



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA

**“IDENTIFICACIÓN DE MUTACIONES EN EL
GEN VWF DE PACIENTES MEXICANOS CON
ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)
PRESENTA**

BRENDA MIREYA MELO NAVA

DIRECTORA DE TESIS: DRA. ROSENDA ISABEL PEÑALOZA ESPINOSA

MÉXICO, D. F.

NOVIEMBRE DE 2006



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.

AGRADECIMIENTOS

Al CONACyT y a la DGEP por el financiamiento otorgado a través de la beca 189668 durante la realización de los estudios de maestría.

Agradezco a la Coordinación de Investigación en Salud del IMSS por el financiamiento otorgado a través de la beca 9091928 durante el desarrollo de la maestría

A los miembros del Comité Tutoral por su guía para la realización de esta tesis

Dra. María Teresa Tusié Luna

Dra. Rosenda Isabel Peñaloza Espinosa

Dr. Diego Julio Arenas Aranda

INDICE GENERAL

Abreviaturas	2
Índice de Figuras y Tablas	3
Abstract	4
Resumen	5
1. Introducción	6
1.1. Enfermedad de von Willebrand	6
1.2. Gen del Factor de von Willebrand	7
1.3. El Factor de von Willebrand	8
1.4. Función del Factor de von Willebrand	10
1.5. Variantes de la Enfermedad de von Willebrand	11
1.5.1 Variante tipo 1	12
1.5.2 Variantes tipo 2	13
1.5.2.1. Variante tipo 2A	13
1.5.2.2. Variante tipo 2B	14
1.5.2.3. Variante tipo 2M	14
1.5.2.4. Variante tipo 2N	15
1.5.3 Variante tipo 3	15
1.6. Diagnostico de la enfermedad	16
1.7. Asesoramiento genético	17
2. Planteamiento del Problema	20
3. Justificación	21
4. Objetivos	22
5. Material y Métodos	23
6. Resultados	30
7. Discusión	48
8. Conclusiones	56
9. Referencias	57
10. Anexos	66

ABREVIATURAS

<i>EVW</i>	Enfermedad de von Willebrand
<i>FVIII</i>	Factor VIII
<i>FVIII:C</i>	Actividad coagulante del Factor VIII
<i>FVW</i>	Factor de von Willebrand
<i>GpIba</i>	Glicoproteína Ib alfa
<i>GpIIb-IIIa</i>	Complejo de glicoproteínas α IIb β III
<i>ISTH</i>	Sociedad Internacional de Trombosis y Hemostasia
<i>TP</i>	Tiempo de Protrombina
<i>TTPa</i>	Tiempo Parcial de Tromboplastina activada
<i>VWF</i>	Gen del Factor de von Willebrand
<i>VWF:Ag</i>	Antígeno del FVW
<i>VWF:CB</i>	Capacidad de unión a la Colágena
<i>VWF:RCo</i>	Actividad del cofactor Ristocetina

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Estructura del gen VWF humano	7
Figura 2. Dominios del péptido maduro del FVW humano	9
Figura 3. Localización de mutaciones puntuales, pequeñas inserciones y deleciones asociadas a los dominios del FVW	13
Tabla 1. Descripción de las variantes de la EVW	18
Tabla 2. Condiciones de amplificación de los exones del VWF	26
Tabla 3. Datos de laboratorio y fenotipo de pacientes mexicanos con EVW	31
Tabla 4. Variantes de VWF en individuos mexicanos y otras poblaciones	34
Tabla 5. Nuevas variantes en VWF en pacientes mexicanos con EVW	36
Figura 4. Secuencias de las nuevas variantes encontradas en VWF	37
Figura 5. Secuencia de una nueva variante encontrada en VWF	38
Tabla 6. Mutaciones en VWF en pacientes mexicanos con EVW	39
Figura 6. Análisis del DNA de la variación P812L	40
Figura 7. Secuencias de las mutaciones encontradas en VWF en pacientes mexicanos con EVW	41
Figura 8. Secuencias de las mutaciones encontradas en VWF en pacientes mexicanos con EVW	43
Figura 9. Secuencia de las mutación 867 G>A localizada en el exón 52 de VWF	44
Tabla 7. Mutación y diagnóstico en los pacientes mexicanos con EVW	46
Tabla 8. Variantes en la secuencia del extremo 3' del exón 28	47

ABSTRACT

Von Willebrand disease (VWD) is the most common hereditary bleeding disorder with a prevalence of 1% in the population. This disease is caused by a deficiency or abnormality of von Willebrand factor (VWF). VWF promotes platelets adhesion and its aggregation during thrombus formation. Another function of VWF is to carry the FVIII of the coagulation. The VWF is synthesized exclusively in endothelial cells and megakaryocytes. The molecular study of VWF (von Willebrand factor gene) is necessary in Mexico so that we can know the type VWD that a patient shows and to give a suitable diagnosis. This is the first genetic-molecular work made in Mexico that has studied the origin of VWD.

The objective of this project was to identify mutations located in the sequence of VWF in 34 Mexican patients of Pediatric Hospital, National Medical Center, Century XXI. The search of mutations was made by PCR (Polymerase Chain Reaction) and subsequently by direct sequencing of PCR products correspond to exons with greater frequency of mutation (18, 19, 20, 28, 45 and 52) informed by International Society of Thrombosis and Haemostasis (ISTH).

Sequencing data and haemostasia tests showed that 48% of patients have 1 VWD, 35% 2A VWD, 3% 2B VWD 3% 2M VWD and 11% 2N VWD. We found one mutation in patients with type 1, E1447Q mutation that has not been reported and was not in 100 alleles of healthy people. We found the R1597L mutation in a patient with 2A VWD, in 5 patients unrelated G1609R, in one patient S1613P, in one patient I1628T and the P2781S mutation that has not been informed previously. Also we found in one patient with 2B VWD the R1308P mutation. We found in one patient with 2M VWD the S1285F mutation, previously informed. Whereas in a patient with 2N VWD the new mutation, P812L that was not found in 100 alleles of healthy people.

Results show that there are in our patients 2 polymorphisms previously informed and one new mutation located in exon 18. One polymorphism reported in exon 19. There are also 8 polymorphisms previously informed, 2 new polymorphisms, 6 mutations previously reported and one new mutation in exon 28. In exon 45 only 1 polymorphism already reported and in exon 52 there are 3 new polymorphisms and one mutation

We propose the molecular study of VWF to establish the genotype-phenotype correlation in patients with the disease and with it to provide an accurate diagnosis and an adequate treatment of the disease.

RESUMEN

La enfermedad de von Willebrand (EVW) es el desorden de la coagulación hereditaria más común con una frecuencia del 1% en la población. Esta enfermedad es causada por una deficiencia o anomalía del factor de von Willebrand (FVW). El FVW promueve la adhesión de las plaquetas y su agregación durante la formación del trombo. Otra función del FVW es transportar al FVIII de la coagulación. El FVW se sintetiza exclusivamente por células de endoteliales y megacariocitos. El estudio molecular de VWF (gen del factor de von Willebrand) es necesario que sea implementado en México para que podamos conocer el tipo EVW que manifiesta un paciente y para dar un diagnóstico adecuado. Este es el primer trabajo genético-molecular realizado en México que ha estudiado el origen de la EVW.

El objetivo de este proyecto fue identificar mutaciones en la secuencia de VWF en 34 pacientes mexicanos del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional SXXI. La búsqueda de mutaciones se realizó por la técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), seguida por la secuenciación directa de los productos de PCR correspondientes a los exones con mayor frecuencia de mutación (18, 19, 20, 28, 45 y 52) informados por la Sociedad Internacional de Trombosis y Haemostasis (ISTH).

