

00544



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

HAPLOTIPOS DEL GEN FACTOR VON WILLEBRAND
EN POBLACION MEXICANA SELECCIONADA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL DIPLOMA
DE LA ESPECIALIZACION EN
BIOQUIMICA CLINICA
P R E S E N T A:
Q. B. RIGOBERTO SANTIAGO CONTRERAS



MEXICO, D. F.

2005

m. 347207



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE QUÍMICA
DIRECCIÓN**

REF: FQUI/CP/48/2005

BIOL. FRANCISCO J. INCERA UGALDE.

Jefe de la Unidad de Administración del Posgrado.
Presente.

Me es grato informarle que el alumno **RIGOBERTO SANTIAGO CONTRERAS** presentará próximamente su examen para obtener el diploma de Especialización en Bioquímica Clínica (Clave 341) ante el siguiente jurado:

Presidente: Dra. María Dolores Lastra Azpilicueta (FQ)
Vocal: Dr. Armando Isibasi Araujo (CMNSXXI)
Secretario: Dr. Rodolfo Pastelín Palacios (FQ)
Primer Suplente: Dr. Fabio A. Salamanca Gómez (CMNSXXI)
Segundo Suplente: Dr. Diego J. Arenas Aranda (CMNSXXI, IMSS)

Sin otro particular de momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, D. F., 11 de marzo de 2005.

El Director

M. en C. Santiago Capella Vizcaíno

C.c.p. Integrantes del Jurado
C.c.p. Coordinador de Área
C.c.p. Departamento de Control Escolar
C.c.p. Interesado
*ggm.

CONTENIDO

	Página
1.- RESUMEN	2
2.- ANTECEDENTES	3
3.- JUSTIFICACION DEL TRABAJO DE INVESTIGACION	7
4.- OBJETIVO PRINCIPAL	8
5.- OBJETIVOS PARTICULARES	8
6.- HIPOTESIS	9
7.- GENERALIDADES	9
8.- MATERIALES Y METODOS	13
9.- RESULTADOS Y DISCUSIONES	14
10.- CONCLUSIONES	30
11.-BIBLIOGRAFIA	31

RESUMEN.

ANTECEDENTES. La enfermedad de Von Willebrand (VWD) es el padecimiento de sangrado hereditario más común del ser humano a nivel mundial. Es de intensidad variable debido a alteraciones en el gen VWF, localizado en el cromosoma 12p13.3. Consecuente al tipo, grado y sitio de la alteración del gen, se encuentra la estructura final y función de la proteína del Factor Von Willebrand (VWF), cuyo papel principal en el sistema de coagulación es enlazar las plaquetas al endotelio vascular además de transportar y proteger de degradación al Factor VIII de la coagulación. En México no se han realizado estudios de segregación de haplotipos en familias portadoras de alguna alteración en el gen VWF. **OBJETIVO.** Identificar los haplotipos del gen VWF en familias con VWD para conocer mediante pedigríes, la segregación de genes afectados, y comparar la frecuencia de alelos encontrados con los informados en otras poblaciones. **MATERIAL Y METODO.** Se estudiaron nueve familias nucleares (padres e hijos) mexicanas con al menos un caso de VWD, previo consentimiento informado. Se extrajo DNA de sangre periférica y se amplificaron por PCR cinco sitios polimórficos del gen VWF con iniciadores previamente informados. A continuación se cortaron con enzimas de restricción en los sitios polimórficos: Rsa I exón 13, Rsa I exón 18, Msp I intrón 19, Kpn I exón 28 y Aci I exón 42. Se formaron los haplotipos de acuerdo a la presencia o ausencia del sitio de corte. **RESULTADOS.** El estudio de la segregación de los haplotipos fue informativo para 5 familias y la comparación de las frecuencias obtenidas con respecto a otros estudios informados, muestra una aparente similitud genética con poblaciones de Malasia e India Oriental para Rsa I (exon 18) y con chinos para Msp I (intron 19). **CONCLUSIONES.** Los resultados obtenidos en la detección de haplotipos fueron informativos en el 56 % de los casos estudiados y son de utilidad en el asesoramiento genético de dichas familias. Con respecto a la frecuencia de los alelos para los dos polimorfismos mencionados, de acuerdo con lo informado en otras poblaciones, se deduce que la frecuencia de nuestros alelos no son completamente similares a los de una sola población, si no que indican una mezcla con la de varias poblaciones; lo cual nos permite conocer mejor nuestra población desde el punto de vista molecular.

ANTECEDENTES.

La enfermedad de Von Willebrand (vWD) es el trastorno hemorrágico hereditario más frecuente de la especie humana. Se ha estimado que el 1 % de la población general lo presenta, aunque solamente el 0.01% es sintomático. Fue descrita por primera vez por el Dr. Eric von Willebrand en 1924 en una familia que vivía en las Islas Aland. Aunque su descubridor no identificó la causa definitiva de la enfermedad, la distinguió de la hemofilia ya que a diferencia de ésta, la vWD se presenta tanto en hombres como en mujeres, de tal manera que tiene un patrón de herencia autosómico, por lo que la llamó Pseudohemofilia ^{1,20}.

A diferencia de la hemofilia, la vWD se caracteriza por presentar tiempos prolongados de sangrado, trastornos de la hemostasia primaria en mucosas (tracto gastrointestinal y genitourinario principalmente), y sangrados posquirúrgicos en ambos sexos.

La causa principal de esta enfermedad está dada por una deficiencia cualitativa o cuantitativa del Factor Von Willebrand (vWF), una proteína que tiene la función de transportar y estabilizar al factor VIII de la cascada de la coagulación en los sitios de acción, luego las carencias o alteraciones funcionales del vWF pueden producir un cuadro similar a la hemofilia, es decir una clínica sobreañadida de trastornos de la coagulación. Sin embargo es considerada una trombopatía merced a que en el enfermo las plaquetas no se adhieren a la colágena del subendotelio a pesar de ser intrínsecamente normal, pues la adhesividad de las plaquetas a esta parte de los vasos sanguíneos es otra función que depende del vWF.

BIOSINTESIS, FUNCION Y CATABOLISMO DEL vWF.

El Factor von Willebrand es una glicoproteína multimérica de alto peso molecular y es el producto final de la expresión del gen vWF. Dicho gen ubicado en la región 12p13.3 con una longitud aproximada de 178 Kb, comprende 51 intrones y 52 exones con un número de secuencias repetidas que incluyen 14 repetidos Alu y una zona polimórfica de repetidos simples TCTA en el intron 40, y codifica para un mRNA que se traduce en un precursor de la subunidad madura de la proteína ^{11,19}.

El Factor von Willebrand es producido en los cuerpos de Weibel-Palade de las células endoteliales, en los gránulos α -plaquetarios de los megacariocitos y en el subendotelio del tejido conectivo. Posterior a la traducción del mRNA se produce un precursor proteico, pre-pro-vWF, que contiene 4 tipos de dominios repetitivos (de A a D) como se muestra en la figura 1. La unidad monomérica de la proteína consta de 2050 residuos de aminoácidos y se forma al liberarse un segmento de propéptido de 763 aminoácidos ^{1,32}.

Cada subunidad posee sitios muy importantes relacionados con su estructura y función: puentes disulfuro involucrados en la dimerización y multimerización localizados en la

parte C-terminal y en el dominio D3 respectivamente²³, y una serie de sitios de enlace para F VIII, colágena, heparina y glicoproteínas plaquetarias GPIb y GPIIb/IIIa. La multimerización de estas subunidades es esencial para su función de adhesión y agregación plaquetaria²¹.

Los monómeros son subsecuentemente N-glicosilados y ensamblados en dímeros en el retículo endoplásmico y posteriormente en multímeros en el aparato de golgi. Con respecto a la glicosilación, vWF es una de las pocas proteínas que transportan antígenos de grupos sanguíneos (sistema ABO)³¹.

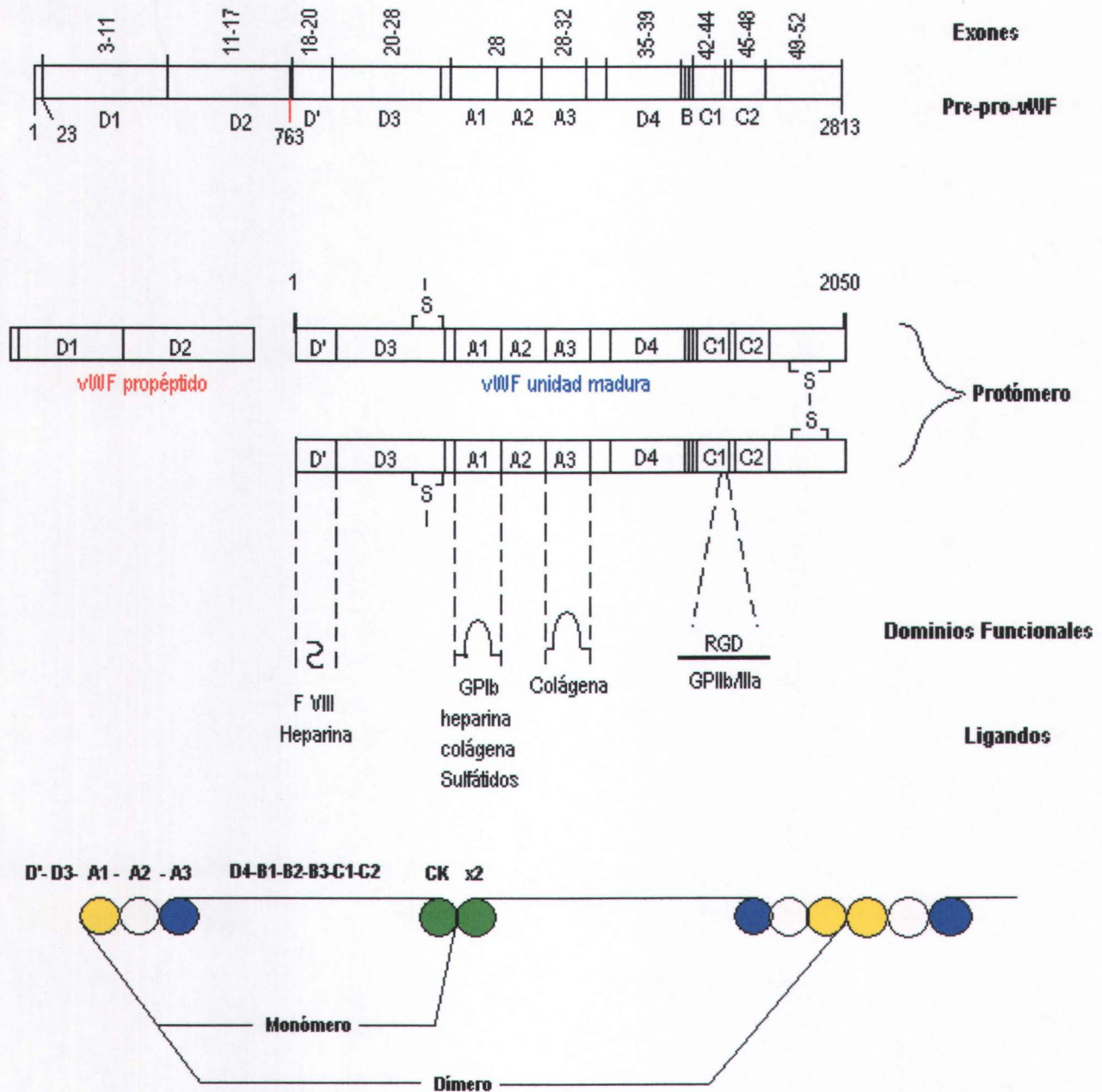


Fig. 1 .- ESTRUCTURA Y DOMINIOS DEL VWF.

Entre las funciones más importantes del vWF se encuentran: *adhesión plaquetaria a la superficie endotelial*²⁵ en la que enlaza dos plaquetas uniendo sus receptores GPIb y GPIIb/IIIa y ligaduras específicas expuestas en sitios endoteliales de venas dañadas (diferentes tipos de colágena). Esto activa a las plaquetas lo cual les permite exponer el complejo GPIIb/IIIa, un receptor integral que puede enlazar fibrinógeno y otros ligandos incluyendo vWF, potenciando así el crecimiento del trombo. *Transporte y estabilización del FVIII*²⁶, con el que interactúa de manera no covalente protegiéndolo de degradación proteolítica por la proteína C activada. Por esta razón al vWF también se le conoce como Antígeno relacionado con el FVIII³¹.

Finalmente el catabolismo de esta proteína está mediado por una metaloproteínasa que la corta entre Y842 y M843 produciendo segmentos residuales que posteriormente van a ser degradados por otras peptidasas³¹.

CLASIFICACION DE LA ENFERMEDAD DE vON WILLEBRAND.

