

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE MEDICINA**

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
HOSPITAL DE PEDIATRIA
CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI

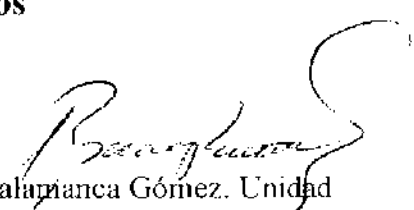
**Frecuencia de heterocigocidad del polimorfismo TCTA del
intrón 40 del gen VWF, en pacientes con enfermedad de von
Willebrand y en población indígena mexicana.**

T E S I S

Como uno de los requisitos para obtener el grado de
Especialista en Genética Médica

P R E S E N T A

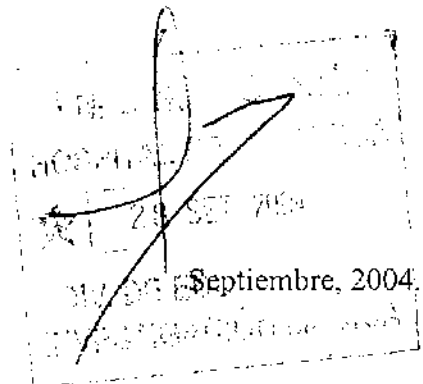
Dr. Juan Jorge Palacios Casados

Tutor de la tesis: Dra. Rosenda Isabel Peñalosa Espinosa, 
Cotutores: Dr. Diego Julio Arenas Aranda, Dr. Fabio Abdel Salamianca Gómez. Unidad
de investigación en Genética Humana, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional S
XXI.

Asesores de la tesis: Dr. Jorge Martín Trejo, Dra. Herminia Benítez Aranda, Servicio de
Hematología pediátrica, Centro Médico Nacional S XXI

Dirección del tesista: Laboratorio de Genética Molecular, UIM Genética Humana,
CMN S XXI, IMSS. Teléfono 56-27-69-41, 56-27-69-45. Fax 55-88-51-74. Correo
electrónico: jOrge_26@yahoo.com.mx

México Distrito Federal





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Dedicatoria

A mis padres, por el amor y apoyo incondicionales que siempre me han brindado, especialmente por haber hecho de este viaje apasionante en la búsqueda de conocimiento una aventura y no una carga, por haberme impulsado en todo momento y sobre todo en esos momentos en que pensaba que ya no podía más.

A mi padre, por ser mi amigo, por ser mi maestro, el que me encaminó en esta senda del conocimiento médico, el que me enseñó a ser dedicado y obstinado en la búsqueda del bienestar de mis pacientes, por confiar en mi loco sueño de ser genetista hasta el final.

A mi madre, que por sobre todas las cosas antepone a sus hijos, no puedo pensar en alguien que nos haya impulsado, defendido, alentado y encausado a ser mejores en todos los aspectos de nuestro ser, ni en alguien que irradie tanta paz en otros como tú, gracias a ti por creer en mí sin juzgarme y respetarme por ser quien soy.

A mis hermanos que me han enseñado que siempre estarán ahí para apoyarme cuando más los necesite, de sobra saben que cuentan conmigo para todo, gracias por enseñarme que la vida no es un lugar oscuro, por el contrario con sus maneras tan diversas de ver la realidad, me han enseñado que es la diversidad, lo que hace interesante estar aquí. Héctor, por tu nobleza de espíritu siempre te irá bien en la vida, te lo garantizo porque te lo mereces. Alejandro, no permitas que el mundo cambie un ápice de tu mancha de ser con los demás ya que tienes eso que es tan raro de encontrar, esperanza y fe en otros.

A mis amigos que les ha tocado lidiar conmigo en las buenas y en las malas y en ocasiones en las peores, a ustedes a quienes no tengo palabras para agradecerles que me hayan enseñado una y otra vez cuando estoy equivocado (que suelen ser tantas cosas) y que tienen tanto que enseñarme. Alan porque sabes que ocupas un lugar especial, por tu amistad en mi vida, Verónica por tu apoyo emocional en todas mis locuras, saben que siempre están en mis pensamientos y que contarán conmigo en todo momento. A mis compañeros de residencia por haberme enseñado tanto o más que los libros, de la realidad de nuestra profesión, por su compañerismo y aliento en los momentos más difíciles de la carrera.

A mis maestros por su pasión en lo que hacen, por los conocimientos compartidos, por su dedicación a la enseñanza, por enseñarme a ser analítico y por nunca conformarme con el conocimiento que tengo, gracias por enseñarme a siempre ir más allá.

Agradecimientos

Agradezco con todo mi corazón a la Dra. Rosenda Peñaloza Espinosa por su pasión en la enseñanza, por el compartir innumerables horas de laboratorio enseñándome un área nueva de conocimientos que representa para mí la biología molecular, un conocimiento que me temo, llegó para quedarse, y más aún, inculcarme la necesidad de mantenerse actualizado en un campo siempre cambiante, gracias por su amistad, infinita paciencia y todos los consejos recibidos (y los que faltan por llegar), mil gracias Dra. Rosenda.

Quiero agradecerle al Dr. Fabio Salamanca Gómez en primer lugar por su confianza al admitirme para cursar la especialidad en el Centro Médico Nacional Siglo XXI Hospital de pediatría, agradecerle por su optimismo, las discusiones científicas y culturales realizadas durante sus clases, quien a pesar del escaso tiempo libre con que cuenta siempre encontró momentos para atender nuestras preocupaciones tanto a nivel humano como en relación a los conocimientos que adquirimos a lo largo de la carrera, gracias Dr. Fabio por siempre tratarme como a un colega, aunque nos lleva a todos los residentes una enorme ventaja de conocimientos, puedo afirmar que solo recibimos atenciones de su parte.

Deseo externar mi agradecimiento más sincero a todos los investigadores del servicio de biología molecular, Dr. Diego por su eterna buena cara y por siempre encontrar un instante para aclarar cuanta duda tuviéramos en la cabeza en relación a la biología molecular, gracias por sus bromas irreverentes y por su dedicación para con nosotros. Dr. Ramón Coral, gracias por los consejos recibidos durante la revisión de la tesis, fueron vitales para la culminación y aceptación de la misma. Dra. Haydec, gracias por siempre interesarse en nuestras preguntas y ayudarnos a comprender lo intrincado de la investigación en genética, pero por sobre todo, por su apoyo constante en la búsqueda de conocimientos. Finalmente agradezco a todo el personal del servicio de Citogenética por los conocimientos compartidos en un área que, como la medicina, es ciencia y arte, que requiere de muchísima práctica y de mucho cariño por lo que se hace. Especialmente agradezco a los Drs. Jorge Martín y Herminia Benítez del servicio de hematología pediátrica del CMN S XXI HP por sus sugerencias al estudio realizado y por la estrecha colaboración que siempre nos brindaron. Gracias a todos.

“No llores por el sol que muere al anocheccer, ya que las lágrimas te impedirán gozar de las estrellas”

Rabindranath Tagore.

“Si puedo ver un poco más allá en el horizonte que el resto de los hombres, es porque estoy parado sobre los hombros de gigantes”

Sir Isaac Newton

“Solamente es ciega, la persona que no ve la vida con los ojos del corazón”

Nauj Egroj

“La medicina cura unas veces, alivia otras y consuela siempre”

Anónimo

“Practerita Non Mutatis, Ergo, Carpe Diem”

(el pasado no cambia, por lo tanto, vive el presente)

“Nada en el universo ocurre al azar”

Albert Einstein.

“Solo existen dos cosas seguras...lo infinito del universo y la estupidez humana...y de la primera no estoy tan seguro”

Albert Einstein.

“Lo esencial es invisible a los ojos”

Antoine de Saint-Exupéry

“El principito”

100
100
RESPONSE

Juan Jorge Palacios
Cibola 93
29/04/04



Resumen

La enfermedad de von Willebrand (VWD) se caracteriza desde el punto de vista clínico por presentar anomalías cualitativas o cuantitativas relacionadas con el factor de von Willebrand (VWF) mismo que tiene un lugar de vital importancia en el sistema de coagulación al participar directamente con las plaquetas formando puentes de unión entre las mismas y el sitio de lesión vascular además de proteger al factor VIII de una prematura degradación en el plasma. Alteraciones en la secuencia genética de este gen (mutaciones) pueden traducirse en disminución o ausencia de la adhesividad plaquetaria y a deficiencia secundaria de factor VIII. La deficiencia hereditaria del VWF es el trastorno hemorrágico más común en el ser humano. Se encuentra localizado en el cromosoma 12p13.3. En el presente trabajo se aborda un repetido VNTR (variable number tandem repeat, repetido en tandem de número variable) que ha sido útil en los estudios de ligamiento realizados en otras poblaciones por ser un marcador molecular intragénico de repetidos TCTA localizado en el intrón 40 del VWF, ya que ha mostrado presentar una gran heterocigocidad y ser altamente polimórfico, características esenciales para un buen marcador génico, que en este caso, tiene la ventaja de que se encuentra segregando con la enfermedad de von Willebrand.

El objetivo primordial del trabajo es determinar el grado de heterocigocidad de dicho marcador en nuestra población ya que no se cuentan con datos al respecto, para lo cual realizaremos el estudio del mismo en dos grupos principales de sujetos, 1) pacientes con el diagnóstico de enfermedad de von Willebrand así como sus familiares en primer grado y 2) un grupo control integrado por sujetos pertenecientes a tres poblaciones indígenas del país. Para el análisis de la heterocigocidad del este marcador se estudiaron un total de 38 individuos para el primer grupo y de 39 para el segundo. Se aisló DNA nuclear de cada individuo y se amplificaron los segmentos correspondientes a la secuencia de interés por medio de la técnica de PCR (polimerase chain reaction, reacción en cadena de la polimerasa). Los productos amplificados se analizaron primero en geles de agarosa al 2% para comprobar que se tenía suficiente amplificado y después en geles de poliacrilamida al 8%. La heterocigocidad encontrada para dicho VNTR fue del 60% para los pacientes con el

diagnóstico de VWD, del 70.5% para los padres, del 81% para los hermanos. Para el grupo control se encontraron las siguientes heterocigocidades: en purépechas del 71.4%, en náhuas del 86% y de 33% en otomís.

Los hallazgos de este estudio orientan a pensar que este VNTR tiene un buen nivel de heterocigocidad lo que vuelve útil para un estudio de ligamiento. Los estudios de ligamiento actualmente requieren la valoración de múltiples marcadores genéticos para aumentar su nivel de especificidad. Gracias al estudio de otros VNTR similares al que se estudio sería factible construir un haplotipo con potencial en el estudio de ligamiento genético de esta enfermedad lo que implicaría contar con una herramienta más para facilitar el diagnóstico de dicha enfermedad y realizar un análisis de otros probables enfermos en la familia aunque no tengan datos de sangrado, lo que por supuesto tendría gran impacto en el diagnóstico y en el asesoramiento genético de esta coagulopatía hereditaria.