Los datos de secuenciación y las pruebas de hemostasia mostraron que el 48% de los pacientes tiene EVW 1, el 35% EVW 2A, el 3% EVW 2B, el 3% 2M y el 11% EVW 2N. Encontramos una mutación en un paciente con el tipo 1, E1447Q cambio que no ha sido informado y que no se encontró en 100 alelos de personas sanas. En un paciente con EVW 2A encontramos la mutación R1597L, G1609R en 5 pacientes no relacionados, S1613P en 1 paciente, I1628T en un paciente y la mutación P2781S que no ha sido informada previamente. También encontramos en un paciente con EVW 2B la mutación R1308P. Encontramos en un paciente con EVW 2M la mutación S1285F, previamente informada. Mientras que en un paciente con EVW 2N se encontró la nueva mutación P812L que no fue encontrada en 100 alelos de personas sanas.

Los resultados obtenidos muestran que en nuestros pacientes hay 2 polimorfismos previamente informados y una mutación nueva presente en el exón 18. Un polimorfismo informado en el exón 19. También se encontraron 8 polimorfismos previamente informados, 2 polimorfismos nuevos, 6 mutaciones previamente informadas y 1 mutación nueva en el exón 28. En el exón 45 sólo 1 polimorfismo ya informado y en el exón 52 se encontraron 3 nuevos polimorfismos y una mutación.

Con base a los resultados obtenidos en este estudio, proponemos que el estudio molecular de VWF es necesario para establecer la correlación genotipo-fenotipo en pacientes con la enfermedad y con ello proporcionar un diagnóstico certero y un tratamiento adecuado de la enfermedad.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Enfermedad de von Willebrand

La enfermedad de von Willebrand (EVW) fue descrita en 1926 por el Dr. Erick von Willebrand, quién estudió una familia del archipiélago de Aland, cuyos miembros padecían de hemorragias que afectaban por igual a hombres y mujeres, siendo este padecimiento diferente a la hemofilia. Un tiempo de coagulación prolongado con un conteo normal de plaquetas, fue la anormalidad manifestada más importante por lo que sugirió que se debía a un defecto funcional de las plaquetas que estaba asociado a la lesión sistémica de las paredes de los vasos, por lo que llamó a este desorden pseudohemofilia hereditaria.¹ En 1971 se identificó que el responsable de esta enfermedad era el factor de von Willebrand (FVW) y no en el Factor VIII (FVIII).²

Las principales manifestaciones clínicas de la EVW son hemorragias mucocutáneas como epistaxis, gingivorragias, hemorragias del tubo digestivo, equimosis en la piel, hematomas y metrorragias.³ Aunque se han descrito más de 20 subtipos de EVW, la clasificación actual consiste de tres tipos.^{4,5}

Se considera que la EVW es la alteración hereditaria de la coagulación más frecuente que se debe a la deficiencia o anormalidad del FVW. La prevalencia de la EVW es del 1% en la población mundial.^{6, 7, 8} En la revisión hecha por Castaman y cols. se considera que las formas clínicamente significativas de la enfermedad afectan a por lo menos 100 personas por millón en la población.³ Los datos de prevalencia basados en referencias de centros especializados han mostrado valores desde 2.3 en Kagoshima, Japón hasta de 11.3 en la región IX de Chile, mientras que valores intermedios fueron informados en el Reino Unido, Suiza, Jordania, Venezuela y Suecia. En el año 2005 se informó que en los centros especializados localizados en la región nórdica la prevalencia estimada era de 8 por 100 000 habitantes.⁹ Debido a que se ha visto que hay variación en la prevalencia informada para diferentes países, incluyendo algunos en vías de desarrollo es difícil asegurar la prevalencia existente en México, ya que seguramente hay diferencias en las formas de diagnóstico y en el registro entre poblaciones. En nuestro país, no hay un registro epidemiológico exacto de

la enfermedad, de hecho sólo se han informado algunos estudios desde el punto de vista clínico y hematológico. En uno de ellos se informaron 60 casos en 24 familias con diagnóstico de EVW¹⁰ y en otro se estudió la asociación entre la gravedad de hemorragias en pacientes pediátricos con las variantes de la EVW logrando un mejor diagnóstico clínico.¹¹

1.2. Gen del Factor de von Willebrand (VWF)

El gen que codifica para el FVW ha sido clonado y localizado en el cromosoma 12p.13.2. Es un gen compuesto de 178 kb y contiene 52 exones que originan un mRNA de 8923 pb (Figura 1).¹²

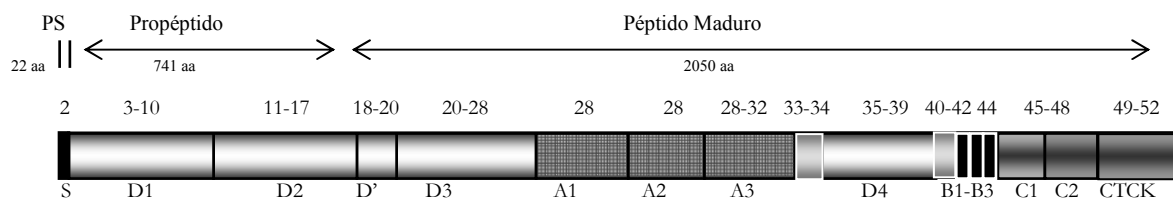


Figura 1. Estructura del gen VWF humano localizado en el cromosoma 12 (p13.3). (Tomada y modificada de la Base de Datos de VWF).¹³ Los 17 primeros exones codifican para el péptido señal (PS) y para el propéptido. El péptido maduro es codificado por los exones 18-52.

La secuencia codificante de VWF ha revelado un sitio de inicio de la transcripción, la caja TATA a -30 pb y la caja CCAAT a -22pb¹⁴. El gen también contiene secuencias de elementos que actúan en la región +155 a +247 que son sitios obligatorios para los factores de transcripción GATA y NFY, quienes contribuyen a la activación específica del promotor. Las asociaciones de los factores de unión a VWF son quienes determinan el patrón de activación de este gen en la célula.^{15, 16}

El gen contiene secuencias de elementos que actúan en la región +155 a +247 que son sitios obligatorios para los factores de la transcripción GATA y NFY, quienes contribuyen a la activación específica del promotor. Dentro de los factores que actúan en

trans también se encuentra Ets, un miembro de la familia GATA que funciona como activador, mientras que los factores Oct1 y NF1 funcionan como represores. NFY funciona como activador cuando interactúa con la secuencia CCAAT en la posición -18 en el promotor, mientras que funciona como represor cuando interactúa con la secuencia +226 a +234. Las asociaciones de los factores de unión a VWF son quienes determinan el patrón de activación de este gen en células endoteliales.^{15, 16}

Existe un pseudogen de 23 kb que es parcial y altamente homólogo a VWF ubicado en el cromosoma 22.¹² La secuencia de este pseudogen abarca los exones 23 al 34 y muestra una homología del 97 % en su secuencia.¹⁷ También se conoce que en las secuencias codificantes del extremo carboxilo del FVW en diferentes especies de vertebrados hay una homología significativa.¹⁴

El gen codifica un péptido señal, un propéptido (también conocido como antígeno II del FVW) y a la proteína FVW. Las dos primeras secuencias son codificadas por los 17 primeros exones, mientras que la proteína madura del FVW es codificada por los 35 exones en la porción restante del gen. El producto primario de la proteína FVW consta de un péptido señal de 22 aminoácidos, un propéptido de 741 aminoácidos, y la molécula madura de 2050 aminoácidos.^{3, 16} Esta proteína precursora de 2813 aminoácidos alcanza un peso de 360 KDa. El propolipéptido de 741 aminoácidos pesa 100 KDa y la subunidad madura de 2050 aminoácidos 270 KDa.^{18, 19}