Luego de establecerse que la enfermedad de von Willebrand es una entidad distinta a la hemofilia, se hicieron varios intentos para localizar el gen vWF y encontrar las evidencias moleculares que explicaran estos desórdenes. Así en 1985, Lynch y col.³⁵, y Sadler y col.²⁸, clonaron el gen vWF. En el mismo año Verweij y col.³⁶, clonaron el gen vWF y lo asignaron al cromosoma 12 utilizando sondas de cDNA. En 1987 Shelton-Inloes y col.³⁷, confirmaron la localización del gen en el cromosoma 12 e identificaron una secuencia homóloga en el cromosoma 22 (pseudogen)^{2,11}.

De esta forma se identificaron diferentes grados de manifestaciones de la misma enfermedad con diagnósticos moleculares asociados a mutaciones con macro y microdelecciones, inserciones, mutaciones sin sentido y mutaciones con cambio en el marco de lectura principalmente, a lo largo de todo el gen.

Con este nuevo panorama se presentó la necesidad de clasificar este padecimiento con fines terapéuticos, mismo que se complicó al basarse en diferentes aspectos clínicos como cuadro sintomatológico, resultados fenotípicos de laboratorio, etc. Por esta razón la Sociedad Internacional de Trombosis y Hemostasis (ISTH) propuso un sistema de clasificación simplificado para la vWD (Sadler 1994)³⁸ basado en 3 fenotipos principales y reducido a un total de 6 categorías, de entre 30 reconocidas previamente:

vWD tipo I (presente en el 60 – 80 % de los casos), se caracteriza por una baja a moderada deficiencia cuantitativa del vWF y el FVIII, que están coordinadamente reducidos a 5 – 30 % de los niveles plasmáticos normales. Este subtipo generalmente es transmitido como un rasgo autosómico dominante¹.

vWD tipo II (de 10 – 30 % de los casos), se debe principalmente a anomalías cualitativas del vWF y está dividido en los subtipos 2A, 2B, 2M y 2N. Esta deficiencia cualitativa de multímeros generalmente de tamaño mediano y alto peso molecular, en algunos casos se debe a un defecto en el transporte intracelular o a una proteólisis

extracelular incrementada como en el caso del subtipo 2A^{22,30}. La herencia es autosómica dominante, sin embargo ocasionalmente se transmite de manera autosómica recesiva, como en el caso de la 2N²⁴.

vWD tipo III (de 1 – 5 % de los casos) se transmite como un rasgo autosómico recesivo en homocigotos o heterocigotos compuestos y se caracteriza por niveles muy bajos o indetectables del vWF (menos del 1 % de los niveles plasmáticos normales), con niveles mínimos pero detectables de FVIII¹.

También se han descrito otros tipos de patologías a las que se les han llamado Pseudo vWD. Por ejemplo el de tipo plaquetario, que se debe a un desorden intrínseco de las plaquetas por mutación del GPIb. De igual manera la forma adquirida del vWD, que se debe generalmente a la formación de anticuerpos^{1,27}.

La búsqueda de mutaciones en el gen vWF es complicada debido a que éste es muy grande (180 Kb). Por esta razón la detección indirecta mediante el uso de marcadores genéticos puede ser una mejor opción, al menos para la detección de portadores.

MARCADORES GENETICOS

Los marcadores genéticos son factores hereditarios polimórficos que se encuentran con una frecuencia mayor al 1% en la población general. La frecuencia de estos marcadores varía entre las distintas poblaciones.

La coexistencia de múltiples alelos en un locus define un polimorfismo genético. El resultado de estos polimorfismos se traduce en variabilidad fenotípica de la población y su capacidad de sobrevivencia en el curso de la evolución.

En estudios de genética de población, el uso de los marcadores genéticos ha adquirido gran relevancia por su practicabilidad como método de estudio en la detección de dichos polimorfismos. Uno de los más utilizados en genética son los RFLPs (Polimorfismos en Longitud de los Fragmentos de Restricción).^{2,3,4,5}

RFLPS

Los RFLPs se basan en la aplicación de enzimas de restricción que cortan el DNA en sitios diana de reconocimiento. Así, el tamaño de los fragmentos producidos dependen de la separación de los sitios diana y éstos están directamente relacionados con el polimorfismo de ese segmento de DNA^{8,12}. Aun cuando los polimorfismos que esta técnica puede detectar son de naturaleza bialélica (si “corta” o no la enzima), este inconveniente se supera utilizando una combinación adecuada de enzimas de restricción que detecten un mayor número de polimorfismos.

La ventaja de emplear los RFLPs como marcadores genéticos es que éstos son más frecuentes que la variación normal de un par de bases en el DNA (con una frecuencia de 0.0037 en el genoma humano). Además, dado que investigan tanto exones como

intrones así como zonas repetitivas, lógicamente no dependen de la funcionalidad de los genes¹².

Las mejores aplicaciones de este método han sido en el mapeo de genes, en el estudio de la distribución de poblaciones humanas, y en el diagnóstico y prevención de padecimientos genéticos (detección de portadores de enfermedades hereditarias)⁶. Esta última aplicación se basa en la formación de haplotipos.

HAPLOTIPOS

La frecuencia de polimorfismos supone que cada individuo tiene una combinación única de sitios de restricción a lo largo del genoma. La combinación concreta de una serie de sitios de restricción en una región específica del genoma forma un haplotipo, es decir un genotipo en miniatura. Dichos haplotipos han servido también para definir la evolución molecular de algunas familias de genes.⁸

Posterior a la clonación molecular del cDNA del vWF en 1985 (Ginsburg *et al*, Sadler *et al* y Lynch *et al*)^{28,35} se identificaron muchos RFLP's mediante la técnica de Southern blotting. Dichos sitios polimórficos han sido reportados en la base de datos de polimorfismos del vWF creado por Sadler y Ginsburg en 1993⁷ ([www.http://mmg2.im.med.umich.edu](http://mmg2.im.med.umich.edu)). El empleo de éste método se dio hasta el advenimiento de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), una técnica que ha adquirido gran relevancia para estos propósitos en los últimos años y que ha permitido simplificar muchos pasos con respecto al método anterior⁹.

En la actualidad, en nuestro país se han diagnosticado los casos de esta enfermedad mediante datos clínicos y algunos estudios de laboratorio, entre los que se cuentan los tiempos de Protrombina y Tromboplastina, la cuenta total de plaquetas, la determinación de la agregación plaquetaria por Ristocetina, y el análisis de multímeros, entre otros²⁸. Dado que esta es una enfermedad de carácter hereditario, es posible determinar su transmisibilidad mediante el uso de marcadores genéticos, práctica que ya se ha desarrollado en otros países como Italia, Canadá y China con gran éxito^{5,29}.

JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN.

Con los grandes avances que actualmente ha experimentado la ciencia, estamos obligados a manejar las ciencias de la salud a un nivel molecular en el cual el tratamiento tradicional de las enfermedades no sea el objetivo principal de la medicina, si no que seamos capaces de prevenirlas. Con los progresos de la genética en combinación con las innovadoras herramientas de la biología molecular, actualmente, es posible detectar a portadores de enfermedades hereditarias y predecir con mayor confiabilidad la transmisión de las mismas.

intrones así como zonas repetitivas, lógicamente no dependen de la funcionalidad de los genes¹².

Las mejores aplicaciones de este método han sido en el mapeo de genes, en el estudio de la distribución de poblaciones humanas, y en el diagnóstico y prevención de padecimientos genéticos (detección de portadores de enfermedades hereditarias)⁶. Esta última aplicación se basa en la formación de haplotipos.

HAPLOTIPOS

La frecuencia de polimorfismos supone que cada individuo tiene una combinación única de sitios de restricción a lo largo del genoma. La combinación concreta de una serie de sitios de restricción en una región específica del genoma forma un haplotipo, es decir un genotipo en miniatura. Dichos haplotipos han servido también para definir la evolución molecular de algunas familias de genes.⁸

Posterior a la clonación molecular del cDNA del vWF en 1985 (Ginsburg *et al*, Sadler *et al* y Lynch *et al*)^{28,35} se identificaron muchos RFLP's mediante la técnica de Southern blotting. Dichos sitios polimórficos han sido reportados en la base de datos de polimorfismos del vWF creado por Sadler y Ginsburg en 1993⁷ ([www.http://mmg2.im.med.umich.edu](http://mmg2.im.med.umich.edu)). El empleo de éste método se dio hasta el advenimiento de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), una técnica que ha adquirido gran relevancia para estos propósitos en los últimos años y que ha permitido simplificar muchos pasos con respecto al método anterior⁹.

En la actualidad, en nuestro país se han diagnosticado los casos de esta enfermedad mediante datos clínicos y algunos estudios de laboratorio, entre los que se cuentan los tiempos de Protrombina y Tromboplastina, la cuenta total de plaquetas, la determinación de la agregación plaquetaria por Ristocetina, y el análisis de multímeros, entre otros²⁸. Dado que esta es una enfermedad de carácter hereditario, es posible determinar su transmisibilidad mediante el uso de marcadores genéticos, práctica que ya se ha desarrollado en otros países como Italia, Canadá y China con gran éxito^{5,29}.

JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN.

Con los grandes avances que actualmente ha experimentado la ciencia, estamos obligados a manejar las ciencias de la salud a un nivel molecular en el cual el tratamiento tradicional de las enfermedades no sea el objetivo principal de la medicina, si no que seamos capaces de prevenirlas. Con los progresos de la genética en combinación con las innovadoras herramientas de la biología molecular, actualmente, es posible detectar a portadores de enfermedades hereditarias y predecir con mayor confiabilidad la transmisión de las mismas.

Para realizar este tipo de estudio es necesario detectar la anomalía genética tanto en los progenitores como en los descendientes, lo cual, puede hacerse de manera directa analizando la alteración molecular del gen. Sin embargo para ciertas enfermedades, como la enfermedad de Von Willebrand, esto resulta demasiado caro y tardado debido a que el gen de interés es muy largo.

El empleo de los RFLPs como marcador genético, puede ser de gran utilidad en el diagnóstico de portadores de esta enfermedad debido a que simplifica los métodos de diagnóstico y es más rápido, con lo cual se pueden establecer esquemas de orientación genética para la prevención de la transmisión de la misma.

Por otra parte dado que en nuestro país este es el primer trabajo de investigación que se realiza a nivel molecular en el gen vWF, es de importancia conocer la frecuencia de los diferentes alelos que se encuentran en dicho gen en familias portadoras de la enfermedad para posteriores trabajos de genética de poblaciones. Los resultados servirán para dar un mejor asesoramiento genético a las familias que lo requieran.

OBJETIVO GENERAL DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN.

Determinar si existe ligamiento en la segregación de alelos vWF defectuosos, presentes en individuos enfermos, utilizando marcadores genéticos en familias con la enfermedad de Von Willebrand.

OBJETIVOS PARTICULARES.

- Selección de la población de estudio. Familias mexicanas que presenten la enfermedad de Von Willebrand.
- Detección de RFLP's en el gen vWF de cada individuo de la población de estudio y formar haplotipos con los resultados de los cortes enzimáticos.
- Demostrar, si es el caso, el ligamiento de la enfermedad con el marcador genético en las familias estudiadas mediante pedigrees familiares.

DISEÑO DEL PROYECTO.

Este es un trabajo de investigación de tipo experimental transversal comparativo.

Para realizar este tipo de estudio es necesario detectar la anomalía genética tanto en los progenitores como en los descendientes, lo cual, puede hacerse de manera directa analizando la alteración molecular del gen. Sin embargo para ciertas enfermedades, como la enfermedad de Von Willebrand, esto resulta demasiado caro y tardado debido a que el gen de interés es muy largo.

El empleo de los RFLPs como marcador genético, puede ser de gran utilidad en el diagnóstico de portadores de esta enfermedad debido a que simplifica los métodos de diagnóstico y es más rápido, con lo cual se pueden establecer esquemas de orientación genética para la prevención de la transmisión de la misma.

Por otra parte dado que en nuestro país este es el primer trabajo de investigación que se realiza a nivel molecular en el gen vWF, es de importancia conocer la frecuencia de los diferentes alelos que se encuentran en dicho gen en familias portadoras de la enfermedad para posteriores trabajos de genética de poblaciones. Los resultados servirán para dar un mejor asesoramiento genético a las familias que lo requieran.

OBJETIVO GENERAL DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN.

Determinar si existe ligamiento en la segregación de alelos vWF defectuosos, presentes en individuos enfermos, utilizando marcadores genéticos en familias con la enfermedad de Von Willebrand.

OBJETIVOS PARTICULARES.