Introducción

El mantener la integridad del sistema de coagulación en los organismos superiores con un sistema circulatorio cerrado, es un punto crítico para asegurar su sobrevivencia en un medio ambiente en el que se expone a múltiples eventos que pueden poner en peligro la continuidad y adecuada función de dicho sistema circulatorio. Un sistema complejo y altamente regulado se ha desarrollado para satisfacer esta función protectora que a grandes rasgos depende múltiples elementos que deben interaccionar de manera coordinada, estos elementos los podemos clasificar en tres grandes grupos, 1) células endoteliales que forran el interior de los vasos sanguíneos, 2) las plaquetas y 3) las proteínas plasmáticas involucradas en el sistema de coagulación. Estas últimas son las que más han llamado la atención desde el punto de vista genético-hematológico ya que los desórdenes hereditarios del sistema de coagulación (coagulopatías hereditarias) tienen una elevada tasa de incidencia y prevalencia, además de que representan problemas serios para mantener una adecuada calidad de vida en el paciente afectado, o tienen implicaciones a nivel del consejo genético por los diversos mecanismos de herencia conocidos para las mismas.

De este enorme grupo de patologías, abordaremos en el presente estudio a la más frecuente de todas las coagulopatías hereditarias, la enfermedad de von Willebrand (VWD por sus siglas en inglés, von Willebrand Disease). A diferencia de otras alteraciones del sistema de coagulación en las que se puede observar una correlación lineal entre el déficit del factor involucrado y las manifestaciones clínicas, como en las hemofilias, en la VWD esto no es posible, ya es extremadamente compleja en su fisiopatología, presenta una gran variación fenotípica y una enorme heterogeneidad genotípica, aunado a esto, la gran mayoría de los casos no son diagnosticados con facilidad y muchas de las formas de la misma son leves por lo que pasan desapercibidas para el personal médico poco familiarizado con la misma, ya que presenta tanto defectos cuantitativos como cualitativos de la proteína producida, misma que se involucra en dos funciones biológicas básicas: se une a receptores específicos en la superficie de las plaquetas y al tejido conectivo subendotelial, y forma puentes entre las plaquetas y las regiones dañadas de los vasos.

Además se une al factor de la coagulación VIII y lo estabiliza. La deficiencia del factor de von Willebrand (VWF por sus siglas en inglés, von Willebrand Factor) conduce a la disminución o a la ausencia de adhesión plaquetaria y a deficiencia secundaria del factor VIII, con los lógicos problemas para el diagnóstico diferencial con hemofilia clásica, lo que repercute directamente en el tratamiento, pronóstico y asesoramiento genético del paciente y de la familia.

El porque estudiar esta enfermedad desde el punto de vista genético se entiende en cuanto a la repercusión de la enfermedad a nivel social, ya que es, como ha sido mencionado antes, la coagulopatía hereditaria más común, si tomamos en cuenta a todas sus variantes, 1:250 personas esta afectada por algún subtipo de la enfermedad lo que representa casi al 1% de la población mundial, y 1:8000 para las formas severas, que afectan a ambos sexos por igual, si tomamos como relación a la hemofilia clásica, esta afecta a 1:10000 recién nacidos varones, por lo que es mucho más frecuente la VWD y debería ser la primera opción diagnóstica cuando nos enfrentamos a un paciente con datos compatibles con una alteración en el sistema de coagulación. El objetivo es estudiar esta patología tan común en el área de la hematología-genética clínica para tratar de iniciar una línea de investigación que ayude a diseñar en un futuro herramientas útiles para el diagnóstico y el asesoramiento genético de esta enfermedad como lo es el utilizar marcadores moleculares intragénicos, misma línea que ha sido de gran utilidad para el análisis de ligamiento de esta patología en otras partes del mundo, en ocasiones esto es de vital importancia, especialmente en los lugares donde no se cuenta con centros de investigación de tercer nivel donde se puedan realizar estudios complejos que son necesarios para el diagnóstico definitivo de la enfermedad así como para la subclasificación de la misma, donde por cierto, la clasificación puede subdividirnos a esta patología en casi 20 subtipos que se basan en sutiles datos de laboratorio o clínicos difíciles de detectar en general o de realizar desde el punto de vista laboratorial.

Tomemos por ejemplo los estudios de multímeros, considerados por la mayoría de los investigadores como estudios confirmatorios de la enfermedad que permiten realizar la subclasificación para el subtipo 1 y 2, estos estudios no se realizan en la mayor parte de los hospitales de este país, son difíciles de realizar y aún más difíciles de interpretar. Por otro lado, los estudios moleculares en búsqueda de mutaciones directamente relacionadas con defectos cualitativos es más fácil, rápido y sin tantos problemas de interpretación como el estudio de multímeros; los estudios de ligamiento utilizando marcadores moleculares son relativamente sencillos de realizar, no tan costosos y tienen la ventaja de que son útiles en el asesoramiento genético, cuando es posible armar haplotipos (conjunto de varios marcadores genéticos que segregan junto con la enfermedad pero no son la causa de la misma) esto tiene gran impacto dentro de la genética médica y de la hematología. Tenemos la gran desventaja de que para poder realizar estudios de marcadores moleculares (especialmente los VNTR, Variable Number Tandem Repeats como el repetido TCTA que usaremos) es primero necesario saber si el marcador "potencial" es realmente útil en nuestra población, es decir, si es lo suficientemente polimórfico, con gran heterocigocidad (encontrar alelos con gran variabilidad en el número de repetidos). Una vez teniendo este resultado, se puede inferir que otros marcadores ya estudiados y comparados con el mismo podrían tener una función y utilidad similar a la reportada en la literatura y armar haplotipos con una base sólida de utilidad potencial en nuestra población. El estudio de los padecimientos hereditarios hematológicos es un campo enorme, sin duda apasionante en el que esperamos poder aportar algo más en el desarrollo científico de nuevas herramientas de investigación básica con un valor potencial aplicable a la genética clínica y a la hematología.

Dr. Juan Jorge Palacios Casados



ANTECEDENTES:

El Dr. Erich von Willebrand descubrió en 1926 un nuevo trastorno de la hemostasis diferente a la hemofilia clásica en las islas Aland¹. En su momento, el Dr. von Willebrand la llamó "pseudohemofilia". Sus más importantes características clínicas eran un prolongado tiempo de sangrado, afectación del aparato gastrointestinal, urinario, así como sangrado uterino anormal; la hemartrosis por otro lado era rara en estos pacientes. Este padecimiento también mostraba mejoría conforme aumentaba la edad del paciente. Poco después von Willebrand y Jurgens, en 1933, sugiriere el nombre de "trombopatía constitucional"². Sería conocida con el tiempo como "hemofilia vascular". Eventualmente se lograría demostrar que las plaquetas son intrínsecamente normales, sin embargo, su adhesividad esta comprometida debido a que existe un déficit de factor VIII (FVIII) y también se observó que el plasma de los pacientes con hemofilia clásica corregía las alteraciones hematológicas, tanto en la adhesividad plaquetaria como en el déficit de FVIII, sin embargo, la sangre de un paciente con enfermedad de von Willebrand (VWD por sus siglas en inglés) no corregía los defectos de coagulación de un paciente con hemofilia clásica³⁻⁵. Mucho tiempo pasaría para que se comprendiera totalmente el papel del VWF en la cascada de la coagulación y aún más para demostrar los cambios que ocurren a nivel molecular en esta coagulopatía hereditaria.

Se calcula que el 1% de la población mundial padece de alguna variante de la enfermedad de von Willebrand y que se presentan 125 casos de relevancia por cada millón de habitantes, lo que la convierte en la coagulopatía hereditaria más frecuente, con una incidencia prácticamente del doble en relación a la hemofilia clásica⁶. Esta puede pasar desapercibida debido a que existen muchos subtipos en la clasificación, cada uno con sus características moleculares y clínicas especiales, que pueden ir desde características fenotípicas muy discretas (sangrados más prolongados y abundantes de lo esperado en

procedimientos quirúrgicos, odontológicos etc) o los cuadros graves cuya presentación clínica es indistinguible de la hemofilia clásica severa^{7,8}. Hombres y mujeres se ven afectados por igual y esto se observa en todas las razas. Debe hacerse mención de que la forma de presentación más severa (la variante autosómica recesiva) se observa con mayor frecuencia en Suecia, Israel e Irán, muy probablemente secundario a la alta endogamia y/o consanguinidad que se observa en estas regiones⁹.

Clasificación: La clasificación más actual para la VWD se basa en los defectos de la proteína que se forma, y los agrupa en tres grandes grupos dependiendo de si el defecto es cuantitativo leve (tipo 1), cualitativo (tipo 2) y cuantitativo grave (3)^{10,11}.

TIPO 1: Variante más común de la enfermedad de VW y representa más del 70% de los casos. Presenta una deficiencia cuantitativa moderada del VWF, el cual es, funcionalmente normal. Su penetrancia es incompleta. Apenas el 60% de los pacientes afectados muestran anomalías en los laboratorios.

TIPO 2: Se caracteriza por alteraciones cualitativas en el VWF. En relación al defecto observado en la formación de multímeros, se subclasifica en varios tipos:

2A: Defectos funcionales de VWF con función disminuida de la función dependiente de la plaqueta y se asocia con ausencia de multímeros de medio y alto peso molecular. Ginsburg describe las primeras mutaciones asociadas a esta variante alélica de la enfermedad, arginina por triptófano en la posición 834, valina por aspartato en la posición 844 e isoleucina por treonina en la posición 865, todos estos cambios localizados en secuencias codificantes. En esta variante encontramos una proteólisis aumentada de grandes multímeros y presencia de múltiples fragmentos de 176 kD.

2B: Se observa un incremento de la actividad del VWF hacia la glicoproteína Ib (GPIb) plaquetar. Es interesante hacer notar que la mayoría de las mutaciones reportadas para esta variante se relacionan con cambios puntuales, C por T en los dinucleótidos CG, localizados entre las posiciones 504 y 695 y se asocia a la formación de asas (mediante puentes disulfuro) entre cisteínas. El cambio de arginina por cisteína en la posición 545 es también relativamente frecuente en el norte de Europa.

2M: Conocida también como tipo Vicenza. Engloba a las variantes funcionales con disminución de la función plaquetar dependiente y sin pérdida de multímeros de alto peso

molecular. El cambio molecular más frecuentemente reportado es el de arginina por histidina en la posición 1205.

2N: También llamada tipo Normandía. Presenta defectos en la unión del VWF con el FVIII de coagulación, lo que puede mimetizar a una hemofilia clásica entre leve y moderada, y aún más interesante, presenta un patrón de herencia que recuerda más a las enfermedades autosómico recesivas que a las recesivas ligadas a X. El cambio molecular reportado es el cambio de un una treonina por una metionina en la posición 28 del sitio de unión a F8I de la proteína VWF.