1.3. El Factor de von Willebrand (FVW)

El FVW es sintetizado por células endoteliales, megacariocitos y plaquetas. Los cuerpos de Weibel Palade y los gránulos alfa en las plaquetas contienen al FVW en su forma de multímeros grandes. Aunque también puede encontrarse unido a diferentes tipos de colágena de la matriz subendotelial.^{3, 18} En la unión y actividad del FVW participan los dominios de repetidos D1, D2, D', D3, A1, A2, A3, D4, B1, B2, B3, C1, C2, C3 y CK. El dominio CK participa de manera importante en la dimerización del factor y D3 en su multimerización (Figura 1). En los dominios A1 y A3 interactúa con diferentes tipos de

colágena, con otros componentes de la matriz y con las glicoproteínas receptoras de las plaquetas GpIb α (subunidad del complejo GpIb-IX-V) y a GpIIb-IIIa (integrina α IIb β III).¹⁸

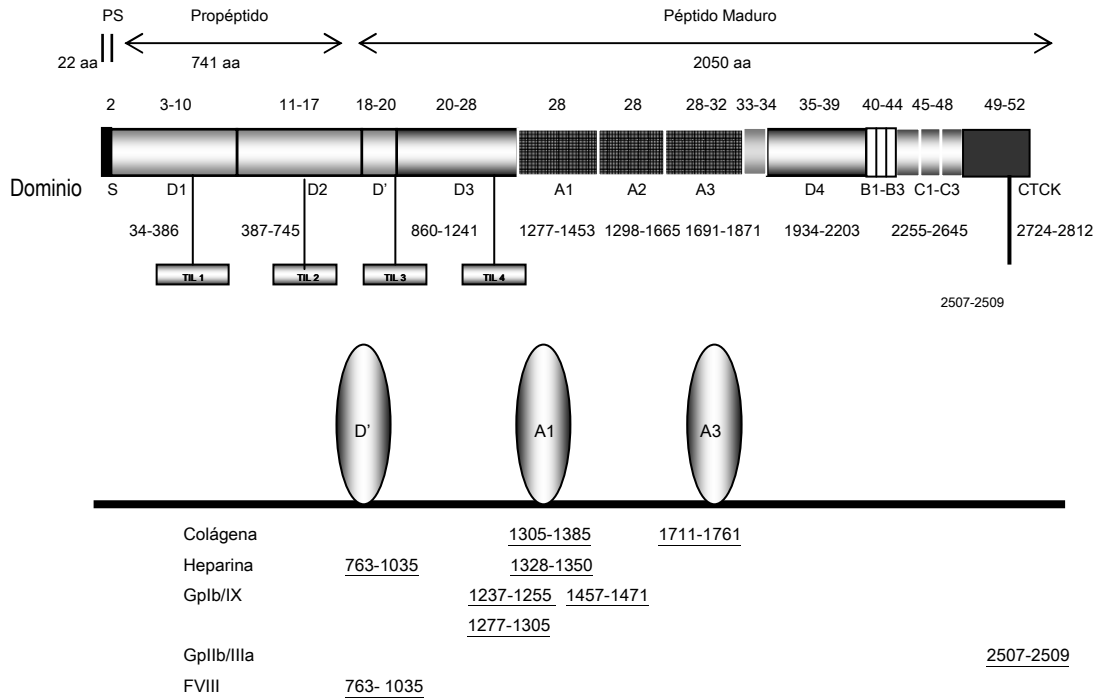


Figura 2. Número de residuos de aminoácidos en los dominios de unión del péptido maduro FVW de humano. Los primeros 2 exones de VWF codifican para el péptido señal (PS), el propéptido es codificado por los exones 3-17 y el péptido maduro es codificado por los exones 18-52. El FVIII se une al FVW en su dominio D'; el dominio D3 permite la unión con la GpIb/IX; el dominio A1 permite la unión con la heparina, la colágena y con la GpIb/IX, quién también interacciona en el dominio A2. El dominio A3 es importante para unirse a la colágena, mientras que la unión con la GpIIb/IIIa se hace en el dominio CTCK.

El procesamiento postraduccional comienza con la eliminación del péptido señal y la glicosilación de sus cadenas en el retículo endoplásmico. Posteriormente ocurre su dimerización por enlaces disulfuro y su proteólisis entre los dominios D1 y D2.¹⁶ En el aparato de Golgi termina el proceso de glicosilación tipo O y N y los carbohidratos específicos de la glicosilación tipo N son modificados por sulfatación.^{3,14} Finalmente ocurre la polimerización del factor en más de 50 unidades de 0.5 a 20 MDa. En la red *trans* de Golgi la enzima furina o PACE (endoproteasa dependiente de calcio asociada a membrana) escinde el propéptido, siendo este proceso importante para la unión al FVIII, pero no para

la multimerización.¹⁷ La secreción del FVW puede inducirse por desmopresina (análogo de la vasopresina) mediante su unión al receptor V2 de células endoteliales.³

En el plasma, la metaloproteasa ADAMTS-13 actúa sobre los multímeros del FVW entre Y1605 y M1606 en el dominio A2. Este proceso crea las diferentes forma en que encontramos el factor que van desde su forma de dímero simple hasta los 20 dímeros que forman el multímero más complejo.²¹ La degradación proteolítica de los multímeros es un evento normal, ya que estos tienen un elevado potencial trombogénico por que poseen múltiples sitios de interacción con las plaquetas y las paredes de los vasos sanguíneos. En condiciones de homeostasis esta reacción inhibe el crecimiento del trombo que forman las plaquetas.²¹

1.4. Función del FVW

La actividad del FVW en el proceso de formación del tapón plaquetario es importante ya que las plaquetas se adhieren a células de la matriz subendotelial por la interacción del FVW con la colágena I y III vía su dominio A3 (E1673-G1874) y su dominio A1 (E1260 y G1479) con la glicoproteína GpIb α (subunidad del complejo GpIb-IX-V) de las plaquetas.^{22,23} Además de que el FVW también se une a glicolípidos sulfatados que sirven de moléculas accesorias en su interacción con las plaquetas en el dominio A1, en el sitio de unión a la colágena y heparina.²¹ En la adhesión plaquetaria, los multímeros del FVW tienen una participación mayor por que poseen múltiples sitios de anclaje a receptores de las glicoproteínas.²⁴

La glicoproteína GpIa/IIa (integrina $\alpha 2\beta 1$) es otro receptor importante de la plaquetas y su interacción con el FVW permite un aumento de su afinidad a la colágena.²³ Cuando GpIa/IIa y el complejo de interfase GpIb-IX-V se unen al FVW, la colágena es expuesta a P-selectina para reparar la ruptura de vasos sanguíneos.²⁵

La agregación de las plaquetas es mediada por la unión del FVW en su secuencia RGDS con el receptor GPIIb-IIIa (o integrina $\alpha IIb\beta 3$) que también se une al fibrinógeno para reclutar más plaquetas en el tapón plaquetario. La actividad de los multímeros de

FVW en la adhesión plaquetaria se logra porque poseen múltiples sitios de anclaje a estos receptores.²⁶

A nivel intracelular la activación de las plaquetas por medio del FVW activa a la enzima fosfaditilinositol 3 cinasa que estimula la síntesis de fosfaditilinositol 3, 4, 5 trifosfato (PIP³).²⁷ También se activa al receptor FcγRIIA (FcγRIIA) y se estimula a la fosfolipasa A2 por acción del Ca²⁺ y de la cinasa MAPK 38.^{26,28} La presencia del FVW se usa como molécula marcadora de daño endotelial en pacientes con dermatomiositis y esta relacionada al aumento de las enzimas aspartato aminotransferasa, alanina aminotransferasa y aldolasa.²⁹

Otra función importante del FVW ocurre al competir con los sitios de unión a fosfolípidos del FVIII y evitar que el factor de la coagulación sea proteolizado por proteasas de serina, incluyendo a la proteína C activa. El FVW interacciona en su dominio D' con el FVIII manteniéndolo en un estado activo pero inhibiendo su actividad sobre la trombina y evitando su inactivación por el factor X activado (FXa).^{2,24}

1.5. Variantes de la Enfermedad de von Willebrand

Los defectos en la síntesis y actividad del FVW provocan la EVW. La clasificación revisada de la EVW por la Sociedad Internacional de Trombosis y Hemostasia (ISTH), la identifica en dos categorías: la deficiencia cuantitativa del factor (tipos 1 y 3) y la deficiencia cualitativa (tipo 2)^{8,30,31}.

