



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas,
Odontológicas y de la Salud

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS MÉDICAS

“ANÁLISIS DE SEGREGACION DEL POLIMORFISMO ATCT DEL
INTRÓN 40 EN EL GEN *VWF* EN FAMILIAS CON ENFERMEDAD DE
VON WILLEBRAND”

PRESENTA:

DR. JUAN JORGE PALACIOS CASADOS

Tutora principal: DRA. ROSENDA ISABEL PEÑALOZA
ESPINOSA

Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS

Cotutor: DR. FABIO ABDEL SALAMANCA GÓMEZ

Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS

Ciudad de México, febrero 2019



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.

RESUMEN

ANTECEDENTES. La enfermedad de von Willebrand (EVW) es el padecimiento hematológico de origen hereditario más frecuente. Es difícil de diagnosticar por la variedad compleja en signos y síntomas que presentan los pacientes, además de las decenas de mutaciones informadas a lo largo de los 52 exones del gen *VWF*. Existen tres regiones de repetidos (ATCT/AGAT) de número variable (VNTR) del intrón 40 del gen *VWF* que segregan con el padecimiento. El objetivo del presente trabajo fue analizar la frecuencia y segregación de tales VNTRs en familias con EVW y en un grupo de individuos no relacionados y sin antecedentes de EVW.

MATERIAL Y MÉTODOS. Se extrajo el DNA de sangre periférica de cada uno de los integrantes de la familia nuclear (padres e hijos) previo consentimiento informado, se realizó la amplificación de la región del DNA correspondientes con iniciadores previamente informados y se corrió una electroforesis en gel de poliacrilamida de las muestras con marcadores de peso molecular. Se analizaron los resultados y se secuenciaron algunas muestras para corroborar el número de repetidos. Se obtuvo la frecuencia génica y heterocigosidad de los VNTRs y su segregación por la prueba de TDT.

RESULTADOS. Se analizaron 17 familias con EVW y 50 individuos normales no relacionados sin antecedentes hemorrágicos. Se observaron 11 diferentes alelos en el VNTR-1 y VNTR-2 y ocho en el VNTR-3. La frecuencia de heterocigotos en el grupo de individuos sanos fue de 55.3%, 72.8% and, 76.4%, mientras que en el grupo de padres fue de 77.3%, 28.6% y 58% respectivamente no relacionados.

Los haplotipos 5-10-10 y 5-11-10, fueron los más frecuentes en padres y aplicando la prueba de Trasmisión de Desequilibrio (TDT) encontramos que VNTR3 tuvo un valor- $p=0.0457$ sugiriendo una asociación con la enfermedad de von Willebrand.

ANTECEDENTES:

La enfermedad de von Willebrand (EVW) se llama así en honor del Dr. Erich Von Willebrand quien la describió en 1926, como un trastorno de la hemostasis diferente a la hemofilia clásica en pacientes de 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 pacientes¹. Este padecimiento también mostraba mejoría conforme aumentaba la edad del paciente. Poco después Von Willebrand y Jurgens (en 1933), sugirieron 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 está comprometida debido en parte, a que existe un déficit de factor VIII (F VIII) y a que el plasma de los pacientes con hemofilia clásica corregía las alteraciones hematológicas, tanto en la adhesividad plaquetaria como en el déficit de F VIII. Sin embargo, la sangre de un paciente con enfermedad de Von Willebrand no corregía los defectos de coagulación de un paciente con hemofilia clásica^{4,5}. Mucho tiempo pasaría para que se comprendiera totalmente el papel del factor de von Willebrand (VWF por sus siglas en inglés) 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 aproximadamente 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. La EVW 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.

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)^{10,11}; mide aproximadamente 178 kb y contiene 52 exones¹². El gen codifica para una preproteína que contiene además de la proteína VWF, dos regiones llamadas propéptido (antígeno de VW-II) y otra conocida como péptido-senál, 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 gen¹³. Además, se han identificado secuencias repetidas, incluyendo 14 secuencias conocidas como Alu y una secuencia simple polimórfica ATCT/AGAT de

670 pares de bases en el intrón 40¹² que es muy importante debido a que segrega junto con la enfermedad.

Existen muchas mutaciones documentadas para cada una de las variantes de EVW, mismas que no serán abordadas en este trabajo; basta agregar que existe un pseudogen en el cromosoma 22 (22q11-q13) de 23 kb que contiene información de los exones 23-34 del gen *VWF* (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 *VWF*, puede complicar en ocasiones su estudio a nivel molecular¹⁴. El gen se expresa mayoritariamente en células endoteliales y megacariocitos¹⁵. 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 von Willebrand 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 de Daltons (multímeros de alto peso molecular)¹⁶. Este factor circula en el plasma como una glicoproteína multimérica, que juega un papel crítico en la hemostasia primaria mediando la adhesión de las plaquetas al subendotelio y entre las mismas plaquetas, para resanar el 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 pro-coagulante F VIII, 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 fibrina¹⁷.

Se calcula que el 1-2% de la población general presenta alguna variante de EVW debido a diferentes mutaciones, lo que la convierte en la coagulopatía hereditaria más frecuente¹⁸.

Clasificación

La clasificación más actual para la EVW 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 (Tipo 3)^{19,20}.

El protocolo de estudios para los pacientes en los que se sospecha EVW debe comprender, mínimo, los siguientes estudios de laboratorio, además de la valoración clínica y los antecedentes genéticos-hematológicos de la familia²¹:

- 1) Tiempo de hemorragia y actividad de F VIII.
- 2) Actividad del cofactor de ristocetina.
- 3) Agregación plaquetaria 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 VWF.
- 9) Ensayo de unión a colágena.
- 10) Grupo sanguíneo.
- 11) Factores que modifican las concentraciones de VWF: el grupo AB0, estrógenos, edad, niveles de hormonas tiroideas y estrés²²⁻²⁵.

Es relativamente sencillo diagnosticar el tipo 3 por parámetros clínicos y de laboratorio, en comparación con los tipos 1 y 2 que son complicados de diagnosticar usando solamente parámetros clínicos o de laboratorio, aunque las pruebas más sensibles de acuerdo con Ulrich Budde,²² son la actividad del cofactor de ristocetina, el estudio de multímeros y la determinación del antígeno Ag-VWF.

