



MÁSTER  
UNIVERSITARIO EN  
INVESTIGACIÓN  
EN MEDICINA  
CLÍNICA



FACULTAD DE MEDICINA

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ

## TRABAJO FIN DE MÁSTER

**Prevalencia de portadores de enfermedades recesivas en donantes de gametos centroamericanos frente a donantes de gametos europeos. Un estudio comparativo.**

**Alumno: Martos García, Candela Isabel**

**Tutor: Auso Monreal, Eva**

Curso: Máster en Investigación en Medicina clínica, 2018/2019

## **RESUMEN**

**Introducción:** Existen más de 1100 enfermedades hereditarias recesivas. Es conocido que las frecuencias de portadores de enfermedades recesivas difieren entre razas o grupos étnicos. En la actualidad, existe un vacío de información acerca de la prevalencia de portadores de enfermedades recesivas en la población de Centroamérica.

**Objetivos:** Comparar la prevalencia de portadores de las enfermedades recesivas más comunes en la etnia caucásica en la población centroamericana, así como, evaluar si el test de cribado genético de portadores de enfermedades recesivas usado en la población europea es efectivo en la población de Centroamérica.

**Metodología:** Se seleccionarán donantes de ambos sexos de cuatro centros reproductivos centroamericanos siguiendo el criterio de selección de la legislación española. Tras la extracción de ADN se analizarán los 15 genes relacionados con enfermedades recesivas de mayor importancia y prevalencia en la etnia caucásica.

De este estudio se espera encontrar una diferencia significativa en la prevalencia de portadores de enfermedades recesivas en la población centroamericana en comparación con la europea. Tras este primer análisis exploratorio y si se cumple nuestra hipótesis, el siguiente paso será conocer cuáles son las enfermedades recesivas más prevalentes en la población de Centroamérica con el objetivo de crear un test específico y dirigido a la población diana. La existencia de un test específico y efectivo para dicha población ayudará a aumentar la adhesión de centros que realicen las pruebas consiguiendo un abaratamiento en los costos de éstas, siempre en pro del beneficio de la salud de la población de Centroamérica.

**Palabras clave:** Portador, prevalencia, selección de donantes, recesivo.

## **ABSTRACT**

**Introduction:** There are more than 1100 inherited recessive diseases. It is known that the frequencies of carriers of recessive diseases differ between races or ethnic groups. At present, there is a vacuum of information about the prevalence of carriers of recessive diseases in the population of Central America.

**Objectives:** To compare the prevalence of carriers of the most common recessive diseases in Caucasian ethnicity in the Central American population, as well as to assess whether the genetic screening test of carriers of recessive diseases used in the European population is effective in the population of Central America.

**Methodology:** Donors of both sexes will be selected from four Central American reproductive centers following the selection criteria of Spanish legislation. After DNA extraction, the 15 genes related to recessive diseases of greater importance and prevalence in Caucasian ethnicity will be analyzed.

This study is expected to find a significant difference in the prevalence of recessive disease carriers in the Central American population compared to the European population. After this first exploratory analysis and if our hypothesis is fulfilled, the next step will be to know which are the most prevalent recessive diseases in the population of Central America with the objective of creating a specific test aimed at the target population. The existence of a specific and effective test for said population will help to increase the adhesion of centers that carry out the tests getting a lower cost of these, always for the benefit of the health of the population of Central America.

**Key words:** Carrier, prevalence, donor selection, recessive.

## ÍNDICE

✚	<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
✚	<b>ABSTRACT</b>	<b>2</b>
✚	<b>1.INTRODUCCIÓN</b>	<b>4</b>
	• 1.1 Contexto actual	4
	• 1.2 Situación actual en España	8
	• 1.3 Situación actual en Centroamérica	10
✚	<b>2.HIPÓTESIS</b>	<b>12</b>
✚	<b>3.OBJETIVOS</b>	<b>12</b>
✚	<b>4.METODOLOGÍA</b>	<b>14</b>
	• 4.1 Diseño del estudio, lugar y tiempo de ejecución	14
	• 4.2 Sujetos de estudio	14
	• 4.3 Procedimiento de selección	15
	• 4.4 Criterios de inclusión	16
	• 4.5 Criterios de exclusión	16
	• 4.6 Variables de estudio	17
	• 4.7 Recogida de datos clínicos	17
	• 4.8 Limitaciones	18
✚	<b>5.ASPECTOS ÉTICOS</b>	<b>20</b>
✚	<b>6.PLAN DE TRABAJO</b>	<b>21</b>
	• 6.1 Desarrollo del proyecto	21
	• 6.2 Distribución de tareas del equipo investigador	21
	• 6.3 Cronograma	22
	• 6.4 Experiencia del equipo investigador	23
✚	<b>7.MARCO ESTRATÉGICO</b>	<b>24</b>
	• 7.1 Utilidad y aplicabilidad práctica	24
	• 7.2 Capacidad del proyecto de abordar objetivos	24
	• 7.3 Medios disponibles para la realización del proyecto	25
✚	<b>8.PRESUPUESTO</b>	<b>27</b>
✚	<b>9.BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>28</b>
✚	<b>ANEXOS</b>	<b>31</b>

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Contexto actual

A nivel mundial, la mayor preocupación de los pacientes que van a iniciar un ciclo de reproducción asistida (RA) es la posibilidad de fracaso que todo procedimiento experimental conlleva, así como la presencia de enfermedad por un inexistente cribado de enfermedades hereditarias durante el proceso.

Las enfermedades genéticas mendelianas poseen unos patrones de herencia que se pueden definir tras la observación de la enfermedad a lo largo de las distintas generaciones, mediante el estudio de la historia familiar (1). Estos patrones son:

**-Autosómico dominante**, la enfermedad aparece cuando hay una sola copia del alelo mutante, localizado en un cromosoma no sexual. Una pareja con un progenitor que posea una enfermedad con este tipo de herencia tendrá una probabilidad de tener un hijo afecto del 50%.

**-Autosómico recesivo**, la enfermedad aparece cuando hay dos copias del alelo mutante, localizado en un cromosoma no sexual, por lo que para que una persona herede la enfermedad necesita recibir dos alelos recesivos, uno de cada progenitor, las probabilidades de tener un hijo afecto de una pareja sana portadora son de un 25%.

**-Dominante Ligado al X**, en este caso el alelo mutante se localiza en el cromosoma X pero la presencia de una única copia provoca la enfermedad, por lo que las hijas de un padre afecto siempre tendrán la enfermedad, pero ninguno de sus hijos la heredará. En caso de mujeres heterocigotas el 50% de las niñas y de los niños serán afectados. Si la madre posee la mutación en homocigosis, el 100% de los niños y el 50% de las niñas heredarán dicha mutación, por lo que sufrirán la enfermedad.

**-Recesivo ligado al X**, la enfermedad es provocada por un alelo mutante localizado en el cromosoma X. La incidencia de estas enfermedades es mucho mayor en hombres que en mujeres, puesto que una mujer debe heredar dos cromosomas X con el alelo mutado. Los padres transmitirán el alelo mutado a todas sus hijas, siendo portadoras en el caso de la pareja no posea

la mutación. En el caso de que la pareja sea heterocigota para dicha mutación el 50% de mujeres serán portadoras y el 50% de niñas afectas por la enfermedad. En el caso de los niños, el cromosoma X lo heredan de la madre, por lo que una mujer afecta siempre tendrá niños afectos y en caso de ser heterocigota, tendrá una posibilidad del 50% de tener niños afectos y 50% niños sanos.

- **Ligada al Y**, en este caso la enfermedad es ocasionada por un gen mutado que se localiza en el cromosoma Y. Este cromosoma es muy pequeño y posee pocos genes y su herencia (solo se transmite de padres a hijos varones) hace que si el padre posee una enfermedad ligada al Y todos sus hijos la poseerán y ninguna de sus hijas (2).

