Hammer,

- M. F. (2008). New binary polymorphisms reshape and increase resolution of the human Y chromosomal haplogroup tree. *Genome Research*, 18(5), 830-838. <https://doi.org/10.1101/gr.7172008>
- Kasper, C. K., & Lin, J. C. (2007). Prevalence of sporadic and familial haemophilia. *Haemophilia: The Official Journal of the World Federation of Hemophilia*, 13(1), 90-92. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2516.2006.01397.x>
- Keaton, J. M., Hellwege, J. N., Giri, A., Torstenson, E. S., Kovesdy, C. P., Sun, Y. V., Wilson, P. W. F., O'Donnell, C. J., Edwards, T. L., Hung, A. M., Velez Edwards, D. R., & Million Veteran Program. (2021). Associations of biogeographic ancestry with hypertension traits. *Journal of Hypertension*, 39(4), 633-642. <https://doi.org/10.1097/HJH.0000000000002701>
- Keene, K. L., Mychaleckyj, J. C., Leak, T. S., Smith, S. G., Perlegas, P. S., Divers, J., Langefeld, C. D., Freedman, B. I., Bowden, D. W., & Sale, M. M. (2008). Exploration of the utility of ancestry informative markers for genetic association studies of African Americans with type 2 diabetes and end stage renal disease. *Human Genetics*, 124(2), 147-154. <https://doi.org/10.1007/s00439-008-0532-6>
- Kempton, C. L., Payne, A. B., & Fedewa, S. A. (2023). Race, ethnicity, and immune tolerance induction in hemophilia A in the United States. *Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis*, 7(8), 102251. <https://doi.org/10.1016/j.rpth.2023.102251>
- Kopelman, N. M., Mayzel, J., Jakobsson, M., Rosenberg, N. A., & Mayrose, I. (2015). Clumpak: A program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K. *Molecular Ecology*, 15(5). <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1755-0998.12387>
- Kramer, H. J., Stimp, A. M., Laurie, C. C., Reiner, A. P., Lash, J., Daviglus, M. L., Rosas, S. E., Ricardo, A. C., Tayo, B. O., Flessner, M. F., Kerr, K. F., Peralta, C., Durazo-Arvizu, R., Conomos, M., Thornton, T., Rotter, J., Taylor, K. D., Cai, J., Eckfeldt, J., ... Franceschini, N. (2017). African Ancestry-Specific Alleles and Kidney Disease Risk in Hispanics/Latinos. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 28(3), 915-922. <https://doi.org/10.1681/ASN.2016030357>

- Lahiri, D. K., & Nurnberger, J. I., Jr. (1991). A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Research*, *19*(19), 5444. <https://doi.org/10.1093/nar/19.19.5444>
- Lakich, D., Kazazian, H. H., Jr, Antonarakis, S. E., & Gitschier, J. (1993). Inversions disrupting the factor VIII gene are a common cause of severe haemophilia A. *Nature Genetics*, *5*(3), 236-241. <https://doi.org/10.1038/ng1193-236>
- Lee, Y. L., Teitelbaum, S., Wolff, M. S., Wetmur, J. G., & Chen, J. (2010). Comparing genetic ancestry and self-reported race/ethnicity in a multiethnic population in New York City. *Journal of Genetics*, *89*(4), 417-423. <https://doi.org/10.1007/s12041-010-0060-8>
- Li, J. Z., Absher, D. M., Tang, H., Southwick, A. M., Casto, A. M., Ramachandran, S., Cann, H. M., Barsh, G. S., Feldman, M., Cavalli-Sforza, L. L., & Myers, R. M. (2008). Worldwide human relationships inferred from genome-wide patterns of variation. *Science (New York, N.Y.)*, *319*(5866), 1100-1104. <https://doi.org/10.1126/science.1153717>
- Llamas, B., Fehren-Schmitz, L., Valverde, G., Soubrier, J., Mallick, S., Rohland, N., Nordenfelt, S., Valdiosera, C., Richards, S. M., Rohrlach, A., Romero, M. I. B., Espinoza, I. F., Cagigao, E. T., Jiménez, L. W., Makowski, K., Reyna, I. S. L., Lory, J. M., Torrez, J. A. B., Rivera, M. A., ... Haak, W. (2016). Ancient mitochondrial DNA provides high-resolution time scale of the peopling of the Americas. *Science Advances*, *2*(4), e1501385. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1501385>
- Macfarlane, R. G. (1964). An Enzyme Cascade In The Blood Clotting Mechanism, And Its Function As A Biochemical Amplifier. *Nature*, *202*, 498-499. <https://doi.org/10.1038/202498a0>
- Mansilla, F. (2010). *El aporte africano al acervo génico de poblaciones cosmopolitas de la Argentina. Su estimación a partir de la determinación del alelo DUFFY*NULL por la técnica de PCR-RFLP* [Tesis de Licenciatura en Ciencias Biológicas]. Universidad Maimónides.
- Marcát, G. C. B., Arencibia, V., Russo, M. G., Dejean, C. B., Otero, C., Rivolta, C., & Seldes, V. (2024). Prácticas mortuorias y parentesco genético: STRs en muestras de individuos prehispánicos de la Quebrada de Humahuaca. *InterSecciones en*

Antropología, 25(2), Article 2. <https://doi.org/10.37176/iea.25.2.2024.873>

- Marchione, V. D. (2018). *Relaciones genotipo-fenotipo en Hemofilia. Desarrollo de un esquema de análisis molecular para mejorar la atención médica de las familias con Hemofilia*. [Tesis para optar al título de Doctor de la Facultad de Farmacia y Bioquímica]. Universidad de Buenos Aires.
- Marchione, V. D., Radic, C. P., Abelleiro, M., Primiani, L., Neme, D., Candela, M., Pinto, M., Brasi, C., & Rossetti, L. (2016). El polimorfismo CTLA4 p.Thr17Ala (c.49A>G) se asocia con el desarrollo de inhibidor en pacientes argentinos con hemofilia A severa. *Hematología*, 20(3), 292-297.
- Marchione, V. D., Zuccoli, J. R., Abelleiro, M. M., Radic, C. P., Neme, D., Candela, M., de Tezanos Pinto, M., De Brasi, C. D., & Rossetti, L. C. (2017). A prevalent CTLA4 missense variant significantly associates with inhibitor development in Argentine patients with severe haemophilia A. *Haemophilia: The Official Journal of the World Federation of Hemophilia*, 23(2), e166-e169. <https://doi.org/10.1111/hae.13194>
- Martínez Marignac, V. L., Bertoni, B., Parra, E. J., & Bianchi, N. O. (2004). Characterization of admixture in an urban sample from Buenos Aires, Argentina, using uniparentally and biparentally inherited genetic markers. *Human Biology*, 76(4), 543-557. <https://doi.org/10.1353/hub.2004.0058>
- McVey, J. H., Rallapalli, P. M., Kembell-Cook, G., Hampshire, D. J., Giansily-Blaizot, M., Gomez, K., Perkins, S. J., & Ludlam, C. A. (2020). The European Association for Haemophilia and Allied Disorders (EAHAD) Coagulation Factor Variant Databases: Important resources for haemostasis clinicians and researchers. *Haemophilia: The Official Journal of the World Federation of Hemophilia*, 26(2), 306-313. <https://doi.org/10.1111/hae.13947>
- Miller, C. H., Benson, J., Ellingsen, D., Driggers, J., Payne, A., Kelly, F. M., Soucie, J. M., Craig Hooper, W., & Hemophilia Inhibitor Research Study Investigators. (2012). F8 and F9 mutations in US haemophilia patients: Correlation with history of inhibitor and race/ethnicity. *Haemophilia: The Official Journal of the World Federation of Hemophilia*, 18(3), 375-382. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2516.2011.02700.x>
- Miller, S., Coveney, C., Johnson, J., Farmaki, A.-E., Gupta, N., Tobin, M. D., Wain, L. V.,