Se debe hacer notar que existen pocos estudios en la literatura sobre la utilidad de los polimorfismos genéticos en el análisis de ligamiento o mejor dicho, de asociación con la enfermedad de Von Willebrand. El estudio molecular es sencillo y rápido gracias a las técnicas de biología molecular como la PCR que pueden ser de utilidad clínica ya que algunos parecen verse ligados con la enfermedad.

El repetido de tetranucleótidos polimórfico (VNTR, por sus siglas en inglés, variable number tandem repeats) ATCT/AGAT en el intrón 40, ha sido estudiado en múltiples grupos étnicos, como ya lo ha descrito en población norteamericana Sadler²⁶, en la francesa Gaucher²⁷ y Mazzini²⁸ en población brasileña, encontrando en este último estudio, el VNTR más útil para el estudio de ligamiento además de reportar un nuevo marcador polimórfico de 14 repetidos no descrito antes 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 EVW²⁹. Recientemente, en un estudio realizado por Casaña et al, en población española, se informaron datos sugestivos de un posible marcador intragénico para la variante tipo 1 de la EVW³⁰. En población mexicana no contamos con datos al respecto.

Por otra parte, definimos los conceptos Polimorfismo genético como la coexistencia de dos o más alelos para un locus específico de un gen, de manera estable, presente en más del 1% de la población, que usualmente no se asocia a patología; Exones como secuencias de nucleótidos que forman parte del RNA mensajero maduro durante la transcripción (y por definición, un gen comienza y termina con un exón) y los intrones como secuencias de DNA intercaladas en el gen, que serán eliminadas cuando se procese el transcrito primario y se constituya el RNA mensajero maduro.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

¿Los repetidos ATCT/AGAT de los VNTRs1, 2, 3 del intrón 40 del gen *VWF* son lo suficientemente polimórficos para servir como marcadores genéticos en los pacientes con diagnóstico de enfermedad de Von Willebrand?

¿Existe alguna asociación de haplotipos que segregan con el padecimiento?

JUSTIFICACIÓN:

Para los grupos caucásicos se han informado una serie de polimorfismos que segregan ligados de manera significativa con la 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 ATCT/AGAT); no existen informes en relación a población mexicana ni de pacientes con el dx. de enfermedad de Von Willebrand ni en población mexicana sana sobre como segrega este polimorfismo, motivo por el cual, empleando herramientas básicas de biología molecular como la ampliación del segmento que se desea investigar por reacción en cadena de polimerasa (PCR) así como secuenciación de los casos representativos permitirá conocer cuál es la prevalencia de dicho polimorfismo en pacientes con dx de enfermedad de von Willebrand y sus familiares de primer grado, en población mexicana sana (mestiza e indígena) y saber el número de repetidos en tandem más frecuente y si se justifica ampliar el estudio usando más marcadores polimórficos (haplotipo) y realizar estudios de ligamiento con la enfermedad de Von Willebrand como se han hecho en otras poblaciones. Se realizará el análisis del mismo analizando como población sana a 100 cromosomas de individuos sanos no relacionados (mestizos mexicanos sin antecedentes de EVW) para conocer la frecuencia en la población de dicho polimorfismo, si se encuentra o no en equilibrio de Hardy-Weinberg y de

esta manera se conocerá un poco más la constitución genética de nuestra población

OBJETIVO GENERAL:

Analizar la región polimórfica de repetidos ATCT/AGAT del intrón 40 en pacientes con diagnóstico de enfermedad de von Willebrand y sus familiares de primer grado (padres e hijos) así como en una muestra de población mestiza mexicana sin antecedentes de EVW.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- 1) Estandarizar metodología de secuenciación.
- 2) Estandarizar metodología de PCR.
- 3) Analizar muestras de pacientes con el diagnóstico de enfermedad de von Willebrand y sus familiares de primer grado.
- 4) Analizar muestras de individuos mestizos mexicanos sin datos de coagulopatías hereditarias.
- 5) Seleccionar muestras representativas y secuenciarlas para saber el número de repetidos en tandem ATCT/AGAT.
- 6) Sacar frecuencias en la población estudiada.
- 7) Analizar el polimorfismo ATCT/AGAT en dichos individuos y determinar su valor como marcador polimórfico en la población mexicana.
- 8) 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 incluyeron los pacientes con diagnóstico de enfermedad de von Willebrand enviados por el servicio de hematología del CMN S XXI IMSS así como a sus familiares de primer grado (padres y hermanos). Se calculó un tamaño de muestra para una población normal que se usará como grupo comparativo de 50 individuos (mestizos mexicanos) no relacionados sin antecedentes de EVW o de otras coagulopatías hereditarias.

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

Técnicas:

Tomar una muestra de dos ml de sangre periférica y extraer el DNA de leucocitos de acuerdo con el método de alta concentración de sales (ver anexo II).

Realizar la amplificación de las tres regiones de repetidos ATCT/AGAT del intrón 40 por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando iniciadores previamente informados (ver anexo III). Correr electroforesis de una alícuota del amplificado para corroborar el resultado, en gel de agarosa horizontal con marcadores de peso molecular (Anexo IV).

A continuación, correr electroforesis de otra alícuota del PCR ahora en gel de poliacrilamida vertical al 8% con voltaje constante de 200 voltios durante 16 horas con marcadores de peso molecular en los extremos (Anexo V).

Teñir con bromuro de etidio y se analizar en un analizador de imágenes. Seleccionar algunas muestras para secuenciar directamente por el método de Big Dye (Anexo VI).

Se analizaron los resultados y se obtuvieron la cuenta génica, frecuencias de heterocigosidad y se aplicó la prueba de TDT para análisis de la segregación.

Criterios de inclusión

Todos los pacientes enviados del servicio de hematología pediátrica de este hospital con el diagnóstico de enfermedad de von Willebrand, establecido el mismo clínicamente con apoyo del laboratorio de hematología especializada.

Individuos (mestizos mexicanos) no relacionados con padres y abuelos mexicanos y sin antecedentes de EVW.

Criterios de no inclusión

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

De la población sana no se incluirán pacientes que tengan padres o abuelos extranjeros.

Criterios de eliminación

Muestra insuficiente.

Tipo de estudio:

Observacional, transversal-descriptivo.