- Selección de la población de estudio. Familias mexicanas que presenten la enfermedad de Von Willebrand.
- Detección de RFLP's en el gen vWF de cada individuo de la población de estudio y formar haplotipos con los resultados de los cortes enzimáticos.
- Demostrar, si es el caso, el ligamiento de la enfermedad con el marcador genético en las familias estudiadas mediante pedigrees familiares.

DISEÑO DEL PROYECTO.

Este es un trabajo de investigación de tipo experimental transversal comparativo.

FORMULACION DE HIPÓTESIS.

H1= Los haplotipos de nuestra población son informativos para el diagnostico de portadores de la vWD y la frecuencia de los alelos es diferente a la de otras poblaciones.

GENERALIDADES.

En 1985 Lynch et al. y Sadler et al.^{28,35}, clonaron el cDNA del vWF de células endoteliales, y en el mismo año Verweij repitió el trabajo y usando sondas de cDNA ubicó la posición del gen vWF en el cromosoma 12. Shelton- Inloes et al.³⁷ (1987), confirmaron la localización del gen en el cromosoma 12 e identificaron una secuencia homóloga en el cromosoma 22¹¹. Mancuso et al. (1991)¹³, reportaron una parcial duplicación no funcional del gen vWF ubicado en el cromosoma 22 y la llamaron pseudogen. Dicho pseudogen duplica la porción media del gen, del exon 23 al 34 y es idéntico en un 97 % a la secuencia génica auténtica, lo que indica que es de origen evolutivo reciente^{11,1,13}. El gen vWF es más distalmente mapeado en 12p13.3 (NIH/CEPH Collaborative Mapping Group, 1992).

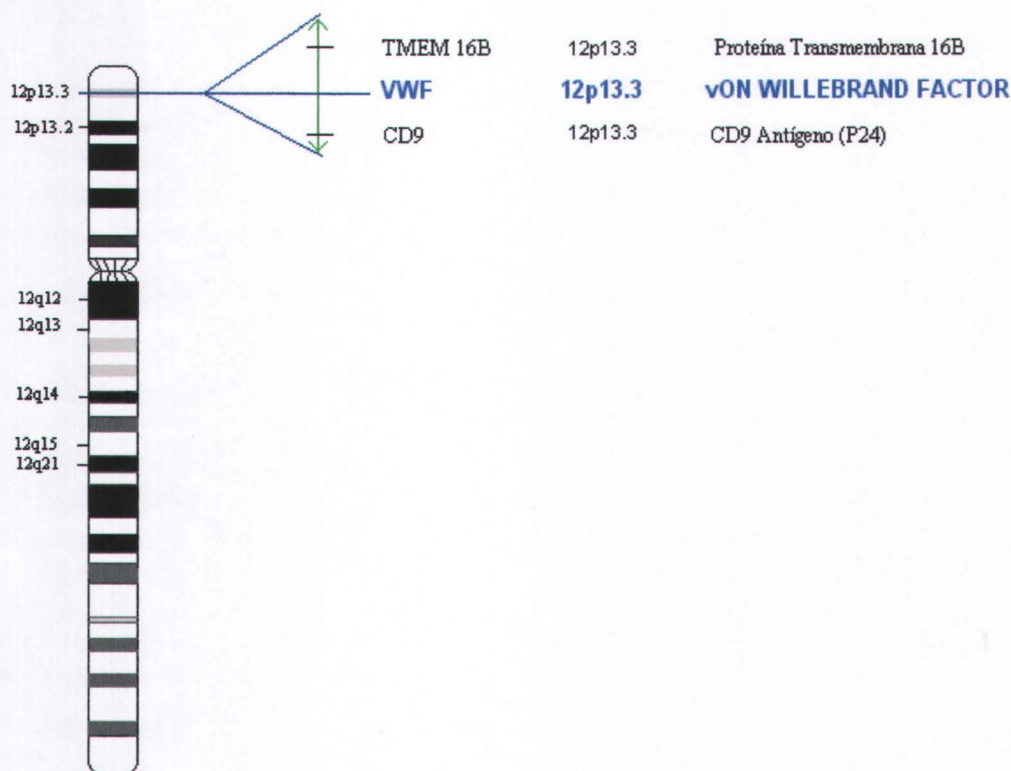


Fig 2 .- Ideograma del cromosoma 12 que ubica el gen del factor Von Willebrand y de otras proteínas. También muestra otras regiones tanto del brazo corto como del largo a manera de ejemplo.

A la fecha innumerables trabajos de diferentes países se han reportado sobre estudios del gen vWF, estudios sobre mutaciones en casos índices con cualquiera de los diferentes tipos de vWD, estudios para la detección de polimorfismos tanto en la región promotora como en la secuencia de intrones y exones del gen, estudios con marcadores genéticos como RFLP y VNTR para la determinación de la segregación de genes patológicos en familias con casos índices, estudios para la determinación del índice de heterocigocidad del gen vWF en población sana, entre otros. La gran mayoría de ellos reportados a finales de la década de los 80's y en el transcurso de los 90's del siglo pasado.

Sin embargo en nuestro país este es el primer estudio que se realiza en el gen vWF en familias con casos índices de vWD donde se emplean RFLP's como marcadores genéticos. Para ello se aprovechó la ventaja de la PCR y se adaptó el método empleado por Moraga en un trabajo de genética de poblaciones reportado en el 2000¹⁴, evitando así métodos que emplean elementos radiactivos.

La estrategia fue amplificar las regiones polimórficas seleccionadas y digerirlas con las enzimas de restricción adecuadas, posteriormente analizar los cortes en geles de agarosa y detectar los diferentes alelos que se presentaron en nuestra población de estudio.

Cinco sitios intragénicos polimórficos fueron elegidos para estudiar en 9 familias mexicanas (un total de 40 individuos estudiados) con pacientes relacionados, para caracterizar y sublocalizar RFLP's en el gen VWF (de 80 cromosomas) e identificar haplotipos como marcadores familiares para fenotipos patológicos.

Estos polimorfismos informados en la base de datos antes mencionada, están distribuidos a lo largo del gen e investigan para cinco sitios polimórficos mediante el uso de cuatro endonucleasas diferentes: exon 13, nt 142 (G+/A-, Rsa I)^{5,7}; exon 18, nt 292 (A+/G-, Rsa I)^{4,7}; intron 19, nt 187 (T/C, Msp I)^{4,7}; exon 28, nt 1282 (A+/G-, Kpn I)^{5,7} y exon 42 nt 3912 (C/T, Aci I)^{5,7}. La selección fue hecha con base en la alta frecuencia que se han demostrado en poblaciones asiáticas y europeas, y por su cercanía a regiones con el mayor número de mutaciones detectadas como se demuestra en la figura 3.

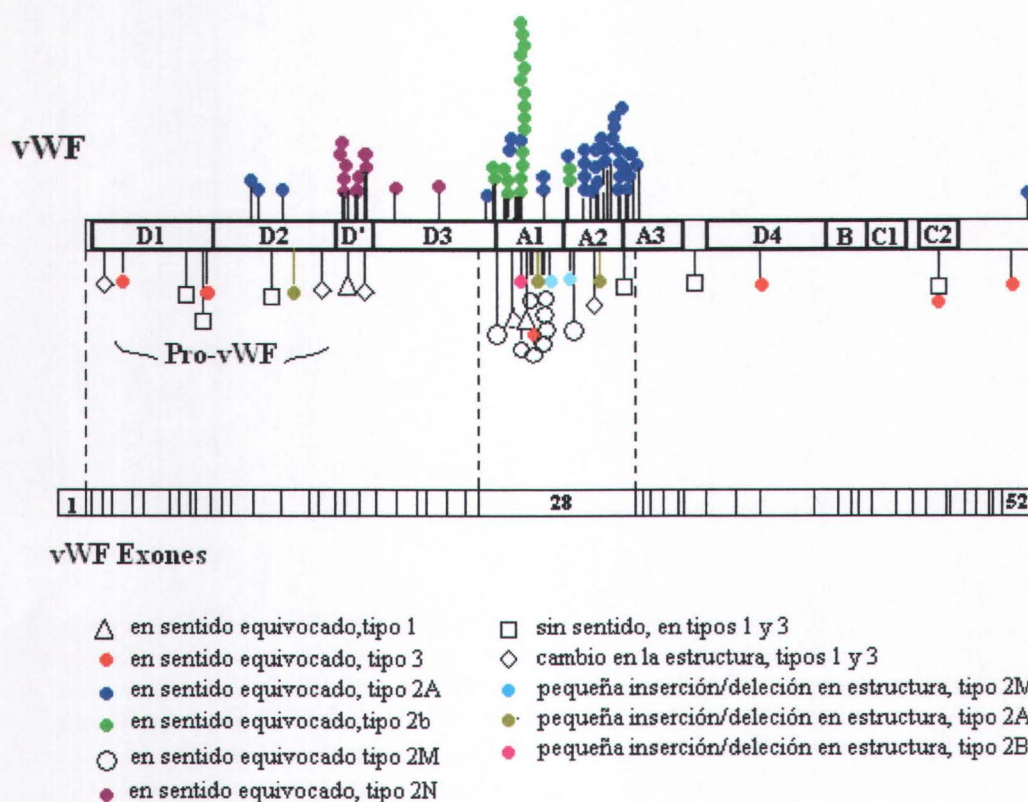


Fig 3 . Mutaciones vWD. Localización de mutaciones puntuales y pequeñas inserciones y/o deleciones asociados con vWD, reportados en la base de datos vWD, y su posición relativa en los 52 exones del gen vWF¹⁰.

La definición de estos cinco polimorfismos está hecha con base en la secuencia de Mancuso (1989)¹⁹.

EXON 13, NUCLEOTIDO 142 (G+/A-, Rsa I).

Se ha demostrado un sitio dimórfico en el nucleótido 142 del exón13. Un sitio Rsa I está presente (+) cuando tal nucleótido es G y ausente cuando es A. Flanqueando los extremos 5' a 124 pares de bases (pb) y 3' (ver oligonucleótidos en la tabla 1) a 169 pb del sitio dimórfico, se obtiene un amplificado de 293 pb que al ser digerido por la endonucleasa Rsa I produce dos fragmentos de DNA, uno de 124 pb y otro de 169 pb. Sin embargo en el segmento de 169 pb existen dos sitios Rsa I no dimórficos, que divide a este fragmento en otros dos fragmentos de 32 y 37 pb. De tal forma que una persona homocigota (+/+) produce el alelo R1 = 124, 100, 37 y 32 pb y una persona que es homocigota (-/-) produce el alelo R2 = 224,37 y 32 pb.

EXÓN 18, NUCLEOTIDO 292 (A+/G-, Rsa I).

La secuencia de Mancuso¹⁹ del vWF muestra un dimorfismo potencial del DNA del nucleótido 292 del exón 18. Un sitio Rsa I está presente (+) cuando la secuencia es GTAC y ausente (-) cuando es ATAC. Utilizando oligonucleótidos de 20 bases (ver tabla 1) que flanquean el extremo 5' a 200 pb y el extremo 3' a 122 pb del sitio dimórfico, se obtiene un amplificado de 322 pb que al ser digerido, como en las personas homocigotas (+/+), da una banda de 200 pb y otra de 122 pb (alelo R1'), o bien la banda de 322 pb (alelo R2') en las personas homocigotas (- / -) y las tres bandas en las personas heterocigotas (+ / -).

INTRÓN 19, NUCLEOTIDO 187 (T/C, Msp I).

En el nucleótido 187 del intrón 19, existe un sitio dimórfico que es Msp (+) cuando es C y Msp (-) cuando es T. Con oligonucleótidos (tabla 1) que flanquean los extremos 5' y 3' a 183 y 44 pb respectivamente del sitio dimórfico, se produce un amplificado de 227 pb. En este segmento dos sitios Msp I se encuentran presentes, uno dimórfico y otro no, con lo cual se producen: alelo M1 = 125 + 58 + 44 pb en personas homocigotas (+/+) y alelo M2 = 169 + 58 pb en personas homocigotas (-/-).

EXON 28, NUCLEOTIDO 1282 (A+/G-, Kpn I).

El nucleótido 1282 del exón 28 ha demostrado ser dimórfico para una secuencia Kpn I (+) cuando dicho nucleótido es A y Kpn I (-) cuando es G. Con oligonucleótidos que flanquean los extremos 5' y 3' (tabla 1) a 369 y 401 pb respectivamente del sitio dimórfico se produce un amplificado de 770 pb. Con el empleo de la enzima Kpn I es posible detectar 2 posibles alelos que son: alelo K1 = 401 + 369 pb y alelo K2 = 770 pb. Los oligonucleótidos empleados en este segmento permiten una amplificación selectiva de esta parte del exón 28 del auténtico gen sin interferencia del pseudogen vWF.

EXON 42 NUCLEOTIDO 3912 (C/T, Aci I).