De las alteraciones moleculares que se han encontrado en pacientes clasificados con EVW tipo 1 y 3 podemos mencionar a las mutaciones sin sentido que originan la pérdida de residuos de cisteína en el dominio D3 (área de multimerización) y el extremo carboxilo terminal (área de dimerización) (Figura 3). Las alteraciones en estos dominios dan lugar a la secreción reducida del FVW en el medio y a la retención intracelular del mismo.³¹

1.5.1 Variante tipo 1.

La EVW tipo 1 es una condición autosómica dominante de penetrancia y fenotipo variable que se presenta en el 70-80 % de los casos. El patrón de multímeros del FVW en una electroforesis es reducido, lo que la describe como una deficiencia parcial cuantitativa del FVW.³¹ A pesar de su elevada prevalencia la causa genética aún no está bien comprendida. Se han informado mutaciones que comprenden 2 pequeñas deleciones que resultan en cambio de un marco de lectura, una mutación sin sentido y 11 mutaciones de cambio de sentido.³²

No hay alguna mutación dominante que haya sido identificada en una proporción importante en pacientes con EVW tipo 1 y en la mayoría de los casos son heterocigotos a alguna mutación.^{32,33} Por lo que es importante mencionar el estudio de 70 familias con EVW tipo 1 en Canadá donde se encontró que el 14.3% presentó el polimorfismo Y1584C.³⁴

En algunas familias con EVW tipo 1 hay un patrón de herencia claramente dominante con penetrancia elevada y con síntomas de sangrado moderadamente severos.^{32,35}

También se han descrito mutaciones sin sentido, por ejemplo de C1149R en el dominio D3 produciéndose un mecanismo dominante negativo donde la subunidad defectuosa del FVW interfiere con las subunidades normales codificadas por un alelo normal. En este caso los heterodímeros son retenidos en el retículo endoplásmico y sólo los homodímeros silvestres son liberados³⁴. También se han detectado deleciones o mutaciones de cambio de sentido en los exones 19, 26, 28, 37 y 52 (Figura 3).^{13,33}

Existen otros factores que afectan la variedad y penetrancia incompleta de la EVW tipo 1, por ejemplo el grupo sanguíneo pues es conocido que el 60% de la variación del FVW en el plasma se debe a factores genéticos, donde el grupo ABO es el más importante.

En sujetos tipo O los niveles de FVW son más bajos en un 25-35% que en los demás grupos.³⁶ Esto podría deberse a una susceptibilidad mayor del FVW a sufrir proteólisis por ADAMTS13.²¹

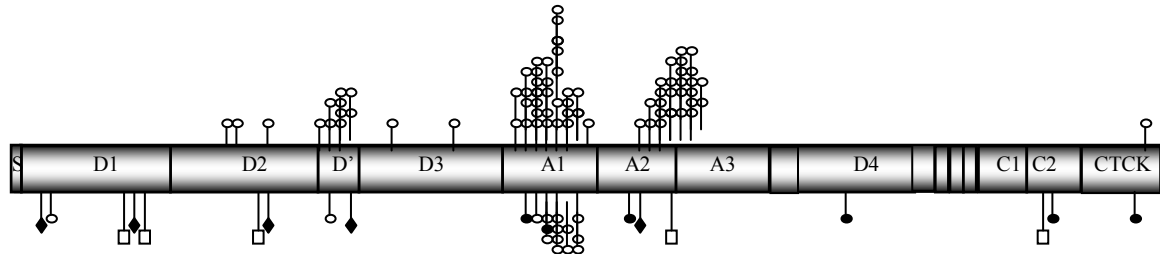


Figura 3. Localización de mutaciones puntuales en los dominios del factor de von Willebrand, con sentido equivocado (○), pequeñas inserciones y deleciones (●) y cambio de sentido (◻). (Datos obtenidos en la Base de Datos de VWF).¹³

1.5.2 Variante tipo 2.

Se estima que las anomalías del FVW que se detectan en laboratorio son 8000 en un millón, de las cuales 125 personas son clínicamente afectadas y cerca del 10% están afectados por una variante cualitativa de la EVW.¹⁸ Las variantes tipo 2 de la EVW incluyen todas las variantes en las cuales la proteína que circula es cualitativamente anormal por un defecto en la estabilidad, función o en la distribución de sus multímeros². La herencia de estas variantes es autosómica dominante con excepción del tipo 2N que es recesiva.³⁸ Con el conocimiento de los dominios del FVW involucrados en la interacción de la GPIIb α , se ha realizado la búsqueda de mutaciones principalmente en el exón 28 de VWF que codifica para los dominios A1 y A2 de la proteína madura. La búsqueda de mutaciones se ha extendido a los exones adicionales del VWF que están relacionadas con los tipos 2A, 2B, 2M y 2N de la EVW.

1.5.2.1 Variante tipo 2A.

El tipo 2A de la EVW está caracterizado por un defecto cualitativo del FVW de herencia autosómica dominante y con la ausencia de multímeros de elevado e intermedio peso molecular³³.

Se conocen cerca de 45 mutaciones de cambio de sentido responsables de este fenotipo.¹² Estas mutaciones se dividen en 2 grupos con distintos mecanismos patogénicos. En el primer grupo, mutaciones como G1505R, S1506L y V1607D afectan el transporte intracelular, o provocan defectos en su ensamblaje, en el almacenamiento o en la secreción de sus multímeros de alto peso molecular en el plasma y en las plaquetas.³⁶ En el segundo grupo, mutaciones como G1505E y R1597W provocan defectos en la proteólisis de los multímeros de alto peso molecular (multímeros necesarios para la unión del complejo de glicoproteínas GPIb-IX-V) e incrementan los multímeros de bajo peso molecular.^{19, 37}

1.5.2.2 Variante tipo 2B.

La EVW tipo 2B está caracterizada por la pérdida de los grandes multímeros del FVW y a que su afinidad al complejo GPIb-IX-V se encuentra aumentada. Las pruebas de laboratorio muestran una respuesta aumentada del plasma rico en plaquetas a la ristocetina. La unión del FVW mutante puede iniciar trombocitopenia que llega a ser severa. Este desorden representa menos del 20% de las variantes tipo 2.³⁹ La mayoría de las mutaciones en la variante 2B se deben a mutaciones en el dominio A1, se sabe que el 90% son causadas por mutaciones en las posiciones 1306, 1308, 1316 y 1341 y el exón que se encuentra principalmente afectado es el 28 (dominio A1).⁴⁰