Se realizará selección de muestra de manera aleatorizada para los individuos mestizos y se analizará si la población se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg.

Se trata de un estudio ***abierto*** (en relación con la ceguedad del estudio).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se estudió un total de 63 individuos pertenecientes a 17 familias (34 mujeres y 29 hombres). Se ellos, 24 fueron pacientes pediátricos con EVW y cinco hermanos no afectados, y de los padres, 18 tuvieron antecedentes de EVW y 16 sanos.

Además, se analizaron 50 individuos sin antecedentes de EVW, no relacionados. Todos firmaron una carta de consentimiento o asentamiento informado.

Se obtuvo el DNA de una muestra de sangre periférica de cada individuo por la técnica de concentración de sales y se amplificaron las tres regiones de los VNTR1, 2, y 3 por PCR (Figura 1).

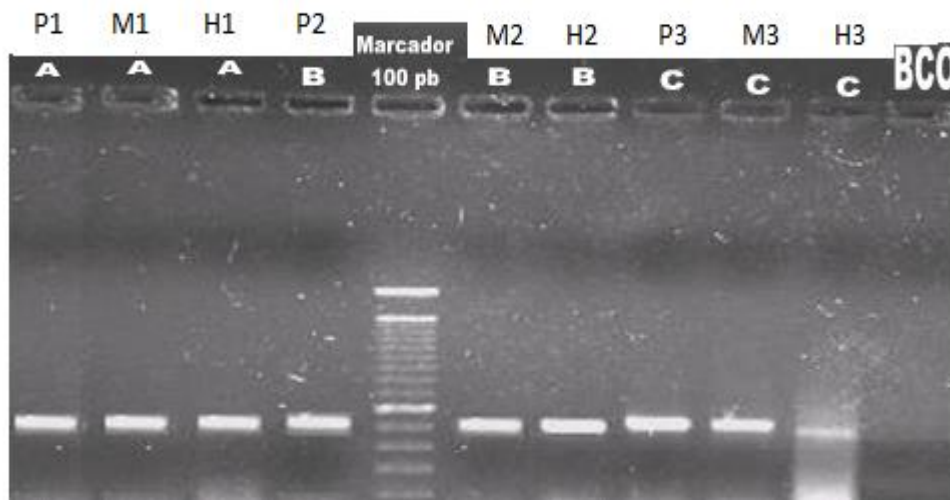
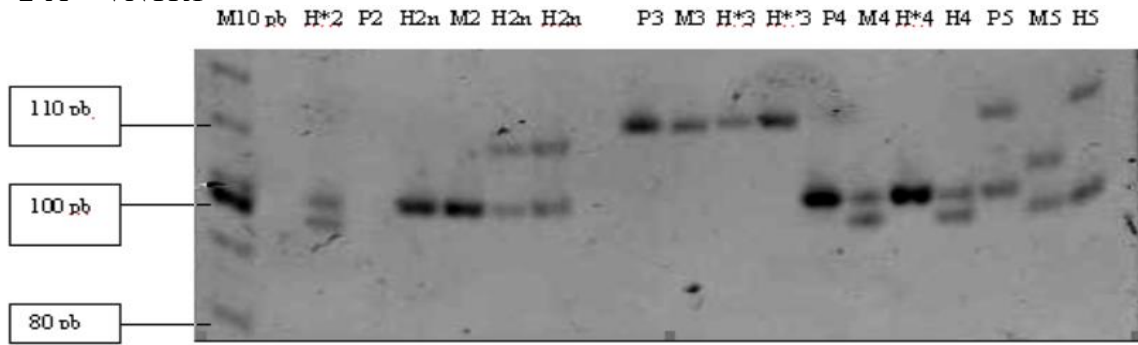


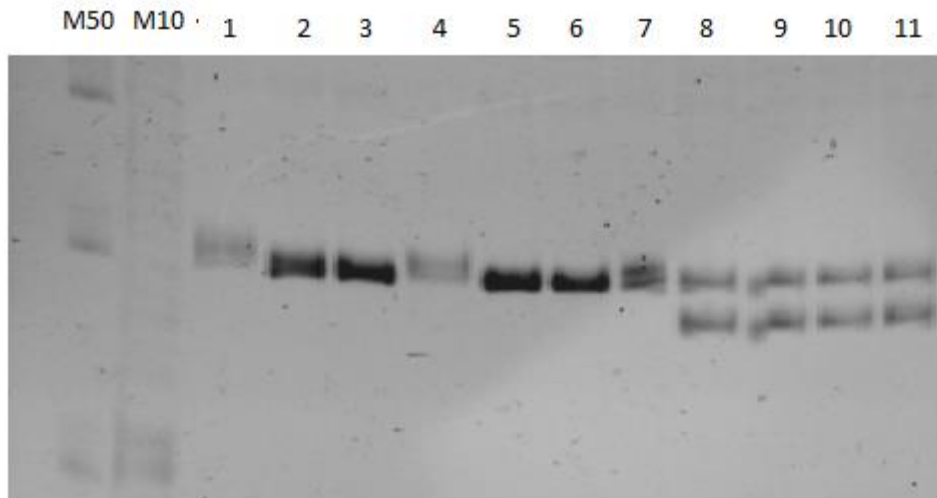
Figura 1. Amplificación por PCR de tres muestras de las regiones VNTR1 (A), VNTR2 (B) y VNTR3 (C).

Un ejemplo de corrimiento electroforético de algunas muestras en geles de poliacrilamida vertical al 8% se ejemplifica en la siguiente Figura 2. M= marcador de peso molecular.