TIPO 3: Presenta un tipo de herencia autosómica recesiva, con niveles muy bajos o indetectables de VWF. Estos pacientes presentan trastornos hemorrágicos graves, muy similar al fenotípico de la hemofilia A grave. Su frecuencia es de 1 por 100 000 habitantes y los portadores obligados son casi siempre asintomáticos. En este caso, una mutación puntual, C por T, afecta a la arginina de la posición 1659 produciendo un codón de paro en el exón 28. Mutaciones sin sentido también han sido reportadas (CGA a TGA) en los exones 28, 32 y 45.

El protocolo de estudios para los pacientes en los que se sospecha VWD debe comprender, mínimo, los siguientes estudios de laboratorio, además de la valoración clínica y los antecedentes genéticos-hematológicos de la familia¹²:

- 1) Tiempo de hemorragia y actividad de F VIII.
- 2) Actividad del cofactor de ristocetina.
- 3) Agregación plaquetar inducida por ristocetina (RIPA).
- 4) Cuantificación del factor VW
- 5) Medida funcional CBA (collagen binding assay).
- 6) Grupo sanguíneo.
- 7) Análisis de estructura multimérica.
- 8) Captación de factor VIII por el factor de VW.
- 9) Ensayo de unión a colágena.
- 9) Grupo sanguíneo.

Las pruebas más sensibles para el dx, según Ulrich Budde,¹³ son la actividad del cofactor de ristocetina, el estudio de multímeros y la determinación del Ag-VWF. Factores que modifican las concentraciones de VWF y deben ser tomados en consideración son: el grupo ABO, estrógenos, la edad, niveles de hormonas tiroideas y estrés, aunque existen muchas otras pruebas de laboratorio que se relacionan con el dx. de la enfermedad de von Willebrand, la mayoría son muy complejas o aún se encuentran en fases experimentales.¹⁴⁻¹⁶ Es relativamente sencillo diagnosticar el tipo 3 por parámetros clínicos y de laboratorio; es muy difícil diagnosticar los tipos 1 y 2 usando solamente parámetros de laboratorio.

Es importante conocer algunos aspectos de la biología molecular del gen y de la actividad fisiológica de la proteína sintetizada por el mismo para comprender la etiopatogenia de la enfermedad, lo que permite entender el motivo por el cual se aborda esta patología como proyecto de investigación y también nos permite entender la utilidad de los polimorfismos moleculares y su potencial aplicación a la práctica clínica en general, pero sin duda con más impacto en las áreas de la genética médica y la hematología.

El gen VWF se localiza en el brazo corto del cromosoma 12 (12p13.3)^{17,18}, mide aproximadamente 178 kb y contiene 52 exones¹⁹. Los exones pueden variar en su tamaño (de 40 a 1379 pares de bases) lo mismo se puede decir en relación a los intrones (de 19 a 97 pares de bases). El gen codifica para una preproteína que contiene además de la proteína de VW, dos regiones llamadas propéptido (antígeno de VW II) y otra conocida como péptido señal, las cuales son codificadas por 17 exones en una región de aproximadamente 80 kb de DNA, mientras que la subunidad madura de VWF es codificada por 35 exones en la porción restante del gen²⁰.

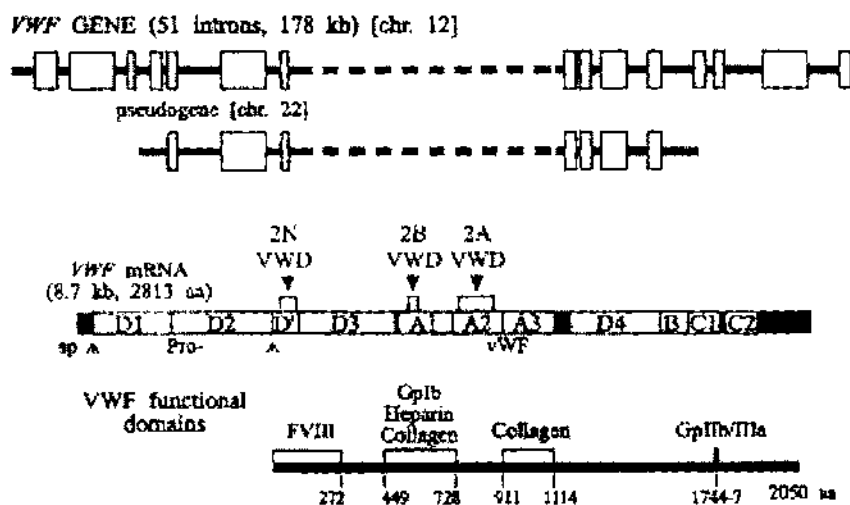


Figura 1. Estructura del gen VWF y de su mensajero. Se observan las estructuras esquemáticas del gen y del pseudogen VWF así como la localización cromosómica de cada uno de ellos en la parte superior de la imagen. El correspondiente RNA mensajero también se incluye. En las porciones marcadas con flechas se indican los puntos donde ocurren más frecuentemente las mutaciones relacionadas con la VWD. Tomado de Ginsburg D⁴⁴, 1999.

Se han identificado secuencias repetidas, incluyendo 14 secuencias conocidas como Alu y una secuencia simple polimórfica TCTA de 670 pares de bases en el intrón 40²¹ que es muy importante debido a que segrega junto con la enfermedad.

Existen muchas mutaciones documentadas para cada una de las variantes de VWD, mismas que no serán abordadas en este trabajo; basta agregar que existe un pseudogen en el cromosoma 22 (22q11-q13) de 23 kb y corresponde a los exones 23-34 del gen de VW (homología del 97%) en el que se han encontrado mutaciones sin sentido, lo que sugiere que el pseudogen no codifica para ninguna proteína, sin embargo, su similitud con el gen de VW, puede complicar en ocasiones su estudio a nivel molecular²². El gen se expresa mayoritariamente en células endoteliales y megacariocitos²³. Es interesante hacer notar que el gen puede dividirse en segmentos repetidos de aminoácidos, regiones conocidas como dominios (A,B,C y D). El factor de VW se sintetiza en las células endoteliales y en los megacariocitos, esto cobra una importancia capital, ya que es en los puntos donde más se necesita. La proteína VWF existe como una serie de multímeros que varían de peso molecular desde 05 (dímeros pequeños) hasta 20 millones (multímeros de alto peso molecular)²⁴. Este factor circula en el plasma como una glicoproteína multimérica, muy grande que pueden alcanzar un peso de 20,000 kD; el VWF juega un papel crítico en la hemostasia primaria mediando la adhesión de las plaquetas al subendotelio y entre las

mismas plaquetas, en el lugar del daño vascular, en especial en condiciones de altas fuerzas de cizalladura que son las que prevalecen en la microcirculación. Actúa además como transportador de la proteína procoagulante llamada FVIII, a la que estabiliza y protege de una degradación prematura en el plasma y lo sitúa en el lugar de la herida para la consiguiente formación del coágulo de fibrina²⁵.

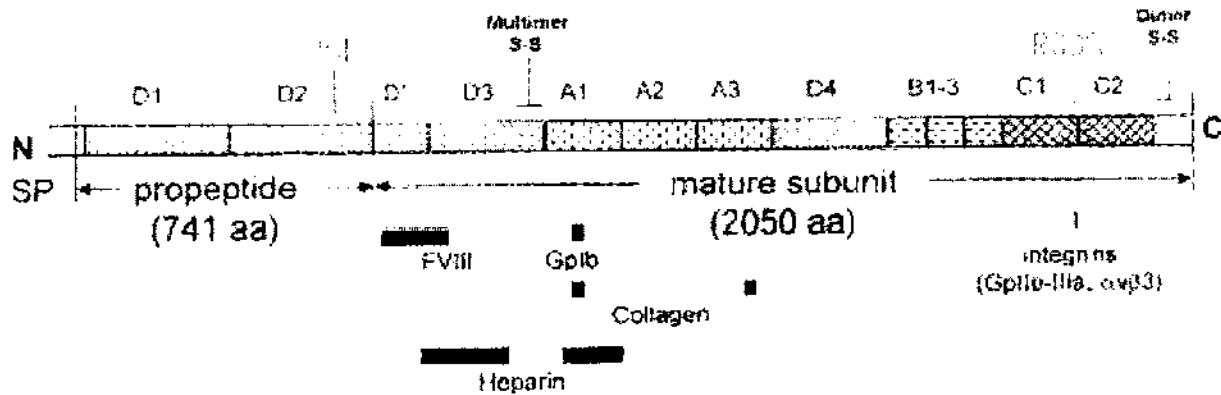


Figura 2. Dominios estructurales del pro-VWF. Entre paréntesis se encuentran el tamaño (en número de aminoácidos, aa) del propeptido y de la subunidad madura. Los sitios de unión para otras moléculas están indicados en rectángulos negros y los puntos de unión para multímeros y dímeros están marcados por las letras S-S. Tomado de Ginsburg D, 1999.

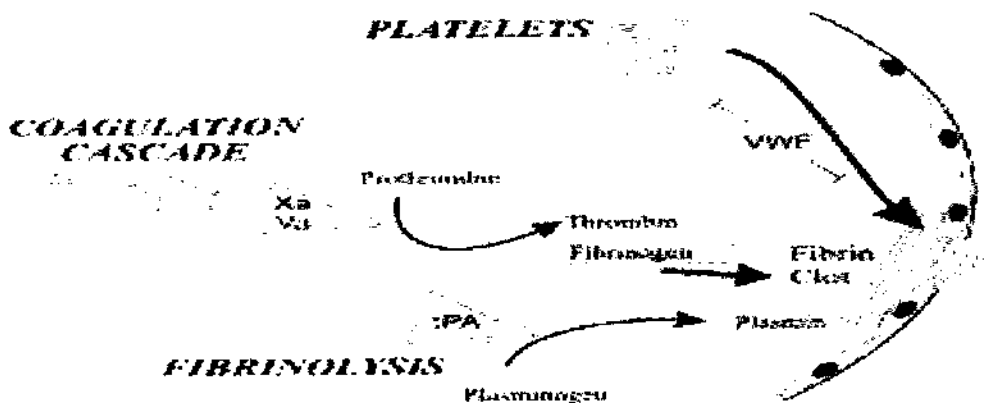


Figura 3. Función del VWF. El VWF es sintetizado en las células endoteliales y en los megacariocitos. Este factor provee un enlace adhesivo entre las plaquetas y los sitios de daño a nivel de la pared vascular, además de servir como acarreador del factor VIII. Tomado de Ginsburg D⁴¹, 1999.

Es interesante hacer notar que existen pocos estudios en la literatura que hablan sobre la utilidad del uso de los polimorfismos genéticos en los análisis de ligamiento o mejor dicho, de asociación con la enfermedad de von Willebrand, estudios que suelen ser sencillos, rápidos gracias al uso de técnicas de biología molecular como es la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés, Polimerase Chain Reaction) y que podrían tener utilidad clínica ya que algunos parecen verse asociados (ligados) con la enfermedad; es especialmente útil el estudio de un repetido polimórfico tetranucleótido (VNTR, por sus siglas en inglés, variable number tandem repeats, repetidos en tandem de número variable) TCTA, en el intrón 40, como ya lo ha descrito en población norteamericana Sadler²⁶, en la francesa Gaucher²⁷ y el más reciente estudio del mismo intrón por Mazzini²⁸ en población brasileña, encontrando en este último estudio el VNTR más útil para el estudio de ligamiento (VNTR 1, que muestra gran homología con el VNTR que nosotros usamos en nuestro estudio) además de reportar un nuevo marcador polimórfico de 14 repetidos nunca antes descrito para dicha población.