- McCormack, F. X., Boocock, D. J., & Johnson, S. R. (2018). The vitamin D binding protein axis modifies disease severity in lymphangiomyomatosis. *The European Respiratory Journal*, *52*(5), 1800951. <https://doi.org/10.1183/13993003.00951-2018>
- Naylor, J. A., Buck, D., Green, P., Williamson, H., Bentley, D., & Giannelli, F. (1995). Investigation of the factor VIII intron 22 repeated region (int22h) and the associated inversion junctions. *Human Molecular Genetics*, *4*(7), 1217-1224. <https://doi.org/10.1093/hmg/4.7.1217>
- Naylor, J., Brinke, A., Hassock, S., Green, P. M., & Giannelli, F. (1993). Characteristic mRNA abnormality found in half the patients with severe haemophilia A is due to large DNA inversions. *Human Molecular Genetics*, *2*(11), 1773-1778. <https://doi.org/10.1093/hmg/2.11.1773>
- Nazemialman, B., Vahabi, S., Sabouri, E., Hosseinpour, S., & Doaju, S. (2019). Association of vitamin D binding protein and vitamin D receptor gene polymorphisms in Iranian patients with chronic periodontitis. *Odontology*, *107*(1), 46-53. <https://doi.org/10.1007/s10266-018-0383-0>
- Oldenburg, J., & Pavlova, A. (2006). Genetic risk factors for inhibitors to factors VIII and IX. *Haemophilia: The Official Journal of the World Federation of Hemophilia*, *12 Suppl 6*, 15-22. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2516.2006.01361.x>
- Otto, J. C. (1996). An account of an hemorrhagic disposition existing in certain families. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, *328*, 4-6. <https://doi.org/10.1097/00003086-199607000-00002>
- Pääbo, S. (2014). *Neanderthal man: In search of lost genomes*. Basic Books.
- Páramo, J. A., Panizo, E., Pegenaute, C., & Lecumberri, R. (2009). Coagulación 2009: Una visión moderna de la hemostasia. *Revista de Medicina de la Universidad de Navarra*, 19-23. <https://doi.org/10.15581/021.9149>
- Park, S.-Y., Wilkens, L. R., Kolonel, L. N., Monroe, K. R., Haiman, C. A., & Marchand, L. L. (2017). Exploring Differences in the Aspirin-Colorectal Cancer Association by Sex and Race/Ethnicity: The Multiethnic Cohort Study. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, *26*(2), 162-169.

<https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-16-0560>

- Patiño, J. (2020). *Determinación de Marcadores Informativos de Ancestría mediante Multiplex PCR- APLP* [Tesis de Maestría Biología Molecular Médica]. FFyB y FCEN, UBA.
- Paul, H., Berg, V., Gangadharan, B., Bowen, J., LeBeau, P., Blatný, J., Male, C., Radulescu, V. C., Diaz, R., Mancuso, M. E., Brown, D. L., & Reipert, B. M. (2023). Prospective Hemophilia Inhibitor PUP Study reveals distinct antibody signatures during FVIII inhibitor eradication. *Blood Advances*, 7(9), 1831-1848. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2022007267>
- Pavlova, A., Delev, D., Lacroix-Desmazes, S., Schwaab, R., Mende, M., Fimmers, R., Astermark, J., & Oldenburg, J. (2009). Impact of polymorphisms of the major histocompatibility complex class II, interleukin-10, tumor necrosis factor-alpha and cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 genes on inhibitor development in severe hemophilia A. *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH*, 7(12), 2006-2015. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2009.03636.x>
- Pavlovsky, A. (1947). Contribution to the pathogenesis of hemophilia. *Blood*, 2(2), 185-191.
- Peakall, R., & Smouse, P. E. (2012). GenAlEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics*, 28(19), 2537-2539. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts460>
- Peprah, E., Xu, H., Tekola-Ayele, F., & Royal, C. D. (2015). Genome-wide association studies in Africans and African Americans: Expanding the framework of the genomics of human traits and disease. *Public Health Genomics*, 18(1), 40-51. <https://doi.org/10.1159/000367962>
- Perego, U. A., Achilli, A., Angerhofer, N., Accetturo, M., Pala, M., Olivieri, A., Hooshiar Kashani, B., Ritchie, K. H., Scozzari, R., Kong, Q.-P., Myres, N. M., Salas, A., Semino, O., Bandelt, H.-J., Woodward, S. R., & Torroni, A. (2009). Distinctive Paleo-Indian migration routes from Beringia marked by two rare mtDNA haplogroups. *Current Biology: CB*, 19(1), 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.11.058>
- Pizarro, M. H., Santos, D. C., Melo, L. G. N., Barros, B. S. V., Muniz, L. H., Porto, L. C.,

- Silva, D. A., & Gomes, M. B. (2019). Influence of genomic ancestry and self-reported color-race in CKD in a nationwide admixed sample of Brazilian patients with type 1 diabetes. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*, *12*, 1831. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S210585>
- Pratt, K. P., Gunasekera, D., Vir, P., Tan, S., Pierce, G. F., Olsen, C., Butenas, S., & Mann, K. G. (2023). Anti-FVIII antibodies in Black and White hemophilia A subjects: Do F8 haplotypes play a role? *Blood Advances*, *7*(17), 4983-4998. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2021004909>
- Pritchard, J. K., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, *155*(2), 945-959. <https://doi.org/10.1093/genetics/155.2.945>
- Reilly, P. F., Tjahjadi, A., Miller, S. L., Akey, J. M., & Tucci, S. (2022). The contribution of Neanderthal introgression to modern human traits. *Current Biology: CB*, *32*(18), R970-R983. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2022.08.027>
- Reiner, A. P., Ziv, E., Lind, D. L., Nievergelt, C. M., Schork, N. J., Cummings, S. R., Phong, A., Burchard, E. G., Harris, T. B., Psaty, B. M., & Kwok, P.-Y. (2005). Population structure, admixture, and aging-related phenotypes in African American adults: The Cardiovascular Health Study. *American Journal of Human Genetics*, *76*(3), 463-477. <https://doi.org/10.1086/428654>
- Robbins, C., Torres, J. B., Hooker, S., Bonilla, C., Hernandez, W., Candreva, A., Ahaghotu, C., Kittles, R., & Carpten, J. (2007). Confirmation study of prostate cancer risk variants at 8q24 in African Americans identifies a novel risk locus. *Genome Research*, *17*(12), 1717. <https://doi.org/10.1101/gr.6782707>
- Rogaev, E. I., Grigorenko, A. P., Faskhutdinova, G., Kittler, E. L. W., & Moliaka, Y. K. (2009). Genotype analysis identifies the cause of the «royal disease». *Science (New York, N.Y.)*, *326*(5954), 817. <https://doi.org/10.1126/science.1180660>
- Rosenberg, N. A., Pritchard, J. K., Weber, J. L., Cann, H. M., Kidd, K. K., Zhivotovsky, L. A., & Feldman, M. W. (2002). Genetic structure of human populations. *Science (New York, N.Y.)*, *298*(5602), 2381-2385. <https://doi.org/10.1126/science.1078311>
- Rossetti, L. C., Candela, M., Bianco, R. P., de Tezanos Pinto, M., Western, A., Goodeve, A.,