Hay más de 1100 enfermedades hereditarias recesivas y aproximadamente 1 a 2 parejas de cada 100 se encuentran en riesgo de tener un hijo afecto por una de estas enfermedades. Cuando dos miembros de la pareja son portadores de la misma enfermedad recesiva tienen un 25% de probabilidad de tener un hijo afecto. El problema lo encontramos en que los individuos portadores sin antecedentes familiares relacionados con la enfermedad, suelen desconocer su patología y, por tanto, desconocen el riesgo y lo que ello conlleva (3).

Cuando una pareja con deseos reproductivos inicia un ciclo de reproducción asistida con donantes de gametos, resulta indispensable realizar pruebas genéticas a estos donantes. El objetivo es evitar el uso de gametos portadores de enfermedades recesivas que puedan dar lugar a un hijo afecto debido a la unión de dos gametos de individuos que desconocen ser portadores de una misma enfermedad recesiva, asegurando así, que el donante seleccionado esté libre de una patología hereditaria. (4)

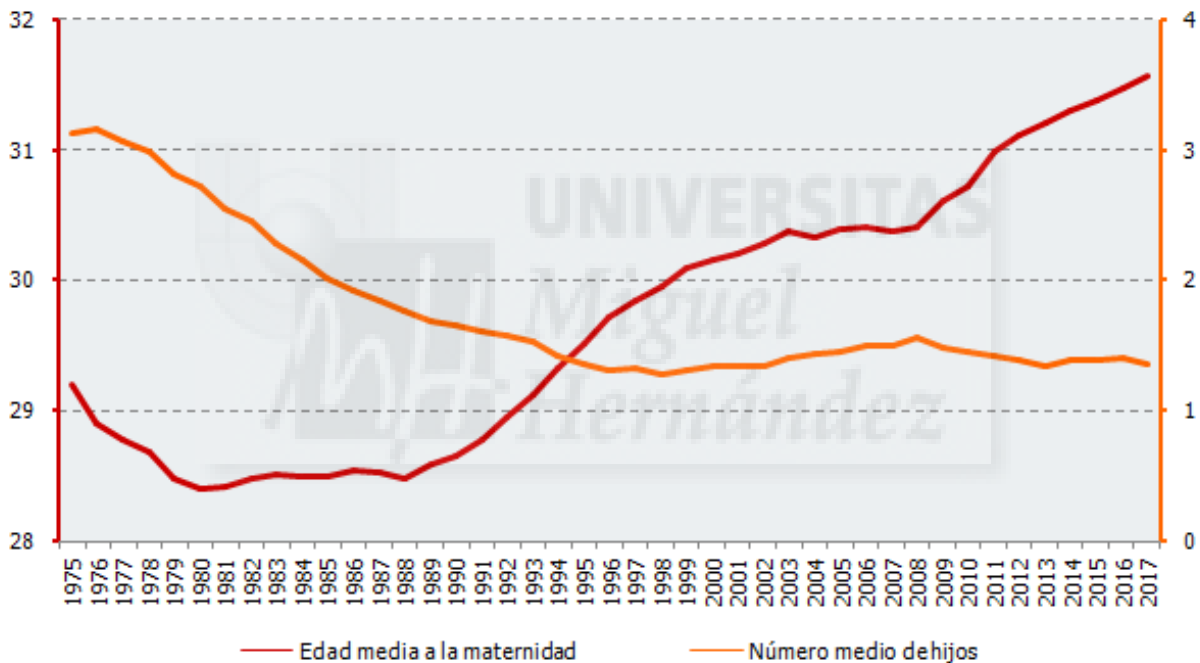
Los avances tecnológicos de secuenciación y la disminución de los costes de la técnica han logrado que el análisis expandido de portadores sea factible, pudiendo identificar a estas parejas reduciendo el riesgo de transmisión de la enfermedad (5).

Según datos del Instituto de Estadística y Cartografía de Andalucía, la edad materna es uno de los principales factores asociados a la infertilidad, la cual ha ido aumentando con el paso de los años, situándose actualmente, en 31.5 años de media, y disminuyendo a 1.2 hijos por familia (Figura 1). La edad materna avanzada está claramente asociada con diversos factores

relacionados con la infertilidad como: la disminución de la reserva ovárica, lo cual se relaciona con un aumento de FSH y una disminución de AMH (6) o el aumento de alteraciones cromosómicas, siendo del 23.5% en mujeres menores a 35 años y llegando al 46.5% en mujeres mayores de 40 (7).

Todo esto se traduce en una disminución de la tasa de embarazo. Según los datos de la Sociedad Española de Fertilidad la tasa de gestación por transferencia, desciende de un 44.3% a los 35 años a un 22.8% a los 45 años (8).

Figura 1. Indicador coyuntural de fecundidad y edad media de la maternidad desde 1976 hasta 2011. En naranja se representa el número medio de hijos por mujer y en roja la edad media de la mujer en tener su primer hijo. Datos tomados del Instituto de Estadística y Cartografía de Andalucía.



En el caso de los varones, la edad, a pesar de las creencias, también desempeña un papel fundamental a la hora de tener un hijo sano. En la espermatogénesis los errores en la replicación del ADN, la efectividad en la reparación del daño no replicativo del ADN entre divisiones celulares y la exposición a mutágenos durante la vida, provoca mutaciones de novo (9). Estas están altamente asociadas con la edad, ya que tienden a surgir y acumularse en mayor frecuencia con el envejecimiento testicular, duplicándose cada 16.5 años en el caso de las mutaciones

paternas. Además se ha visto que estas mutaciones están implicadas en el desarrollo de enfermedades como la esquizofrenia o el autismo (10,11).

El factor más importante de infertilidad masculina es la calidad seminal, la cual se ve afectada por varios parámetros como son: la concentración espermática, la movilidad, la morfología, la vitalidad y la fragmentación de ADN espermático (12).

El estrés oxidativo (OS, de sus siglas en inglés) está asociado a factores que alteran la espermatogénesis como: la exposición a metales (13), la obesidad, la inflamación, la contaminación o el tabaquismo (14). El OS produce radicales libres de oxígeno (ROS) que, en dosis altas, afectan negativamente a la calidad seminal. El plasma seminal contiene antioxidantes que se generan de manera natural por los espermatozoides, “bloqueando” los radicales libres de oxígeno (ROS). El problema radica en que cuando las especies reactivas de oxígeno se encuentran en dosis altas, los antioxidantes propios del plasma seminal no pueden “bloquear” todos los ROS disminuyendo, entre otros factores, la vitalidad y la movilidad del espermatozoide así como aumentan la fragmentación del ADN e induce daños en la membrana plasmática del espermatozoide, repercutiendo en la capacidad fecundante (15).

Todo esto argumenta, que el uso de donantes de gametos está claramente indicado en parejas de edad avanzada que muestren una disfunción ovárica o espermática o en parejas que independientemente de la edad hayan perdido la función fecundante por alguna razón, como, por ejemplo: personas sometidas a un proceso de quimioterapia (16,17) o que presenten alteraciones genéticas heredables. En España el número de ciclos de reproducción asistida realizados con donantes de gametos asciende al 30% (18), mientras que en Centroamérica la tasa es del 15% (19).

Es bien conocido, que las frecuencias de portadores de enfermedades recesivas difieren entre grupos étnicos (20), por lo que la legislación vigente sobre la donación de gametos a nivel europeo indica que, se debe llevar a cabo un cribado genético de genes recesivos prevalentes en la etnia del donante.

Cada centro, en cuanto a las enfermedades genéticas se refiere, debe asegurar en todo momento la salud del recién nacido fruto de gametos donados, realizando una adecuada selección del donante (21). Sin olvidar y teniendo en cuenta los criterios económicos y de



productividad que cada centro tiene que asumir, se debe realizar un balance de lo que significa un estudio genético, teniendo en cuenta los criterios de prevalencia de la enfermedad en sí y de sus portadores, así como la gravedad de cada una de las mutaciones genéticas (22).