Sin embargo, había sido difícil encontrar en los análisis de ligamiento de marcadores intragénicos del VWF que tuvieran una asociación constante con la VWD²⁹; recientemente, en un estudio realizado por Casaña en población española, encuentra datos sugestivos de un posible marcador intragénico para la variante tipo 1 de la VWD³⁰. Si bien es cierto que en población mexicana no contamos con datos en relación a los aspectos moleculares propios de este gen, esto no quiere decir que no se han hecho estudios clínicos-epidemiológicos en relación con la enfermedad de von Willebrand.

Benitez-Aranda ha informado sobre la experiencia que tiene el servicio de hematología del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI, manejando niños con el diagnóstico de esta enfermedad, describiendo como se comporta esta patología desde el punto de vista clínico, haciendo mención de las características más relevantes desde el punto de vista hematológico y concluye diciendo que esta coagulopatía hereditaria presenta quizá, un gran subregistro debido a que no se cuenta con pruebas específicas para hacer el diagnóstico de certeza en la mayoría de los hospitales de nuestro país⁸. A pesar de lo mucho que se ha avanzado desde el punto de vista del diagnóstico molecular, pocas herramientas han sido diseñadas específicamente para el estudio de dicha patología que hayan sido validadas en población mexicana, y como es mencionado por Rafael-

Jiménez³¹, al no poder subclasificar correctamente a esta patología, no se da el tratamiento adecuado para la misma en la mayoría de los países que no cuentan con los adecuados avances tecnológicos para realizar diagnósticos de certeza o por no contar con personal con gran experiencia clínica en esta patología.

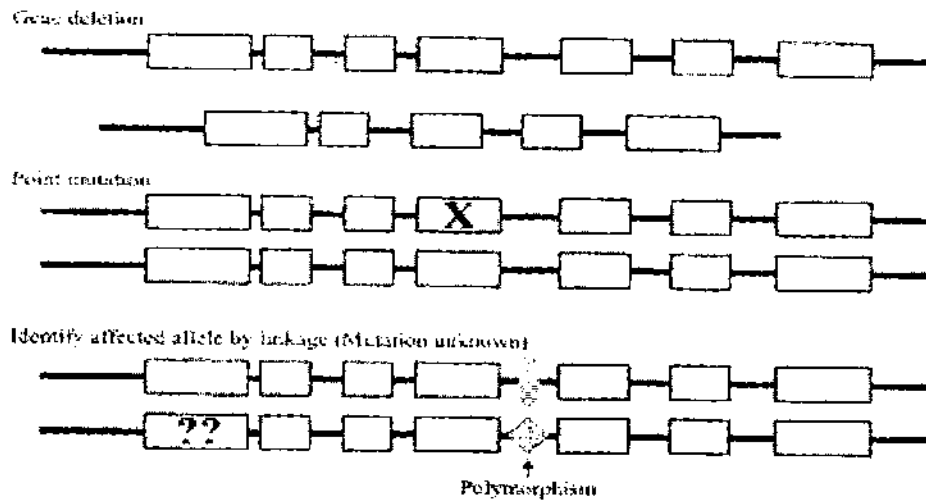


Figura 4. Mecanismos de origen de la VWD. En la parte superior se describe el mecanismo de delección génica que lleva obviamente a interrupción de la secuencia génica. Las mutaciones puntuales han sido ampliamente reconocidas como responsables de diversas formas de VWD. Finalmente, las mutaciones desconocidas pueden ser "rastreadas" a un punto específico del gen utilizando análisis de ligamiento con marcadores genéticos. Tomado de Ginsburg D⁴⁴, 1999.

Este proyecto de investigación pretende sentar las bases para estudios moleculares más adelante utilizando más marcadores génicos polimórficos que ayuden al diagnóstico y a la subclasificación de la enfermedad en el futuro, y quizá, en el estudio de análisis de ligamiento, especialmente para identificar los alelos afectados con la enfermedad cuando no conocemos la mutación. Cabe mencionarse que ya se ha desarrollado una herramienta molecular utilizando marcadores polimórficos intragénicos en este hospital que tienen un papel potencial enorme en la búsqueda de portadoras para otra coagulopatía hereditaria como es la hemofilia clásica³², esperamos poder continuar con la importante línea de investigación que representan las coagulopatías hereditarias.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

¿Cuál es la frecuencia del polimorfismo molecular TCTA del i40 en población mexicana (mestiza e indígena) así como en pacientes con enfermedad de von Willebrand y sus familiares de primer grado?

JUSTIFICACIÓN:

Para los grupos caucásicos se han informado una serie de polimorfismos que segregan ligados de manera significativa con alguna enfermedad. Debido a que la población mexicana presenta una mezcla de genes indígenas, caucásicos y africanos en diferentes proporciones, es necesario investigar la relación entre un polimorfismo ya referido anteriormente en la literatura mundial que puede tener valor significativo con la presencia de la enfermedad en el intrón 40 (repetidos TCTA); estudio importante ya que no existen informes en relación a población mexicana ni de pacientes con el diagnóstico de enfermedad de von Willebrand. Por este motivo, nos propusimos a realizar este estudio empleando herramientas básicas de biología molecular como la ampliación del segmento, por reacción en cadena de polimerasa (PCR), su análisis electroforético y secuenciación de los casos representativos. Esto permite conocer la prevalencia de dicho polimorfismo en población mexicana sana (mestiza e indígena) y en pacientes con diagnóstico de enfermedad de von Willebrand y sus familiares de primer grado, esto permitirá conocer el número de repetidos más frecuente en ambas poblaciones. Además servirá para justificar el estudio de otros marcadores polimórficos y realizar estudios de ligamiento con la enfermedad de von Willebrand. Los resultados permitirán conocer un poco más la constitución genética de nuestra población y determinar si vale la pena realizar más estudios de marcadores moleculares en esta región génica.

OBJETIVO GENERAL:

Analizar la región polimórfica intragénica de repetidos TCTA del i40 en una muestra de población mexicana (mestiza e indígena) sana así como en una muestra de pacientes con dx de enfermedad de von Willebrand y sus familiares de primer grado para determinar su frecuencia en ambas poblaciones.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- 1) Estandarizar metodología de secuenciación.
- 2) Estandarizar metodología de PCR.
- 3) Analizar muestras de individuos mestizos e indígenas mexicanos sin datos de coagulopatías hereditarias.
- 4) Analizar muestras de pacientes con el dx de enfermedad de von Willebrand y sus familiares de primer grado.
- 5) Analizar el polimorfismo TCTA en dichos individuos y determinar su grado de heterocigocidad y su valor como marcador polimórfico en la población mexicana.
- 6) Conocer cuál es el número de repetidos en tandem TCTA más frecuente para la población mexicana (tanto en los pacientes como en la población sana).
- 7) Determinar si se puede aplicar este polimorfismo en un futuro estudio de ligamiento en pacientes con enfermedad de von Willebrand o si es necesario utilizar otros marcadores polimórficos ya descritos.
- 8) Informar los resultados en tesis y publicación en revista médica apropiada.

MATERIAL Y METODOS:

Sujetos:

Se estudió un grupo de 40 individuos (indígenas mexicanos sin ancestros extranjeros en al menos dos generaciones) no relacionados sin antecedentes de VWD o de otras coagulopatías hereditarias. Se incluyeron también los pacientes con diagnóstico de enfermedad de von Willebrand enviados por el servicio de hematología del Centro Médico Nacional Siglo XXI Hospital de Pediatría, así como a sus familiares de primer grado (sin importar para estos casos si existen antecedentes de abuelos o padres europeos).

Los aspectos éticos se cubrieron mediante el consentimiento informado y la aceptación del comité de ética del Hospital.

Técnicas:

A) Se extrajeron 10 ml de sangre venosa periférica por medio de extracción convencional. De este volumen se procesará el DNA de leucocitos, previa centrifugación de 10 ml de sangre total tratada con EDTA como anticoagulante y se trata con solución de lisis para destruir a los eritrocitos previamente separados por centrifugación, se utilizará el método de alta concentración de sales para purificar y aislar una pastilla de DNA a través de extracciones fenólicas como lo describió Kempter³³

B) Se realizó la amplificación del i40 junto con el repetido TCTA por PCR y electroforesis de los productos en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio (0.5 ul) y poliacrilamida no desnaturalizante al 8% con voltaje constante de 200 voltios durante 16 horas; para dichos geles, en cámaras de 33 cm de longitud con separadores de 1.2 mm de espesor. Posteriormente (los geles) teñidos con bromuro de etidio; ambas técnicas basadas en lo descrito por Sambrook³⁴ para la elaboración de geles de agarosa y poliacrilamida. Se realiza la lectura de los geles y el análisis de los mismos de acuerdo a marcadores de peso molecular.

Criterios de inclusión.

Para los casos:

- 1) Pacientes enviados del servicio de hematología pediátrica de este hospital con el dx de VWD.
- 2) Edades comprendidas desde el nacimiento hasta los 16 años.

Ambos sexos.

- 3) Pacientes cuyos padres hayan aceptado que sus hijos participen en dicho estudio firmando un consentimiento informado.

Para los controles:

- 1) Se seleccionarán 100 individuos (50 mestizos y 50 indígenas) no relacionados con los pacientes como grupo control.
- 2) Tener padres y abuelos mexicanos.

Criterios de no inclusión.

Para los casos:

- 1) No se incluirán a aquellos individuos que no deseen participar en el estudio.

Para los controles:

- 1) No se incluirán a aquellos elementos del grupo control que tengan antecedentes de padres y/o abuelos extranjeros.

Criterios de eliminación.

Para los casos y controles:

- 1) Muestras sanguíneas insuficientes para su procesamiento en el laboratorio de biología molecular.
- 2) Muestras en las que no se pueda extraer suficiente DNA para su estudio en los geles de poliacrilamida.

Tipo de estudio: (Por sus características)

- 1) Por su maniobra: Observacional.
- 2) Por la presencia de un grupo control: Comparativo
- 3) Por su ceguedad: Abierto.
- 4) Por la dirección del análisis: Prospectivo.
- 5) Por la captación de los datos: Prolectivo.
- 6) Por el número de mediciones: Transversal.