- Larripa, I. B., & De Brasi, C. D. (2004). Analysis of factor VIII gene intron 1 inversion in Argentinian families with severe haemophilia A and a review of the literature. *Blood Coagulation & Fibrinolysis: An International Journal in Haemostasis and Thrombosis*, 15(7), 569-572. <https://doi.org/10.1097/00001721-200410000-00006>
- Rossetti, L. C., Radic, C. P., Candela, M., Pérez Bianco, R., de Tezanos Pinto, M., Goodeve, A., Larripa, I. B., & De Brasi, C. D. (2007). Sixteen novel hemophilia A causative mutations in the first Argentinian series of severe molecular defects. *Haematologica*, 92(6), 842-845. <https://doi.org/10.3324/haematol.11112>
- Rossetti, L. C., Radic, C. P., Larripa, I. B., & De Brasi, C. D. (2008). Developing a new generation of tests for genotyping hemophilia-causative rearrangements involving int22h and int1h hotspots in the factor VIII gene. *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH*, 6(5), 830-836. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2008.02926.x>
- Rossiter, J. P., Young, M., Kimberland, M. L., Hutter, P., Ketterling, R. P., Gitschier, J., Horst, J., Morris, M. A., Schaid, D. J., & de Moerloose, P. (1994). Factor VIII gene inversions causing severe hemophilia A originate almost exclusively in male germ cells. *Human Molecular Genetics*, 3(7), 1035-1039. <https://doi.org/10.1093/hmg/3.7.1035>
- Ruiz-Linares, A., Adhikari, K., Acuña-Alonzo, V., Quinto-Sanchez, M., Jaramillo, C., Arias, W., Fuentes, M., Pizarro, M., Everardo, P., de Avila, F., Gómez-Valdés, J., León-Mimila, P., Hunemeier, T., Ramallo, V., Silva de Cerqueira, C. C., Burley, M.-W., Konca, E., de Oliveira, M. Z., Veronez, M. R., ... Gonzalez-José, R. (2014). Admixture in Latin America: Geographic structure, phenotypic diversity and self-perception of ancestry based on 7,342 individuals. *PLoS Genetics*, 10(9), e1004572. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004572>
- Ruiz-Narváez, E. A., Rosenberg, L., Wise, L. A., Reich, D., & Palmer, J. R. (2011). Validation of a small set of ancestral informative markers for control of population admixture in African Americans. *American Journal of Epidemiology*, 173(5), 587-592. <https://doi.org/10.1093/aje/kwq401>
- Russo, M. G., Di Fabio Rocca, F., Doldán, P., Cardozo, D. G., Dejean, C. B., Seldes, V., & Avena, S. (2016). Evaluación del número mínimo de marcadores para estimar

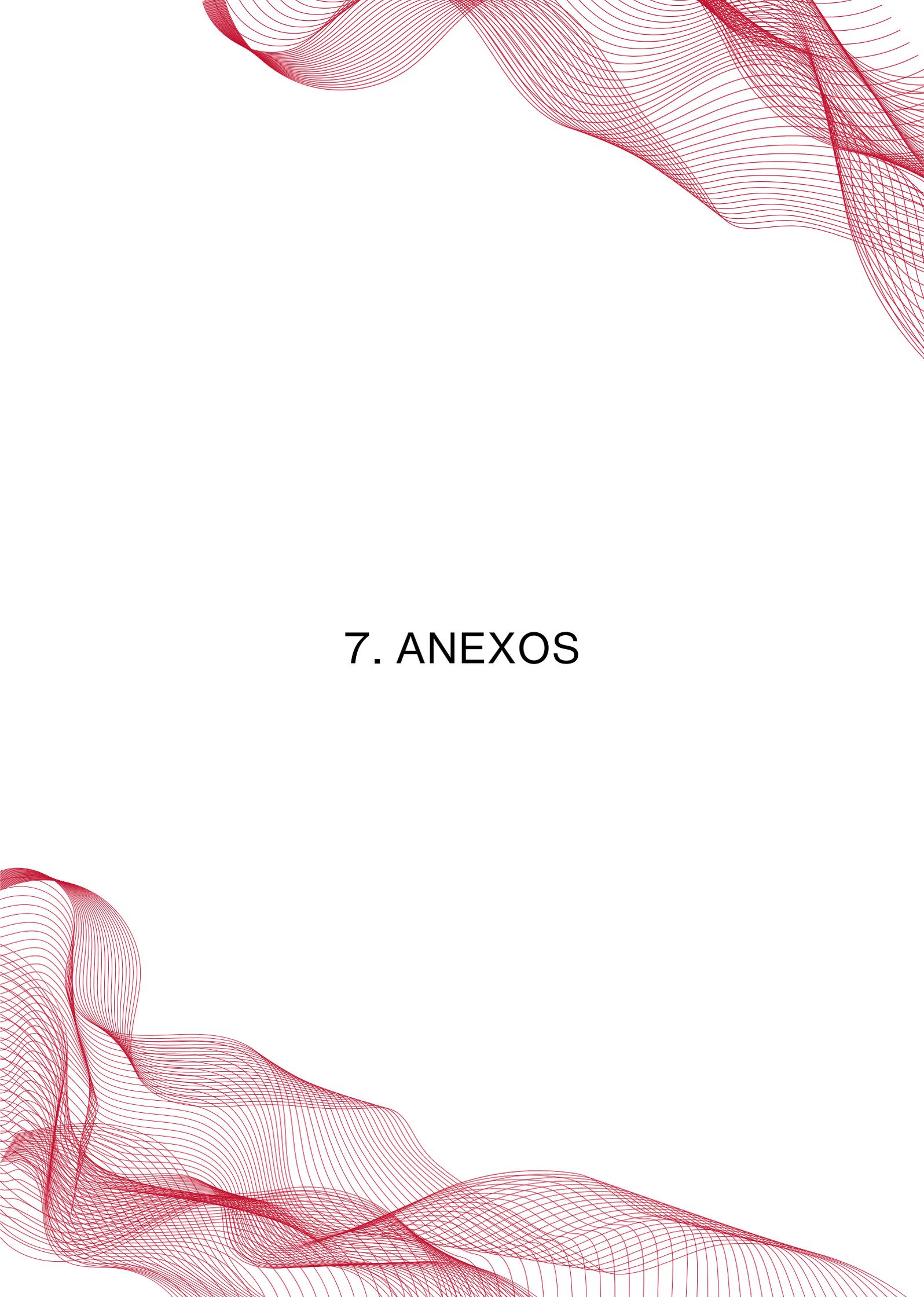
- ancestría individual en una muestra de la población argentina. *Revista del Museo de Antropología*, 49-56. <https://doi.org/10.31048/1852.4826.v9.n1.12579>
- Sanchez, E., Nadig, A., Richardson, B. C., Freedman, B. I., Kaufman, K. M., Kelly, J. A., Niewold, T. B., Kamen, D. L., Gilkeson, G. S., Ziegler, J. T., Langefeld, C. D., Alarcón, G. S., Edberg, J. C., Ramsey-Goldman, R., Petri, M., Brown, E. E., Kimberly, R. P., Reveille, J. D., Vilá, L. M., ... Sawalha, A. H. (2011). Phenotypic associations of genetic susceptibility loci in systemic lupus erythematosus. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 70(10), 1752-1757. <https://doi.org/10.1136/ard.2011.154104>
- Schep, S. J., Schutgens, R. E. G., Fischer, K., & Boes, M. L. (2018). Review of immune tolerance induction in hemophilia A. *Blood Reviews*, 32(4), 326-338. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2018.02.003>
- Schönlein, J. L. (1828). *Über die Hämophilie oder die an die Heidrichhe Anlage zu tödtlichen Blutungen.*
- Schramm, W. (2014). The history of haemophilia—A short review. *Thrombosis Research*, 134 Suppl 1, S4-9. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2013.10.020>
- Seldin, M. F., Qi, L., Scherbarth, H. R., Tian, C., Ransom, M., Silva, G., Belmont, J. W., Gamron, S., Allievi, A., Palatnik, S. A., Saurit, V., Paira, S., Graf, C., Guillerón, C., Catoggio, L. J., Prigione, C., Berbotto, G. A., García, M. A., Perandones, C. E., ... Alarcon-Riquelme, M. E. (2008). Amerindian ancestry in Argentina is associated with increased risk for systemic lupus erythematosus. *Genes & Immunity*, 9(4), 389-393. <https://doi.org/10.1038/gene.2008.25>
- Seldin, M. F., Tian, C., Shigeta, R., Scherbarth, H. R., Silva, G., Belmont, J. W., Kittles, R., Gamron, S., Allevi, A., Palatnik, S. A., Alvarellos, A., Paira, S., Caprarulo, C., Guillerón, C., Catoggio, L. J., Prigione, C., Berbotto, G. A., García, M. A., Perandones, C. E., ... Alarcon-Riquelme, M. E. (2007). Argentine population genetic structure: Large variance in Amerindian contribution. *American Journal of Physical Anthropology*, 132(3), 455-462. <https://doi.org/10.1002/ajpa.20534>
- Shriver, M. D., Parra, E. J., Dios, S., Bonilla, C., Norton, H., Jovel, C., Pfaff, C., Jones, C., Massac, A., Cameron, N., Baron, A., Jackson, T., Argyropoulos, G., Jin, L., Hoggart, C. J., McKeigue, P. M., & Kittles, R. A. (2003). Skin pigmentation, biogeographical