El nucleótido 3912 del exón 42 es un sitio dimórfico para una secuencia Aci I (+) cuando dicho nucleótido es C y Aci I (-) cuando es T. Con oligonucleótidos que flanquean los extremos 5' y 3' (tabla 1) a 233 y 75 pb respectivamente del sitio dimórfico se produce un amplificado de 308 pb, que al ser digerido por la enzima Aci I genera dos fragmentos, uno de 233 pb y otro de 75 pb. Sin embargo en el segmento de 233 pb existe otro sitio Aci I no polimórfico, que genera otros dos fragmentos de 124 y 109 pb. Así, los posibles alelos a obtener son: alelo A1 = 124 + 109 + 75 pb y alelo A2 = 184 + 124 pb.

Con los oligonucleótidos reportados en los artículos consultados se determinó la temperatura óptima de alineamiento mediante el programa computacional "oligo".

El estudio fue aprobado por miembros de la unidad de investigación en genética del hospital de pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI y realizado en el laboratorio de dicha unidad.

MATERIALES Y METODOS

Se estudiaron nueve familias nucleares (padres e hijos) con diagnóstico de von Willebrand, pertenecientes al Hospital de Pediatría, CMN SXXI, IMSS. Los pacientes fueron seleccionados de acuerdo a resultados de estudios de laboratorio (Tiempo de sangrado, IVY, recuento de plaquetas, grupo sanguíneo, TTP, FVIII:C, Ristocetina, FvW:Ag, MvW). Se colectó por flebotomía en tubos con EDTA, muestras de sangre venosa de los pacientes previo consentimiento informado.

Preparación del DNA. Se extrajo DNA genómico a partir de leucocitos empleando el método de sales¹⁵. La concentración en ng/uL de DNA fue determinada por espectrofotometría y se verificó su integridad como DNA de alto peso molecular en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio al 0.5 ng/uL¹⁶.

Amplificación por PCR de las regiones polimórficas. Se emplearon los siguientes oligonucleótidos, informados por Li Zhenyu⁴ y Lee A. O' Brien⁵:

INICIADORES	SECUENCIA	UBICACIÓN*
VWRs13F	5' GCTACCATCCTTTTGAGACAC 3'	in 12, nt 19
VWRs13R	5' CACCACACAAAGCCATTCTAC 3'	in 13, nt 292
VWRs18F	5' TGGGCAACTCTGAGTCTCTT 3'	in 17, nt 92
VWRs18R	5' AGAAAAGTGAAGGGCAGGCA 3'	in 18, nt 394
VWMs19F	5' AGGGCTCTAGATCAGTCACTGTGGCCCT 3'	in 18, nt 4
VWMs19R	5' TGGCCGCGAGCTCCCTCACTCCACC 3'	in 19, nt 206
VWKp28F	5' CCTGAAGCCCCTCCTCCTACT 3'	ex 28, nt 915
VWKp28R	5' AGGATTAGAACCCGAGTCG 3'	in 28, nt 1666
VWAc42F	5' GCACCCTATAGCATAGCTGA 3'	in 41, nt 3,678
VWAc42R	5' ATAGTTAATAGCCAAGCAGT 3'	in 42, nt 3,967

VWRs13F...VWAc42R (VW, von Willebrand; Rs, Rsa I; 13F o R (exon 13 "forward" o "reverse"). In (intron), ex (exon), nt (nucleótido).

* según la secuencia de Mancuso.

La PCR se realizó en las siguientes condiciones: 200 ng de DNA genómico, buffer de reacción 1 X, MgCl₂ 1.5 mM, dNTP 200mm, 10pM de cada iniciador y 1 U de Taq polimerasa en un volumen final de 25 uL.

Con los oligonucleótidos reportados en los artículos consultados se determinó la temperatura óptima de alineamiento mediante el programa computacional "oligo".

El estudio fue aprobado por miembros de la unidad de investigación en genética del hospital de pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI y realizado en el laboratorio de dicha unidad.

MATERIALES Y METODOS

Se estudiaron nueve familias nucleares (padres e hijos) con diagnóstico de von Willebrand, pertenecientes al Hospital de Pediatría, CMN SXXI, IMSS. Los pacientes fueron seleccionados de acuerdo a resultados de estudios de laboratorio (Tiempo de sangrado, IVY, recuento de plaquetas, grupo sanguíneo, TTP, FVIII:C, Ristocetina, FvW:Ag, MvW). Se colectó por flebotomía en tubos con EDTA, muestras de sangre venosa de los pacientes previo consentimiento informado.

Preparación del DNA. Se extrajo DNA genómico a partir de leucocitos empleando el método de sales¹⁵. La concentración en ng/uL de DNA fue determinada por espectrofotometría y se verificó su integridad como DNA de alto peso molecular en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio al 0.5 ng/uL¹⁶.

Amplificación por PCR de las regiones polimórficas. Se emplearon los siguientes oligonucleótidos, informados por Li Zhenyu⁴ y Lee A. O' Brien⁵:

INICIADORES	SECUENCIA	UBICACIÓN*
VWRs13F	5' GCTACCATCCTTTTGAGACAC 3'	in 12, nt 19
VWRs13R	5' CACCACACAAAGCCATTCTAC 3'	in 13, nt 292
VWRs18F	5' TGGGCAACTCTGAGTCTCTT 3'	in 17, nt 92
VWRs18R	5' AGAAAAGTGAAGGGCAGGCA 3'	in 18, nt 394
VWMs19F	5' AGGGCTCTAGATCAGTCACTGTGGCCCT 3'	in 18, nt 4
VWMs19R	5' TGGCCGCGAGCTCCCTCACTCCACC 3'	in 19, nt 206
VWKp28F	5' CCTGAAGCCCCTCCTCCTACT 3'	ex 28, nt 915
VWKp28R	5' AGGATTAGAACCCGAGTCG 3'	in 28, nt 1666
VWAc42F	5' GCACCCTATAGCATAGCTGA 3'	in 41, nt 3,678
VWAc42R	5' ATAGTTAATAGCCAAGCAGT 3'	in 42, nt 3,967

VWRs13F...VWAc42R (VW, von Willebrand; Rs, Rsa I; 13F o R (exon 13 "forward" o "reverse"). In (intron), ex (exon), nt (nucleótido).

* según la secuencia de Mancuso.

La PCR se realizó en las siguientes condiciones: 200 ng de DNA genómico, buffer de reacción 1 X, MgCl₂ 1.5 mM, dNTP 200mm, 10pM de cada iniciador y 1 U de Taq polimerasa en un volumen final de 25 uL.

La reacción se llevó a cabo con un ciclo de 94 °C por 10 mins. y después 35 ciclos con desnaturalización por 30 seg. a 94 °C, alineación con las siguientes temperaturas de acuerdo al sitio amplificado: 56.4 °C para Rsa 13, 55°C para Rsa 18, 61 °C para Msp 19, 57.8 °C para Kpn 28 y 53.7 °C para Aci 42; y extensión final por 35 seg. a 70 °C. Ejecutados en un termociclador de gradiente Ependorff. Una vez terminada la reacción, se analizaron dos uL de producto obtenido en un gel de agarosa al 1.5 % y se compararon con un marcador de 123 pb para corroborar su tamaño.

Digestión con enzimas de restricción. Los amplificados obtenidos fueron digeridos con las enzimas apropiadas en las siguientes condiciones: en un volumen total de 10 uL se añadieron: 1 uL de buffer 10X, 2 U de enzimas de restricción y 4 uL de producto amplificado, el volumen total se complementó con agua. La reacción se incubó a 37 °C por dos horas. Posteriormente el digerido se corrió en un gel de agarosa al 2.5 % teñido con bromuro de etidio y se comparó con un marcador de 123 o 50 pb. Finalmente el gel se analizó en un transiluminador de luz UV.

RESULTADOS Y DISCUSIONES.

Se obtuvo DNA de alto peso molecular de acuerdo a lo esperado (Fig. 4).

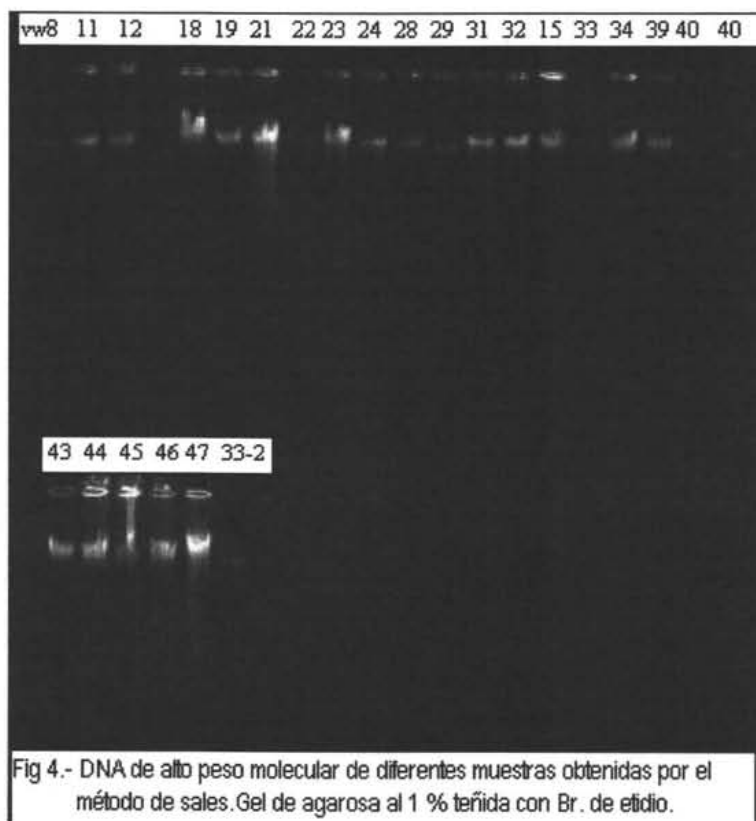


Fig 4.- DNA de alto peso molecular de diferentes muestras obtenidas por el método de sales. Gel de agarosa al 1 % teñida con Br. de etidio.

La reacción se llevó a cabo con un ciclo de 94 °C por 10 mins. y después 35 ciclos con desnaturalización por 30 seg. a 94 °C, alineación con las siguientes temperaturas de acuerdo al sitio amplificado: 56.4 °C para Rsa 13, 55°C para Rsa 18, 61 °C para Msp 19, 57.8 °C para Kpn 28 y 53.7 °C para Aci 42; y extensión final por 35 seg. a 70 °C. Ejecutados en un termociclador de gradiente Ependorff. Una vez terminada la reacción, se analizaron dos uL de producto obtenido en un gel de agarosa al 1.5 % y se compararon con un marcador de 123 pb para corroborar su tamaño.

Digestión con enzimas de restricción. Los amplificados obtenidos fueron digeridos con las enzimas apropiadas en las siguientes condiciones: en un volumen total de 10 uL se añadieron: 1 uL de buffer 10X, 2 U de enzimas de restricción y 4 uL de producto amplificado, el volumen total se complementó con agua. La reacción se incubó a 37 °C por dos horas. Posteriormente el digerido se corrió en un gel de agarosa al 2.5 % teñido con bromuro de etidio y se comparó con un marcador de 123 o 50 pb. Finalmente el gel se analizó en un transiluminador de luz UV.

RESULTADOS Y DISCUSIONES.

Se obtuvo DNA de alto peso molecular de acuerdo a lo esperado (Fig. 4).

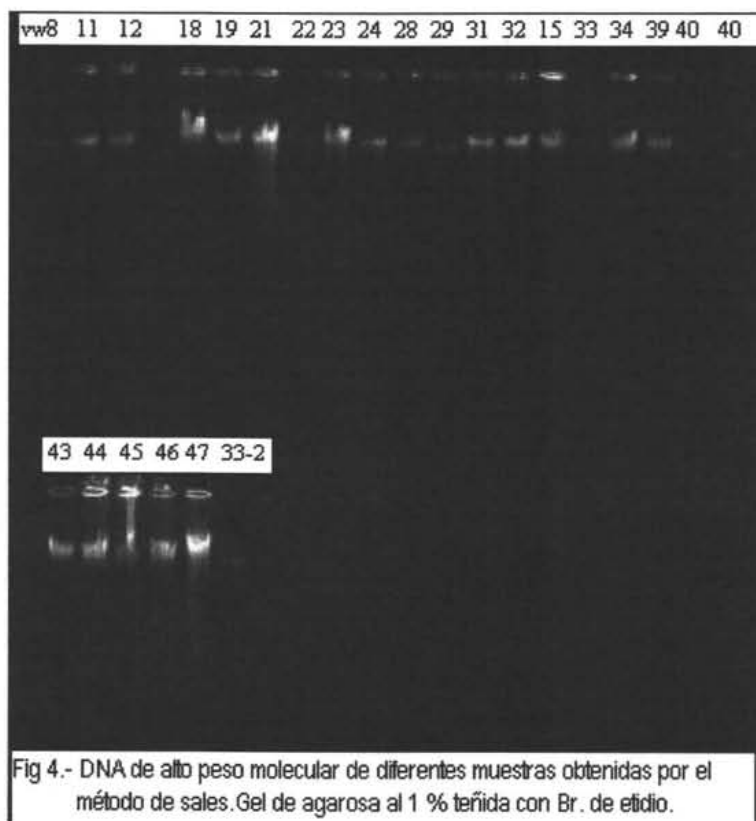


Fig 4.- DNA de alto peso molecular de diferentes muestras obtenidas por el método de sales. Gel de agarosa al 1 % teñida con Br. de etidio.