Factibilidad:

Recursos:

- a) Humanos: Los investigadores que realizaron el estudio son el residente de tercer año de la especialidad en Genética Médica Dr. Juan Jorge Palacios Casados y un tutor, Dra. en el área de Biología Molecular Dra. Rosenda Peñaloza Espinosa. Se cuenta con la asesoría de Médicos co-responsables del proyecto, en el área de hematología pediátrica la Dra. Herminia Benítez Aranda, en el área de Genética Médica Dr. Fabio Salamanca Gómez y en el área de Biología Molecular el Dr. Diego Arenas Aranda.
- b) Materiales: Se cuenta con los recursos físicos necesario en la Unidad de Investigación en Genética Humana del Centro Médico Nacional Siglo XXI, Hospital de Pediatría como son cámaras de electroforesis para geles de agarosa y poliacrilamida, se cuenta con termocicladores y cámaras para PCR y secuenciador.
- c) Financieros: Se cuenta con recursos económicos para la realización de dicho proyecto (IMSS-FOFOI-2002/108).

Variables:

Independientes:

- 1) Polimorfismo molecular de repetidos TCTA del intrón 40 del gen VWF.
- 2) Edad.
- 3) Género
- 4) Lugar de procedencia
- 5) Estado socioeconómico.

Resultados

En las figuras 5-10 se observan los resultados de los electroferogramas en geles de poliacrilamida de las muestras previamente amplificadas por PCR del VNTR TCTA del intrón 40 del gen VWF. El tamaño de las bandas se obtuvo graficando la longitud (mm) del marcador de peso molecular contra el tamaño (pares de bases). Se amplificó una región de 110 pb que incluye seis repetidos TCTA, por lo que la variación en el tamaño sugiere que es originada por la variabilidad del VNTR. Esto se comprobará más adelante con secuenciación. Se encontró una alta frecuencia de heterocigocidad, tanto en los indígenas como en los pacientes con VWD y sus familiares en primer grado (padres y hermanos) (todos mestizos).

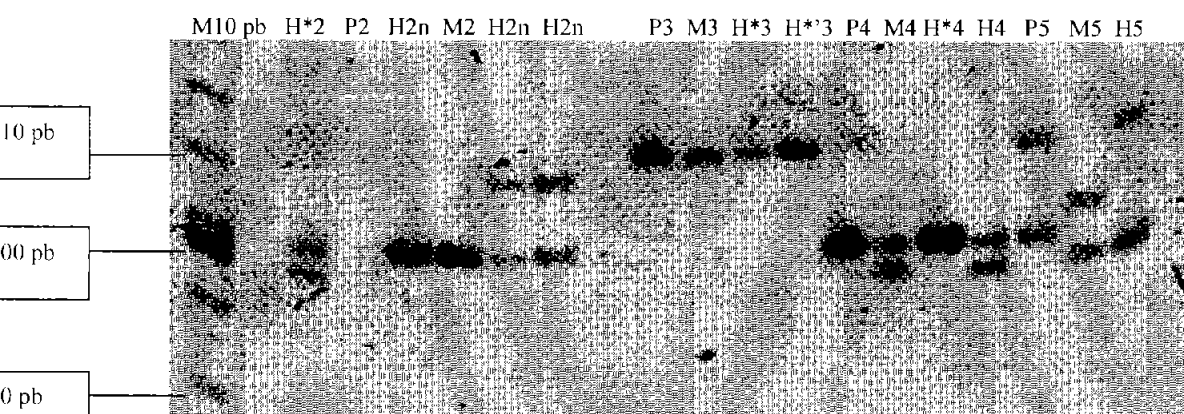


Figura 5. Electroferograma de los productos de amplificación por PCR del VNTR-TCTA del I40-VWF que corresponden a las familias 2, 3, 4, 5 con pacientes con diagnóstico de VWD (marcados con un asterisco); la familia 3 tiene dos casos índices, que se tratan de gemelas monocigóticas. El marcador de peso molecular se encuentra a la izquierda de la imagen. M= Marcador de 10 pb, P = Padre, M = Madre, H* = Caso índice, H = hermano(a) normal.

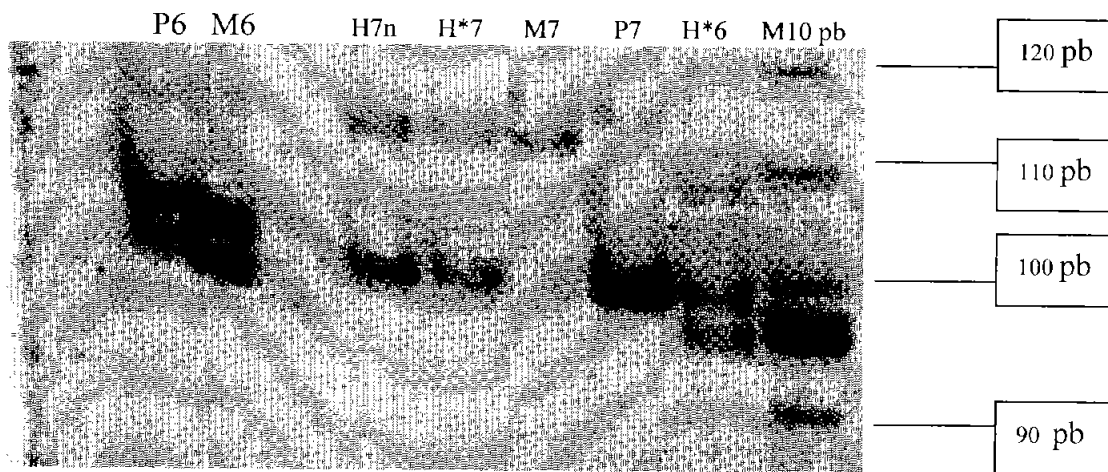


Figura 6. Electroferograma de los productos de las familias 6 y 7 VWD. El marcador de peso molecular se muestra a la derecha de la imagen. M= Marcador de 10 pb, P= Padre, M= Madre, H*=Caso índice, H=hermano(a) normal. Se puede apreciar que la mayoría de los alelos entre los 100 y 120 pares de bases.

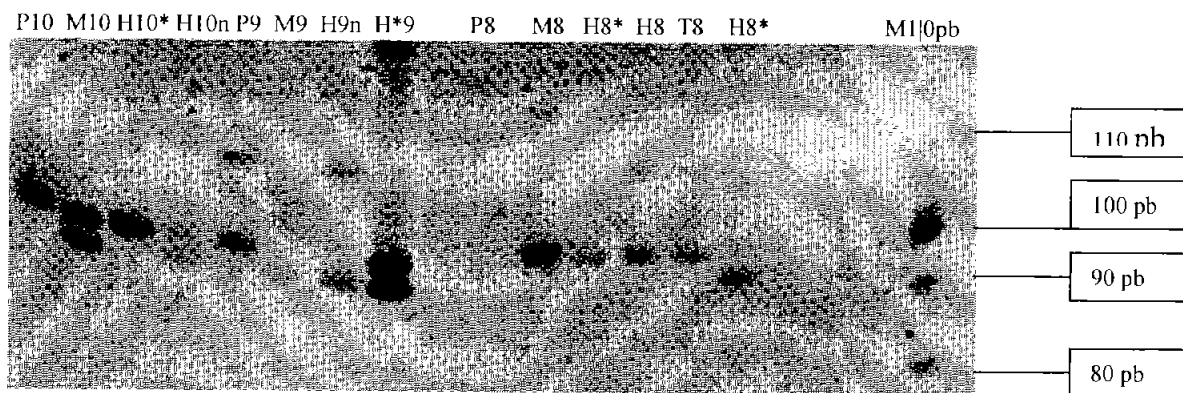


Figura 7. Electroferograma de los productos de amplificado por PCR del VNTR-TCTA del I40-VWF, corresponden a las familias 8, 9 y 10 estudiadas. La familia 8 posee dos hijos afectados con VWD. M=marcador de 10pb, P= Padre, M= Madre, H*=Caso índice, H=hermano(a) normal.

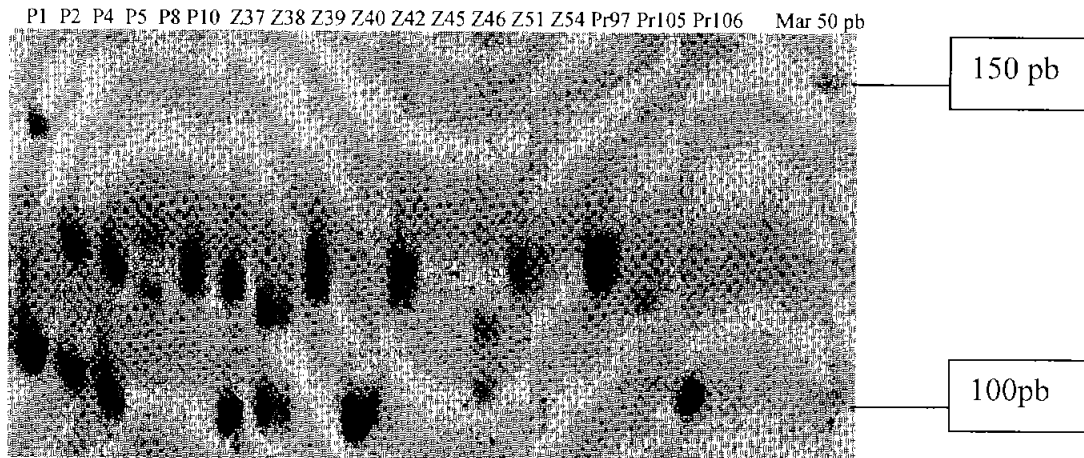


Figura 8. Electroferograma del VNTR-TCTA del I40VWF en tres poblaciones Indígenas diferentes sin antecedentes de coagulopatías hereditarias. Con excepción de dos muestras, una náhuatl (Z40) y una purépecha (106) el resto fueron heterocigotos para este repetido polimórfico, que también muestran una gran variabilidad en el número de pares de bases que los forman. P= Purépecha, Z= Náhuatl (Zitlala).

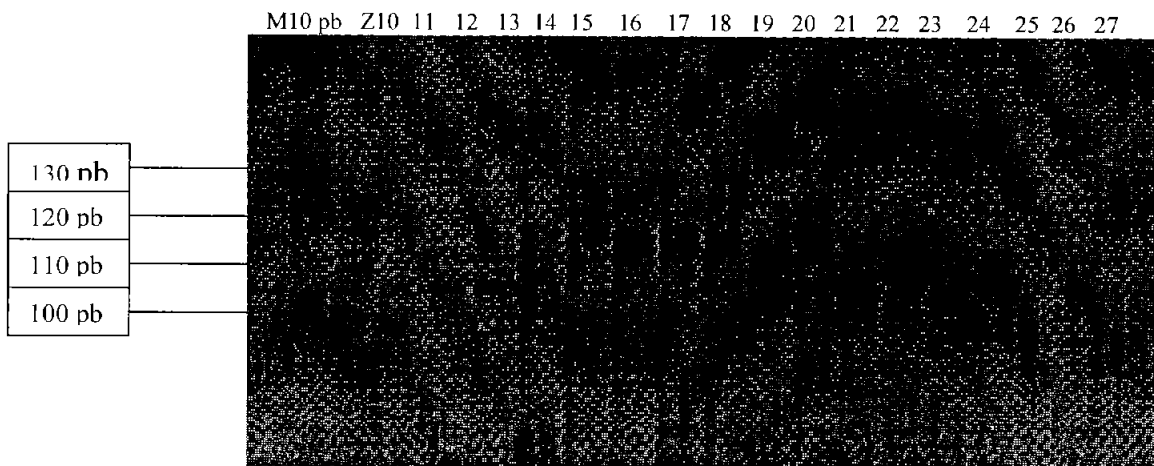


Figura 9. Electroferograma del amplificado del repetido TCTA del I40-VWF en población Náhuatl (Zitlala). M=10pb.