Para estar totalmente seguros de que los donantes de gametos seleccionados no transmiten ninguna enfermedad recesiva es necesario realizar un estudio genético de cribado de mutaciones en enfermedades recesivas (23). Puesto que dichas enfermedades no tienen por qué ser las mismas en todas las partes del mundo, en la actualidad, estudiar todas las enfermedades recesivas, resultaría de un alto coste y bajo beneficio. Lo óptimo sería tener una base de datos con la prevalencia de las enfermedades recesivas más comunes por países, con el objetivo de realizar solo el cribado de las enfermedades más prevalentes al donante, siendo de vital importancia realizar una historia clínica y familiar del candidato a donante (24).

La realización de una correcta historia clínica y familiar del donante es el primer paso fundamental en la selección de los mismos. Con un árbol genealógico podemos detectar muchas enfermedades mendelianas y malformaciones (25). El estudio debe ser mínimo de tres generaciones y es el primer filtro que debe pasar el candidato a donante de gametos (26).

## **1.2 Situación actual en España**

En España, el Real Decreto 412/1996 establece el protocolo que han de seguir los centros españoles para el estudio de los donantes de gametos, donde se determina que los estudios a realizar son fijados por cada comunidad autónoma, aunque establece unos estudios mínimos nacionales, que son:

1. Conocimiento del grupo sanguíneo, factor rH, sífilis, hepatitis, SIDA, toxoplasma, rubeola, citomegalovirus, herpesvirus, gonorrea y chlamidia.
2. Obligatoriedad de realización de las pruebas serológicas en cada donación. Quedan excluidas aquellos donantes que tengan antecedentes familiares de malformaciones ligadas a cromosomopatías, genopatías o metabolopatías (27).
3. No expresa ninguna orientación ni dicta ninguna prueba genética obligatoria que se deban realizar a los donantes de gametos.

4. Se mantiene la ambigüedad sobre las pruebas genéticas a realizar en el donante de gametos, dejando a criterio del facultativo responsable el estudio de las enfermedades genéticas en función del estado del conocimiento actual y de la etnia del donante (28).

Debido a la laguna existente en la ley acerca de las pruebas genéticas a realizar a los donantes, cada centro es el que debe elegir el criterio de selección de donantes incluyendo el tipo de pruebas a realizar. No todos los centros españoles realizan un cribado de enfermedades recesivas en sus donantes de gametos, y en aquellos que usan esta técnica para realizar la selección de sus donantes, son los propios centros los que deben elegir qué enfermedades recesivas analizarán. Por lo tanto, no existe un consenso a nivel nacional ni europeo del uso de un test de portadores como referencia.

Ante esta situación, la Unidad de Genética Vistahermosa con la ayuda de la Unidad de Reproducción de la Clínica Vistahermosa de Alicante, estudió la prevalencia de portadores para enfermedades recesivas de mayor importancia clínica en etnia caucásica basándose en el estudio realizado por Lazarin et. al en 2013 (20), obteniendo los datos mostrados en la figura 2. Esta tabla muestra las enfermedades estudiadas por la Unidad de Genética Vistahermosa para analizar los genes asociados en los estudios de portadores, y será la usada como referencia en este estudio.

Figura 2. Tabla de las enfermedades y genes asociados que incluye el estudio realizado por la Unidad de Genética Vistahermosa de Alicante. Imagen extraída del estudio de Urbano A. et al. 2018 (29)

Enfermedad (número OMIM)	Gen	Tipo de herencia	Frecuencia de portadores	
			N (%)	1 en _
Fibrosis quística (#602421)	<i>CFTR</i>	AR	24 (4.6%) <sup>a</sup>	22
Sordera congénita no sindrómica (DFNB1) (#220290)	<i>GJB2</i>	AR	19 (3.6%)	28
Atrofia Muscular Espinal (#253300)	<i>SMN1</i>	AR	11 (2.1%)	48
Fenilcetonuria (#261600)	<i>PAH</i>	AR	9 (1.7%)	58
Fiebre Mediterránea Familiar (#249100)	<i>MEFV</i>	AR	8 (1.5%)	65
Hiperplasia suprarrenal congénita por deficiencia de 21-hidroxilasa (#201910)	<i>CYP21A2</i>	AR	6 (1.1%)	87
Síndrome de Smith-Lemli-Opitz (#270400)	<i>DHCR7</i>	AR	5 (1.0%)	105
Deficiencia de acil- CoA deshidrogenada (cadena media) (#607008)	<i>ACADM</i>	AR	5 (1.0%)	105
Síndrome de X-Frágil (#300624)	<i>FMR1</i>	LX	4 (1.0%) <sup>b</sup>	101
Anemia falciforme (#603903)	<i>HBB</i>	AR	2 (0.4%)	262
Enfermedad de Canavan (#271900)	<i>ASPA</i>	AR	1 (0.2%)	523
Enfermedad de Gaucher (#230800)	<i>GBA</i>	AR	1 (0.2%)	523
Enfermedad de Pompe (#232300)	<i>GAA</i>	AR	1 (0.2%)	523
Beta-talasemia (#613985)	<i>HBB</i>	AR	1 (0.2%)	523
Enfermedad de Tay-Sachs (#272800)	<i>HEXA</i>	AR	0	-
Síndrome de Riley-Day (Disautonomía Familiar) (#223900)	<i>IKBKAP</i>	AR	0	-

<sup>a</sup> Número de portadores de mutación patogénica en el gen *CFTR*, sin considerar el alelo 5T. Si se tiene en cuenta que se identificaron 17 individuos portadores de este alelo, la frecuencia de portadores de fibrosis quística sería de 7.8%.

<sup>b</sup> Número de portadoras de un alelo en la zona intermedia o zona gris (45-54 repeticiones del triplete CGG de la región promotora del gen *FMR1*). Este estudio se realizó únicamente en población femenina (n=402).

(AR) Herencia autosómica recesiva. (XL) Herencia ligada a X. (N) Número de portadores.

### 1.3 Situación actual en Centroamérica

En Centroamérica la genética como tal, es una rama de la ciencia de reciente aparición con lo que conlleva una escasa práctica debido al alto costo de sus técnicas y a la escasa preparación de genetistas en estos países. En los países centroamericanos no se encuentran bases de datos de prevalencia de enfermedades genéticas en general, así como es muy escasa la bibliografía científica sobre enfermedades recesivas en población centroamericana (30). Los

diagnósticos que reciben los pacientes son estrictamente clínicos. Ante este contexto es fácil entender que la identificación de las enfermedades recesivas tanto en las parejas sometidas a técnicas de reproducción asistida como en portadores resulta de alta complejidad.

Diferente a lo que ocurre en España, en Centroamérica no existe una ley que regule el procedimiento y las técnicas de reproducción asistida, por lo que los criterios de selección de donantes de gametos quedan completamente a cargo de cada centro de reproducción, con el agravante comentado de la falta de experiencia debida a la incipiente aparición de dichos centros en estos países (31). Datos del 2º Congreso Centroamericano de Infertilidad revela que dos de las pruebas estandarizadas más realizadas y que son, la serología para enfermedades infecciosas y el cariotipo, solo se realizan en el 50% de los centros de reproducción asistida. Solo dos centros de este 50% realizan un estudio genético de ADN para identificar a los donantes portadores de enfermedades recesivas, utilizando como criterio para la confección del test, las enfermedades de mayor prevalencia en etnia caucásica. La insuficiencia de pruebas realizadas a los donantes de gametos en los centros de reproducción centroamericanos se debe en parte a la escasez de pacientes dispuestos a utilizar gametos donados para su ciclo de fecundación in vitro y a la elevada relación coste-beneficio (32).

Ante este escenario, en este trabajo nos planteamos conocer y comparar la prevalencia de las enfermedades genéticas recesivas analizadas en los donantes de gametos europeos, en los donantes de gametos centroamericanos. Para ello, utilizaremos como referencia la tabla de portadores de enfermedades genéticas recesivas utilizada por la Unidad de Genética Vistahermosa. Los resultados obtenidos en este estudio revelarán si el test de cribado genético para etnia caucásica puede ser aplicado en los donantes de gametos centroamericanos o si es necesario un estudio de campo para saber cuáles son las enfermedades genéticas más prevalentes en esta población.