Se amplificaron las regiones mencionadas como se muestra en la siguiente figura:

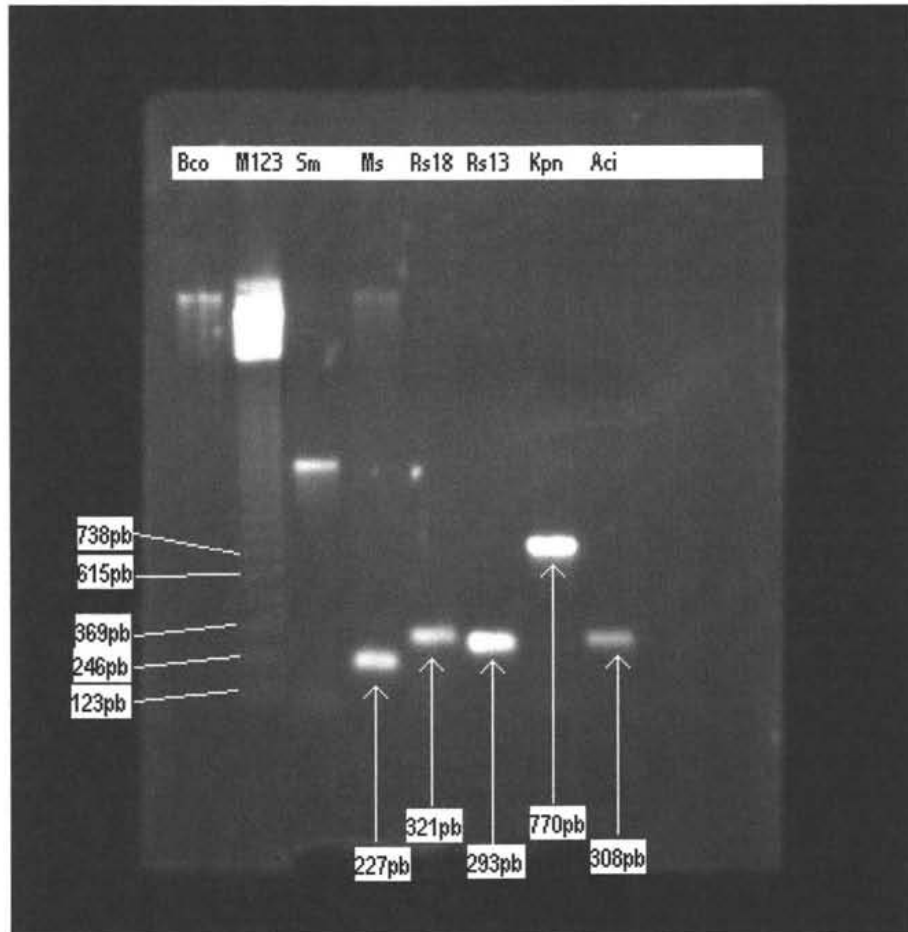


Fig. 5 .- Gel de agarosa al 1% que muestra los amplificados de interés de los 5 pares de oligonucleótidos empleados.

En el análisis del gen vWF de 40 individuos de 9 familias mexicanas (80 cromosomas en total incluyendo los casos índices) para 5 sitios polimórficos se encontraron los siguientes resultados:

La digestión con la endonucleasa Rsa I de un fragmento amplificado de 293 pb del exón 13, produjo los alelos R1(+ / +) y R2 (- / -) reportados. La frecuencia de estos alelos en personas no emparentadas (únicamente padres y madres) es de 0.417/0.583 y en los casos índices es de: 0.350/0.650 (Fig. 6).

El digerido con *Msp* I del amplificado de 227 pb del intrón 19, produjo los alelos M1(+ / +) y M2 (- / -) reportados. La frecuencia de estos alelos en personas no emparentadas (únicamente padres y madres) es de 0.111/0.889 y en los casos índices es de: 0.000/1.000 (Fig. 6).

El fragmento de 308 pb del exón 42 digerido con la endonucleasa *Aci* I produjo los alelos A1 = 233 + 75 pb y A2 = 308 pb. Remitiéndonos a la secuencia de Mancuso (1989), se esperaba obtener fragmentos de 124 + 109 + 75 pb en los homocigotos (+ / +) y fragmentos de 184 + 124 pb en los homocigotos (- / -) en virtud de un sitio *Aci* I aparentemente no polimórfico en el fragmento de 233 pb. Sin embargo los resultados demuestran que este sitio *Aci* I no existe en nuestra población, lo cual hace pensar que seguramente es un polimorfismo que no se había detectado en otras poblaciones y el que solamente puede ser demostrado mediante secuenciación de dicho amplificado. La frecuencia de estos alelos en personas no emparentadas (únicamente padres y madres) es de: 0.388/0.612; y en los casos índice es de: 0.80/0.20. Fig 6.

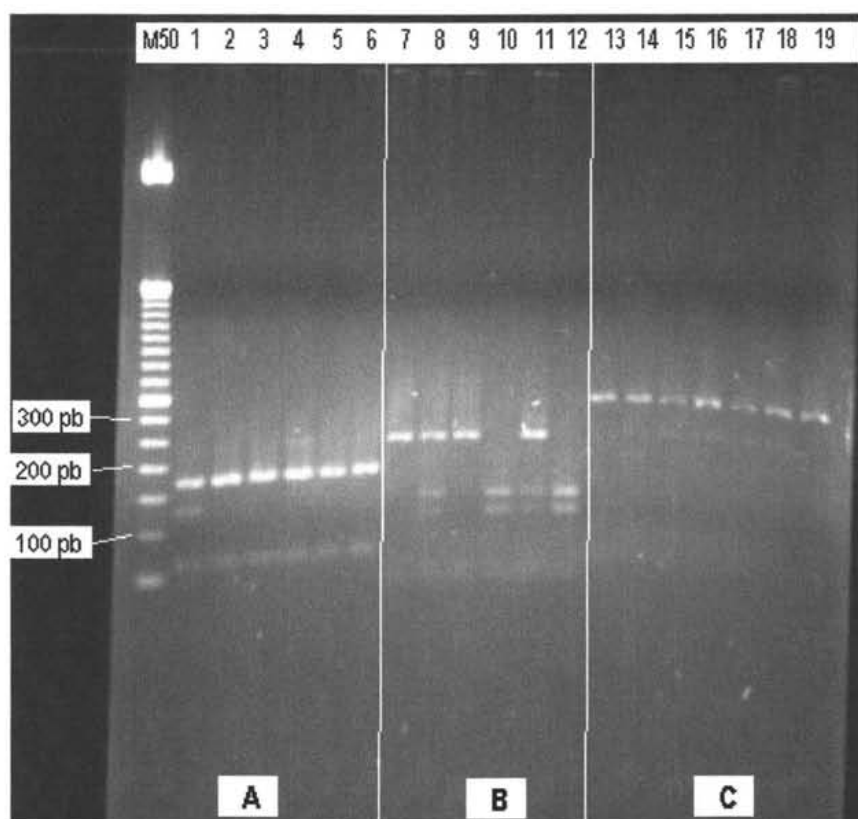


Fig. 6 . Gel que muestra el resultado de la amplificación y corte con enzimas de tres fragmentos diferentes: (A) *Msp* 19: M1 no se obtuvo ningún homocigoto de este alelo solo se muestra un heterocigoto en el carril 1, M2 (carril 2-6); (B) *Rsa* 13: R1 (carril 10 y 12), R2 (carril 7 y 9), los carriles 8 y 11 son heterocigotos; (C) *Aci* 42: los carriles 14-19 muestran solamente heterocigotos A1/A2. A2 (carriles 13 y 19). Gel de agarosa al 2.5 % teñido con bromuro de etidio.

La digestión con la endonucleasa Rsa I de un fragmento amplificado de 321 pb del exón 18, produjo los alelos R1' y R2' reportados. La frecuencia de estos alelos en personas no emparentados (únicamente padres y madres) es de 0.805/0.195 y en los casos índices es de: 0.85/0.15 (Fig. 7).

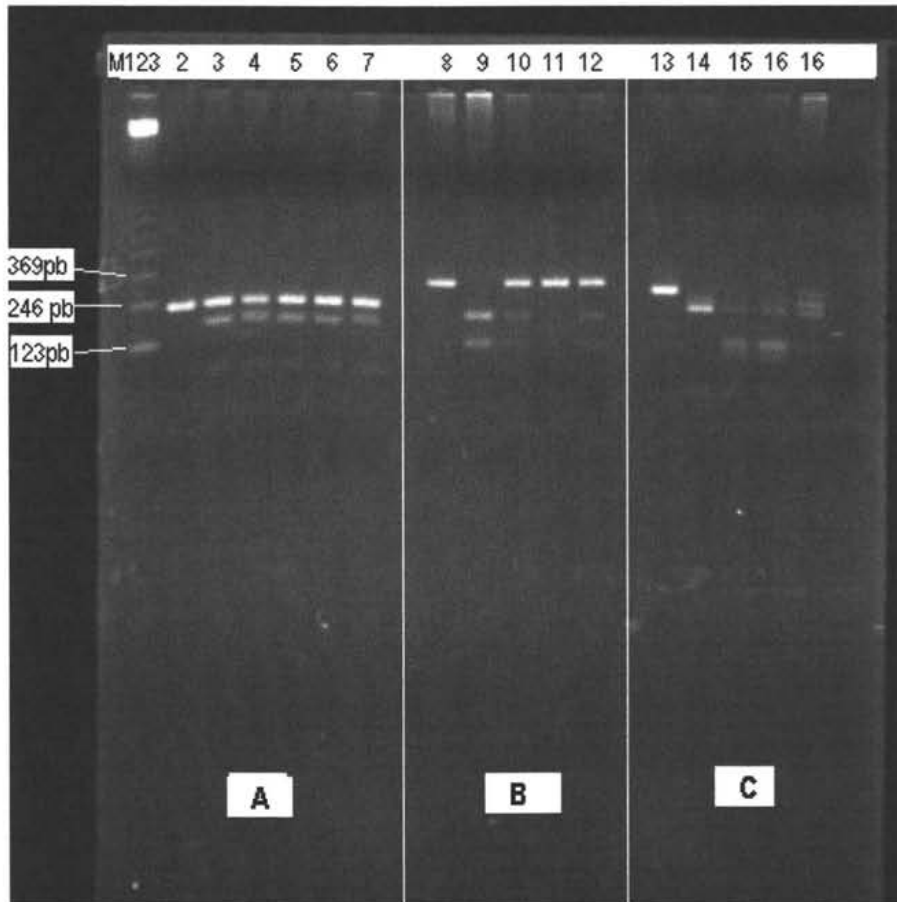


Fig 7.- Gel que muestra los alelos obtenidos en el corte con enzimas de tres diferentes fragmentos: (B) Rsa 18: R1' (carril 9), R2' (carriles 8 y 11), heterocigotos R1'/R2' (carriles 10 y 12). (A) y (C) alelos de Msp 19 y Rsa 13 respectivamente, ambos analizados en el gel anterior. Gel de agarosa al 2.5 % teñido con bromuro de etidio.

La digestión con la endonucleasa Kpn I de un fragmento amplificado de 770 pb del exón 28 produjo los alelos K1 y K2 reportados. La frecuencia de estos alelos en personas no emparentadas (únicamente padres y madres) es de 0.694/0.306 y en los casos índices es de: 0.80/0.20 (Fig. 8).