2-A= VNTR1



2-B VNTR2



2-C VNTR3

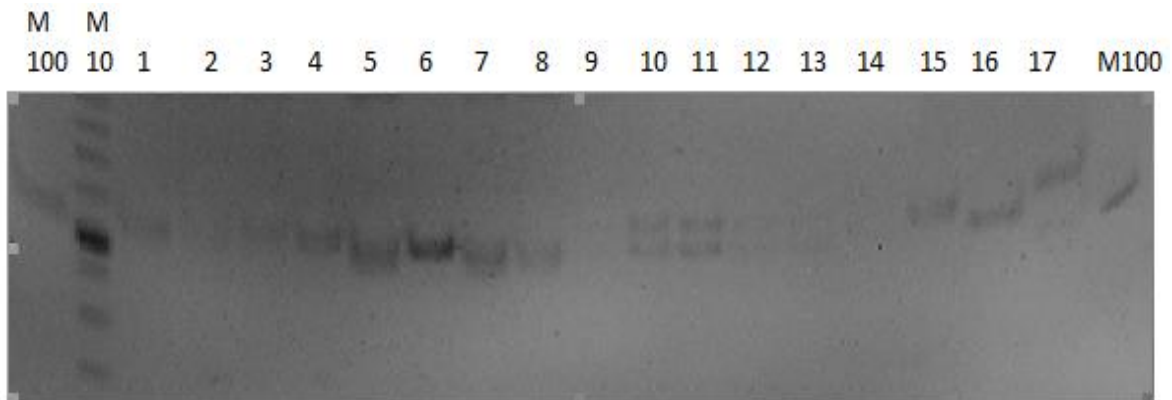


Figura 2. Electroforesis en geles de poliacrilamida mostrando productos polimórficos de VNTR-1 (2A), VNTR-2 (2B) y VNTR-3 (2C). Los números superiores indican el número de muestra. M= marcador de peso molecular en pares de pares.

Se analizó la frecuencia de los VNTRs tanto en el grupo de individuos normales (Tabla 1) como en los padres de los casos índice (con EVW) (Tabla 2) y se obtuvo la frecuencia de heterocigosidad (Tabla 1). La frecuencia de alelos en ambos grupos estuvo en equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE).

Tabla 1. Frecuencia alélica de los VNTRs en el grupo de individuos sanos no relacionados y de los padres de los pacientes.

Alelos #	% VNTR 1		% VNTR 2		% VNTR 3	
	Grupo Sano*	Grupo Padres**	Grupo Sano*	Grupo Padres**	Grupo Sano*	Grupo Padres**
4	1.00	0	2.0	0.0	0	0
5	3.00	20.0	3.0	0.0	0	0
6	7.00	20.0	2.0	0.0	0	0
7	39.00	26.7	7.0	3.3	7.0	1.0
8	15.00	10.0	14.0	3.3	14.0	6.7
9	10.00	3.0	26.0	30.0	27.0	33.3
10	10.00	10.0	26.0	50.0	26.0	36.7
11	5.00	3.0	15.0	13.3	15.0	13.3
12	6.00	3.0	2.0	0.0	2.0	0.0
13	1.00	0	2.0	0.0	2.0	0.00
14	3.00	3.0	1.0	0.0	7.0	0.0
Cromosomas	100	52	100	52	100	52
% Heterocigosidad	55.27	77.32	72.78	28.59	76.38	57.98
% Total	100	99.99	99.99	100	99.99	99.99

- Individuos sin antecedentes de EVW; ** Padres de pacientes

También fue posible realizar árboles familiares para observar la segregación, por ejemplo:

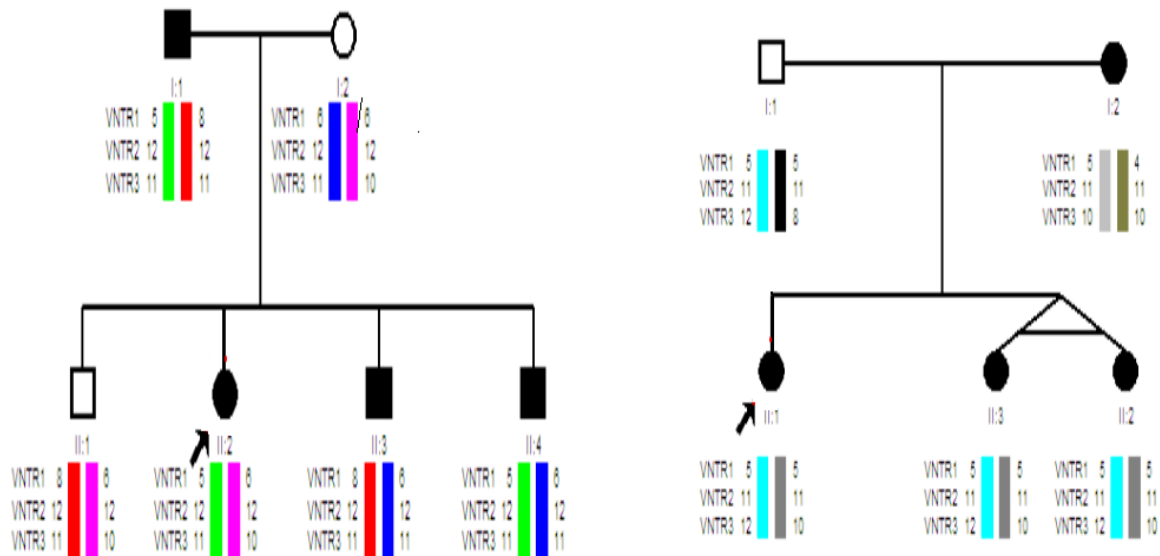
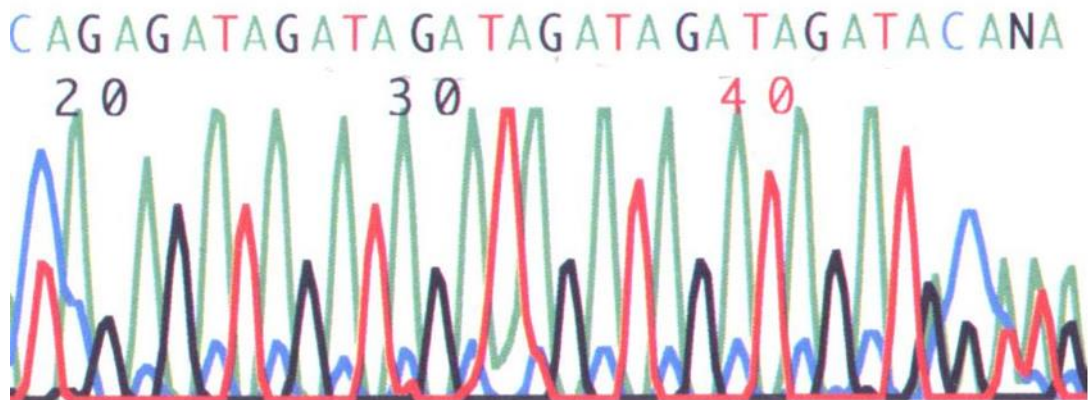
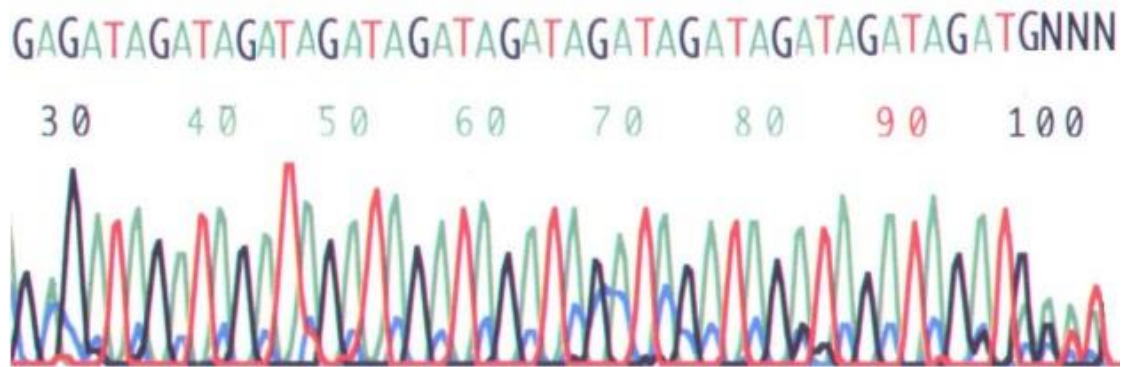