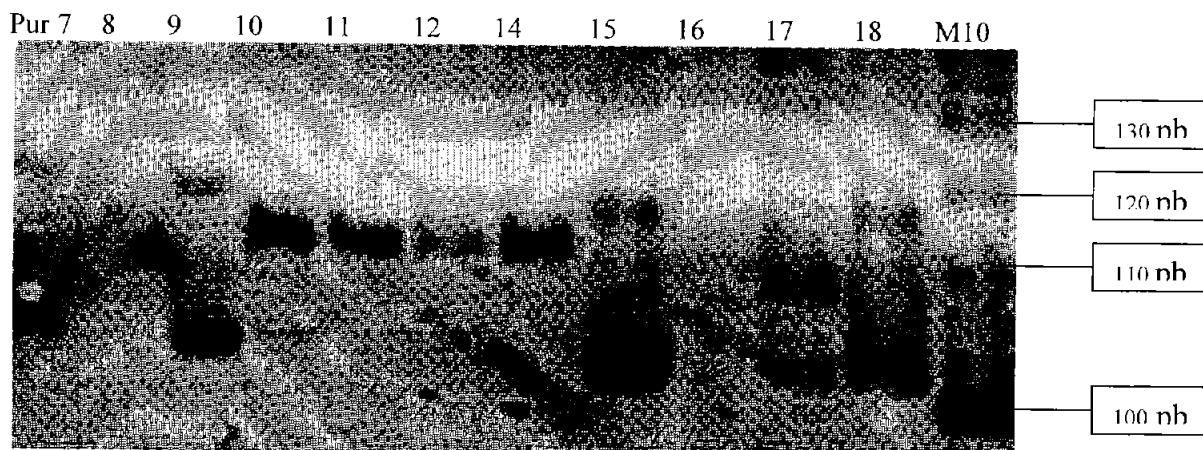


Figura 10. Electroferograma del producto de PCR de población purépecha. A diferencia de lo visto en otras imágenes, aquí observamos el más alto grado de homocigocidad (9,10,11,12 y 14).

La frecuencia de heterocigocidad se muestra en los Cuadros 1 y 2 y diferencia entre los grupos se observa en el cuadro 3.

Cuadro 1 Frecuencia de heterocigocidad en el grupo control.

Población	Heterocigotos		Homocigotos		Total	
	n	%	n	%	n	%
Purépecha	11	84.6	2	15.4	13	100.0
Náhuatl	19	86.4	3	13.6	22	100.0
Total	30	85.7	5	14.3	35	100.0

Cuadro 2. Frecuencia de heterocigotos en pacientes con VWD y sus familiares en primer grado

Población	Heterocigotos		Homocigotos		Total	
	n	%	n	%	n	%
Pacientes con dx. de VWD	5	50.0	5	50.0	10	100.0
Familiares de primer grado	20	71.4	8	28.6	28	100.0
Total	25	71.0	13	28.9	38	100.0

Cuadro 3. Prueba estadística de X^2 entre los diferentes grupos estudiados.

Comparación entre grupos	X^2	p	Significancia
Purépecha vs Náhuatl	0.02	>1.0	NO significativo
Pacientes familiares vs	1.52	>0.1	NO significativo
Indígenas vs Familias VWD	3.89	<0.5	Significativo
Indígenas vs pacientes con VWD	5.7	<0.025	Significativo

DISCUSIÓN

Se encontraron ocho VNTR diferentes en todos los grupos estudiados. La frecuencia de heterocigotos en los grupos de indígenas es similar por lo que puede tomarse como un solo para compararse con el grupo de familias portadoras de VWD.

Es importante señalar que los individuos afectados (casos índice) presentaron el 50% de homocigocidad en comparación con la población indígena (85.7%). Esta diferencia es estadísticamente significativa y permite sugerir que el marcador utilizado para esta investigación es altamente polimórfico ya que presenta un alta grado de heterocigocidad, ambas características lo vuelven de gran utilidad para el estudio de las conformación génica de las poblaciones.

La homocigocidad observada en los casos índice de padres heterocigotos permite dar un mejor asesoramiento genético a estas familias informativas, como semuestra en los árboles genealógicos anexos. Para las familias no informativas (padres e hijos homocigotos o todos heterocigotos con iguales VNTRs) es necesario analizar otros marcadores para encontrar alguno que permita la diferenciación del afectado.

Los resultados aquí mostrados difieren a los informados para otras poblaciones (Mazzini²⁸ et al. 2000, Khatib³⁶ et al. 1997, Zago³⁷ et al. 1996, Casana²⁵ et al. 1995, Pena³⁸ et al. 1994, Peake³⁹ et al 1990) con lo que se corrobora que nuestra población es especial por la mezcla de genes indígenas, europeos y africanos como lo señalan estudios previos (Peñaloza⁴⁰⁻⁴¹ et al., 1995, 2001; Buentello⁴² et al. 2003, Martinez⁴³ et al. 2004).

Por otra parte es necesario ampliar el número de muestras de indígenas y/o incluir otras poblaciones, además de estudiar una muestra de mestizos y secuenciar las muestras representativas para conocer el número exacto de repetidos.

Finalmente consideramos que la enfermedad de von Willebrand representa la coagulopatía hereditaria más frecuente del mundo y su importancia radica en que la gran mayoría de los pacientes presentan alteraciones que van de leves a severas o en el caso de intervenciones quirúrgicas u odontológicas en que se observan prolongados tiempos de coagulación. Afortunadamente la mayoría de los casos se autolimitan. Las formas recesivas (severas) son afortunadamente raras. Es importante contar con una herramienta que nos

ayude a aumentar nuestro conocimiento sobre la segregación familiar de la enfermedad y extender nuestros conocimientos a nivel molecular de dicha enfermedad para poder apoyar el estudio de otros marcadores que ayuden a realizar un estudio más fino que podrán predecir no solo quién tiene la enfermedad, sino que otros individuos de la familia se encuentran en riesgo de poder desarrollar la enfermedad aunque no tengan datos de alteraciones en la hemostasis en ese momento.

Además debemos profundizar en el conocimiento de la composición genética de nuestra población, por lo que los estudios con grupos indígenas y mestizos son especialmente útiles. Estamos seguros que el seguir con esta línea de investigación proporcionará un conocimiento no solo útil desde el punto de vista de una mera curiosidad científica, sino que tendrá un gran impacto en el área de la genética médica y de la hematología clínica.

CONCLUSIONES

1. En población de indígenas se observa una mayor heterocigocidad que la informada para otras poblaciones. Esto ocurre al menos en nahuas (Zitlala, Guerrero), y Purépechas.
2. En los pacientes y familiares con enfermedad de von Willebrand se observaron porcentajes de heterocigocidad mayores que lo informado en otras partes del mundo.
3. Este marcador es altamente polimórfico.
4. Es posible emplearlo en el asesoramiento de familias informativas.
5. Es necesario ampliar el número de muestras de indígenas y mestizos
6. Es importante secuenciar el número de repetidos para conocer la frecuencia exacta de los mismos.

Cronograma de actividades:

1. Delimitación del tema: mayo-julio 2003.
2. Recuperación, revisión y selección de la bibliografía: Agosto-octubre 2003.
3. Elaboración del protocolo preliminar: Noviembre-diciembre 2003.
4. Planeación operativa: Enero-mayo 2004.
5. Estandarización de técnicas de biología molecular (aislamiento de DNA y PCR) junio-agosto 2004.
6. Presentación del protocolo preliminar al comité de investigación del CMN S XXI HP: agosto 2004.
7. Recolección de muestras, aislamiento de DNA, realización de PCR, secuenciación de muestras significativas: agosto-septiembre 2004.
8. Análisis y presentación de resultados en tesis terminada: septiembre-octubre 2004.
9. Envío a revista científica adecuada para su publicación: noviembre-diciembre 2004.

ANEXO 1

CMN S XXI Hospital de Pediatría.

Consentimiento informado para el Protocolo:

Información sobre el estudio.

Se le ha invitado a participar en un estudio de investigación que se realizará en la unidad de investigación en genética médica del CMN S XXI HP. Los médicos de su hijo han determinado que presenta una enfermedad llamada "enfermedad de Von Willebrand". Esta es una enfermedad causada por alteraciones en el material hereditario, provocando que el tiempo de sangrado sea prolongado con manifestaciones de sangrado en muchos niveles, especialmente en las zonas que llamamos mucosas, como nariz, encías etc. Se realizará estudio molecular en la búsqueda de un polimorfismo, es decir, de una variante del material genético que si bien **no es la causa de la enfermedad**, en ocasiones se asocia a la misma, ya que suelen presentarse juntos, y en caso de encontrar resultados significativos pueden ayudar para conocer un poco más sobre esta enfermedad hereditaria; los resultados del estudio se darán a conocer solo a las personas que ustedes autoricen.

Procedimiento.

Se tomarán 5 ml. de sangre periférica del paciente así como de los familiares de primer grado relevantes para el estudio (padres y hermanos) siempre y cuando reúnan los criterios de selección establecidos previamente y solo si desean participar de manera libre en este protocolo de investigación. Al término del estudio, el investigador le proporcionará la información completa sobre los resultados.

Beneficios.

El presente estudio no representa un beneficio directo para el diagnóstico y/o tratamiento del paciente y/o sus familiares de manera inmediata. Sin embargo, el estudio familiar en búsqueda del polimorfismo tetranucleótido del intrón 40 y su presentación con la enfermedad permitirá conocer como se comporta este repetido en nuestra población y sentará las bases para estudios posteriores que permitan desarrollar una herramienta útil para el dx de esta enfermedad.

Confidencialidad.

La información que se obtenga en este estudio, incluyendo registros clínicos y/o de hospital será tratada como privilegiada y confidencial.

Potenciales daños secundarios al estudio:

Al ser un estudio laboratorial que requiere la extracción de una pequeña muestra de sangre (5 ml aproximadamente) puede presentarse una molestia secundaria a la punción con jeringa, que se requiera más de un intento para tomar la muestra y probablemente la aparición de un hematoma que debe solucionarse de manera espontánea sin maniobras especiales. El estudio molecular en sí no representa ningún riesgo para el paciente ni para los familiares del mismo.