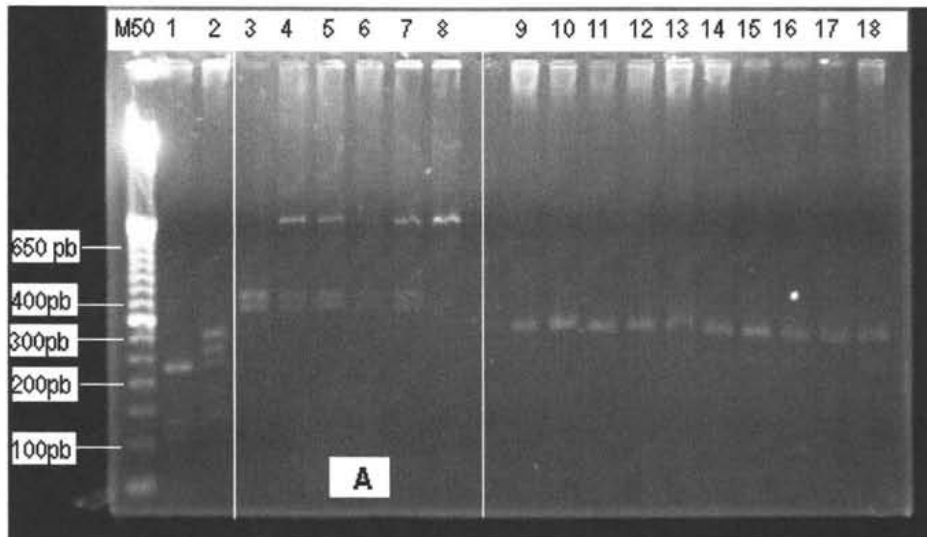


Fig 7.- Gel que muestra los alelos obtenidos en el corte con enzimas de tres diferentes fragmentos: (A) Kpn 28: K1 (carril 3), K2 (carril 8), heterocigotos K1/ K2 (carriles 4-7). Los carriles 1 y 2 y 9-18 son alelos de los fragmentos Rsa 13 y Aci 42 respectivamente, ambos analizados en el gel de la Fig 5. Gel de agarosa al 2.5 % teñido con bromuro de etidio.

La tabla 2 nos muestra los resultados resumidos de los alelos obtenidos en todas las familias.

Las tablas 3 y 4 relacionan los resultados obtenidos en el presente trabajo y los obtenidos en otros países con respecto a dos polimorfismos más informados en la bibliografía: Rsa I (exón 18) y Msp I (intrón 19).

TABLA 2.- Resultados de alelos obtenidos de los cortes con enzimas de restricción de todos los casos analizados.

FAMILIA	CASO	Rsa I Exon 13	Rsa I Exon 18	Msp I Intron 19	Kpn I Exon 28	Aci I Exon 42
1	8	R1	R1'	M2	K1	A2
	9	R1/R2	R1'/R2'	M1/M2	K1	A1/A2
	10	R1	R1'	M1/M2	K2	A1/A2
	11	R1	R1'	M2	K1	A1/A2
	12	R1/R2	R1'/R2'	M1/M2	K1/K2	A1/A2
	13	R1/R2	R1'/R2'	M1/M2	K1	A1/A2
2	14	R1/R2	R1'	M2	K1/K2	A1/A2
	15	R1/R2	R1'	M2	K1/K2	A2
	16	R1/R2	R1'	M2	K1/K2	A2
	17	R1/R2	R1'	M2	K1/K2	A1/A2
3	18	R2	R1'	M2	K1	A2
	19	R2	R1'/R2'	M2	K1	A1/A2
	20	R2	R1'	M2	K1	A1/A2
	21	R2	R1'/R2'	M2	K1	A2
4	22	R2	R1'/R2'	M2	K1	A2
	23	R1/R2	R1'/R2'	M2	K1/K2	A1/A2
	24	R2	R1'/R2'	M2	K1	A1/A2
	25	R2	R1'/R2'	M2	K1	A1/A2
5	26	R1	R1'	M2	K1/K2	A1/A2
	27	R1/R2	R1'	M2	K1/K2	A1/A2
	28	R1	R1'	M2	K1/K2	A2
6	29	R2	R2	M2	K1/K2	A2
	30	R2	R1'/R2'	M1/M2	K1	A1/A2
	31	R2	R1'/R2'	M2	K1	A1/A2
	32	R2	R1'/R2'	M2	K1/K2	A1/A2
7	33	R1/R2	R1'	M2	K1	A1/A2
	34	R1/R2	R1'	M1/M2	K1/K2	A1/A2
	35	R2	R1'	M2	K1	A1/A2
	36	R1	R1'	M2	K1	A2
	37	R2	R1'	M2	K1	A1/A2
	38	R2	R1'	M2	K1	A1/A2
8	39	R1/R2	R1'	M2	K1/K2	A1/A2
	40	R1/R2	R1'	M2	K1/K2	A1/A2
9	41	R2	R1'	M1/M2	K1/K2	A1/A2
	42	R1	R1'	M2	K1/K2	A1/A2
	43	R1/R2	R1'	M2	K1/K2	A1/A2
	44	R1/R2	R1'	M2	K1/K2	A1/A2
	45	R1/R2	R1'	M2	K1/K2	A1
8	46	R1/R2	R1'	M2	K1/K2	A1/A2
	47	R1/R2	R1'/R2'	M2	K2	A1/A2

La presente tabla ejemplifica los resultados de los alelos obtenidos (R1, R2, R1',R2',M1,M2,K1,K2,A1 y A2). El número consecutivo asignado a cada paciente es en la medida que estos fueron capturados y analizados. Por tal razón no hay un orden en la secuencia de la familia 8 y 9. De igual manera no se detalla quienes son los padres y quienes los hijos. Todo esto puede visualizarse perfectamente en los pedigrees familiares.

Tabla 3.- Correlación de la frecuencia de alelos del polimorfismo Rsa I exón 18 de varias poblaciones y el presente trabajo. La correlación se hizo con base en el porcentaje de frecuencia.

Población	Alelo (+)	Alelo (-)	Frecuencia(+/-)	p	X ²	Relación
Mexicanos	29	7	0.81/0.19			
Chinos(Han) ⁴	97	7	0.93/0.07	≤ 0.025	6.36	Significativo
Caucásicos ⁴	65	36	0.65/0.36	≤ 0.01	7.00	Significativo
Malasios ³⁹	36	6	0.86/0.14	≤ 1.0	0.907	No significativo
Afroamericanos ³⁹	34	40	0.46/0.54	≤ 0.001	26.4	Significativo
Hindúes Orient. ³⁹	37	9	0.80/0.20	≤ 1.0	0.031	No significativo

La frecuencia alélica está en porcentaje. La comparación esta hecha entre la población mexicana y cada una de las otras poblaciones empleando para esto el estadístico Chi cuadrada (X²).

Estos datos señalan la similitud genotípica que existe entre nuestra población y la de los malasios y los indios orientales para este polimorfismo. Sin embargo no coinciden con los chinos lo cual difiere con otro estudio sobre el análisis del gen de la hemofilia A empleando VNTR's como marcador genético¹⁸.

Tabla 4.- Correlación de la frecuencia de alelos del polimorfismo Msp I Intrón 19 de tres poblaciones.

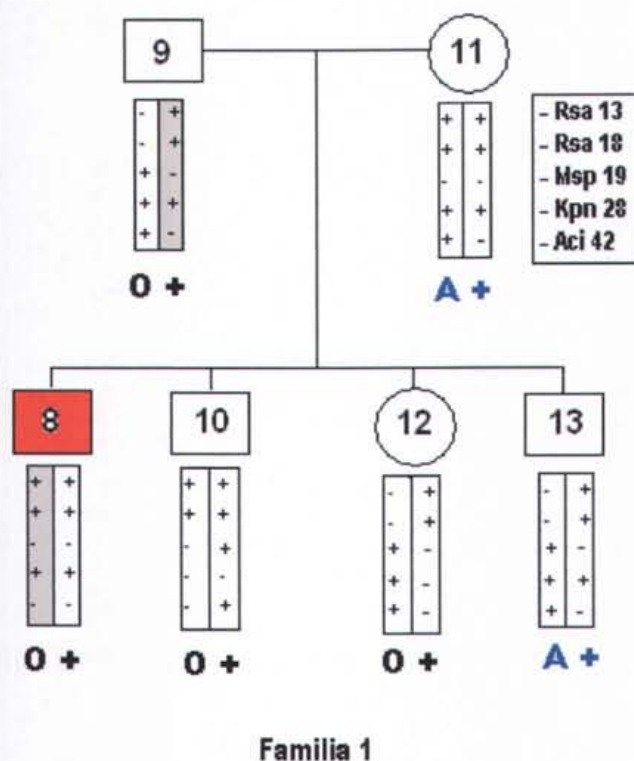
Población	Alelo (+)	Alelo (-)	Frecuencia (+/-)	p	X ²	
Mexicanos	4	32	0.11/0.89			
Chinos(Han) ⁴	21	83	0.20/0.80	≤ 0.1	3.09	No significativo
Caucásicos ^{4,40}	33	67	0.33/0.67	≤ 0.001	14.1	Significativo

La frecuencia alélica esta en porcentaje. La comparación esta hecha entre la población mexicana y cada una de las otras poblaciones empleando para esto el estadístico Chi cuadrada (X²).

Para este polimorfismo los resultados indican la misma diferencia entre nuestra población y las caucásicas, pero no con los chinos que ahora se muestran similares a la nuestra.

Los siguientes esquemas muestran los haplotipos en pedigríes familiares. La nomenclatura empleada es: hombre, mujer, caso índice.

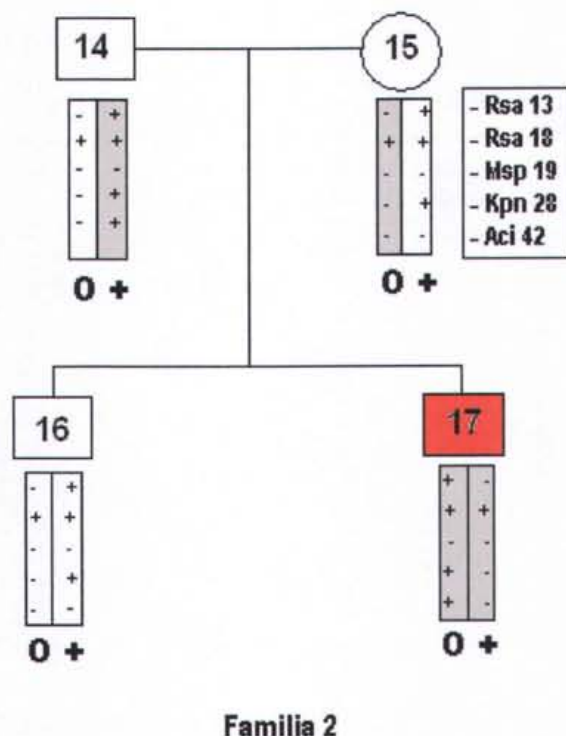
El recuadro ubicado en la parte superior derecha de los esquemas indica la posición de los cortes en los haplotipos. Finalmente los casos índices señalados fueron diagnosticados como tal con base al cuadro clínico de sangrado y otros síntomas que presentaban, además de la historia clínica documentada por el médico. Por esa razón, algunas personas asintomáticas no se les consideró como caso índice aunque posteriormente los resultados fenotípicos de laboratorio corroboraran el diagnóstico. Dichos datos fenotípicos no fueron anexados en este trabajo debido a que fueron realizados en otro laboratorio y aun no han sido publicados, excepto el grupo sanguíneo que está indicado en la parte inferior de cada haplotipo.



Esquema 1.- Pedigree de la familia 1.

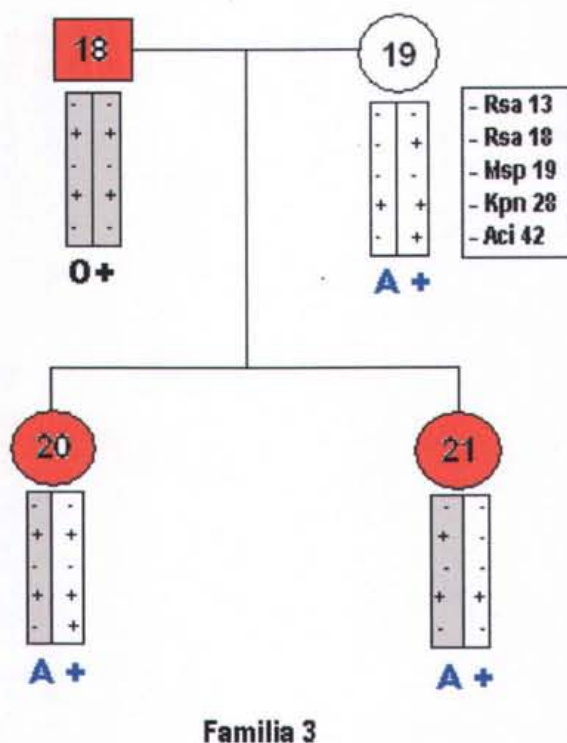
El análisis de este pedigree demuestra que el caso índice recibió un haplotipo igual de ambos padres; y el hijo número 13, que está sano, recibió el mismo alelo de la madre y uno diferente del padre. Podemos deducir que el alelo coloreado es el afectado y que el caso índice lo ha heredado del padre. Nuestras deducciones se refuerzan porque tanto la hija 12 como el hijo 13 recibieron el alelo no afectado del padre y ninguno presenta la enfermedad. Además el estudio de multímeros (MVW) concluyó que tanto el padre como el caso índice presentan el mismo patrón de multimerización de la molécula (reportado como vWD tipo I). Con esto se demostramos que este marcador es útil para deducir la segregación del gen defectuoso.