Figura 3. Árbol familiar mostrando la segregación de haplotipos informativos en dos familias nucleares con EVW. En la primera, el haplotipo 05-12-11 co-segrega con la EVW, y en la segunda ocurre lo mismo con el haplotipo 05-11-12.

Se seleccionaron algunas muestras para analizar la secuencia de nucleótidos



4a)



4b)

Figuras 4a y 4b. Ejemplo de secuencias de nucleótidos (ATCT/AGAT) con seis y once repetidos respectivamente, en las muestras estudiadas.

Se observaron once alelos diferentes para los VNTR1 y VNTR-2, pero sólo ocho en el VNTR3 en individuos normales, mientras que en el grupo de padres de pacientes se encontraron nueve alelos en el VNTR-1, ocho en VNTR 2 y cinco en VNTR3.

Es importante señalar que el número de alelos de los tres VNTRs en el grupo de padres (EVW) es menor con respecto al grupo de sanos, sugiriendo un desequilibrio de ligamiento. En particular, el alelo número 4 del VNTR1 sólo se observó en el grupo de individuos sanos, lo mismo que los alelos #4, #5, y #6 del VNTR2 únicamente en sanos mientras que en VNTR3, los alelos 12, 13 y 14 son los presentes sólo en el grupo de sanos y no en el grupo de padres.

En cuanto a la frecuencia de alelos, el alelo número 7 del VNTR1, y los números 9 y 10 fueron los más frecuentes en VNTR2 y VNTR3 (Tabla 2). Esto puede deberse al bajo número de muestras estudiadas o al vínculo de desequilibrio.

Tabla 2. Haplotipos de las familias estudiadas.

Fam num	Indiv	Sex	VNTR1	VNTR2	VNTR3	Condición
Fami_01	Padre	M	05\08	12\12	10\11	Normal
Fami_01	Madre	F	06\06	12\12	10\11	Afectado
Fami_01	Hijo1	M	06\08	12\12	11\11	Normal
Fami_01	Hija1	F	05\06	12\12	10\11	Normal
Fami_01	Hijo2	M	06\08	12\12	10\11	Afectado
Fami_01	Hijo3	M	06\08	12\12	10\11	Afectado
Fami_02	Padre	M	05\06	10\11	10\11	Afectado
Fami_02	Madre	F	06\06	11\12	11\11	Normal
Fami_02	Hija1	F	05\06	11\11	10\11	Afectado
Fami_02	Hija2	F	06\06	10\12	10\11	Afectado
Fami_03	Padre	M	06\10	11\11	10\11	Afectado
Fami_03	Madre	F	05\10	11\11	10\11	Normal
Fami_03	Hijo1	M	05\10	11\11	10\11	Afectado
Fami_04	Padre	M	06\06	10\11	10\10	Afectado
Fami_04	Madre	F	05\10	11\11	10\10	Normal
Fami_04	Hija1	F	06\10	11\11	10\10	Normal
Fami_04	Hija2	F	06\10	11\11	10\10	Afectado
Fami_05	Padre	M	04\05	10\11	10\11	Afectado
Fami_05	Madre	F	05\08	11\11	10\11	Normal
Fami_05	Hija1	F	04\05	10\11	10\11	Afectado
Fami_05	Hija2	F	04\05	10\11	10\11	Afectado
Fami_06	Padre	M	07\14	10\10	11\12	Normal
Fami_06	Madre	F	07\14	10\10	11\12	Afectado
Fami_06	Hijo1	M	07\14	10\10	11\11	Afectado
Fami_06	Hija1	F	07\07	10\10	11\11	Afectado
Fami_07	Padre	M	06\12	11\11	12\12	Normal
Fami_07	Madre	F	06\13	11\11	11\12	Afectado
Fami_07	Hijo1	M	06\12	11\11	11\12	Afectado
Fami_07	Hija1	F	06\12	11\11	11\12	Afectado
Fami_08	Padre	M	05\10	11\11	11\12	Afectado
Fami_08	Madre	F	05\06	11\11	11\12	Normal
Fami_08	Hija1	F	05\05	11\11	11\12	Afectado
Fami_08	Hija2	F	05\05	11\11	11\12	Afectado
Fami_09	Padre	M	05\06	10\11	10\10	Afectado
Fami_09	Madre	F	05\07	10\11	10\10	Normal
Fami_09	Hija1	F	06\07	10\10	10\10	Afectado
Fami_09	Hija2	F	05\06	10\11	10\10	Afectado
Fami_10	Padre	M	06\07	11\11	11\11	Normal
Fami_10	Madre	F	07\10	11\11	11\11	Afectado
Fami_10	Hijo1	M	06\10	11\11	11\11	Afectado
Fami_11	Padre	M	08\10	08\10	10\10	Normal
Fami_11	Madre	F	08\10	10\10	11\11	Afectado