- ancestry and admixture mapping. *Human Genetics*, 112(4), 387-399.
<https://doi.org/10.1007/s00439-002-0896-y>
- Silva, N., Pereira, L., Poloni, E., & Currat, M. (2012). Human Neutral Genetic Variation and Forensic STR Data. *PloS one*, 7, e49666.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049666>
- Smith, S. A. (2009). The cell-based model of coagulation. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care (San Antonio, Tex.: 2001)*, 19(1), 3-10.
<https://doi.org/10.1111/j.1476-4431.2009.00389.x>
- Srivastava, A., Brewer, A. K., Mauser-Bunschoten, E. P., Key, N. S., Kitchen, S., Llinas, A., Ludlam, C. A., Mahlangu, J. N., Mulder, K., Poon, M. C., & Street, A. (2013). Treatment Guidelines Working Group on Behalf of The World Federation Of Hemophilia. *Haemoph. Off. J. World Fed. Hemoph.*, 19, 1-47.
- Tamayo, L. I., Day-Friedland, E., Zavala, V. A., Marker, K. M., & Fejerman, L. (2023). Genetic Ancestry and Breast Cancer Subtypes in Hispanic/Latina Women. En A. G. Ramirez & E. J. Trapido (Eds.), *Advancing the Science of Cancer in Latinos: Building Collaboration for Action*. Springer. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK595792/>
- Tamm, E., Kivisild, T., Reidla, M., Metspalu, M., Smith, D. G., Mulligan, C. J., Bravi, C. M., Rickards, O., Martinez-Labarga, C., Khusnutdinova, E. K., Fedorova, S. A., Golubenko, M. V., Stepanov, V. A., Gubina, M. A., Zhadanov, S. I., Ossipova, L. P., Damba, L., Voevoda, M. I., Dipierri, J. E., ... Malhi, R. S. (2007). Beringian Standstill and Spread of Native American Founders. *PLoS ONE*, 2(9), e829.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000829>
- Taylor, J. Y., Sun, Y. V., Hunt, S. C., & Kardia, S. L. (2010). Gene–Environment Interaction for Hypertension Among African American Women Across Generations. *Biological Research for Nursing*, 12(2), 149. <https://doi.org/10.1177/1099800410371225>
- Teitel, J. M. (2018). Treatment and prevention of bleeding in congenital hemophilia A patients with inhibitors. *Transfusion and Apheresis Science: Official Journal of the World Apheresis Association: Official Journal of the European Society for Haemapheresis*, 57(4), 466-471. <https://doi.org/10.1016/j.transci.2018.07.011>
- Tomeo, F., Mariz, S., Brunetta, A. L., Stoyanova-Beninska, V., Penttila, K., & Magrelli, A.

- (2021). Haemophilia, state of the art and new therapeutic opportunities, a regulatory perspective. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 87(11), 4183-4196. <https://doi.org/10.1111/bcp.14838>
- Toole, J. J., Knopf, J. L., Wozney, J. M., Sultzman, L. A., Buecker, J. L., Pittman, D. D., Kaufman, R. J., Brown, E., Shoemaker, C., & Orr, E. C. (1984). Molecular cloning of a cDNA encoding human antihemophilic factor. *Nature*, 312(5992), 342-347. <https://doi.org/10.1038/312342a0>
- van Oven, M., & Kayser, M. (2009). Updated comprehensive phylogenetic tree of global human mitochondrial DNA variation. *Human Mutation*, 30(2), E386-394. <https://doi.org/10.1002/humu.20921>
- Vehar, G. A., Keyt, B., Eaton, D., Rodriguez, H., O'Brien, D. P., Rotblat, F., Oppermann, H., Keck, R., Wood, W. I., Harkins, R. N., Tuddenham, E. G., Lawn, R. M., & Capon, D. J. (1984). Structure of human factor VIII. *Nature*, 312(5992), 337-342. <https://doi.org/10.1038/312337a0>
- Viel, K. R., Ameri, A., Abshire, T. C., Iyer, R. V., Watts, R. G., Lutcher, C., Channell, C., Cole, S. A., Fernstrom, K. M., Nakaya, S., Kasper, C. K., Thompson, A. R., Almasy, L., & Howard, T. E. (2009). Inhibitors of factor VIII in black patients with hemophilia. *The New England Journal of Medicine*, 360(16), 1618-1627. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa075760>
- Wang, A., Shen, J., Rodriguez, A. A., Saunders, E. J., Chen, F., Janivara, R., Darst, B. F., Sheng, X., Xu, Y., Chou, A. J., Benlloch, S., Dadaev, T., Brook, M. N., Plym, A., Sahimi, A., Hoffman, T. J., Takahashi, A., Matsuda, K., Momozawa, Y., ... Haiman, C. A. (2023). Characterizing prostate cancer risk through multi-ancestry genome-wide discovery of 187 novel risk variants. *Nature Genetics*, 55(12), 2065-2074. <https://doi.org/10.1038/s41588-023-01534-4>
- Wang, H., Guo, Y., Li, G., Xie, R., Zhang, Z., Han, W., Yang, M., Chen, D., & Jiang, P. (2018). The Association Between Vitamin D Binding Protein Polymorphisms and Vitamin D Level on Epilepsy in China. *DNA and Cell Biology*, 37(9), 786-790. <https://doi.org/10.1089/dna.2018.4252>
- Wight, J., & Paisley, S. (2003). The epidemiology of inhibitors in haemophilia A: A