El otro alelo de la hija 12 y los dos del hijo 10 no concuerdan con los paternos, sin embargo esto también coincidió con otro estudio que realizó el Dr. Jorge Palacios (médico genetista de nuestro centro de investigación que estudio el mismo gen empleando VNTR's como marcador genético)¹⁷. El resultado demostró el mismo número de repetidos para el padre y el hijo 12 pero no para la madre; y diferente número de repetidos para el padre, la madre y el hijo 10.



Esquema 2.- Pedigree de la familia 2.

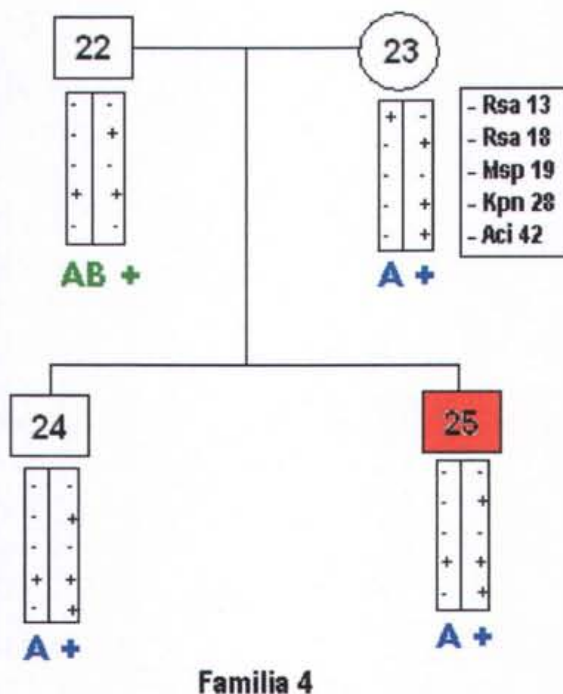
En esta familia el hijo 16 recibió alelos de quienes se piensa no son defectuosos por los resultados fenotípicos de laboratorio informados. Esto nos permite pensar que cualquiera de los dos sombreados puede ser el afectado y dado que no existen más datos en que apoyarnos para deducirlo, se puede decir que necesitaríamos un "tercero en discordia" (un hijo 18) que heredara principalmente el alelo derecho del padre para saber si es el defectuoso, ya que el izquierdo de la madre es similar al otro del padre y se puede prestar a confusión. O bien un descendiente del caso índice que al heredar cualquiera de estos dos alelos podría definir más la situación apoyados en los otros resultados de laboratorio. Por lo pronto en este caso este marcador no es de gran utilidad para determinar la segregación de genes defectuosos.



Esquema 3.- Pedigree de la familia 3.

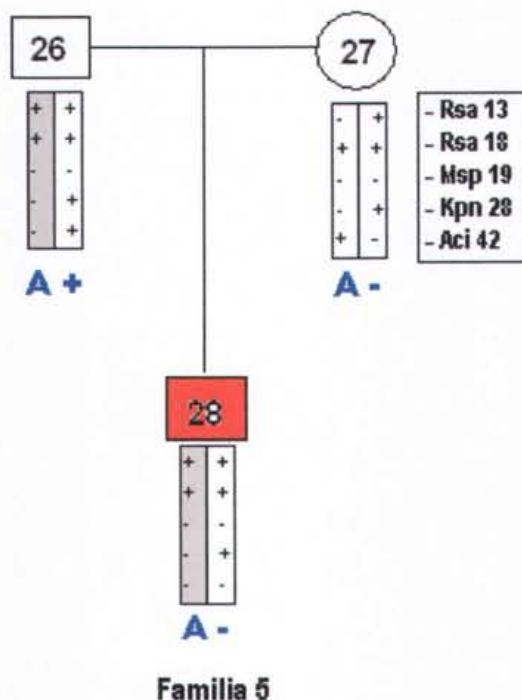
Con estos resultados se puede decir que indiscutiblemente el padre segrega el gen defectuoso, sobre todo con base en los otros resultados de laboratorio. Entre estos estudios fenotípicos del padre cabe mencionar TTP = 51.4", FVIII:C = 54.0, FvW:Ag= 75, y un análisis de multímeros que indica ser un vWD tipo I.

Además este puede ser un claro ejemplo de la influencia del grupo sanguíneo en el padecimiento debido a que solo el padre es grupo "O" POSITIVO y la madre y las hijas son "A" POSITIVO y en estas últimas los resultados fenotípicos solo están ligeramente bajos pero dentro de lo normal. La única incógnita por resolver es saber cual de los dos alelos del padre es el informativo ya que ambos son iguales y lo más probable es que solo uno de ellos se está segregando a los hijos dado que los dos son casos índices.



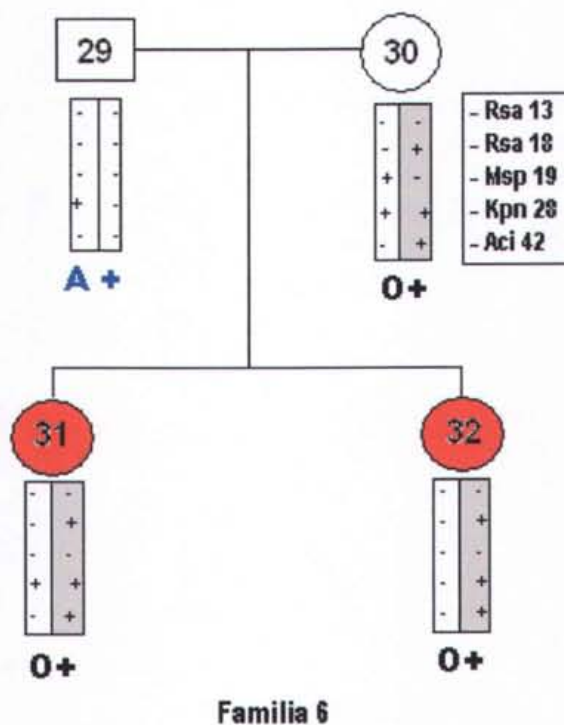
Esquema 4.- Pedigree de la familia 4.

En esta familia este marcador no es informativo debido a que ambos hijos heredan los mismos alelos de los padres. Sin embargo los datos de los estudio fenotípicos sugieren que el padre y el hijo 25 son los afectados y el análisis de multímeros indica que ambos tienen vWD tipo I.



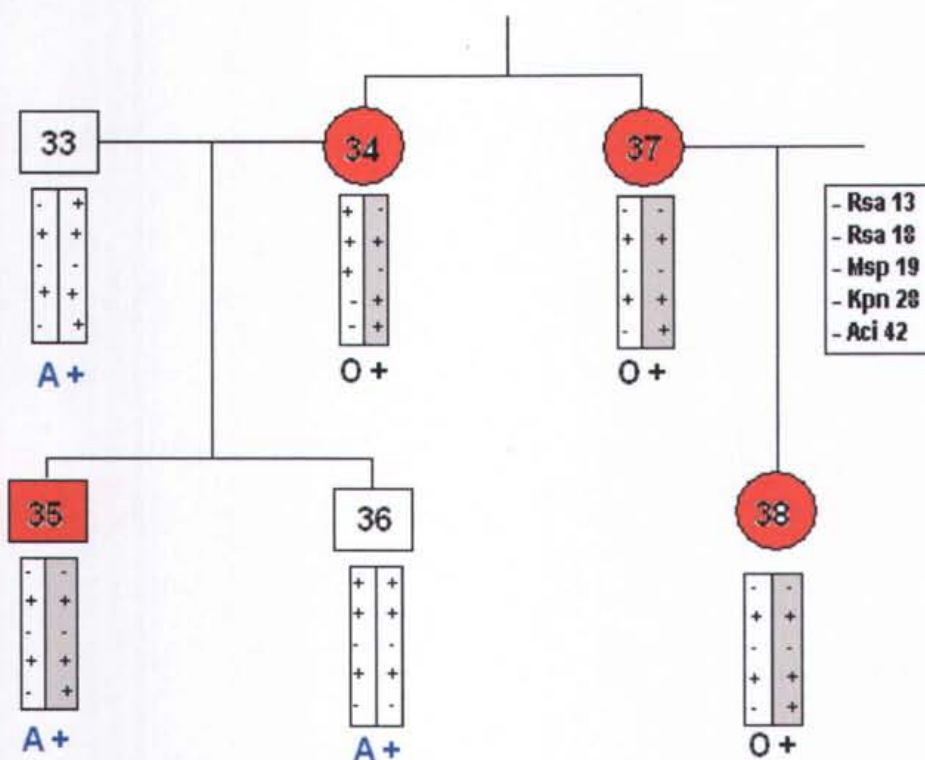
Esquema 5.- Pedigree de la familia 5 que muestra la segregación de haplotipos de padres a hijos. El recuadro superior derecho indica la posición de los cortes en el pedigree y el triángulo rojo el caso índice.

Este caso es parecido al anterior en que no es posible deducir mucho acerca de la segregación de genes afectados debido a que es un solo descendiente y no es posible comparar el efecto del otro gen con el uso de este marcador, excepto si consideramos que los resultados de estudios fenotípicos indican que tanto el padre como el hijo poseen valores bajos de FVIII:C, Ristocetina y FvW:Ag, tiempo prolongado de TTP y un análisis de multímeros con un patrón de vWD tipo I. De esta manera podríamos decir que el gen afectado posiblemente sea el del haplotipo sombreado que es el que hereda el caso índice.



Esquema 6.- Pedigree de la familia 6.

En esta familia los resultados demuestran que es la mamá quién segrega el gen defectuoso, y es que los datos fenotípicos de laboratorio indican valores bajos pero dentro de lo normal como si se tratara de un vWD tipo I aunque en el análisis de multímeros no revela tal cosa. Otro dato curioso es que la hija 31 que es la más afectada según los resultados fenotípicos de laboratorio, produjo un patrón de multímeros de tipo vWD IIB (como si hubiera producido otra mutación de novo) y la hija 32 que también es caso índice, demostró valores similares a los de la mamá pero a diferencia de ella si produjo un patrón de multímeros tipo vWD I. Además, este es otro claro ejemplo de la influencia del grupo sanguíneo en la herencia de esta enfermedad, el papá es "A" (+) y es una persona sana y la mamá al igual que las hijas son "O" (+).

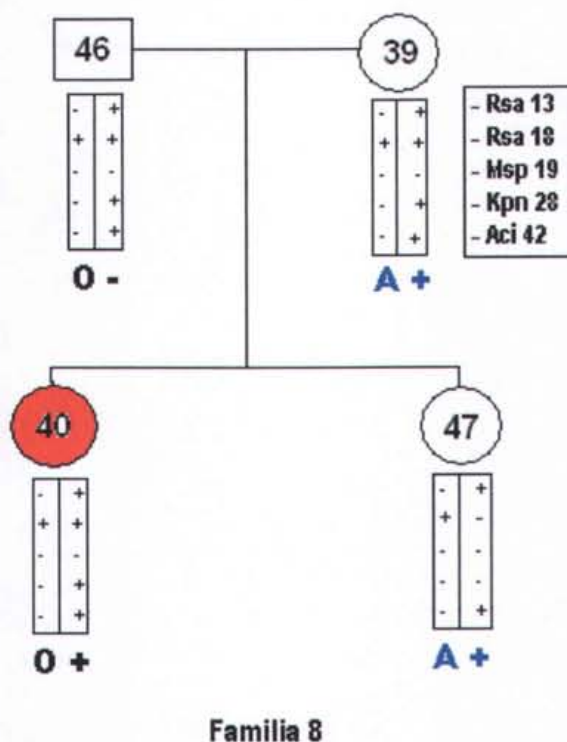


Familia 7

Esquema 7.- Pedigree de la familia 7.

Quizá esta sea la mejor demostración de la utilidad del RFLP como marcador genético ya que se puede apreciar la segregación parental del haplotipo que describe al gen defectuoso. Puede notarse como cada uno de los casos índices comparten dicho haplotipo sombreado y el diagnóstico de vWD es respaldado por los resultados de laboratorio como tipo I.