1.5.2.3 Variante tipo 2M.

La variante 2M (tipo Milwaukee) muestra una disminución en las funciones de las plaquetas dependientes del FVW, ya que la presencia de los multímeros sugiere que la mutación afecta su actividad pero no su estructura. Algunas mutaciones heterogéneas responsables de la variante 2M han sido localizadas en el dominio A1, especialmente en el loop formado por puentes disulfuro entre C1272-C1458 que evita la unión con GpIbIX.⁴¹ Estas mutaciones incluyen la delección del segmento R1392-Q1402 y las mutaciones de cambio de sentido G1324S, F1369I e I1425F.³ La mutación en el tipo Vicenza (R1205H), ha sido informada en familias europeas y está asociada a un cambio en el nucleótido 7401.³

Los exones afectados en este tipo de EVW son 18, 27 y 28 que afectan a los dominios D', D3 y A1.¹³

1.5.2.4 Variante tipo 2N.

La variante 2N (tipo Normandía) se caracteriza por un defecto funcional en la región N terminal de la molécula donde se localiza el sitio de unión para FVIII, sin haber cambio en la distribución de los multímeros en el plasma.^{2,3} En pocos pacientes con tipo 2N los defectos en la unión al FVIII están asociados con una disminución sintomática de las funciones dependientes de las plaquetas. Algunos fenotipos intermediarios pueden ser causados por una coheredabilidad de alelos de EVW tipo 1 y 2N, lo que indicaría que la heterocigocidad puede influir fuertemente en la presentación clínica de las variantes de la enfermedad². Las mutaciones afectan al dominio D' y D3, lo que hace sospechar que se presentan cuando hay una reducción marcada del FVIII en comparación con FVW.³⁷ Se han informado 16 mutaciones de cambio de sentido en los exones 18, 19, 20, 21 y 24.¹³

1.5.3 Variante tipo 3.

Esta variante de la EVW se caracteriza por tener niveles muy bajos o ausentes del FVW y es la forma clínica más grave de la enfermedad. El modo de herencia es autosómico recesivo, asociado con la homocigocidad o heterocigocidad de un alelo alterado.⁶ Las deleciones parciales o totales del gen han sido relacionadas con esta variante, aunque también se han informado mutaciones en casi todos los exones del gen VWF.¹³

La homocigocidad en la deleción del gen puede asociarse con la aparición de aloanticuerpos en contra del FVW, lo que también ha sido utilizado como un estímulo en reacciones anafilácticas.¹⁵

Se han identificado alteraciones en todo el gen: deleciones, mutaciones que llevan a un corrimiento del marco de lectura o mutaciones sin sentido.^{13, 31} Pero existen algunas que son particularmente recurrentes en el norte de Europa 2680delC terminal o R2535X. La región codificante del VWF contiene 11 codones CGA (arginina) por lo que los dinucleótidos CG se convierten en puntos calientes para sufrir cambio de C a T lo que produce un codón de paro.³ Este tipo de mutaciones han sido informadas en los exones 9, 28, 32 y 45 y una eliminación que abarca los exones 26-34 y 27 en mutaciones sin sentido.¹³

1.6. Diagnóstico de la EVW

Dado que la biosíntesis y el procesamiento del FVW son eventos muy complejos puede haber alteraciones en los diferentes loci involucrados, que pudieran resultar en fenotipos semejantes a EVW por lo que se tiene que ser muy cuidadoso en el diagnóstico.⁴²

Los pacientes con EVW manifiestan síntomas hemorrágicos que son típicos defectos de la hemostasia primaria. La enfermedad debe sospecharse en cualquier paciente con historia de hemorragias espontáneas y postoperatorias, especialmente si la historia familiar sugiere un patrón de herencia autosómica.⁴³

Es importante documentar la historia familiar de hemorragia, aunque la hemorragia sólo se presente en algunos miembros de una familia, ya que esto permite distinguir a los falsos positivos. Además hay considerar que el sangrado, no es un síntoma específico pues puede tener diferentes causas.⁴⁴

Aunque se ha informado que la EVW tipo 1 es la forma más común de la enfermedad, en la práctica su diagnóstico es muy difícil de realizar por que los valores de laboratorio de un paciente pueden parecerse a los valores considerados normales.⁴³ Por ejemplo, en un estudio con 37 sujetos heterocigotos para la mutación 2680delC, la media del valor de FVW fue del 46% con un rango de 13% a 110% considerado dentro de lo normal.⁴⁵

Frecuentemente, la interpretación de los valores de laboratorio del FVW es difícil, por lo que el diagnóstico se establece con la imagen global de todas las pruebas de hemostasia. Por regla general, no hay un valor de corte aceptado en donde el paciente pueda ser clasificado en una variante de la EVW en forma definitiva.⁴⁵ Existen además variaciones importantes de los niveles del FVW plasmático en el mismo paciente, variables como el ejercicio, el tabaquismo, enfermedad subyacente, fármacos y el embarazo pueden modificar los niveles del FVW.⁴⁶ En las pruebas de escrutinio la cuenta de plaquetas (CP) es usualmente normal, la trombocitopenia leve puede ocurrir en pacientes con tipo 2B, el tiempo de hemorragia (TH) usualmente es prolongado, pero puede estar normal en pacientes con formas leves de la enfermedad como ocurre en el tipo 1. El tiempo de

protrombina (TP) es normal y el tiempo de tromboplastina parcial activado (TTPa) puede estar prolongado de acuerdo a la concentración del FVIII. El antígeno de FvW (FvW:Ag) y la actividad del cofactor ristocetina (FvW:RCo) son las pruebas básicas para el diagnóstico de la EVW, estudios adicionales como la agregación plaquetaria inducida por Ristocetina (RIPA) y el estudio de los multímeros permiten caracterizar a la EVW para un tratamiento apropiado (Tabla 1).^{44, 45, 47}

1.7. Asesoramiento Genético en la EVW

El asesoramiento del riesgo de EVW requiere que se determine si una familia está afectada por una variante dominante o recesiva. Para las familias afectadas con formas severas de la enfermedad, el asesoramiento es el mismo que en un desorden con carácter recesivo.³

Los 2 principales síntomas a considerar son la historia familiar de hemorragias, y hemorragias en mucosas sin causa aparente. De manera importante hay que documentar las metrorragias recurrentes en mujeres que pueden llegar a ser graves, sobre todo en caso de mujeres embarazadas, donde existe el riesgo de sufrir hemorragias severas al momento del parto.⁵⁰

El diagnóstico prenatal se realiza a través de la determinación de FvW, FVIII y de multímeros en sangre fetal. El gen es altamente polimórfico, con por lo menos 40 sistemas de marcadores para estudios genéticos de EVW.⁵¹ El más informativo de estos es el repetido TCTA del intrón 40, con más de 98 alelos y este sistema es utilizado como diagnóstico prenatal severo de EVW.^{51,53} La secuenciación de polimorfismos también es utilizada para confirmar el diagnóstico neonatal de EVW.⁵⁴

Finalmente, con el diagnóstico preciso es factible proporcionar el mejor tratamiento a los pacientes, conocer el riesgo de la EVW y un adecuado asesoramiento genético. Aunque la mayoría de las familias que reciben asesoramiento genético no decide alterar su ciclo reproductivo por que el fenotipo de la EVW puede ser moderado.⁴³

Tabla 1. Descripción de las variantes de la EVW, pseudo EVW y Hemofilia ^{45, 48, 49}.