## **2. HIPÓTESIS**

Este estudio plantea dos hipótesis:

Hipótesis general: La prevalencia de portadores de enfermedades recesivas en donantes de gametos centroamericanos es diferente a la prevalencia de estas enfermedades en donantes europeos.

Hipótesis específica: Los test de cribado genético de genes recesivos utilizados en los donantes europeos, no son eficientes en los donantes centroamericanos.

Si las hipótesis se cumplen, sería necesario estudiar cuáles son las enfermedades recesivas con mayor prevalencia en Centroamérica con el objetivo de confeccionar un test de cribado genético más específico y efectivo en los donantes centroamericanos. La existencia de estos test específicos mejoraría la detección de enfermedades genéticas en pro del beneficio de la salud de la población de Centroamérica, así como aumentaría la adhesión de centros que realizan las pruebas consiguiendo un abaratamiento en los costos de las pruebas clínicas.

Si las hipótesis no se cumplen, la creación de un test específico no sería necesario, pudiendo usar el mismo test para población centroamericana y europea.

## **3. OBJETIVOS**

Objetivo principal: Conocer la prevalencia de enfermedades recesivas de los donantes de gametos europeos en los donantes de gametos centroamericanos.

Objetivos específicos:

- 1- Estudiar la prevalencia de enfermedades recesivas de las donantes europeas en las donantes de nacionalidad centroamericana.
- 2- Estudiar la prevalencia de enfermedades recesivas de los donantes europeos en los donantes de nacionalidad centroamericana.
- 3- Comparar la prevalencia de enfermedades recesivas entre población centroamericana y europea.

- 4- Evaluar si el test de cribado genético de portadores de enfermedades recesivas usado en la población europea es eficiente en la población centroamericana.



## **4. METODOLOGÍA**

### **4.1 Diseño del estudio, lugar y tiempo de ejecución:**

Se trata de un estudio piloto comparativo de corte transversal con una fase de recogida y análisis de muestras de los donantes de gametos centroamericanos para su posterior comparación con las muestras de donantes de gametos europeos.

Los centros que formarán parte del estudio son los siguientes: UR Ciudad de México, Centro Gestar Guatemala, Centro Repromedic Salvador, UR Managua y Unidad de Genética Vistahermosa de Alicante, esta última en España.

En todas las clínicas centroamericanas participantes, se seleccionarán los donantes y se realizará la extracción sanguínea. El centro UR Managua será el centro receptor de las muestras de sangre. Este mismo centro se encargará de realizar la extracción de ADN de las muestras de sangre recibidas por los centros colaboradores y las de sus propios donantes seleccionados. El ADN extraído será enviado a la Unidad de Genética Vistahermosa en Alicante, donde se procesarán y analizarán los datos.

El estudio tendrá una duración de 19 meses, que abarcará desde septiembre de 2019 a marzo de 2021.

### **4.2 Sujetos de estudio:**

Los sujetos de estudio para este proyecto serán elegidos del programa de donación de los centros reproductivos: UR Managua, UR ciudad de México, Grupo Gestar Guatemala y Centro Repromedic de Salvador. Los donantes se seleccionarán según el criterio de legislación español (Ley 14/2006 y Real Decreto-ley 9/2014) (33), con los que los participantes deberán cumplir los criterios de inclusión comentados más adelante.

Para obtener el tamaño de la muestra se utilizó el paquete estadístico EPIDAT con una precisión absoluta del 2%, un intervalo de confianza del 95% y un tamaño poblacional de 12.000.000 de personas centroamericanas comprendidas entre 18 y 35 años (34), obteniendo un resultado de 369 individuos. Para ello se distribuirán entre los 4 centro participantes, de modo que, cada uno de ellos debe seleccionar a 93 donantes, mitad varones y mitad mujeres, en los doce meses de selección de donantes y recolecta de muestras.

### **4.3 Procedimiento de selección:**

La selección de donantes se llevará a cabo en cada clínica a cargo de los embriólogos responsables del proceso. Todos los donantes (masculinos y femeninos) que accedan a participar en el estudio deberán, previamente a la obtención de datos, leer y firmar el consentimiento informado aceptando la participación en el estudio (Anexo 1) y el documento informativo detallado del estudio (Anexo 2). Igualmente deberán leer y firmar el consentimiento informado para la obtención de muestras (Anexo 3). Los documentos, una vez firmados, serán recogidos y archivados por los centros de reproducción. Estos centros serán los encargados de proporcionar el asesoramiento genético a los candidatos. Los participantes y siguiendo el protocolo normal de las clínicas también tendrán que leer y firmar el consentimiento y documento informado para la donación de gametos.

La selección constará de las siguientes fases:

Fase explicativa del estudio: En esta fase se le explicará al candidato el objetivo del estudio y se le ofrecerá la opción de participar en él de manera voluntaria. Si acepta participar, se le suministrará el consentimiento informado y el documento informativo detallado del estudio los cuales deberá leer y firmar aceptando su participación.

Fase explicativa de los procedimientos técnicos: En esta fase se le explicará minuciosamente al candidato el proceso de donación de gametos y se le suministrará el consentimiento informado y el documento informativo referente a la donación de gametos, así como el consentimiento informado para la realización de pruebas genéticas, los cuales deberá leer y firmar verificando su entendimiento.

Entrevista personal: Se valorará la historia clínica y familiar y se creará un árbol genealógico hasta tercera generación, donde se estudiará la salud genética del donante.

Estas tres fases serán llevadas a cabo por los embriólogos responsables del proceso de selección de donantes de cada centro.

Extracción de sangre para estudio serológico y analítica general: Se realizará la venopunción para la extracción sanguínea, la cual se trasladará a un centro de análisis clínico



para valorar: hematología, coagulación, bioquímica, y serología. Esta fase será llevada a cabo por el personal de enfermería del centro

Tras la realización y superación de todas las fases del estudio preliminar para la selección del donante, estos se someterán a la realización de las pruebas genéticas. Siendo estas:

**Cariotipo:** Se realiza a partir de una muestra sanguínea extraída mediante venopunción. De esta prueba se obtiene el estudio y ordenamiento de los cromosomas. Se llevará a cabo por el embriólogo o genetista responsable del área de citogenética de cada centro de reproducción.

**Extracción de ADN para panel de portadores:** Las muestras de sangre obtenidas en cada centro reproductivo se enviarán al centro UR Managua en 24 a 48 horas tras la extracción, las cuales, se procesarán de inmediato por la embrióloga responsable de laboratorio en UR Managua para extraer ADN según protocolo (Anexo 4). Las muestras de ADN obtenidas en un mes de los 4 centros de reproducción centroamericanos se enviarán a la Unidad de Genética Vistahermosa para su procesamiento y obtención de los resultados.

**Cribado de portadores:** Las muestras de ADN de donantes procedentes de los distintos centros de reproducción centroamericanos se procesarán mediante tecnología de amplicones, empleando la plataforma NGS Gen Read V2 (Qiagen) y posterior secuenciación con un equipo Miniseq (Illumina). Se llevará a cabo en la Unidad de Genética Vistahermosa de Alicante en España.

#### **4.4 Criterios de inclusión:**

Edad: entre 18 y 35 años.

Etnia: centroamericana.

Aceptar participar en el estudio y firma del consentimiento informado

No presentar factores de riesgo en la historia clínica y familiar.

No presentar factores de riesgo en los estudios analíticos realizados.

#### **4.5 Criterios de exclusión:**

Individuos con antecedentes familiares de enfermedad hereditaria y aquellos con cualquier trastorno genético o enfermedades congénitas.

Individuos con exámenes serológicos positivos para cualquier enfermedad de transmisión sexual.

#### **4.6 Variables de estudio:**

Objetivo 1: Variable dependiente: Mutaciones en los test de cribado de portadores centroamericanos.

Variable independiente: donantes femeninas centroamericanas

Objetivo 2: Variable dependiente: Mutaciones en los test de cribado de portadores centroamericanos.