1. Participación / suspensión.

La participación de su hijo en este estudio es voluntaria. Usted está en libertad de retirar a su hijo de este estudio en cualquier momento. Su decisión de rehusarse a participar o suspender el estudio no afectará la calidad ni la disponibilidad de su atención médica.

2 Consentimiento.

Una persona responsable de este estudio le ha explicado los pormenores del mismo y los riesgos y beneficios potenciales que esté implica. Usted a tenido la oportunidad de hacer preguntas. Si tiene alguna duda deberá comunicarse con las responsables del estudio Dr. Juan Jorge Palacios Casados y/o Dra. Rosenda Peñaloza Espinosa. Al firmar este documento, usted accede voluntariamente a participar en este estudio.

Firma del padre o tutor

Testigo

Firma de la madre o tutora

Testigo

Para cualquier duda, comunicarse al Laboratorio de Investigación en Genética Humana del CMN S XXI HP con el Dr. Juan Jorge Palacios Casados y/o Dra. Rosenda Peñaloza Espinosa, tel 56 27 69 00 ext 21941

ANEXO 2

Método de extracción de DNA de muestras de sangre.

- Tomar una muestra de 5 a 10 ml de sangre de un individuo y mezclarla con 500 μ l de EDTA al 0.5%
- Centrifugar a 3 Krpm durante 10 min.
- Tomar con pipeta Pasteur la capa de leucocitos de la interfase y pasarla a un tubo eppendorf limpio y esterilizado.
- Agregar al tubo 1.5 ml de solución de lisis de eritrocitos, mezclar vigorosamente hasta que se halla resuspendido la pastilla.
- Centrifugar a 3 Krpm por 10 minutos.
- Eliminar el sobrenadante usando vacío.
- Repetir los pasos 4,5 y 6 por lo menos dos veces, hasta que la pastillas se encuentre blanca.
- Resuspender la pastilla en 886 de NaCl a 5mM, agitar vigorosamente
- Agregar a cada tubo 46 de SDS al 10%, agitar vigorosamente.
- Adicionar 308 de NaCl saturado a cada tubo, agitar vigorosamente.
- Centrifugar 15 min. a 15 Krpm, transferir el sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf.
- Realizar al menos dos extracciones fenólicas (fenol-cloroformo-isoamílico; 25:24:1), después se trabaja con la fase acuosa.
- Precipitar el DNA con un volumen de isopropanol o dos volúmenes de etanol.
- Centrifugar 5 min. a Krpm, eliminar el sobrenadante y lavar dos veces la pastilla con etanol al 70%.
- Resuspender la pastilla de DNA en 200 a 500 μ l de agua desionizada.
- Almacenar el DNA a -20°C .

ANEXO 3

Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa.

1. Se seleccionó la región TCTA del intrón 40 para amplificar por medio de la reacción en cadena de la polimerasa donde se eligieron los oligonucleótidos de inicio (*primers*) informados por Pena et al., 1994, con la siguiente secuencia:

TGTACCTAGTTATCTATCCTG
GTGATGATGATGGAGACAG

2. Material necesarios:

- Agua desionizada.
- MgCl₂ 50mM.
- Solución amortiguadora para la amplificación.
- Mezcla de los cuatro dideoxinucleósidos a una concentración de 3mM
- Un par de primer a 10 pmol/ul.
- DNA genómico 50 ng/ul.
- *Taq* DNA polimerasa 5 U/ul.
- Termociclador.
- Aceite mineral.
- Material plástico, tubos eppendorf de 500ul y puntas desechables.
- Micropipetas.
- Microcentrifugas.

3. Procedimientos:

- Se realiza una mezcla con todos los reactivos a excepción del DNA genómico, calculando la cantidad de reactivos par un volumen final de 25ul.
- Posteriormente se agrega 200ng (2 ul) de DNA.
- Se colocarán los tubos en el termociclador, bajo las siguientes condiciones: 94°C (4 min), seguida de 35 ciclos de 94°C (1 min), 55°C (45 seg) y 72°C (45 seg), y una extensión final de 72°C por 2 min.

ANEXO 4

Electroforesis en geles de agarosa.

1. Material

- Solución amortiguadora TBE 1x preparada a partir del *stock* 5x (Tris borato 0.089M, Ácido bórico 0.089M y EDTA 0.003M).
- Bromuro de etidio a una concentración de 1 ng/ml.
- Agarosa grado molecular.
- Marcador de peso molecular de 123 pb.
- Cámara de electroforesis horizontal.
- Fuente de poder.

2. Procedimiento

- Se prepara gel de agarosa al 2% (1g. Agarosa en 50 ml de solución amortiguadora).
- La mezcla se calienta aproximadamente a 90°C por 45 min.
- Una vez disuelta el agarosa completamente se agrega 2.5 µl de Bromuro de etidio, agitándose para homogenizar.
- Se vierte la agarosa fundida, en la plataforma de la cámara previamente sellada y se inserta un peine a 2 mm de profundidad en la solución.
- Una vez que el gel haya polimerizado se retirará el peine cuidadosamente.
- Se añade a la cámara de electroforesis suficiente solución amortiguadora, hasta cubrir el gel.
- Se coloca en los pozos formados por los peines 10µ de la muestra mezclada con colorante (azul bromofenol).
- Se aplica una corriente de 100 volts por aproximadamente 20 min.
- Posteriormente se trasilumina con una lámpara de luz UV y se toman fotografías mediante el programa digital.

ANEXO 5

Electroforesis en geles de poliacrilamida.

1. Material

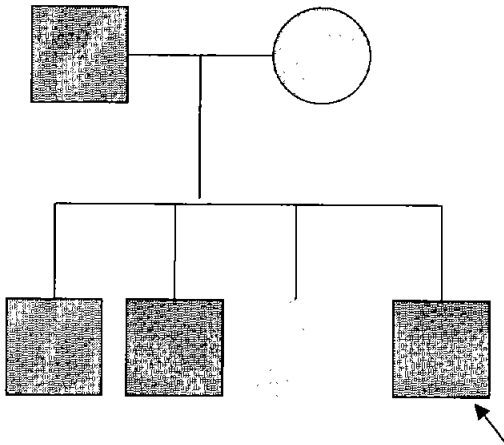
- Solución amortiguadora TBE 1 x p preparada a partir del *stock* 5 x, Bromuro de etidio a una concentración de 1 µg/ml.
- Acrilamida, Bis-acrilamida, TEMED, Persulfato de amonio (PSA al 10%), Marcador de peso molecular de 100 pares de bases; cámara de electroforesis horizontal, Fuente de poder.

2. Procedimiento

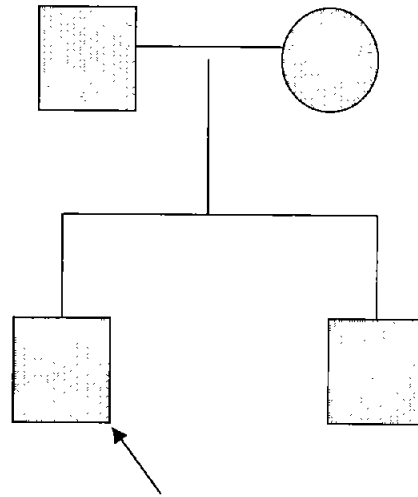
- Se prepara gel de acrilamida al 8% a partir de un stock al 30% (acrilamida 29%+bis al 1%) en solución amortiguadora (de acuerdo a Sambrook et al., (1999).
- Una vez preparada la mezcla de reacción, se vierte en la plataforma de la cámara y se inserta un peine para formar pozos.
- Una vez que el gel polimerice, retirar el peine cuidadosamente y se añade a la cámara de electroforesis vertical, suficiente solución amortiguadora, hasta cubrir el gel en ambos extremos.
- Se colocan las muestras mezcladas con colorante (azul bromofenol, xilen cianol y ficoll) en los pozos.
- Se aplica una corriente de 100 volts por aproximadamente 16 hs.
- Posteriormente se tiñe con solución con bromuro de etidio, se trasilumina con una lámpara de luz UV y se toman fotografías mediante el programa digital.