Diagnóstico	Definición	Herencia	Subvariantes	FVIII %	FVW:Ag%	FVW:RCo%	FVW:CB%
Normal				50-100	50-100	50-100	50-100
Tipo 1	Deficiencia parcial cuantitativa del FVW. Presencia de todos los multímeros.	Autosómica dominante	I plaquetas normales, I plaquetas bajas, IA y I-1, I-2, I-3	Bajo ↔ Normal	Bajo ↔ Normal	Bajo ↔ Normal	Bajo ↔ Normal
Tipo 2A	Disminución de la función de plaquetas con ausencia de multímeros de elevado peso molecular. -2A.-Alteraciones en el transporte y secreción de multímeros. - 2B. Plaquetas discordantes -2C.-Defecto en la multimerización. -2D. Defecto en la dimerización	Autosómica dominante	IIA, IB, I plaquetas discordantes, IIC, IID, IIE, IIF, IIG, IIH, II-1, IIA-1, IIA-2, IIA-3	Bajo ↔ Normal	Bajo ↔ Normal	Bajo	Bajo
Tipo 2B	Afinidad incrementada del FVW con Gplb. Asociado a trombocitopenia, especialmente después administrar desmopresina. -2B New York, Malmö	Autosómica dominante	IIB, I New York/Malmö	Bajo ↔ Normal	Bajo ↔ Normal	Bajo	Bajo
Tipo 2M	Función del FVW dependiente de plaquetas disminuida con la presencia de grandes multímeros. No hay ausencia de multímeros de elevado peso molecular. 2M (Milwaukee) -B Vicenza	Autosómica dominante	B, I Vicenza, IC y ID	Bajo ↔ Normal	Bajo ↔ Normal	Bajo	Bajo a medio pero más alto que FVIII:RCo
Tipo 2N	Disminución de la afinidad del FVW por el FVIII. - 2N (Normandía)	Autosómica recesiva	Defecto de unión a FVIII tipo Normandía	Bajo	Bajo ↔ Normal	Bajo ↔ Normal	Bajo ↔ Normal
Tipo 3	Deficiencia completa del FVW	Recesiva homocigota o doblemente heterocigota	III	Muy bajo	Indetectable	Indetectable	Indetectable
Pseudo EVW	Sin defecto en el FVW. Desorden en las plaquetas con una afinidad incrementada del FVW por Gplb. Puede haber trombocitopenia	Dominante		Bajo ↔ Normal	Bajo ↔ Normal	Bajo	
Hemofilia	Pueden estar alterados los niveles de FVW	Ligado al X		<1	50-100	50-100	50-100

La clasificación de la ISTH agrupa en 3 variantes (números arábigos) las más de 20 subvariantes (números romanos) de la EVW. Se observan los valores de las principales pruebas de laboratorio en el diagnóstico de la enfermedad.

Usualmente la terapia de la EVW está basada en la infusión de desmopresina. Sin embargo, el uso de desmopresina en la liberación de multímeros de elevado peso molecular ha sido asociado a infarto al miocardio y a trombosis arterial. Además de que este tratamiento no funciona en las variantes tipo 2 y 3 que necesitan la administración de

concentrados de FVW/FVIII.⁴⁹ El problema con el uso de los concentrados es que son derivados de sangre y existe el riesgo de que estén contaminados por virus. Por lo que la terapia génica en la EVW resulta ser prometedora ya que sólo el defecto en el gen VWF es lo que provoca la enfermedad y en este ámbito ya se ha logrado que células endoteliales caninas corrijan la EVW tipo 3.⁵⁵ Esto no quiere decir que no hay cuestiones importantes que tienen que ser resueltas antes de aplicarse la terapia en humanos. Hay que considerar la eficiencia en la transferencia del gen por que se utilizan vectores retrovirales que llevan 8kb de cDNA que tienen que permitir la expresión por un tiempo prolongado, particularmente en los megacariocitos.⁵⁶

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La EVW es una entidad muy difícil de diagnosticar debido a la interrelación que establece el factor con diferentes componentes biológicos que participan en la hemostasia, como las proteínas que participan en la agregación y adhesión de las plaquetas y con el FVIII. Esto se ve reflejado en las múltiples variantes que existen de la enfermedad y que sólo pueden ser diagnosticadas en un hospital de tercer nivel, donde también tienen que tener implementado la prueba de patrón de multímeros de alta resolución, prueba muy importante para poder determinar los subtipos de la variante tipo 2.⁵⁷ Aunque en México se están haciendo esfuerzos por conocer la prevalencia y la manera de realizar su diagnóstico con respecto a la intensidad de la hemorragia,^{9,10,58} no se conoce de manera específica el tipo y la frecuencia de las alteraciones moleculares que están causando la enfermedad.

El estudio de la búsqueda de mutaciones en VWF es difícil y desde el punto de vista económico es costoso de realizar, por que el tamaño del gen es de 178 kb y el tipo de mutaciones más frecuentes son cambio de sentido. Es por eso que en este trabajo se hizo la búsqueda de mutaciones en los exones más frecuentemente alterados para otras poblaciones (18, 19, 20, 28, 45 y 52)¹³ en muestras de DNA en pacientes mexicanos con EVW del Hospital de Pediatría, CMN SXXI, IMSS.

3. JUSTIFICACIÓN

A pesar de la elevada prevalencia que representa la EVW en la población en general y de la importancia de las enfermedades hematológicas en nuestro país⁵⁹, se ha subestimado la frecuencia de la EVW debido a que su diagnóstico es muy difícil de establecer. Existe poca información de estudios realizados en pacientes mexicanos con la enfermedad y un desconocimiento del tipo de mutaciones que originan la enfermedad en nuestro país, por lo que resulta necesario estudiar este padecimiento desde un punto de vista molecular. Este estudio contribuye principalmente a conocer las causas de la EVW presente en nuestros pacientes, realizar un diagnóstico certero y proporcionar un adecuado tratamiento y asesoramiento al paciente. Además de permitirnos conocer más de la constitución genética presente en nuestra población

4. OBJETIVOS

- **OBJETIVO GENERAL**

Identificar mutaciones en pacientes mexicanos con enfermedad de von Willebrand en los exones más frecuentemente alterados (18, 19, 20, 28, 45 y 52) del gen VWF.

- **OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Creación de una genoteca de pacientes con EVW.
2. Realizar la clasificación del tipo de variante de EVW que está afectando a cada paciente de acuerdo al tipo de herencia y a sus características clínicas.
3. Determinar la existencia de mutaciones en los pacientes mexicanos con EVW.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

- **Pacientes.**

El estudio se realizó en el Hospital de Pediatría, CMN SXXI del Instituto Mexicano del Seguro Social, el cuál es un centro de atención de tercer nivel. Se estudiaron 34 pacientes mestizo mexicanos con diagnóstico de EVW, 27 de ellos no relacionados, previo consentimiento informado y con la aceptación del comité de ética del hospital (Anexo 1). Los pacientes fueron referidos por el Servicio de Hematología del Hospital de Pediatría y por otros hospitales de los estados de Aguascalientes, Chiapas, Colima, Jalisco, Morelos, Nayarit y Sonora.

Los síntomas de sangrado y la historia familiar de sangrado fueron obtenidos por un cuestionario detallado. Los síntomas específicos de sangrado que mostraron los pacientes fueron: epistaxis, menorragias, equimosis y hemorragias (post parto). La investigación realizada se encuentra disponible a todos los miembros de la familia. No existieron casos de consanguinidad en las familias.

La clasificación y subtipificación de la EVW se realizó de acuerdo a los criterios de la Sociedad Internacional de Hemostasia y Trombosis (ISTH).^{13,30}

- **Estudios de Coagulación.**

Las determinaciones de laboratorio que se realizaron en los pacientes fueron: tiempo de sangrado (método de Ivy), cuenta de plaquetas (CP), tiempo de protrombina (TP), tiempo parcial de tromboplastina activada (TTPa), cuantificación del factor VIII (FVIII: C), antígeno del FVW (VWF: Ag) y actividad del cofactor ristocetina (VWF: RCo) por el método de plaquetas fijadas. Cuando el primer estudio resultó normal y se tenía una historia familiar de sangrado las pruebas se repitieron de forma independiente y los valores presentados son promedio.