Variable independiente: donantes masculinos centroamericanos

Objetivo 3: Variable dependiente: Mutaciones en los test de cribado de portadores centroamericanos.

Variable independiente: donantes centroamericanos

Objetivo 4: Variable dependiente: Número de mutaciones en los test de cribado de portadores

Variable independiente: etnia o raza.

Otras variables que se medirán en este estudio son las variables sociodemográficas como el sexo, la nacionalidad y la edad.

#### **4.7 Recogida de datos clínicos:**

Se tomarán muestras codificadas de sangre periférica a todos los candidatos seleccionados como donantes para mantener su anonimato. Las muestras se recogerán en los

distintos centros de reproducción asistida, y serán enviadas a UR Managua para realizar la extracción de ADN genómico según protocolo estandarizado.

Una vez extraído el ADN, las muestras refrigeradas serán enviadas a la Unidad de Genética Vistahermosa para su procesamiento con el fin de obtener los resultados del cribado genético.

En el cribado genético se analizarán 15 genes relacionados con 16 enfermedades recesivas de mayor importancia y prevalencia en etnia caucásica: Fibrosis quística, sordera congénita no sindrómica, atrofia muscular espinal, fenilcetonuria, fiebre mediterránea familiar, hiperplasia suprarrenal congénita, síndrome de Smith-Lemli-Opitz, deficiencia de acil-CoA, síndrome X frágil, anemia falciforme, enfermedad de Canavan, enfermedad de Gaucher, enfermedad de Pompe, beta talasemia, Enfermedad de Tay Sachs y síndrome de Riley-Day (Figura 2).

El cribado del test se realizará mediante secuenciación masiva o NGS (next generation secuency), que permite estudiar toda la secuencia codificante del gen y sus regiones flanqueantes (35).

La mayor parte de los genes estudiados mediante este test tienen una cobertura cercana al 100%.

Los datos se analizarán estadísticamente mediante el programa informático SPSS con un contraste estadístico Chi-cuadrado y un intervalo de confianza (CI) del 95%.

El análisis final se distribuirá por grupos siguiendo los criterios de los objetivos.

#### **4.8 Limitaciones**

Debido a la reciente incorporación de la reproducción asistida en los países centroamericanos, el tabú generado por los pacientes en torno a esta práctica es muy habitual, por ello, es frecuente encontrar una actitud de negación y rechazo a la hora de realizar tales procedimientos. El rechazo es mayor cuando en determinados casos se aconseja la donación de gametos y sobre todo la donación de gametos femeninos.

Por ello, el número de centros especializados en reproducción asistida en la región es muy limitado, y de estos, los que incluyen un plan de donación de gametos en su oferta de servicios son todavía más reducidos.

Ante esta situación, la mayor limitación de este proyecto es el número de donantes potenciales aptos para el estudio en cada centro de reproducción en Centroamérica.

Según los resultados obtenidos tras este estudio piloto llevado a cabo durante 19 meses, el equipo investigador se planteará la posibilidad de ampliar y continuar con el estudio varios años más con el objetivo de conseguir un número mayor de participantes en el estudio y resultados con mayor significancia estadística.

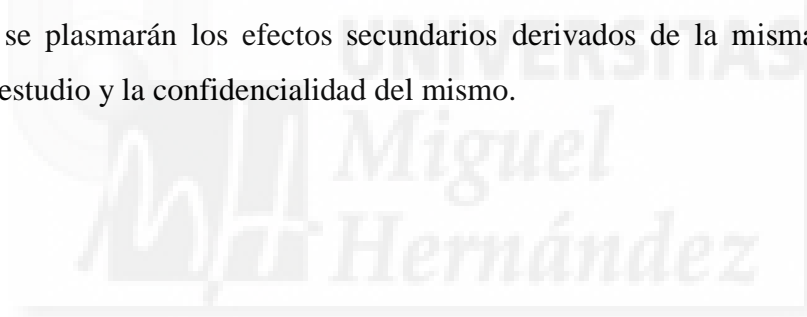


## 5. ASPECTOS ÉTICOS

Para la realización de este proyecto se pedirá la aprobación del Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) de todos los centros implicados en el proyecto, siendo estos: Hospital General Universitario de Alicante, Facultad de Ciencias Médicas de Managua, Comité de Bioética Nacional de Guatemala, Comité de Bioética Nacional de Salvador y Comité de Ética Ciudad de México.

A cada donante entrevistado se le informará de la realización del estudio, se le explicará la voluntariedad del mismo y todos aquellos sujetos que decidan participar en el estudio deberán leer y firmar el consentimiento informado aceptando su participación en el estudio. Los donantes también deberán leer y firmar los consentimientos informados para la obtención de muestras y donación de gametos.

Igualmente, se les aportará el documento informativo respecto a la técnica de donación de gametos donde se plasmarán los efectos secundarios derivados de la misma y el documento informativo del estudio y la confidencialidad del mismo.



## **6. PLAN DE TRABAJO**

### **6.1 Desarrollo del proyecto**

Fase 1:

Septiembre y octubre de 2019. Preparación de protocolos y coordinación con los diferentes centros. Solicitud de permiso a los diferentes comités de ética.

Fase 2:

Noviembre de 2019 a octubre de 2020. Selección de donantes y recogida de muestras por los diferentes centros centroamericanos. Envío de estas a España para su procesamiento y recogida de datos en la Unidad de Genética Vistahermosa.

Fase 3:

Noviembre de 2020 y diciembre de 2020. Análisis estadístico de los datos e interpretación de los resultados.

Fase 4:

Enero de 2021 a marzo de 2021. Redacción final del manuscrito y envío a revistas de alto impacto científico y congresos nacionales e internacionales de genética y reproducción asistida.

### **6.2 Distribución de tareas del equipo investigador**

Investigadora principal (IP): este papel lo asumirá Candela Martos, la realizadora de este proyecto. El IP será el encargado de solicitar los permisos de los diferentes comités de ética para el desarrollo del proyecto. Se responsabilizará de coordinar al resto del equipo investigador, seleccionar y obtener los consentimientos informados de los participantes en la región de Nicaragua, coordinar la recogida de muestras sanguíneas, realizar la extracción de ADN de las mismas y gestionar el envío de estas a la Unidad de Genética Vistahermosa. Así mismo se

encargará del análisis e interpretación de los resultados. Escritura del manuscrito y publicación en revistas científicas de alto impacto.

Investigadores asociados en Centroamérica (IAC): serán los encargados de seleccionar a los donantes en cada centro, obtener los consentimientos informados y coordinar la recogida y envío de muestras a UR Managua. Además, serán los encargados de supervisar la correcta obtención de las muestras sanguíneas por parte del equipo de enfermería del centro.

Investigador asociado en España (IAE): será el encargado de procesar las muestras recibidas de las diferentes clínicas de Centroamérica participantes en el proyecto y realizar el envío de los datos a la clínica receptora de éstos en Centroamérica.

### 6.3 Cronograma de las actividades

Tarea	Responsable	Se 19	Oc 19	No 19	Di 19	En 20	Fe 20	Ma 20	Ab 20	May 20	Ju 20	Jul 20	Ag 20	Se 20	Oc 20	No 20	Di 20	En 21	Fe 21	May 21	
Preparación de protocolos	IP		X																		
Coordinación de los centros	IP		X																		
Permisos de C.C.E.E	IP	X																			
Selección de donantes	IP, IAC			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X						
Recogida de muestras	IP, IAC			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X						
Procesamiento muestras y recogida datos	IAE			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X						
Análisis estadístico e interpretación resultados	IP															X	X				
Escritura del manuscrito y difusión	IP																	X	X	X	

Legenda: IP: investigador principal, IAC: investigadores asociados en Centroamérica, IAE: investigador asociado en España.

#### **6.4 Experiencia del equipo investigador**

El equipo investigador del proyecto esté formado por un conjunto de especialistas en embriología y/o genética de cada centro de reproducción. En cada centro son:

Grupo Gestar Guatemala: biólogo especialista en embriología y reproducción humana. Máster en reproducción asistida por el centro IVI Valencia, con 12 años de experiencia en el campo de la reproducción humana asistida, Experiencia demostrada en coordinar congresos centroamericanos de infertilidad.