Pedigrees

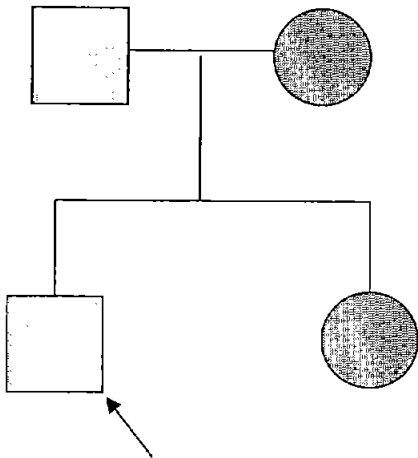
Familia 2



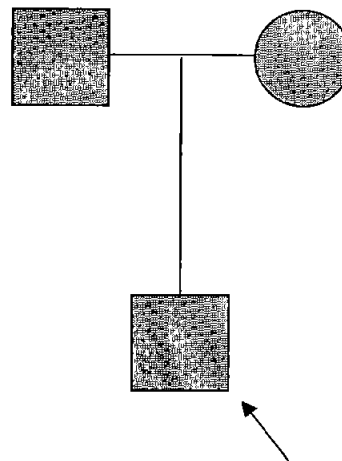
Familia 3



Familia 4

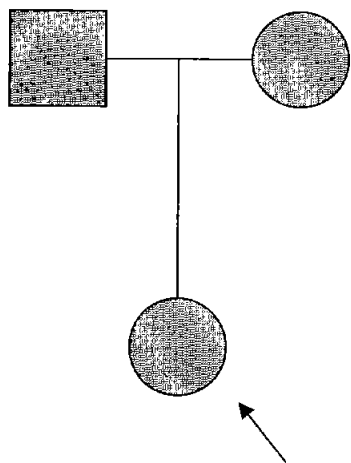


Familia 5

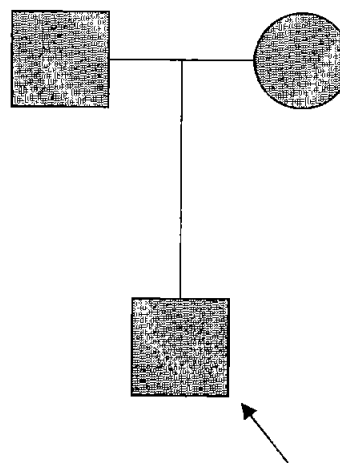


Pedigrees

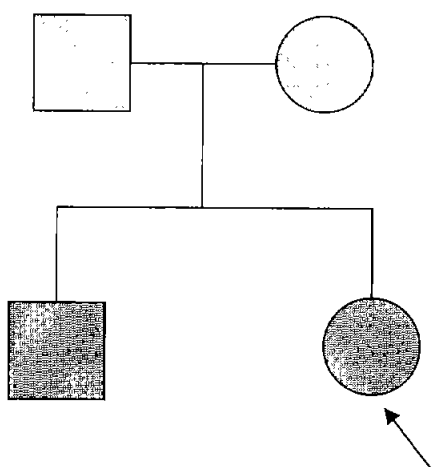
Familia 5



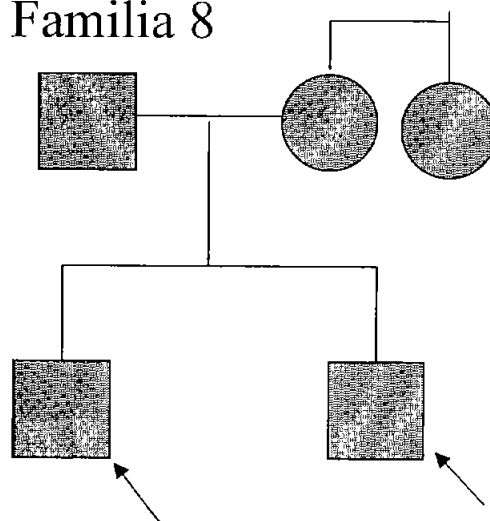
Familia 6



Familia 7

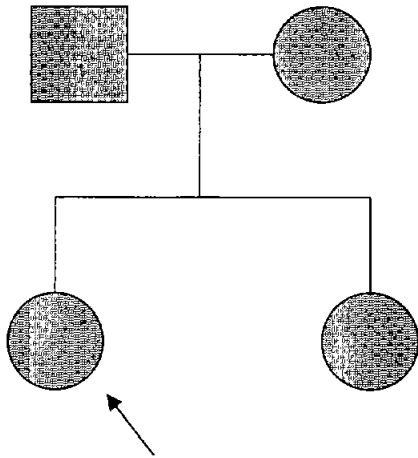


Familia 8

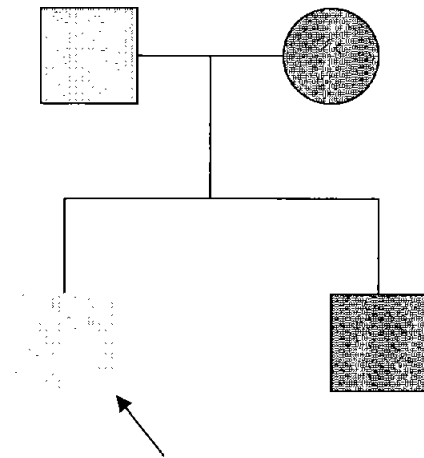


Pedigrees

Familia 9



Familia 10



  Heterocigotos

  Homocigotos

Bibliografía:

1. von Willebrand EA: **Ueber hereditaere Pseudohaemophilie.** *Acta Med. Scand.* 1931;76: 521-550.
2. von Willebrand EA, Jurgens R: **Ueber eine neue Bluterkrankheit: die konstitutionelle Thrombopathie.** *Klin Wschr.* 1933;12: 414-417.
3. Barrow EM, Heindel CC, Roberts IIR, Graham JB: **Heterozygosity and homozygosity in von Willebrand's disease.** *Proc Soc Exp Biol Med.* 1965;118: 684-687.
4. Cornu P, Larrieu MJ, Caen JP, Bernard J: **Transfusion studies in von Willebrand's disease: effect on bleeding time and factor VIII.** *Brit J Haemat* 1963;9:189-202.
5. Biggs R, Matthews JM: **The treatment of haemorrhage in von Willebrand's disease and the blood level of factor VIII (AHG).** *Brit J Haemat.* 1963;9: 203-214.
6. Montgomery R, Cox, Gill J: **Hemophilia and von Willebrand Disease.** Hemostasis. Chapter 44. 1631-1655. Edit McGraw-Hill.
7. Benitez H: **Diagnóstico de la enfermedad de von Willebrand en México.** *Gac Med Mex.* 2003;139 (supl 2): S47-S49.
8. Benítez-Aranda H, Fernández G: **Características clínicas de la enfermedad de von Willebrand.** *Rev Biomédica.* 2001;12 (supl 1): S46-S47.
9. Berlinger S: **A relative high frequency of severe (type III) von Willebrand's disease in Israel.** *Br J Haematol.* 1986;62:535-543.
10. Sadler J: **A revised classification of von Willebrand's disease.** *Thromb Haemost.* 1994; 71:520-25.
11. Lethagen S: **Revised classification and treatment of von Willebrand disease.** *Thromb Haemost.* 1998;80:199-200.
12. Mammen E: **Diagnosis and management of congenital von Willebrand disease.** *Semin Thromb Hemost.* 2002;26:109-110.
13. Ulrich B, Elke D: **Laboratory diagnosis of congenital von Willebrand Disease.** *Semin Thromb Hemost* 2002;26:173-187.

14. Favaloro E: **von Willebrand Factor Collagen-Binding (Activity) Assay in the diagnosis of von Willebrand disease: A 15 year journey.** *Semin Thromb Hemost* 2002; 26:191-172.
15. Neugebauer B, Goy C: **Comparison of two von Willebrand Factor Collagen-Binding Assays with different Binding Affinities for Low, Medium, and High Multimers of von Willebrand Factor.** *Semin Thromb Hemost* 2002;26:139-147.
16. Furla Miha, Lämmle Bernhard: **Assay of von Willebrand Factor Cleaving Protease.** *Semin Thromb Hemost* 2002;26:167-171.
17. Ginsburg D: **Molecular basis of human von Willebrand disease: analysis of platelet von Willebrand factor mRNA.** *Proc Nat Acad Sci.* 1989;86:3723-3727.
18. Ginsburg D: **Human von Willebrand factor (vWF): isolation of complementary DNA (cDNA) clones and chromosomal localization.** *Science.* 1985;228:1401-1406.
19. Mancuso DJ, Sadler JE: **Structure of the gene for human von Willebrand factor.** *J Biol Chem* 1989;264:19514-19527.
20. Bonthron, Orkin SII: **Nucleotide sequence of pre-pro-von Willebrand factor cDNA.** *Nucleic Acids Res.* 1986;14: 7125-7127.
21. Mancuso DJ, Sadler JE: **Human von Willebrand factor gene and pseudogene: structural analysis and differentiation by polymerase chain reaction.** *Biochemistry.* 1991;30: 253-269.
22. Sporn LA : **Von Willebrand factor released from Weibel-Palade bodies binds more avidly to extracellular matrix than that secreted constitutively.** *Blood.* 1987;69:1531-1534.
23. Nachman RL, Jaffe EA, Miller C, Brown WT : **Structural analysis of factor VIII antigen in von Willebrand disease.** *Proc Nat Acad Sci.* 1980;77:6832-6836.
24. Hoffman R, Ginsburg D: **Structure, biology and genetics of von Willebrand Factor.** *Hematology. Basic principles and practice.* Chap. 112. Ed. Churchill-Livingston New York. 1995;1717-1723.

25. Casaña P, Aznar J: **Diagnóstico molecular de las coagulopatías congénitas. Hemofilia y enfermedad de von Willebrand.** *Rev Iberoamer Tromb Hemostasis.* 1998;11:47-53.
26. Sadler JL, Ginsburg, D: **A database of polymorphisms in the von Willebrand factor gene and pseudogene.** *Thromb. Haemost.* 1993;69:185-191.
27. Gaucher C, Mercier B: **von Willebrand disease family studies: comparison of three methods of analysis of the von Willebrand factor gene polymorphism related to a variable number tandem repeat sequence in intron 40.** *Br J Haematol.* 1992;82:73-80.
28. Mazzini J: **Allele frequencies of three VNTRs in intron 40 of the human von Willebrand factor gene in types 1,2, and 3 von Willebrand disease patients and controls of a brazilian population.** *Thromb Res.* 2000;100:489-494.
29. Castaman G, Eikenboom JCJ, Bertina RM, Rodeghiero F: **Inconsistency of association between type 1 von Willebrand disease phenotype and genotype in families identified in an epidemiological investigation.** *Thromb Haemost.* 1999;82:1065-1070.
30. Casana P, Martinez F, Haya S, Espinos C, Aznar JA: **Significant linkage and non-linkage of type I von Willebrand disease to the von Willebrand factor gene.** *Brit. J. Haemat.* 2001;115:692-700.
31. Jiménez R: **Actualidades en el dx y la clasificación de la enfermedad de von Willebrand.** *Gac Med Méx.* 2002;138, (supl 1): 55-57.
32. Martínez R, Benítez-Aranda H, Peñaloza R, Navarrete, Salamanca F, Arenas D: **Polymorphism distribution of Int13, Int22 y SNT14 VNTRs in a mexican population and their application in carrier diagnosis of hemophilia A.** *Am J Hematology.* 2004; 77:1-6.
33. Kempter B: **Quick preparation of high molecular weight DNA freezing.** *TIBs* 1992;8:7-8.
34. Sambrook J, Fristch I, Maniatis T: **Molecular cloning. chapter 6. Gel electrophoresis of DNA.** Cold Spring Harbor laboratory press. New York, 1989.
35. **Kit de purificación de PCR (QUIAGEN, USA), Big Dye (Applied Biosystem, USA), Kit de purificación de Big Dye.**

36. Kathib II, Ezzughayyar M: **The distribution of the vWF alleles and genotypes in the Palestinian population.** J Forensic Sci 1997; 42:504-505.
37. Zago MA, Silva WA: **Interpopulational and intrapopulational genetic diversity of Amerindians as revealed by six variable number of tandem repeats.** Hum Hered 1996; 46:274-289.
38. Pena SDJ, Souza KT: **Allelic associations of two polymorphic microsatellites in intrón 40 of the human von Willebrand factor gene.** Proc Natl Accd Sci USA 1994; 91:723-727.
39. Peake IR, Bowen D: **Family studies and prenatal diagnosis in severe von Willebrand disease by polymerase chain reaction amplification of a variable number tandem repeat region of the von Willebrand factor gene.** Blood 1990; 76:555-561.
40. Peñaloza R, García-Carrancá A, Ceras T, Alvarez C, Berumen J Zavala C and Salamanca F: **Frequency of haplotypes in beta globin gene cluster in a selected sample of the Mexican population.** Am J Hum Biol 1995;7:45-49.
41. Peñaloza R, Delgado P, Arenas D, Barrientos C, Buentello L, Locza F and Salamanca F: **(AC)_n dinucleotide repeat polymorphism in 5' β -globin gene in native and Mestizo Mexican population.** Hum Biol 2001;73(6):865-9.
42. Buentello-Malo L, Peñaloza-Espinosa RI, Locza F, Salamanca-Gómez F, Cerda-Flores R: **Genetic structure of seven Mexican indigenous populations based on five polymarker loci.** Am J Hum Biol 2003; 15:3-29.
43. Martínez R, Benítez-Aranda H, Peñaloza R, Navarrete, Salamanca F, Arenas D: **Polymorphism distribution of Int13, Int22 y SNT14 VNTRs in a mexican population and their application in carrier diagnosis of hemophilia. A.** Am J Hematology 2004; 77:1-6.
44. Ginsburg D: **The molecular biology of von Willebrand disease.** Haemophilia 1999; 5:19-27.