- **Extracción de DNA.**

Obtener 5 ml de sangre periférica en tubos con EDTA (ácido diaminotetracético) como anticoagulante.

1. Centrifugar la sangre a 3000 rpm durante 15 minutos. Se transfieren las células blancas a un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml.

2. Añadir solución buffer de lisis de células rojas (Tris HCl 10 mM pH 8, NaCl 10 mM, MgCl₂ 5 mM), mezclar vigorosamente. Centrifugar a 3000 rpm por 10 minutos. Eliminar el sobrenadante. Repetir hasta que se eliminen las células rojas.

3. Agregar 180 µl de NaCl 5mM, agitar vigorosamente y dejar 5 minutos a temperatura ambiente.

4. Añadir 90 µl de SDS (dodecil sulfato de sodio) al 10%, mezclar vigorosamente.

5. Adicionar 620 µl de NaCl saturado. Centrifugar 10 minutos a 10 000 rpm a 4°C. Transferir el sobrenadante a un tubo de microcentrífuga.

6. Precipitar el DNA con etanol al 100%. Centrifugar 5 minutos a 10 000 rpm y recuperar el precipitado. Eliminar el sobrenadante y lavar dos veces el DNA con etanol al 70%.

7. Dejar secar el DNA a 55 °C. Rehidratar el DNA con 200 µl de agua desionizada.

8. Almacenar el DNA a -20°C.

- **Extracción de DNA a partir de 300 µl de sangre en personas sanas.**

Se extrajo DNA con el kit de purificación Wizard® Genomic de Promega™ de sangre de 50 personas con tiempo de sangrado (<3.5 minutos), valores de TP (10-14 segundos) y TTPa normales (23-32 segundos), que acudieron al Servicio de Hematología del Hospital de Pediatría, CMN SXXI.

1. A partir de 300 µl de sangre se agrega 900 µl de solución de lisis (Promega™) en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml. Mezclar suavemente, e incubar la muestra por 10 minutos a temperatura ambiente.

2. Centrifugar a 14 000rpm durante 1 minuto. Eliminar el sobrenadante.

-
3. Repetir el lavado si el botón celular contiene células rojas.
 4. Resuspender el botón celular en 15 µl de solución de lisis y vortexear el tubo vigorosamente por 15 segundos.
 5. Agregar 300 µl de solución de lisis de ácidos nucleicos (Promega™) en las células resuspendidas e incubar a 37 ° C hasta que se homogenice completamente el botón celular.
 6. Centrifugar a 14 000 rpm durante 3 minutos. Transferir el sobrenadante a un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml.
 7. Agregar 300 µl de isopropanol. Centrifugar a 13 000 -16 000 g o a la velocidad máxima de la microcentrífuga durante 1 minuto a temperatura ambiente. Eliminar el sobrenadante y agregar 300 µl de etanol al 70%. Lavar el botón celular.
 8. Centrifugar a 14 000 rpm durante 1 minuto. Eliminar el etanol.
 9. Rehidratar el DNA con 100 µl de solución de rehidratación por 1 hora a 65°C o toda la noche a 4°C. Guardar el DNA a - 20 °C.

- **Cuantificación de DNA.**

La cantidad de DNA se determina midiendo su absorbancia en una dilución 1:50 de DNA con agua desionizada estéril en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 260 nm y la pureza se determina con la proporción 260/280nm.

La integridad del DNA obtenido es comprobada cualitativamente mediante el corrimiento electroforético. El gel se prepara con agarosa al 1 % y se tiñe con bromuro de etidio (0.5 µg/ml), utilizando como amortiguador TAE (Tris-base 2 M, ácido acético glacial 1. 14 ml y EDTA 0.5 M pH 8) y se corre a 100 V.

Las muestras de DNA se cargan con buffer de corrida (0.25 % de bromofenol, 0.25 % de xilencianol, y 50% de sacarosa en agua).

- **Reacción de PCR (Polimerase Chain Reaction)**

La amplificación de cada exón fue hecha a partir de 100 ng de DNA genómico con 50 mM de KCl, 20 mM de Tris-HCl pH 8.4, la concentración de MgCl₂ se modificó dependiendo de los pares de iniciadores utilizados (Tabla 2), 0.2 mM de cada dNTP (desoxiribonucleótido trifosfatado), una unidad de Taq DNA polimerasa (InvitrogenTM Life Technologies) y 10 pM de cada par de iniciadores. Los iniciadores fueron diseñados con el programa OLIGO 2 (Primer análisis software, National Biosciences Inc. ©1989-92) en base a la secuencia con el número de acceso AH005287.

Tabla 2. Condiciones de amplificación de los exones de VWF.

<i>Exón</i>	<i>Sentido</i> <i>Secuencia 5'-3'</i>	<i>Antisentido</i> <i>Secuencia 5'-3'</i>	<i>(pb)</i>	<i>Tm (C°)</i>	<i>MgCl₂</i>
18	TAG GGG ACC AAA GGA CAG T	CTG CCT ACA AGA AAA CTG AA	293	55.5	2 mM
19	CTG AGG ACT TTT GGA TTC TTT TCT	CCC TCA CTC CAC CCG CAG	189	57.3	2 mM
20	TTC CTT CAT TGC CTC CAT GG	TGA GCA GAG GGA AAA TGG AC	428	57.3	2 mM
28	AGAAGTGTCAC <u>AGGTTCTT</u> C	C <u>ICTCCCCTGC</u> CCCTGGTAT G	1439	62°	1 mM
45	CTG GCT TCT CCA AGG TGC TT	GGA AAT TCG GAG AGA AAG GTG A	488	58.4	2 mM
52	GGG GGT CAG GGA GAA AGC AG	TGG GCT CAG AAG GGC ACA AG	391	60.5	1 mM

*Los nucleótidos subrayados indican la especificidad del gen contra la del pseudogen que se localiza en el cromosoma 22 (34).

Las condiciones de amplificación con cada par de iniciadores se realizaron de acuerdo a su temperatura de fusión (T_m), la longitud del fragmento amplificado y la procesibilidad de la enzima (1 minuto por 1 kb). Inicialmente la reacción se incubó por 5 minutos a 94° C seguida por 35 ciclos. Cada ciclo consistió de una desnaturalización de 30 segundos a 95° C, un alineamiento de 30 segundos, y una extensión a 72° C (30-60 segundos), y un ciclo final de 7 minutos a 72° C. Los productos de PCR se analizaron en geles de agarosa.

- **Electroforesis en gel de agarosa.**

Los productos de PCR se visualizan en geles de agarosa, cuya concentración se modifica según la longitud del producto amplificado. La agarosa es diluida en buffer TAE y teñida con bromuro de etidio (0.5 µg/ml). La electroforesis se realiza a 100 V, utilizando marcadores de peso molecular de 123 pb. La visualización se realiza en un transiluminador.

- **Purificación de DNA por fibra de vidrio.**

Los productos de PCR son purificados a partir del gel de agarosa.