- systematic review. *Haemophilia: The Official Journal of the World Federation of Hemophilia*, 9(4), 418-435. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2516.2003.00780.x>
- Wood, W. I., Capon, D. J., Simonsen, C. C., Eaton, D. L., Gitschier, J., Keyt, B., Seeburg, P. H., Smith, D. H., Hollingshead, P., Wion, K. L., Delwart, E., Tuddenham, E. G., Vehar, G. A., & Lawn, R. M. (1984). Expression of active human factor VIII from recombinant DNA clones. *Nature*, 312(5992), 330-337. <https://doi.org/10.1038/312330a0>
- World Federation of Hemophilia. (2022). *Trastornos de la coagulación hereditarios*. <https://elearning.wfh.org/es/centros-de-aprendizaje/trastornos-de-la-coagulacion-hereditarios/>
- World Federation of Hemophilia. (2024). *Report on the Annual Global Survey*.
- Wright, I. S. (1962). The Nomenclature of Blood Clotting Factors. *Canadian Medical Association Journal*, 86(8), 373.
- Y Chromosome Consortium. (2002). A nomenclature system for the tree of human Y-chromosomal binary haplogroups. *Genome Research*, 12(2), 339-348. <https://doi.org/10.1101/gr.217602>
- Yoshitake, S., Schach, B.G., Foster, D.C., Davie, E.W., & Kurachi, K. (1985). Nucleotide sequence of the gene for human factor IX (antihemophilic factor B). *Biochemistry*, 24, 3736-3750.
- Zerjal, T., Xue, Y., Bertorelle, G., Wells, R. S., Bao, W., Zhu, S., Qamar, R., Ayub, Q., Mohyuddin, A., Fu, S., Li, P., Yuldasheva, N., Ruzibakiev, R., Xu, J., Shu, Q., Du, R., Yang, H., Hurles, M. E., Robinson, E., ... Tyler-Smith, C. (2003). The Genetic Legacy of the Mongols. *American Journal of Human Genetics*, 72(3), 717. <https://doi.org/10.1086/367774>
- Zhu, X., & Cooper, R. S. (2007). Admixture mapping provides evidence of association of the VNN1 gene with hypertension. *PLoS One*, 2(11), e1244. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001244>
- Ziv, E., John, E. M., Choudhry, S., Kho, J., Lorizio, W., Perez-Stable, E. J., & Burchard, E. G. (2006). Genetic ancestry and risk factors for breast cancer among Latinas in the

San Francisco Bay Area. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 15(10), 1878-1885.
<https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-06-0092>



7. ANEXOS

ANEXO I

Consentimiento informado

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA ESTUDIOS GENÉTICOS EN HEMOFILIA

Buenos Aires,..... de.....de.....

Proyecto de investigación: "Exploración masiva del genotipo en pacientes con variantes patogénicas constitucionales que modifican el fenotipo hemofílico en varones y mujeres"

Lugar de realización: Laboratorio de Genética Molecular de la Hemofilia, Instituto de Medicina Experimental CONICET – Academia Nacional de Medicina

Investigadores responsables: Dra. Liliana Rossetti, Dra. Pamela Radic

Por la presente deixo expreso mi consentimiento para la utilización de muestras de mi sangre (o la de mi hijo/a) que será objeto de estudios moleculares, sobre el ADN/ARN extraído a partir de los leucocitos de sangre periférica, mucosa bucal y/u orina relacionados al desarrollo de hemofilia y su respuesta al tratamiento.

La muestra de mi ADN o ARN extraída podrá ser utilizada en futuras investigaciones que permitan ampliar el conocimiento en el área de la hemofilia, pero no para el estudio de otras patologías de origen total o parcialmente genético sin mi expresa autorización por escrito.

Fui informado/a, a través de una entrevista de asesoramiento, que la confidencialidad de mi identidad será preservada de acuerdo a lo establecido en la Ley No.25326 de Protección de Datos Personales comprendiendo tanto a las publicaciones que surgieran de este estudio como a los resultados que se encontrarán encriptados o codificados y que me entregarán un informe con los resultados obtenidos.

La participación en este estudio es de carácter completamente voluntario, pudiendo denegar mi colaboración en cualquier momento si así lo considerare. El procedimiento no involucra para mí beneficios directos desde el punto de vista diagnóstico ni pronóstico, sino que esta contribución permitirá ahondar el estudio en Hemofilia. A su vez, el equipo de investigación y todo aquel profesional involucrado en la recolección, almacenamiento, transporte y descarte final del material biológico se compromete a tomar los recaudos necesarios para mantener el anonimato de la muestra y de la información obtenida a partir de ella, preservando mi privacidad según dispone la Declaración de Helsinki y la Declaración Internacional sobre Datos Genéticos debido a que son muestras biológicas (art. 2 inciso IV) y los art. 20 y 21.

Asimismo, soy consciente de que no recibiré ningún tipo de retribución y/o compensación por la toma del material biológico y que la utilización del mismo por el Laboratorio de Genética Molecular de la Hemofilia tampoco le generará ningún tipo de retribución económica a los investigadores responsables.

Consiento en participar de este estudio:

Apellido y Nombre.....

Firma.....

Nº y tipo de documento.....

Yo, el abajo firmante, deixo constancia de haber estado presente durante la presentación de los datos aquí expresados a la persona arriba firmante.

.....

Firma del auditor/testigo

.....

Fecha

ANEXO II

Comité de Ética de la ANM



ACADEMIA NACIONAL DE MEDICINA
(BUENOS AIRES)

Buenos Aires, 5 de noviembre de 2019.-

La Academia Nacional de Medicina avala el proyecto de investigación elevado por las Dras. Liliana Rossetti y Pamela Radic para ser presentado al PICT de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica.

El título es: *"Exploración masiva del genotipo en pacientes con variantes patogénicas constitucionales que modifican el fenotipo hemofílico en varones y mujeres"*.

El mismo se realizará en el Laboratorio de Genética Molecular de Hemofilia del IMEX-CONICET/ANM.

Acad. Dr. MARCELO V. ELIZARI
PRESIDENTE

T. I. N° 13160/19/X

Avda. Las Heras 3092
C1425ASU Buenos Aires
Argentina

Tels.: (54.11) 4805-6890/3392
E-mail: acamedbai@acamedbai.org.ar
Web: www.anm.edu.ar



ACADEMIA NACIONAL DE MEDICINA

(BUENOS AIRES)

Buenos Aires, 30 de octubre de 2019.-

El Comité de Ética de los Institutos de la Academia Nacional de Medicina avala el proyecto de investigación titulado "*Exploración masiva del genotipo en pacientes con variantes patogénicas constitucionales que modifican el fenotipo hemofílico en varones y mujeres*", elevado por las Dras. Liliana Rossetti y Pamela Radic.

La documentación evaluada no presenta objeciones desde el punto de vista ético.