Fami_11	Hija1	F	08\08	10\10	10\11	Afectado
Fami_11	Hijo1	M	08\10	10\10	10\11	Normal
Fami_12	Padre	M	07\11	10\10	08\08	Normal
Fami_12	Madre	F	07\11	10\10	08\08	Afectado
Fami_12	Hija1	F	07\07	10\10	08\08	Afectado
Fami_13	Padre	M	06\07	10\10	11\11	Normal
Fami_13	Madre	F	07\08	09\10	09\10	Afectado
Fami_13	Hija1	F	07\07	10\10	09\11	Afectado
Fami_13	Hijo1	M	06\07	09\10	09\11	Normal
Fami_14	Padre	M	07\08	09\10	08\10	Normal
Fami_14	Madre	F	07\08	10\12	09\10	Afectado
Fami_14	Hija1	F	07\07	09\10	09\10	Afectado
Fami_15	Padre	M	07\07	10\12	08\10	Normal
Fami_15	Madre	F	07\07	09\10	09\09	Afectado
Fami_15	Hijo1	M	07\07	10\12	09\10	Afectado
Fami_16	Padre	M	05\07	10\10	09\11	Afectado
Fami_16	Madre	F	07\09	09\11	09\09	Normal
Fami_16	Hijo1	M	05\07	09\10	09\09	Afectado
Fami_17	Padre	M	05\07	09\10	08\10	Afectado
Fami_17	Madre	F	06\09	08\09	08\10	Afectado
Fami_17	Hijo1	M	07\09	09\09	10\10	Afectado

Se obtuvieron los haplotipos de las familias estudiadas (Tabla 3). Se observaron 35 haplotipos diferentes en ambos padres y solo 24 en casos con índice. En los primeros, los más frecuentes fueron 5-10-10 y 5-11-10 (11.76% cada uno) mientras que en los pacientes pediátricos fue el haplotipo 10-11-11 (8,82%), sugiriendo una combinación de los anteriores, como era de esperarse.

Tabla 3. Frecuencia de Haplotipos of VNTR1,-2,- 3 en las **familias**.

Haplotipo	Padre %	Madre %	Caso indice %
04-11-11	2.94		2.94
05-10-09	2.94		2.94
05-10-10	11.76		5.88
05-11-10	2.94	11.76	5.88
05-11-12	2.94		
05-12-10	2.94		
06-08-08	2.94	2.94	
06-10-10			2.94
06-10-11	2.94		
06-11-10	8.82	2.94	5.88
06-11-11	5.88	5.88	5.88
06-11-12	2.94	2.94	
06-12-10		2.94	
06-12-11		5.88	2.94
07-09-08	5.88		
07-09-09		8.82	5.88
07-10-08	2.94	2.94	2.94
07-10-09		5.88	5.88
07-10-10		2.94	2.94
07-10-11	8.82	2.94	5.88
07-11-11	2.94	2.94	
07-12-10	2.94		2.94
08-10-10	5.88	5.88	2.94
08-10-11		2.94	
08-11-11		2.94	
08-12-11	2.94		2.94
09-09-10	2.94	2.94	5.88
09-11-09		2.94	
10-08-10	2.94		
10-10-10			2.94
10-10-11		2.94	2.94
10-11-10		2.94	2.94
10-11-11	2.94	5.88	8.82
11-10-08	2.94	2.94	2.94
12-11-12	2.94		2.94
13-11-12		2.94	
14-10-12	2.94	2.94	2.94
Total 34	99.96	99.96	99.96

Los haplotipos 5-10- 10 y 5-11-10 fueron los más frecuentes en los padres de los afectados. En el VNTR-1, se encontró una p - para TDT no significativa al igual que para VNTR-2, pero significativa para VNTR3 (0.046), esto sugiere que el marcador VNTR3 puede estar asociado con VWD (Tabla 4).

Tabla 4. ANALISIS DE DATOS Y LOCUS PARA LA TRANSMISIÓN DE DESEQUILIBRIO

RESULTADOS PARA LOCUS VNTR-1:											TDT1_p-value	TDT2_P-value	
ALELO NUM.	4	5	6	7	8	9	10	11..12..13..14				0.3036E	0.4147E
PASÓ	2	10	6	12	4	1	3	0	2	0	1		
NO PASÓ	0	10	8	5	5	1	5	2	0	2	3		
RESULTADOS PARA LOCUS VNTR-2:													
ALELO NUM.	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	0.4532E	0.7327E
PASÓ	0	0	0	0	0	4	10	4	2	0	0		
NO PASÓ	0	0	0	0	2	2	6	8	2	0	0		
RESULTADOS PARA LOCUS VNTR-3:													
ALELO NUM.		7	8	9	10	11	12	13				0.0457E	0.1869E
PASÓ		0	0	3	11	13	2	0					
NO PASÓ		0	4	0	7	10	8	0					
TDT1= CHI-CUADRADA DE ESTADISTICA TDT CON VALOR P- APROXIMADO BASADA EN 10,000 REMUESTREOS, Y TDT2= <u>TDT ESTADISTICA RESIDUAL ESTANDARIZADO MAS GRANDE,</u> BASADO EN 10,000 REMUESTREOS.													
		ALELO (LLAMADO) VNTR1 VNTR2 VNTR3											
EL ALELO MAS BAJO TRANSMITIDO ES EL NUM		8(011)	5(008),	2(008).									
EL ALELO MAS ALTO TRANSMITIDO ES NUM		4(007)	7(010),	3(009).									
DE ESTOS DOS, EL ALELO MAS <u>EXTREMO</u> ES NUM		4(007)	5(008),	2(008).									

En el presente caso, el valor de p para TDT fue 0.3036 para VNTR1, 0.45320 para VNTR2, mientras que para VNTR3 fue de 0.04570, lo que sugiere que VNTR3 está segregando con la enfermedad de von Willebrand.

Se aplicó la prueba de tendencia TDT porque es un método para evaluar la tendencia lineal hacia la transmisión de alelos más cortos o más largos de padres heterocigotos a niños afectados, dando una poderosa prueba de asociación cuando hay una base biológica para sospechar una relación entre la longitud del alelo y el riesgo para la enfermedad ya que el TDT fue diseñado específicamente para evitar las asociaciones de población espurias producidas por la estratificación de una muestra de personas afectadas [22].