Repromedic Salvador: ginecóloga y embrióloga especialista en embriología y reproducción humana. Máster en reproducción asistida por el centro IVI Valencia, con 7 años de experiencia en el campo de la reproducción humana asistida.

UR Ciudad de México: biólogo especialista en embriología y reproducción humana. Máster en medicina y genética reproductivas por la Universidad Miguel Hernández de Elche, con 5 años de experiencia en el campo de la reproducción humana asistida. Creador del blog sobre embriología clínica *Embrioloblog*.

UR Managua: bióloga especialista en embriología y reproducción humana. Máster en medicina y genética reproductivas por la Universidad Miguel Hernández de Elche, con 4 años de experiencia en el campo de la reproducción humana asistida.

UG Vistahermosa: doctor en biología y especialista en genética y reproducción humana. Máster en medicina y genética reproductivas por la Universidad Miguel Hernández de Elche, con 10 años de experiencia en el campo de la reproducción humana asistida. Experiencia investigadora con publicaciones en el ámbito de la genética reproductiva.



## **7. MARCO ESTRATÉGICO**

### **7.1 Utilidad y aplicabilidad práctica**

Debido a la inexistencia de estudios que aporten información sobre la prevalencia de enfermedades recesivas en la población de Centroamérica, no existe un test de cribado genético específico y normalizado para dicha población. Ante esta situación, el criterio acerca de cuáles son las enfermedades recesivas que se deben someter a cribado genético, recae sobre cada centro de reproducción asistida. Ante esta situación, los especialistas en Centroamérica se ven obligados a utilizar los test de cribado que se usan en la población caucásica, existiendo la posibilidad de obviar enfermedades que puedan tener mayor riesgo y prevalencia para la población centroamericana. Estas prácticas, conllevan un elevado gasto para la sociedad además de albergar dudas acerca de la efectividad del cribado genético.

Con nuestro estudio pretendemos comparar la prevalencia de las enfermedades recesivas de la población europea en la población de Centroamérica para saber si los test de cribado genético empleados en Europa son útiles y eficaces para la población centroamericana. Si nuestros resultados mostrasen diferente prevalencia de enfermedades recesivas en Europa y Centroamérica, quedaría patente la necesidad de estudiar cuáles son las enfermedades genéticas recesivas de mayor prevalencia en la población centroamericana con el objetivo de confeccionar un test de cribado genético específico para esta población. Conseguir una mayor adhesión de centros que realicen las pruebas genéticas, así como abaratar los costes repercutiría en un beneficio económico/social para la sociedad en Centroamérica.

### **7.2 Capacidad del proyecto de abordar los objetivos**

La prevalencia cuantifica la proporción de individuos de una población que padecen una enfermedad en un momento o periodo de tiempo determinado y es un dato de suma importancia en cualquier estudio epidemiológico, siendo básico para poder desarrollar el presente proyecto. Por ello el conocimiento de la prevalencia de enfermedades en diferentes grupos étnicos, resulta interesante para conformar parte de la bibliografía necesaria para posteriores estudios.

El equipo que conforma este proyecto avala suficiente experiencia en el campo de la reproducción asistida para desarrollar todas las tareas con éxito. Con la ayuda de los test de cribado de enfermedades recesivas más relevantes en etnia caucásica como control, resultará fácil comparar las prevalencias de esas mismas enfermedades en la población de interés.

Con todo esto, podemos afirmar que el proyecto aborda los objetivos de interés.

### **7.3 Medios disponibles para la realización del proyecto**

Los centros de fertilidad centroamericanos que van a intervenir en el estudio, cuentan con las infraestructuras necesarias para realizar una correcta selección de donantes.

Todas las clínicas centroamericanas cuentan con:

Consultas independientes del espacio general destinado para los pacientes, para la explicación del proyecto y entrega de los diferentes consentimientos informados.

Estancias independientes para la extracción sanguínea equipadas con todo el material fungible e inventariable necesario: guantes de látex, gomas de compresión, jeringas, agujas, tubos de recolección y neveras donde almacenar las muestras hasta su envío.

Papelería: ordenadores e impresoras para imprimir los diferentes documentos necesarios para la realización del estudio (Anexos 1, 2 y 3), así como las hojas de historia clínica.

La UR Managua, además cuenta con:

Ordenadores con acceso a internet, altavoces y videocámara. Todos cuentan con el software necesario para el análisis estadístico de los datos (SPSS).

Equipo necesario para la extracción de ADN: guantes de nitrilo sin polvo, micropipetas automáticas, puntas de pipetas con filtro y estériles, tubos eppendorf de 1.5 ml, 2 Kit de extracción de ADN cell sv mini (GeneAll) para 200 muestras, termobloque, vórtex, microcentrífuga y nevera para almacenamiento de las muestras hasta su envío.

Equipo de medición de ADN: tubos mini-ependorf, fluorómetro Qubit (Thermo Fisher), reactivos Qubit.

La UG Vistahermosa cuenta con:

Equipo necesario para cribado de portadores: guantes de nitrilo sin polvo, micropipetas automáticas, puntas estériles para micropipetas, tubos mini-ependorf, dos termocicladores para PCR (abi2720 y simpliamp), dos secuenciadores (ngs miniseq y sanger Abi3100avant), ordenadores con acceso a internet y software de bioinformática para la recogida de los resultados.



## 8. PRESUPUESTO

Cada centro de fertilidad será el encargado de costear los gastos asociados a:

- El procedimiento de selección de donantes que incluye gastos en: papelería, material fungible utilizado para la extracción sanguínea, portes del envío de muestras y el costo de la prueba de cribado de portadores realizada.
- La formación continuada del personal y la asistencia a congresos nacionales e internacionales.
- El pago establecido por convenio de las horas extra que tengan que invertir los investigadores para la realización del proyecto.

Los gastos derivados del estudio por parte de UR Managua y UR Ciudad de México, entran dentro del presupuesto aprobado para la campaña de selección de donantes de UR de 2020, incluyendo: material fungible empleado tanto en las extracciones sanguíneas como en las extracciones de ADN, los portes del envío de muestras y los costos de las pruebas de cribado genético de portadores. La coordinación entre centros será gestionada vía Skype, lo cual no conllevará gastos añadidos.

La UR Vistahermosa se encargará de la compra de dos kits de extracción de ADN. Cada kit está optimizado para procesar 200 muestras.

La publicación del manuscrito en revistas científicas de alto prestigio no llevará cargo adicional.

<i>Actividad</i>	<i>Presupuesto en euros</i>
<i>Kit extracción ADN x400 muestras</i>	<b>1080</b>
<i>Envío de muestras</i>	<b>1200</b>
<i>Asistencia a congresos nacionales e internacionales</i>	<b>3000</b>
<i>Transporte y alojamiento destinado a la asistencia a congresos</i>	<b>3000</b>
<i>Papelería: papel para consentimientos informados y tinta para impresora.</i>	<b>200</b>
<b>TOTAL</b>	<b>8480</b>

## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. The New York-Mid-Atlantic Consortium for Genetic and Newborn Screening Services. Pedigree and family history-taking. In: Genetic Alliance, editor. *Understanding Genetics*. Washintong DC: Genetic Alliance; 2009.
2. Alliance G, Screening, Services TNY-M-AC for G and N. Inheritance Patterns. In: Genetic Alliance, editor. *Understanding Genetics: A New York, Mid-Atlantic Guide for Patients and Health Professionals*. Washintong DC: Genetic Alliance; 2009.
3. Bell CJ, Dinwiddie DL, Miller NA, Hateley SL, Ganusova EE, Mudge J, et al. Carrier Testing for Severe Childhood Recessive Diseases by Next-Generation Sequencing. *Sci Transl Med*. 2011 Jan 12;3(65):65ra4.
4. Neal SA, Werner MD. The impact of contemporary preimplantation genetic screening and diagnosis on the detection of aneuploidy and inherited genetic diseases. *Birth Defects Res*. 2018 May 1;110(8):644–7.
5. Van Dijk EL, Auger H, Jaszczyszyn Y, Thermes C. Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends Genet*. 2014 Sep;30(9):418–26.
6. Bozkurt B, Erdem M, Mutlu MF, Erdem A, Guler I, Mutlu I, et al. Comparison of age-related changes in anti-Müllerian hormone levels and other ovarian reserve tests between healthy fertile and infertile population. *Hum Fertil*. 2016 Jul 2;19(3):192–8.
7. Munné S, Chen S, Colls P, Garrisi J, Zheng X, Cekleniak N, et al. Maternal age, morphology, development and chromosome abnormalities in over 6000 cleavage-stage embryos. *Reprod Biomed Online*. 2007 Jan 1;14(5):628–34.
8. Sociedad Española de Fertilidad. Informe estadístico de Técnicas de Reproducción Asistida. Madrid; 2015.
9. Cioppi F, Casamonti E, Krausz C. Age-Dependent De Novo Mutations During Spermatogenesis and Their Consequences. In: *Advances in experimental medicine and biology*. 2019. p. 29–46.
10. Kong A, Frigge ML, Masson G, Besenbacher S, Sulem P, Magnusson G, et al. Rate of de novo mutations and the importance of father's age to disease risk. *Nature*. 2012 Aug 22;488(7412):471–5.
11. Sanders SJ, Murtha MT, Gupta AR, Murdoch JD, Raubeson MJ, Willsey AJ, et al. De novo mutations revealed by whole-exome sequencing are strongly associated with autism. *Nature*. 2012 May 4;485(7397):237–41.
12. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. Fifth edit. Switzerland; 2010.
13. Jamalán M, Ghaffari MA, Hoseinzadeh P, Hashemitabar M, Zeinali M. Human Sperm Quality and Metal Toxicants: Protective Effects of some Flavonoids on Male Reproductive Function. *Int J Fertil Steril*. 2016;10(2):215–23.

14. Adewoyin M, Ibrahim M, Roszaman R, Isa M, Alewi N, Rafa A, et al. Male Infertility: The Effect of Natural Antioxidants and Phytocompounds on Seminal Oxidative Stress. *Diseases*. 2017 Mar 1;5(1):9.
15. Aitken RJ. Reactive oxygen species as mediators of sperm capacitation and pathological damage. *Mol Reprod Dev*. 2017 Oct;84(10):1039–52.
16. Antal Z, Sklar CA. Gonadal Function and Fertility Among Survivors of Childhood Cancer. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2015 Dec;44(4):739–49.
17. Tang M, Webber K. Fertility and pregnancy in cancer survivors. *Obstet Med*. 2018 Sep 29;11(3):110–5.
18. Ballesteros A, Castilla A, Nadal J, Ruiz M. Sociedad Española de Fertilidad. Manifiesto de la SEF sobre la donación de gametos en España. 2015.
19. Zegers-Hochschild F, Schwarze JE, Crosby J, Musri C, Urbina MT. Assisted reproductive techniques in Latin America: the Latin American Registry, 2015. *Rbmo J*. 2018;37(6):685–92.
20. Lazarin GA, Haque IS, Nazareth S, Iori K, Patterson AS, Jacobson JL, et al. An empirical estimate of carrier frequencies for 400+ causal Mendelian variants: results from an ethnically diverse clinical sample of 23,453 individuals. *Genet Med*. 2013 Mar 13;15(3):178–86.
21. Amor DJ, Kerr A, Somanathan N, McEwen A, Tome M, Hodgson J, et al. Attitudes of sperm, egg and embryo donors and recipients towards genetic information and screening of donors. *Reprod Health*. 2018 Dec 9;15(1):26.
22. Soini S, Ibarreta D, Anastasiadou V, Aymé S, Braga S, Cornel M, et al. The interface between assisted reproductive technologies and genetics: technical, social, ethical and legal issues. *Eur J Hum Genet*. 2006 May 25;14(5):588–645.
23. Kauffman TL, Wilfond BS, Jarvik GP, Leo MC, Lynch FL, Reiss JA, et al. Design of a randomized controlled trial for genomic carrier screening in healthy patients seeking preconception genetic testing. *Contemp Clin Trials*. 2017 Feb;53:100–5.
24. Stevens B, Krstic N, Jones M, Murphy L, Hoskovec J. Finding Middle Ground in Constructing a Clinically Useful Expanded Carrier Screening Panel. *Obstet Gynecol*. 2017 Aug;130(2):279–84.
25. Delgado-Plasencia L, Medina-Arana V, Barrios del Pino Y, Fernández-Peralta A, González-Aguilera JJ. Genealogical Tree Study as Screening Method in the Lynch Syndrome Prior to Genetic Test. *Am J Clin Oncol*. 2010 Aug;33(4):376–80.
26. Martín S, Martín S, Morcillo T. Programa de donación de óvulos. In: *Guía de práctica clínica*. Sevilla; 2012. p. 1–22.
27. Real Decreto 412/1996, de 1 de marzo, por el que se establecen los protocolos obligatorios de estudio de los donantes y usuarios relacionados con las técnicas de reproducción humana asistida y se regula la creación y organización del Registro Nacional de donantes de gametos y preembriones con fines de reproducción humana. BOE num.72 España;

- 1996 p. 11253–6.
28. Harper JC, Aittomäki K, Borry P, Cornel MC, de Wert G, Dondorp W, et al. Recent developments in genetics and medically assisted reproduction: from research to clinical applications. *Eur J Hum Genet.* 2018;26(1):12–33.
  29. Urbano A, Montoya E, Ochando I RJ. Ventajas del cribado de portadores en donantes de gametos con un panel de 15 genes mediante tecnología Next-Generation Sequencing. *Genética médica y genómica.* 2018;2:21–9.
  30. Céspedes-Garro C, Naranjo M-EG, Rodrigues-Soares F, LLerena A, Duconge J, Montané-Jaime LK, et al. Pharmacogenetic research activity in Central America and the Caribbean: a systematic review. *Pharmacogenomics.* 2016 Oct;17(15):1707–24.
  31. Holtkamp KCA, Vos EM, Rigter T, Lakeman P, Henneman L, Cornel MC. Stakeholder perspectives on the implementation of genetic carrier screening in a changing landscape. *BMC Health Serv Res.* 2017 Dec 16;17(1):146.
  32. Martos García C. Segundo Congreso Centroamericano de Expertos en Infertilidad. In: *Sistemas de cultivo embrionario.* Ciudad de Guatemala; 2019.
  33. Ley 14/2006, de 26 de mayo, sobre técnicas de reproducción humana asistida. BOE num. 126 España; 2006 p. 19947–56.
  34. IndexMundi [Internet]. Distribución por edad. 2019 [cited 2019 Jul 22]. Available from: <https://www.indexmundi.com/es/>
  35. Behjati S, Tarpey PS. What is next generation sequencing? *Arch Dis Child - Educ Pract Ed.* 2013 Dec;98(6):236–8.

**ANEXO 1**

**CONSENTIMIENTO INFORMADO ESTUDIO GENÉTICO**

Sra. (APELLIDOS, Nombre): .....

Edad: ..... Fecha de nacimiento: .....

Número (marcar la opción elegida):  Cédula de Identidad: .....

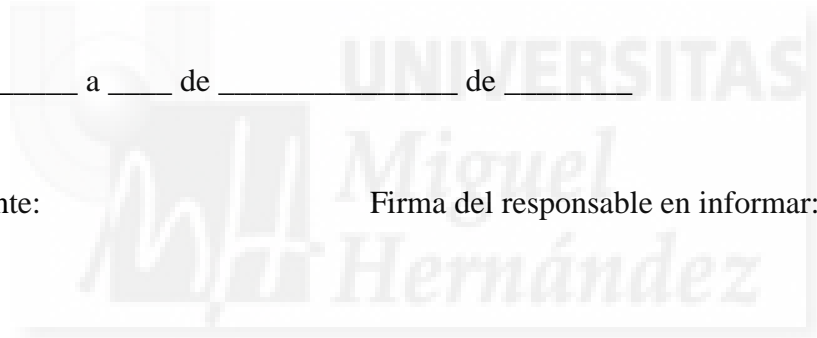
Acepta participar en el estudio: **Prevalencia de portadores de enfermedades recesivas en población centroamericana frente a la población europea. Un estudio comparativo.**

Bajo las condiciones anteriormente explicadas en el documento informativo para el estudio genético.