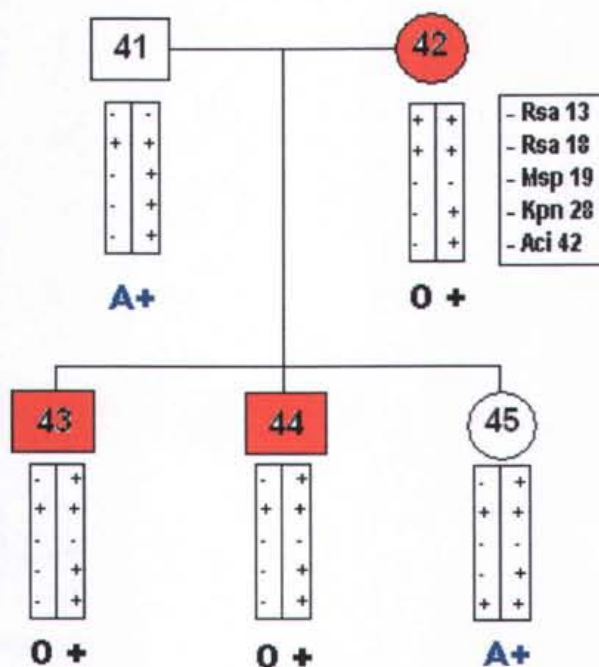
En cuanto a segregación de haplotipos ambos alelos del hijo 36 no coinciden con ninguno de los padres. El estudio se repitió 2 veces y el resultado fue el mismo. En el análisis de VNTR's los resultados demostraron que ambos hijos, 35 y 36, heredaron los repetidos de los padres. De tal manera que la posible explicación de este fenómeno es que haya habido un doble evento de recombinación en la etapa de la meiosis en los genes del caso 36, y probablemente este haya sido el factor que lo protegió de heredar la enfermedad de von Willebrand en su afán del gen de sobrevivir en el curso de la evolución.



Esquema 8.- Pedigree de la familia 8.

En esta familia este marcador no es informativo, por que ambos padres poseen los mismos haplotipos y así para el caso índice no sabemos cual es el gen afectado.

Para la hija 47, el alelo derecho no coincide con los paternos (polimorfismos Rsa 18 y Kpn 28). La probable explicación de este resultado es que para el primer polimorfismo se haya presentado una mutación silenciosa de novo de un nucleótido en el punto de corte, resultando un alelo no presente en los padres. Y para el segundo polimorfismo, es probable un evento de entrecruzamiento de los dos genes de cualquiera de los padres, con el cual se produce un haplotipo diferente a los paternos.



Familia 9

Esquema 9.- Pedigree de la familia 9.

Finalmente en esta última familia tenemos los dos casos índice de los hijos 43 y 44 que heredaron los mismos haplotipos y la hija 45 que presenta un alelo diferente a los del padre (quién se supone se los haya heredado). Este es un caso similar al del hijo 36 de la familia 7 en el sentido que dicha diferencia posiblemente se deba a una recombinación de los genes de este descendiente en el polimorfismo Aci 42 y que tendría el mismo fin que el caso mencionado. Sin embargo para fines de detección del gen defectuoso, esto carece de importancia pues los resultados de laboratorio concluyen que es la madre la que presenta el padecimiento y el alelo que segrega es el mismo para los tres hijos lo que indica que el uso de este marcador es inútil para los fines que perseguimos.

Una vez más el grupo sanguíneo está en relación con la manifestación de la enfermedad: los casos índices son grupo "O" Positivo y el padre y la hija no afectada son "A" Positivo.

CONCLUSIONES.

Solo en cinco de nueve familias mexicanas estudiadas, con casos de vWD, fue posible demostrar mediante RFLP's la segregación del gen vWF afectado. Los casos no informativos se debieron principalmente a la baja heterocigosidad alélica intrafamiliar y al número reducido de integrantes familiares, lo cual hace pensar que sería interesante determinar cual es el índice de heterocigosidad alélica del gen vWF en la población sana.

En cuanto a la frecuencia de los alelos encontrados en nuestra población para algunos polimorfismos informados, tenemos mayor similitud genética con las poblaciones asiáticas y los Hindúes orientales, que con las otras poblaciones señaladas, lo que es congruente con la teoría de las ondas migratorias de los amerindios a partir de Asia.

Por otra parte se corrobora en la mayoría de los casos que el grupo sanguíneo es un factor ligado a los propósitos determinados. Los estudios realizados por Keightley et al (1999) demuestran que los polimorfismos -1234 C/T, -1185 A/G y -1051 G/A en el promotor del gen vWF influyen los niveles plasmáticos de VWF al menos en individuos con grupo sanguíneo O³³. Otros estudios también demostraron una relación entre el grupo sanguíneo ABO y los niveles plasmáticos de antígeno VWF, donde el grupo O está asociado con los niveles más bajos de este antígeno, el grupo AB está asociado con los niveles más altos y los grupos A y B con los niveles intermedios³⁴.

En este contexto existen algunas particularidades que mencionar en nuestro trabajo. Los casos índices de las familias 4,5 y 7 no comparten esta teoría pues son del grupo sanguíneo A y presentan la enfermedad. Sin embargo las hijas de la familia 3 son del grupo A, presentan la enfermedad, pero con una sintomatología leve comparado con el padre que es del grupo O; y los estudios fenotípicos de laboratorio indican que las hijas están menos afectadas.

La utilidad de estos marcadores genéticos (RFLP's) en el diagnóstico de vWD es relativa, no siempre son concluyentes. Mientras se cuente con los otros datos fenotípicos de laboratorio y una suficiente heterocigosidad alélica intrafamiliar, los resultados de RFLP's pueden ser de utilidad en el asesoramiento genético de las familias que lo requieran.

BIBLIOGRAFIA

1. Beutler E, Marshall A. L., Barry S. C.: Williams Hematology, sixth Edition, Mc Graw Hill, 2001. pp1815-1816.
2. Bernardi F, Marchetti G, Casonato A. Characterization of polymorphic markers in the von Willebrand factor gene and pseudogene. *Br J Haematol* 1990;74:282–289.
3. Murray Elizabeth, Giles Alan, Bridge Peter. Cosegregación of the von Willebrand Factor Gene Polymorphisms and possible germinal mosaicism in the IIB von Willebrand disease. *Blood*. 1991;77:1476–1483.
4. Li Zhenyu, Wang Yong, Tai Hong. Sma I, Hha I, Msp I and Rsa I restriction fragment length polymorphisms in the von Willebrand factor gene of Chinese population. *Chinese Med J* 1998;111:686–689 .
5. Lee A. O'Brien, Paula D. James, Maha Toman. Founder von Willebrand factor haplotype associated with type 1 von Willebrand disease. *Blood* 2003;102:549–557.
6. Peñaloza R., Salamanca F. Los marcadores genéticos y sus aplicaciones en biomedicina. *Rev Mex Patol Clin* 1994;41:1-7
7. Sadler EJ, Ginsburg D. A database of polymorphisms in the von Willebrand Factor gene and pseudogene. *Thromb Haemost.* 2003;69:185 – 191.
8. Lewis, B. *Genes VII* . Edit. Oxford Univ Press, 2001.pp 38-44.
9. Metzker ML, Caskey TC. Polymerase Chain Reaction. *Encyclopedia of sciences*. 2001.
10. Ginsburg D, Handin RI, Bonthron DT, et al: Human von Willebrand Factor (vWF): Isolation of complementary DNA (cDNA) clones and cromosomal localization. *Science* 1985;228:1401-1411.
11. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispmim.cgi?id=193400>.
12. Kochert G. Introduction to RFLP mapping and plant breeding applications. The Rockefeller Foundation. University of Georgia, 1994
13. Mancuso DJ, Tuley EA, Westfield LA, et al: Human von Willebrand factor gene and pseudogene: Structural analysis and differentiation by polimerase chain reaction. *Biochemistry*.1991;30:253-259.
14. Moraga ML, Rocco P, Miquel JF, et al: Mitochondrial DNA polymorphisms in Chilean aboriginal populations: implications for the peopling of the southern cone of the continent. *Am J Phys Antropol*.2000;113:19-20.
15. Lahiri DK, Nurnberger JI : A rapid non-enzimatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res*.1991;19:19.
16. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. *Molecular cloning: a laboratory manual*, second edition, Cold Spring Harbor Lab Press.1989; pp5.28-5.31.
17. Palacios JJ, Benitez, Buentello L, Flores M, Salamanca F, Peñaloza R. Frecuencia de heterocigocidad del polimorfismo TCTA del intrón 40 del gen VWF, en pacientes con enfermedad de von Willebrand y en población indígena mexicana. Tesis de especialidad. Fac. de Medicina, UNAM. 2005.
18. Martínez R, Arenas D, Peñaloza R, Salamanca F. Estudio de mutaciones en el gen de la hemofilia A y diagnóstico molecular de portadoras. Tesis de Maestría. Fac. de Ciencias, UNAM. 2001.

19. Mancuso DJ, Tuley EA, Westfield LA, et al: Structure of the gene for human von Willebrand Factor. *J Biol Chem.*1989;264: 19514.
20. Nilsson IM: The history of von Willebrand disease. *Haemophilia* 1999; 5 (sup 2):7
21. Ruggeri ZM: Von Willebrand Factor and the mechanisms of platelet function. Ruggeri,Z.M.1998. Pp 33-77.
22. Ribba AS, Christophe O, Baruch O, et al: Influence of mutations and size of multimers in type II von Willebrand disease upon the function of von Willebrand Factor. *Blood.*1994; 83: 3553-3561.
23. Schneppenheim R, Budde U, Ruggeri ZM, et al: Expression and characterization of von Willebrand factor dimerization defects in different types of von Willebrand disease. *Blood.* 2001; 97:2059-2066.
24. Keeney S, Cumming A, Hay C: Mutations in von Willebrand Factor multimerization Domains are not a common cause of classical type 1 von Willebrand disease. *Thromb Haemost.*1999; 82:1446.
25. Rand JH, Glanville RW, et al: The significance of subendothelial von Willebrand factor. *Thromb Haemost.*1997;78:445-450.
26. Allen S, Abuzenadah A, Blagg J: Two novel type 2N von Willebrand disease causing mutations that result in defective factor VIII binding, multimerization, and secretion of von Willebrand factor. *Blood.* 2000; 95:2000-2005.
27. Battle J, Lourés E, Vila P, et al : Alloantibody from a severe von Willebrand disease patient inhibits von Willebrand factor-FVIII interaction and shows a non-specific FVIII inhibition. *Am J Hematol.* 1997. PS-2684:658.
28. Sadler JE, Shelton-Inloes BB, Sorace JM, Harlan JM, Titani K, Davie EW, Cloning and characterization of two cDNAs coding for human von Willebrand factor. *Proc Natl Acad Sci USA.*1985; 82:6394-6398.
29. Eikenboom JC, Castran G, et al: Characterization of the genetic defects in recessive type 1 and type 3 von Willebrand disease patients of Italian origin. *Thromb Haemost.*1998; 79:709-717.
30. Meyer D, Fressinaud E, Gaucher C, et al: Gene defects in 150 unrelated French cases with type 2 von Willebrand disease: from the patient to the gene. *Thromb and haemost.*1997;78:451-456.
31. J.E. Biochemistry and genetics of von Willebrand factor. *Annu Rev Biochem.* 1998;67:395-424.
32. Rosenberg JB, Haberichter SL, Joswiak MA, et al: The role of the D1 domain of the von Willebrand factor propeptide in multimerization of VWF. *Blood.* 2002;100:1699-1705.
33. Keighley AM, Lam YM, Brady JN, et al: Variation at the von Willebrand factor (vWF) gene locus is associated with plasma vWF:Ag levels: identification of three novel single nucleotide polymorphisms in the vWF gene promoter. *Blood.* 1999;93:4277.
34. Gill JC, Endres-Brooks J, Bauer PJ, Montgomery RR. The effect of ABO blood group on the diagnosis of von Willebrand disease. *Blood.* 1987;69:1691.
35. Lynch DC, Zimmerman TS, Collins CJ, et al: Molecular cloning of cDNA for human von Willebrand factor. Authentication by a new method. *Cell.*1985;41:49.
36. Verweij CL, de Vries CJM, Distel B, et al: Construction of cDNA coding for human von Willebrand factor using antibodies probe for colony-screening and mapping of the chromosomal gene. *Nucleic Acids Res.*1985;13:4699.

37. Shelton-Inloes BB, Broze GJ J, Miletich JP, Sadler JE. Evolution of human von Willebrand factor: cDNA sequence polymorphisms, repeated domains, and relationship to von Willebrand antigen II. *Biochem Biophys Res Commun.*1987;114:657-65.
38. Sadler JE, Gralnick HR: Commentary: A new classification from von Willebrand disease. *Blood.*1994;84:676.
39. Kunkel GR, Graham JB, Fowlkes DM, Lord ST. Rsa I polymorphism in von Willbrand factor (vWF) at codon 789. *Nucleic Acid Research.*1990;18:4961.
40. Mercier B, Gaucher C, Mazurier C. A Msp I polymorphism in the von Willebrand factor gene. *Nucleic Acid Research.*1990;18:7467.