Los presentes resultados podrían ampliarse en un futuro con un mayor número de muestras comparando una población abierta versus una población enferma, así como el estudio de estos marcadores genéticos en poblaciones indígenas, lo que ya se ha hecho para otros marcadores [23-27]. Esto podría ayudar a revelar el origen de tales haplotipos (indígenas o europeos), así como a una mejor comprensión de la compleja diversidad genética de nuestras poblaciones mestizas, además, permitiría el uso de nuevas herramientas moleculares que facilitarían el diagnóstico correcto de la enfermedad y su asesoramiento genético

Los minisatélites y microsatélites son muy frecuentes en el genoma humano, algunos son altamente polimórficos con heterogeneidad variable que han servido como marcadores de riesgo y otros se han relacionado con la patogénesis de algún padecimiento [25-27]. Estos mini- o microsatélites también pueden desempeñar un papel importante en la replicación, reparación, mutación del ADN, la regulación de la transcripción génica y la alteración de la estructura de la proteína.

En particular, los VNTRs (ATCT/AGAT) del intrón 40 del gen *VWF*, se han empleado para identificar individuos a nivel poblacional y en la segregación de la EVW [28].

Cabe señalar que el número de alelos encontrados en VNTRs 1 y 2 del grupo sano es similar a la reportada previamente, pero no a VNTR3 ya que aquí se observó un menor número de alelos. Esto puede ser debido a un desequilibrio de ligamiento, o a que la muestra es pequeña, porque hay una gran diversidad entre las poblaciones mexicanas [29-35] lo que sugiere ampliar el número de muestra en un posterior estudio.

Los resultados del polimorfismo del VNTR1 aquí obtenidos en el grupo normal (sin antecedentes de EVW), se comparó con el de otras poblaciones encontrando una menor heterogeneidad (Tabla 4). De la misma forma, la heterogeneidad de VNTR2 y VNTR3 (17% y 58%) fue menor a la informada previamente por Mazinni et al. (67% vs 81%; $p < 0,001$) [11]. Esto corrobora la diversidad de las poblaciones y la particularidad de nuestra población mexicana.

Tabla 4. Porcentaje de frecuencias alélicas del VNTR1 observadas en el presente trabajo comparadas con estudios previos.

Alelo	Mestizos Mexicanos ¹ (n=100)*	Británicos ² (n=106)	Brazileños ³ (n = 366)	Australians ⁴ (n = 570)	Brazileños -II ⁵ (100)
5	3	0	0	0	0
6	7	8.5	17.5	15.9	9.8
7	40	39.6	47.3	42.6	56.86
8	15	0.9	3.3	4.2	0.98
9	10	0	0	0.4	0.98
10	10	9.4	8.2	6.1	11.76
11	5	12.3	11.7	16.1	11.76
12	6	26.4	10.4	12.3	6.86
13	0	1.9	1.6	1.8	0.98
14	3	0.9	0	0.4	0
15	1	0	0	0.2	0
Total	100	100	100	100	100
Heterocigosis %	55.27	75	72	74.7	66.67

* Número total de cromosomas estudiado. ¹Presente trabajo, ²Peake et al (1990); ³Pena et al. (1994); ⁴Haddad & Sparrow (1997); ⁵Mazzini (2000)

CONCLUSIONES.

1. Se analizaron tres VNTR del gen *VWF* en un grupo de familias con antecedentes de EVW y otro sin tales antecedentes
2. Se observaron once alelos en los VNTRs1 y 2, y ocho en el VNTR3
3. La frecuencia de heterocigocidad fue de 55.27%, 72.78% y 76.38% para los VNTR1, 2 y 3, respectivamente.
4. La frecuencia de los alelos 5 y 6 de VNTR1 en el grupo de padres de pacientes fue mayor que el de sanos.
5. La frecuencia de los alelos 9 y 10 de los VNTRs 2 y 3 en el grupo de padres de pacientes fue mayor que el de sanos.
6. Estas frecuencias y las de heterocigocidad distaron de lo observado en los padres de los pacientes sugiriendo un desequilibrio de ligamiento.
7. El resultado del análisis de datos y locus para la transmisión de desequilibrio sugiere que el VNTR3 está relacionado con la EVW ($p=0.0457$).

Agradecimientos:

Este trabajo fue apoyado por FOFOI, IMSS número 2005-1-I-011 to RP.

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 HR, 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. In: Hemostasis. Ch. 44. 1631-1655.
7. Benítez-Aranda H.: Diagnóstico de la enfermedad de von Willebrand en México. *Gac Méd Méx.* 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. Ginsburg D: Molecular basis of human von Willebrand disease: analysis of platelet von Willebrand factor mRNA. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1989; 86:3723-3727.
11. Ginsburg D : Human von Willebrand factor (vWF): isolation of complementary DNA (cDNA) clones and chromosomal localization. *Science* 1985; 228:1401-1406.

12. Mancuso DJ, Sadler JE: Structure of the gene for human von Willebrand factor. *J. Biol. Chem.* 1989; 264:19514-19527.
13. Bonthron D, Orkin SH: Nucleotide sequence of pre-pro-von Willebrand factor cDNA. *Nucleic Acids Res.* 1986; 14:7125-7127.
14. Mancuso DJ, Sadler JE: Human von Willebrand factor gene and pseudogene: structural analysis and differentiation by polymerase chain reaction. *Biochemistry* 1991; 30:253-269.
15. 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.
16. 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.
17. Hoffman R, Ginsburg D: Structure, biology and genetics of von Willebrand Factor. *Hematology, Basic principles and practice.* Chap. 112. Ed. Churchill-Livingston.1995; 1717-1723.
18. Casaña P, Aznar J: Diagnóstico molecular de las coagulopatías congénitas. Hemofilia y enfermedad de von Willebrand. *Rev Iberoamer Tromb Hemostasis.* 1998; 11:47-53.
19. Sadler J: A revised classification of von Willebrand's disease. *Thromb Haemost.* 1994; 71:520-25.
20. Lethagen S: Revised classification and treatment of von Willebrand disease. *Thromb Haemost.* 1998; 80:199-200.
21. Eberdhard M: Diagnosis and management of congenital von Willebrand disease. *Semin Thromb Hemost.* 2002; 26:109-110.
22. Budde U, Drewke E: Laboratory diagnosis of congenital von Willebrand Disease. *Semin Thromb Hemost.* 2002; 26:173-187.
23. Favaloro E: Von Willebrand Factor Collagen-Binding (Activity) Assay in the diagnosis of von Willebrand disease: A 15 year journey. *Seminars Thromb Hemost* 2002; 26:191-172.