En \_\_\_\_\_ a \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

Firma del paciente:

Firma del responsable en informar:





## ANEXO 2

### DOCUMENTO INFORMATIVO ESTUDIO GENÉTICO

#### **Prevalencia de portadores de enfermedades recesivas en donantes de gametos centroamericanos frente a donantes de gametos europeos. Un estudio comparativo.**

Le rogamos que lea esta información antes de firmar la hoja de consentimiento informado para participar en el estudio.

Este estudio evalúa la prevalencia de enfermedades recesivas (aquellas que el paciente no padece, pero puede transmitir a la descendencia) en donantes de gametos centroamericanos comparadas con las enfermedades recesivas en donantes europeos.

El objetivo de este estudio es aumentar el conocimiento acerca de estas enfermedades a nivel centroamericano ya que no existen datos preliminares. Con ello se prevé unificar criterios de selección en las donantes de gametos.

En total se incluirán 369 donantes de gametos seleccionados. La participación o no participación al estudio no tendrá repercusión en la calidad del tratamiento médico y la atención que recibirá.

El estudio consiste en realizarle una extracción de sangre, para posteriormente analizar su ADN.

Los datos demográficos y clínicos necesarios para realizar una descripción completa de los participantes en el estudio (edad, país y tratamiento realizado...), se obtendrán de la historia clínica de la donante. El anonimato de las donantes se garantiza en todo momento. Si usted lo solicita, se le proporcionará el resultado de su prueba.

Este estudio ha sido aprobado por Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) del Hospital General Universitario de Alicante para la realización de este proyecto, también se pedirá la aprobación del Comité de Ética de la facultad de Ciencias Médicas de Managua, así como del Comité de Bioética Nacional de Guatemala y Comité de Bioética Nacional de Salvador. Los participantes tienen derecho en cualquier momento a anular su consentimiento para este estudio. Los datos personales de los participantes serán protegidos e incluidos en un fichero sometido a las garantías que fija la Ley Orgánica 15/1999 de Protección de Datos de 13 de diciembre y su reglamento de seguridad RD 1720/2007 de 21 de diciembre. Conforme a lo establecido por la ley española, los participantes tendrán derecho al acceso, rectificación, cancelación y oposición de sus datos, enviando una solicitud por escrito acompañada de copia de su Identificación o Pasaporte a Unidad de Genética Vistahermosa, Avenida de Denia 103 Alicante, España o por mail a la dirección laboratorio@urmanagua.com. Sólo el equipo investigador, el monitor y, si fuera necesario, los representantes del Comité de Ética y de las Autoridades tendrán acceso a los datos. Los documentos generados por el estudio son confidenciales.

Firma del paciente:

Firma del responsable de información:

### ANEXO 3

#### Consentimiento Informado para la realización de pruebas genéticas

**Sr/Sra/Tutor legal**.....con cédula de  
identidad:.....

Declaro conocer que se me va a extraer/se va a extraer a mi representado una muestra de sangre para realizar un estudio genético.

**1.-** El objetivo de dicho estudio es analizar los cromosomas y/o genes que pueden estar implicados  
en:.....  
.....

**2.-** Los beneficios y los riesgos que existen en dicho procedimiento. Se me ha respondido a todas las preguntas y resuelto todas las dudas que me han surgido. Así mismo conozco y me han informado de los riesgos del procedimiento de extracción de la muestra

**3.-** Se utilizarán para el estudio las técnicas de citogenética y de biología molecular necesarias para el diagnóstico de esta patología, en los laboratorios de la Unidad de Genética o en otros designados por el responsable de la misma.

**4.-** La Unidad de Genética guardará confidencialidad acerca del resultado del estudio.

**5.-** Es posible que de dicho estudio no se derive ningún resultado concluyente acerca de la patología, debido al conocimiento incompleto del gen.

**6.-** En el caso de identificarse la mutación o cambio responsable de la patología de mi familia, deseo ser informado: **SÍ / NO** (encierre en un círculo la opción deseada)

**7.-** En el caso de que del estudio se derivasen resultados de interés para otros miembros de mi familia, éstos podrán solicitar voluntariamente la realización del estudio.

**8.-** Los resultados obtenidos podrán ser utilizados para una posible publicación científica, guardando estricta confidencialidad sobre la identidad del paciente.

**9.-** Mi ADN sin identificación se podrá utilizar como control en otros estudios genéticos: **SÍ / NO** (encierre en un círculo la opción deseada)

**10.-** Mi ADN sin identificación se podrá utilizar para otros estudios de investigación. **SI / NO** (encierre en un círculo la opción deseada)

**11.-** Conozco mi derecho a retirar mi consentimiento en cualquier momento y sin dar explicación alguna.

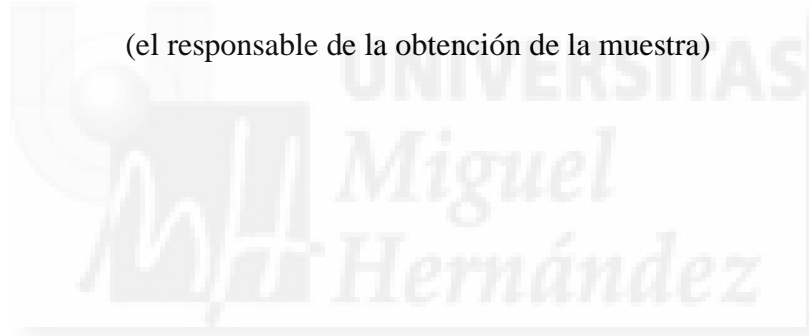
He sido informado adecuadamente de los once puntos anteriores y de los temas que de ellos se derivan por el Dr. ....

Fecha: .....Firma:.....

Constato que he informado al sujeto de los puntos anteriores

Fecha:.....Firma:.....

(el responsable de la obtención de la muestra)



## ANEXO 4

### *Protocolo de extracción de ADN*

Esta se llevará a cabo mediante el kit comercial *cell sv mini* de Gene All siguiendo las indicaciones del fabricante:

El kit consta de proteasa K, tampón de lisis BL, tampón de lavado BW, tampón TW y tampón de elución AE.

El protocolo es el siguiente:

Precalentar el termobloque o estufa a 56°C, atemperar los reactivos y descongelar la proteasa K.

Pipetear 20 microlitros de proteasa K al tubo eppendorf de 1.5 ml, añadir 200 microlitros de muestra y 200 microlitros de BL. Pasar la mezcla por vórtex e incubar de 10 a 15 minutos a 56 °C pasando la muestra por vórtex cada 5 minutos de la incubación.

Añadir 200 microlitros de etanol absoluto y pasar por vórtex y *spin* de centrifuga.

Transferir la mezcla a la columna y centrifugar 1 minuto a 6000 g.

Reemplazar la columna en un nuevo eppendorf y tirar lo sobrante.

Añadir 600 microlitros de BW y centrifugar 1 minuto a 6000 g. Reemplazar la columna.

Añadir 700 microlitros de TW centrifugar 1 minuto a 6000 g y reemplazar la columna.

Centrifugar la columna con el tubo sin líquido 1 minuto a 6000 g, poner la membrana en un tubo nuevo y añadir de 100 a 200 microlitros de AE, incubar 1 minuto a temperatura ambiente y centrifugar 5 minutos a máxima velocidad.

La calidad y cantidad del ADN extraído se medirá mediante el fluorómetro Qubit 2.0 de Thermo Scientific.