Los integrantes del Comité de Ética son:

- Dra. Liliana Martínez Peralta (Presidente)
- Acad. María Marta de E. de Bracco (Vicepresidente)
- Dra. Emilse Bermejo (Secretaria)
- Acad. Mercedes Weissenbacher
- Dra. Hna. Elena Lugo
- Dra. María del Carmen Sasiain
- Dr. Roberto Chuit
- Dr. Miguel Ángel Espeche Gil
- Dr. Ezequiel Vázquez
- Dra. Mirta Giordano
- Hna. Mercedes
- Bioq. María Fabiana Alberto

T. I. N° 13160/19/X

Dra. Liliana Martínez Peralta
Presidente
CEIANM

Avda. Las Heras 3092
C1425ASU Buenos Aires
Argentina

Tels.: (54.11) 4805-6890/3392
E-mail: acamedbai@acamedbai.org.ar
Web: www.anm.edu.ar

Buenos Aires, 25 de octubre de 2019

Señores Miembros del
Comité de Ética de los Institutos de la Academia Nacional de Medicina

El Comité de Bioseguridad, en conjunto con la Comisión de Higiene y Seguridad, considera **aprobado** el proyecto titulado "**Exploración masiva del genotipo en pacientes con variantes patogénicas constitucionales que modifican el fenotipo hemofílico en varones y mujeres**" presentado por las investigadoras responsables (IR), **Dra. Liliana C. Rossetti/ Dra. Pamela Radic**

Cabe destacar que dicha aprobación se otorga en función de la información vertida en los formularios que les fueran entregados al Comité y Comisión mencionados, y que el cumplimiento de lo allí explicitado queda bajo la entera responsabilidad del IR. Tanto el IR como el personal involucrado se comprometen a cumplir con todas las normas de Bioseguridad y Seguridad relacionadas a su proyecto.

Asimismo, el IR se compromete a informar cualquier cambio que se produzca antes o durante el desarrollo del proyecto tales como modificaciones de las técnicas, del equipamiento o de los materiales utilizados, o cambios de los riesgos difundidos respecto de los materiales utilizados, o modificaciones del personal involucrado.

Esta aprobación tiene una validez máxima de **tres años** y se refiere exclusivamente a los procedimientos desarrollados en las instalaciones de la Academia Nacional de Medicina y al transporte de material desde y hacia la misma. Todas aquellas prácticas que se realicen fuera de este ámbito quedan bajo la responsabilidad de la Institución en la que se realicen.

Validez hasta: 25 de octubre de 2022

Comité de Bioseguridad de los Institutos de la Academia Nacional de Medicina


Dra. Carmen Graciela Stanganelli
Bioquímica
M.N. 2876

Comisión de Higiene y Seguridad de la Academia Nacional de Medicina


DRA SUSANA FINK

ANEXO III

Tabla de Resultados PCR-APLP - Múltiplex

#	Múltiplex I - A				Múltiplex I - B				Múltiplex II - A				Múltiplex II - B				Múltiplex III - A				Múltiplex III - B				Multiplex IV					
	OGFOD3	FOXP1	KLHL29	AMER1	SLC24A5	DLGAP5	AMER4	AMER2	ROR1	NOTCH2	CYP19-E2	ROPN1L	SLC39A4	WI-9231*1	PTPRO															
1	2	2	1	1	2	2	1	2	1	1	2	2	1	2	1	2	1	1	2	2	1	1	1	2	2	2	2	1	1	
2	2	2	1	1	2	2	1	2	1	2	2	2	2	2	1	2	1	1	2	2	1	1	2	2	2	2	2	1	1	
3	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	2	2	1	2	1	1	1	2	1	2	1	2	1	2	2	2	1	1
4	2	2	1	2	1	1	1	2	1	2	1	2	1	1	1	2	1	1	1	2	2	2	1	2	2	2	2	2	1	1
5	1	2	1	1	2	2	1	2	1	2	0	0	2	2	1	1	1	1	1	1	2	2	1	2	2	2	2	0	0	
6	2	2	1	1	2	2	2	2	1	2	0	0	2	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1	1	0	0	2	2	0	0
7	0	0	0	0	2	2	1	2	1	2	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	1	1	2	2	2	2	0	0
8	2	2	1	2	1	1	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	2	2	1	2	0	0	1	2	0	0
9	0	0	0	0	2	2	1	2	0	0	0	0	2	2	1	1	2	2	1	1	2	2	1	1	0	0	2	2	0	0
10	2	2	1	2	2	2	1	2	1	2	2	2	1	2	1	2	1	2	1	2	2	2	1	2	1	2	2	2	1	1
11	2	2	1	1	2	2	1	1	2	2	1	2	2	2	1	2	2	2	1	1	2	2	1	1	2	2	2	2	1	1
12	0	0	0	0	2	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	2	2	2	2	2	2	1	2	1	1
13	2	2	1	1	2	2	1	2	1	2	2	2	2	2	1	2	1	2	1	2	2	2	1	1	2	2	2	2	1	1
14	1	2	1	2	2	2	1	2	1	2	2	2	2	2	1	2	1	1	1	2	2	2	1	1	1	2	1	2	1	1
15	1	2	1	2	1	1	1	2	1	2	2	2	2	2	1	1	1	2	1	2	2	2	1	2	1	2	2	2	1	1
16	1	2	1	2	2	2	1	1	1	2	2	2	2	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	1	1	1
17	1	2	1	1	2	2	1	2	1	2	1	1	1	2	1	2	1	1	1	1	2	2	1	2	2	2	1	2	1	1
18	1	2	1	1	2	2	1	2	1	2	0	0	2	2	1	2	1	1	1	1	2	2	1	2	2	2	1	1	1	2
19	1	2	1	1	2	2	1	2	0	0	0	0	0	0	2	2	1	1	1	1	2	2	1	2	0	0	2	2	1	2
20	1	2	1	2	2	2	1	2	1	2	2	2	2	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	1	0	0	2	2	1	2
21	0	0	1	1	2	2	2	2	1	2	0	0	2	2	1	2	1	1	1	2	2	2	1	2	0	0	1	2	1	1