24. 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.
25. Miha F, Bernhard L: Assay of von Willebrand Factor Cleaving Protease. *Semin Thromb Hemost.* 2002; 26:167-171.
26. Sadler JE, 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. Norrgard, K. Forensics, DNA fingerprinting y CODIS. *Nature Education* 2008; 1(1): 35).
29. 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.
30. Castaman G; Eikenboom JC, 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.
31. Casana P, Martinez F, Haya S, Espinos C, Aznar JA: Significant linkage and non-linkage of type 1 von Willebrand disease to the von Willebrand factor gene. *Brit. J. Haemat.* 2001; 115:692-700.

ANEXO I

CMN S XXI UMAE 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 2 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 cómo 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 de laboratorio que requiere la extracción de una pequeña muestra de sangre 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 este 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 a la Unidad 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 II

Método de extracción de DNA de muestras de sangre.

1. Tomar una muestra de 2-3 ml de sangre de un individuo y mezclarla con 500 ul de EDTA al 0.5%
2. Centrifugar a 3 Krpm durante 20 min y separar con pipeta Pasteur la capa de leucocitos de la interfase y pasarla a un tubo eppendorf limpio y esterilizado.
3. Agregar al tubo 1.5 ml de solución de lisis de eritrocitos, mezclar vigorosamente hasta que se halla resuspendido la pastilla.
4. Centrifugar a 5 Krpm por 10 minutos y eliminar el sobrenadante usando vacío.
5. Repetir los pasos 4,5 y 6 por lo menos dos veces.
6. Resuspender la pastilla en 886 de NaCl a 5mM, agitar vigorosamente. Dejar 10min a Temperatura Ambiente (TA).
7. Agregar a cada tubo 46 de SDS al 10%, agitar vigorosamente. Dejar 10min a TA
8. Adicionar 308 de NaCl saturado a cada tubo, agitar vigorosamente.
9. Centrifugar 15 min a 15 Krpm. Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf.
10. Precipitar el DNA con un volumen de isopropanol o dos volúmenes de etanol.
11. Centrifugar 5 min. a 5 Krpm, eliminar el sobrenadante y lavar dos veces la pastilla con etanol al 70%.
12. Resuspender la pastilla de DNA en 200 a 500 ul de agua desionizada
13. Leer la concentración de DNA a 260 y 280 nm. Calcular la concentración tomando en cuenta que 1DO=50ng/ul y la dil 1:50.
14. Guardar una alícuota a 4°C y otra a -20°C.

ANEXO III

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:

Vwi40F: TGTACCTAGTTATCTATCCTG;

vw140R: GTGATGATGATGGAGACAG

2. Material necesario:

- Agua desionizada., MgCl₂ 50mM. Solución amortiguadora para la amplificación. Mezcla de los cuatro deoxinucleósidos a 2mM/ul Iniciadores a 10 pmol/ul. DNA genómico 50 ng/ul. *Taq* DNA polimerasa 5 U/ul. Termociclador. Tubos eppendorf de 200 ul y puntas desechables. Micropipetas. Microcentrifugas.

3. Procedimiento:

- Se preparará una mezcla de reactivos de acuerdo a lo informado por Pena et al. (1994) excepción del DNA genómico, calculando la cantidad de reactivos para un volumen final de 25ul.
- Posteriormente se agregan 100-200 ng de DNA.
- Se colocarán los tubos en el termociclador bajo las siguientes condiciones: 94°C (4 min), seguida de 35 ciclos de 94°C (30seg), 55°C (30seg) y 72°C (30seg), y una extensión final de 72°C por 2 min.

ANEXO IV

Electroforesis en geles de agarosa

1. Material

- Solución amortiguadora TBE 1x preparada a partir del *stock* 5x, Bromuro de etidio a una concentración de 1 ug/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% en solución amortiguadora.
- Una vez disuelta la agarosa con calor, se agrega de Bromuro de etidio, agitándose para homogenizar.
- Se vierte la agarosa en la plataforma de la cámara y se inserta un peine para formar pozos.
- Una vez que el gel se solidifique, retirar el peine cuidadosamente y se añade a la cámara de electroforesis suficiente solución amortiguadora, hasta cubrir el gel.
- 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 20 min.
- Posteriormente se trasilumina con una lámpara de luz UV y se toman fotografías mediante el programa digital.

ANEXO V

Electroforesis en geles de acrilamida.

3. Material

- Solución amortiguadora TBE 1x preparada a partir del *stock* 5x, Bromuro de etidio a una concentración de 1 ug/ml.
- Acrilamida, Bis-acrilamida, TEMED, Persulfato de amonio (PSA al 10%). Marcador de peso molecular de 123pb, Cámara de electroforesis horizontal, Fuente de poder.

4. 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 de 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.

ANEXO VI

Secuenciación de las muestras seleccionadas.

5. Material

- Muestra amplificada por PCR, Kit de purificación de PCR (QUIAGEN, USA), Big Dye (Applied Biosystem, USA), Kit de purificación de Big Dye.

6. Procedimiento

- Las muestras seleccionadas y amplificadas por PCR se purifican pasándolas por columnas de sephadex QUIAGEN, de acuerdo al instructivo de la casa comercial. Cuantificar lo obtenido por espectrofotómetro a 260nm. 1DO=30ng/ul.
- Continuar con la reacción de secuenciación agregando 2 ul de Big Dye a 30ng de PCR purificado y llevándolo a un volumen de 20ul. Se lleva al termociclador de acuerdo a las condiciones sugerido por Applied Biosystem. 25 ciclos (95° 10seg, 50° 5 seg y 60° 4min).
- Pasar la reacción por nuevas columnas de purificación y secar a 95° 10min.
- Llevar al secuenciador donde un experto nos dará los resultados como electroferograma.
- Comparar con lo informado en la literatura e informar en artículo de publicación.