#	Múltiplex I - A				Múltiplex I - B				Múltiplex II - A				Múltiplex II - B				Múltiplex III- A				Múltiplex III- B				Multiplex IV						
	OGFOD3		FOXP1		KLHL29		AMER1		SLC24A5		DLGAP5		AMER4		AMER2		ROR1		NOTCH2		CYP19-E2		ROPN1L		SLC39A4		WI-9231*1		PTPRO		
22	1	2	1	1	2	2	1	1	0	0	0	0	0	0	1	2	1	1	1	2	2	2	1	2	1	2	2	2	1	1	
23	1	2	1	2	2	2	1	1	1	2	0	0	2	2	1	2	1	1	1	2	2	2	1	2	2	2	2	2	1	1	
24	1	2	1	1	2	2	1	1	0	0	0	0	0	0	2	2	1	1	1	2	2	2	1	1	2	2	2	2	1	1	
25	0	0	1	1	2	2	1	2	0	0	0	0	1	1	2	2	1	2	1	2	0	0	1	1	2	2	2	2	1	1	
26	0	0	1	1	2	2	1	2	0	0	0	0	1	1	1	2	1	1	1	2	2	2	1	2	2	2	1	1	1	1	
27	2	2	1	1	1	1	1	2	0	0	0	0	2	2	1	2	1	2	1	2	2	2	1	1	0	0	2	2	1	1	
28	1	2	1	1	1	2	1	1	0	0	0	0	2	2	1	2	2	2	1	1	2	2	1	2	0	0	2	2	1	1	
29	1	2	1	1	2	2	1	1	2	2	0	0	1	1	2	2	2	2	1	1	2	2	1	2	0	0	2	2	1	1	
30	0	0	1	1	1	2	1	2	1	2	2	2	1	2	2	2	1	1	1	1	2	2	1	2	2	2	0	0	1	1	
31	2	2	1	1	1	2	1	2	1	2	2	2	2	2	2	2	1	1	2	2	0	0	2	2	2	2	0	0	1	1	
32	2	2	1	1	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	2	2	1	2	1	2	0	0	2	2	2	2	0	0	1	1	
33	2	2	1	2	1	2	2	2	1	2	1	2	1	2	2	2	1	1	1	2	0	0	1	2	2	2	0	0	1	1	
34	0	0	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	1	1	1	2	0	0	2	2	2	2	0	0	1	1	
35	2	2	1	1	2	2	1	2	2	2	2	2	1	2	2	2	1	1	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	1	1	
36	2	2	1	2	2	2	0	0	1	2	1	2	1	2	2	2	2	2	2	0	0	1	2	2	2	2	2	2	1	1	
37	2	2	2	2	1	2	2	2	1	2	2	2	2	2	1	2	2	2	1	1	0	0	1	2	2	2	0	0	1	1	
38	2	2	1	2	2	2	2	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	2	2	1	2	2	2	1	2	1	2	
39	2	2	1	1	1	2	1	2	1	2	2	2	1	2	2	2	1	2	1	1	2	2	1	1	2	2	1	2	1	1	
40	2	2	1	1	1	2	2	2	2	2	1	2	1	2	2	2	1	1	2	2	0	0	1	2	2	2	1	2	1	1	
41	2	2	1	2	1	2	0	0	2	2	2	2	1	2	2	2	1	1	1	1	2	2	1	2	2	2	2	0	0	0	0
42	0	0	0	0	2	2	2	2	2	2	1	2	1	2	1	2	1	1	1	1	2	2	1	2	2	2	0	0	0	0	
43	1	2	1	1	2	2	2	2	1	2	1	2	1	2	2	2	1	2	1	2	2	2	1	1	2	2	0	0	1	1	

#	Múltiplex I - A				Múltiplex I - B				Múltiplex II - A				Múltiplex II - B				Múltiplex III - A				Múltiplex III - B				Multiplex IV						
	OGFOD3		FOXP1		KLHL29		AMER1		SLC24A5		DLGAP5		AMER4		AMER2		ROR1		NOTCH2		CYP19-E2		ROPN1L		SLC39A4		WI-9231*1		PTPRO		
44	0	0	1	2	2	2	1	2	2	2	2	2	0	0	0	0	1	1	2	2	2	2	1	2	1	2	1	2	0	0	
45	2	2	1	2	1	2	0	0	1	1	2	2	1	1	2	2	1	1	1	1	2	2	1	1	1	2	2	2	2	1	1
46	2	2	1	1	1	2	1	2	1	1	2	2	1	1	2	2	1	1	1	1	2	2	1	2	2	2	1	2	1	1	
47	2	2	1	2	2	2	0	0	2	2	1	2	1	1	2	2	1	1	1	1	0	0	1	2	2	2	1	2	1	1	
48	0	0	1	1	2	2	2	2	1	2	1	1	1	2	2	2	1	1	1	1	0	0	1	1	2	2	1	1	1	1	
49	2	2	1	1	2	2	2	2	2	2	1	2	1	2	2	2	1	1	1	1	0	0	1	1	1	2	2	2	2	1	1
50	0	0	1	1	0	0	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	1	1	1	1	0	0	1	1	2	2	1	2	1	1	
51	2	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1	2	1	1	1	1	0	0	0	0	2	2	1	2	0	0	
52	1	2	1	1	1	2	2	2	2	2	1	1	1	2	2	2	1	1	1	1	0	0	1	1	1	2	0	0	0	0	
53	0	0	1	1	1	2	2	2	2	2	1	2	1	2	2	2	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	
54	0	0	1	2	1	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	1	2	1	1	0	0	2	2	2	2	0	0	1	1	
55	0	0	1	1	1	2	2	2	2	2	1	1	1	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	1	1	
56	2	2	1	1	2	2	2	2	0	0	1	1	2	2	2	2	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	
57	2	2	1	1	2	2	2	2	1	1	1	2	2	2	1	2	1	1	1	1	0	0	1	1	2	2	1	2	1	1	
58	0	0	1	1	0	0	2	2	1	1	2	2	2	2	1	2	1	1	1	1	0	0	1	2	2	2	1	2	0	0	
59	1	1	1	1	1	2	2	2	1	1	2	2	1	1	2	2	1	1	1	1	0	0	1	1	2	2	0	0	0	0	
60	2	2	1	1	1	2	2	2	1	1	2	2	1	2	2	2	1	1	1	1	0	0	1	1	2	2	0	0	1	1	
61	2	2	1	1	1	2	2	2	1	1	1	1	2	2	2	2	1	1	1	1	0	0	1	1	1	2	0	0	0	0	
62	2	2	1	1	1	2	2	2	1	2	1	2	2	2	2	2	1	1	1	1	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0	
63	2	2	1	1	1	2	2	2	0	0	1	2	2	2	2	2	1	1	1	1	2	2	1	2	2	2	0	0	1	1	
64	2	2	1	1	1	2	2	2	0	0	1	2	2	2	2	2	1	1	1	1	2	2	1	2	0	0	0	0	1	1	
65	0	0	0	0	2	2	0	0	1	2	0	0	1	2	2	2	0	0	0	0	2	2	1	2	0	0	0	0	0	0	

ANEXO IV

Tabla de Resultados PCR-APLP

#	KIF3C		WI-11909		EURO		MECOM		10510511		DAG 1		2042314	
1	1	2	1	2	0	0	2	2	2	2	1	1	2	2
2	1	2	1	2	0	0	2	2	1	2	1	1	2	2
3	1	2	1	1	0	0	2	2	2	2	1	2	1	2
4	1	2	0	0	0	0	2	2	2	2	1	1	1	2
5	1	2	1	1	0	0	2	2	1	1	1	1	1	1
6	1	2	1	2	1	2	2	2	1	1	1	2	1	2
7	1	2	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2
8	0	0	1	1	0	0	2	2	1	1	2	2	1	2
9	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	1	2	1	2	0	0	2	2	1	2	1	2	2	2
11	1	2	0	0	1	1	2	2	1	1	1	1	2	2
12	2	2	2	2	1	1	1	2	1	2	1	2	1	1
13	1	2	2	2	0	0	2	2	1	2	2	2	2	2
14	1	2	2	2	0	0	2	2	1	2	1	2	2	2
15	2	2	1	2	0	0	2	2	1	2	1	1	1	2
16	1	2	2	2	0	0	1	2	1	2	1	2	1	1
17	2	2	1	2	0	0	2	2	2	2	1	2	0	0
18	1	2	1	1	0	0	2	2	1	2	1	2	1	2
19	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1
20	1	2	0	0	0	0	2	2	2	2	1	2	1	2
21	2	2	1	1	2	2	2	2	1	2	1	2	1	1
22	2	2	1	1	2	2	2	2	2	2	1	1	2	2
23	2	2	1	1	0	0	2	2	1	2	1	1	2	2
24	1	2	1	2	2	2	2	2	2	2	1	1	0	0
25	1	2	1	1	2	2	2	2	1	1	1	1	1	2
26	2	2	1	1	2	2	2	2	0	0	1	1	1	2
27	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0	0
28	2	2	1	1	0	0	2	2	1	2	2	2	1	1
29	2	2	1	2	2	2	0	0	1	2	2	2	1	2
30	0	0	0	0	1	2	2	2	1	2	1	1	1	2
31	2	2	0	0	1	2	0	0	1	2	1	2	1	2
32	2	2	0	0	1	2	2	2	1	2	1	2	1	2
33	2	2	1	2	1	2	2	2	2	2	1	2	1	2
34	2	2	0	0	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2
35	2	2	0	0	1	1	2	2	2	2	1	2	2	2

#	KIF3C		WI-11909		EURO		MECOM		10510511		DAG 1		2042314	
36	2	2	0	0	1	2	2	2	1	2	1	2	1	2
37	2	2	0	0	1	2	1	2	1	2	1	2	2	2
38	2	2	0	0	1	2	1	2	1	1	1	2	1	2
39	1	2	0	0	1	2	2	2	1	2	1	2	1	2
40	2	2	0	0	1	2	1	1	2	2	1	1	2	2
41	2	2	0	0	1	2	1	2	2	2	1	2	2	2
42	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	1	2	1	2
43	0	0	0	0	1	2	1	2	2	2	1	2	2	2
44	2	2	1	2	1	2	2	2	1	2	1	2	1	2
45	2	2	0	0	1	2	0	0	1	2	1	2	1	2
46	2	2	0	0	2	2	0	0	1	2	1	2	1	2
47	2	2	0	0	2	2	2	2	1	2	1	1	1	2
48	2	2	0	0	1	2	1	1	2	2	1	2	1	2
49	2	2	0	0	2	2	1	1	2	2	1	2	0	0
50	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	1	2	0	0
51	2	2	1	2	2	2	2	2	1	2	1	1	1	2
52	1	2	1	2	1	2	1	2	1	1	1	2	1	2
53	2	2	1	2	2	2	2	2	1	2	1	2	1	2
54	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
55	0	0	0	0	2	2	2	2	1	2	1	2	1	2
56	1	1	0	0	2	2	2	2	2	2	1	2	0	0
57	1	2	0	0	2	2	2	2	1	2	1	2	0	0
58	1	1	1	2	2	2	1	1	1	2	1	1	1	2
59	2	2	1	2	2	2	1	2	1	1	1	2	0	0
60	2	1	0	0	1	2	1	2	2	2	1	2	0	0
61	0	0	1	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2
62	2	2	0	0	2	2	2	2	2	2	2	2	0	0
63	2	2	0	0	0	0	0	0	1	1	1	2	0	0
64	0	0	0	0	2	2	0	0	2	2	2	2	0	0
65	2	2	0	0	0	0	0	0	2	2	1	1	0	0

ANEXO V
Tabla de Resultados PCR-RFLP

#	APO		GC*S		DRD2		WI-7423		WI-11153		LPL		TYR192	
1	1	1	1	2	2	2	1	2	1	1	1	1	2	2
2	1	1	1	2	2	2	1	2	1	1	1	1	1	2
3	1	1	1	2	1	1	1	2	2	2	1	2	1	2
4	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	2	1	2
5	1	1	1	1	2	2	1	2	1	1	2	2	1	1
6	0	0	1	1	2	2	2	2	1	1	1	1	2	2
7	1	1	1	1	2	2	1	2	2	2	1	1	2	2
8	1	2	2	2	2	2	1	2	1	1	1	2	1	1
9	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2
10	1	1	2	2	1	2	1	2	1	2	2	2	2	2
11	1	1	2	2	1	2	1	2	2	2	1	1	2	2
12	1	1	0	0	1	2	2	2	0	0	1	2	2	2
13	1	1	2	2	2	2	2	2	1	1	0	0	1	1
14	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1
15	1	1	1	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2
16	1	1	1	2	2	2	2	2	1	2	1	2	2	2
17	1	1	2	2	1	1	1	2	2	2	1	2	1	1
18	1	1	2	2	1	2	2	2	2	2	1	2	1	2
19	1	1	2	2	1	1	1	2	1	1	2	2	1	2
20	1	1	1	2	1	2	1	2	1	1	1	1	1	2
21	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2
22	1	1	0	0	1	1	2	2	1	1	2	2	2	2
23	1	1	2	2	1	2	2	2	2	2	1	1	2	2
24	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	1	2
25	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1
26	1	2	1	2	2	2	2	2	2	2	1	1	2	2
27	1	1	1	2	1	2	2	2	2	2	1	1	1	1
28	1	1	2	2	1	1	1	2	2	2	1	2	1	1
29	1	2	1	1	2	2	2	2	2	2	1	1	1	2
30	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2
31	1	1	1	2	1	2	2	2	1	2	1	2	1	2
32	1	1	1	2	1	2	2	2	2	2	1	2	1	2
33	1	2	1	2	1	2	1	1	1	2	1	2	1	2
34	1	1	1	1	1	1	1	2	1	2	2	2	1	2
35	1	1	1	2	1	2	2	2	1	1	0	0	1	2

#	APO		GC*S		DRD2		WI-7423		WI-11153		LPL		TYR192	
36	1	1	1	2	1	2	1	2	1	2	0	0	2	2
37	0	0	1	2	1	2	2	2	1	2	2	2	1	2
38	1	1	1	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2
39	1	1	0	0	2	2	1	2	1	2	2	2	1	2
40	1	1	0	0	1	1	2	2	1	2	1	2	1	2
41	1	1	2	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	1
42	1	1	2	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1	1
43	1	2	1	2	1	2	1	2	1	1	1	2	1	2
44	1	1	2	2	2	2	1	2	1	1	1	2	1	2
45	1	1	2	2	1	2	2	2	2	2	1	2	1	2
46	1	1	2	2	0	0	2	2	1	2	1	1	1	2
47	1	1	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2
48	1	1	2	2	2	2	2	2	1	2	1	1	1	2
49	1	1	2	2	1	1	1	2	1	2	1	1	1	2
50	1	1	2	2	1	2	1	2	1	2	2	2	1	2
51	0	0	2	2	1	1	1	2	2	2	1	2	1	2
52	0	0	2	2	2	2	2	2	1	2	1	1	1	2
53	1	1	2	2	1	2	2	2	1	1	2	2	1	2
54	1	1	2	2	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2
55	1	2	2	2	0	0	2	2	1	2	1	2	2	2
56	1	1	1	2	1	2	2	2	2	2	1	2	2	2
57	1	1	1	2	1	2	1	2	1	1	1	2	1	2
58	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2
59	1	1	2	2	2	2	2	2	1	2	1	2	2	2
60	1	1	2	2	2	2	1	2	1	2	1	2	2	2
61	1	1	2	2	1	2	1	2	1	2	1	2	2	2
62	1	1	2	2	2	2	1	2	2	2	1	1	1	2
63	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
64	1	1	1	2	1	2	2	2	0	0	1	2	1	1
65	1	1	2	2	1	2	1	2	0	0	2	2	2	2