1. La banda de interés es cortada y mantenida a -30°C toda la noche.
2. Como columna se utiliza un microtubo de centrifuga de 600 µl que contiene fibra de vidrio y como soporte un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml.
3. El fragmento de agarosa es colocado dentro de la columna y se centrifuga a 14 000 rpm durante 5 minutos. Se desecha el tubo de 600 µl y se mide el volumen obtenido. A este volumen se le agrega el doble de su cantidad de etanol al 100 % y la mitad de acetato de amonio 3 M (40.82 g/100 ml pH 5).
4. Centrifugar a 14 000 rpm durante 5 minutos. Se retira el sobrenadante y se agrega 300 µl de etanol al 70%. Este lavado se repite 3 veces.
5. Se elimina completamente el etanol y se resuspende el DNA en 12 µl de agua desionizada estéril.
6. La cuantificación del DNA se hizo en electroforesis de agarosa 1% con un marcador de masa de DNA (Invitrogen™ Inc.).

- **Secuenciación y análisis de las secuencias de VWF.**

Los fragmentos de PCR purificados fueron secuenciados con el kit de secuenciación Big Dye Terminator (Applied Biosystems™), usando 10 ng de DNA por cada 100 pb a secuenciar, 1 µl de Big dye® Terminator v3.1 (Applied Biosystems™), 10 pmol del oligonucleótido y se completo la reacción a un volumen final de 20 µl con agua.

La reacción de secuencia consistió de una desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, seguida de 25 ciclos conformados por la desnaturalización a 94°C por 10 segundos, el alineamiento a 55°C y la extensión de 4 minutos a 60°C.

Para la purificación de la reacción de secuencia se utilizaron columnas de sefadex (Marligen Bioscience TM Inc.). Finalmente las muestras fueron secadas y corridas con el analizador genético ABI 3100 (Applied Biosystems).

Los datos obtenidos en las secuencias fueron comparados con la secuencia del gen VWF, y con las variantes publicadas por la base de datos de la Sociedad Internacional de Trombosis y Hemostasia y con el algoritmo BLAST (Basic local alignment search tool. National Center of Biotechnology Information).⁶⁰

El alineamiento múltiple fue realizado con ClustalW en el EMBL (European Molecular Biology Laboratory)⁶¹ con las secuencias obtenidas en el NCBI con los números de acceso XM_508945.1 para *P. troglodytes*, AF099154.1 para *C. familiaris*, XM_342759.2 para *R. norvegicus*, AY208897.1 para *M. musculus* y AF052036.1 para *S. scrofa*.

- **Análisis de la mutación P82L.**

El cambio heterocigoto 2435 C>T localizado en la posición 362 del exón 18 en un paciente con EVW tipo 2N fue analizado con cortes con enzimas de restricción.

Se realizó el análisis de la secuencia con el programa FastPCR. PCR Team © 1999-2005 of the Institute of Biotechnology, University of Helsinki, Finlandia y se determinó que SmaI es la endonucleasa que reconoce la secuencia 5'...CCC Δ GGG...3'.

La amplificación del exón 18 se realizó de acuerdo a las condiciones de amplificación de los iniciadores de esta región (tabla 2). El análisis se realizó en 100 cromosomas normales no relacionados. 2 μ l del producto de PCR fueron restringidos con 1

unidad de la enzima SmaI (New England Biolabs TM), 1 μ l de NE buffer 4 [®] (50 mM de acetato de potasio, 20 mM Tris acetato, 10 mM acetato de magnesio y 1 mM de DTT pH 7.9) y 7 μ l agua para una un volumen final de 10 μ l y se incubó por 16 horas a 25°C.

6. RESULTADOS

1. Análisis del fenotipo

De los 34 pacientes diagnosticados, el 56 % fueron mujeres. La edad promedio de los pacientes fue de 12 años con un rango de 2-33 años.

Los 27 pacientes estudiados no relacionados con al menos un miembro afectado en su familia recibieron un diagnóstico de EVW. Es importante considerar que no hay un consenso al considerar la definición de la variante tipo 1. En este estudio se usó el criterio diagnóstico de la historia de sangrado, así como los niveles de VWF: Ag, VWF: FVIII y VWF: RCo.

En la definición de nuestro estudio fue requerido documentar la historia familiar del desorden, en la mayoría de las familias había más de un miembro afectado, lo cual es consistente con el modo de herencia manifestada. Todos los casos índices mostraron historia de sangrado con uno o más de los siguientes síntomas: epistaxis, metrorragia, y sangrado excesivo después de cirugías.

En las pruebas de hemostasia de los casos índice se encontró que el rango de los niveles del FVW es amplio, y la mayoría de esta variación no puede ser explicada. Por lo que es importante mencionar que un componente genético que afecta el nivel de FVW, es el tipo sanguíneo ABO.³⁶ Hay que hacer notar que el tipo sanguíneo más común fue el O con 77%, el A con 17%, el B con 3% y el AB con 3%.

Se observó alargamiento en el TTPa en el 56% (18/32) de los pacientes, la cuenta de plaquetas se encontró baja en un paciente (3%), el VWF: Ag se encontró disminuido en el 23 % (7/30), el nivel de FVIII se encontró disminuido en el 15 % (5/33) y finalmente el tiempo de sangrado de Ivy se encontró prolongado en el 56% (17/30) de los pacientes (Tabla 3).

Tabla 3. Datos de laboratorio de pacientes con EVW.

Pac.	Familiares afectados	Sexo	Ivy	PQ	GS	TTPa	FVIII	VWF: RCo	VWF: Ag
1	Padre y hermano	M	ND	235	O+	42.2/30.0	14	ND	71
2	Padre y hermano	M	ND	243	O+	44.9/30.0	14	ND	76
3	Madre	M	2.4	234	B+	32.3/30.0	96	106	142
4	Hijo	F	2.1	203	O+	ND	72	98	110
5	Padre y hermano	M	6.2	351	O+	33.2/30.0	66	89	117
6	Padre y hermano	M	4.0	339	O+	39.2/30.0	75	88	92
7	Hermana	F	15	233	O+	41.7/30.7	68	80	80
8	Madre y hermana	F	3.5	332	A+	28.7/27.7	97	87	123
9	Madre y hermana	F	5.3	230	A+	29.7/30.1	86	97	101
10	Hermana	M	4.4	250	A+	36.4/30.0	107	106	121
11	Ambos padres	M	5.3	284	A-	26.0/29.2	33	77	89
12	Padre y hermana	F	8.1	290	O+	39.6/29.2	68	24	42
13	Madre y prima	M	2.3	330	A+	33.9/30.1	92	104	92
14	Madre y primo	F	3.2	361	O+	33.2/30.5	95	105	117
15	Hermana	F	9.0	326	O+	38.7/30.0	73	81	56
16	Dos hermanas	F	5.2	262	O+	41.4/30.0	60	103	78
17	Madre	M	3.0	282	O+	28.7/30.0	ND	106	90
18	Ambos padres y una hermana	M	5.2	272	O+	34.4/29.6	41	17	38
19	Madre y hermana	F	5.1	477	O+	ND	4	106	30
20	Madre y hermana	F	2.2	334	O+	31.9/30.7	142	94	100
21	ND	F	4.3	474	O+	32.2/29.8	88	106	82
22	Padre y hermano	F	2.1	361	O+	37.7/30.6	76	81	43
23	Padre y hermana	M	2	331	O+	34.4/29.8	130	93	66
24	ND	F	ND	112	O+	24.7/29.8	186	58	99
25	ND	F	ND	235	O+	30.2/29.9	112	102	36
26	Madre y hermana	M	11	298	AB+	31.2/30.2	117	5	23
27	Abuelo y Madre	F	1.4	277	O+	36.9/29.6	64	102	ND
28	Padre	F	11	164	O+	29.9/29.6	78	98	ND
29	ND	F	2.2	292	O+	32.7/29.9	113	100	ND
30	Padre	F	5.0	366	O+	32.7/29.9	71	88	51
31	Madre	M	10	322	O+	35.0/29.8	49	ND	1
32	Madre	M	5.5	248	A+	51.8/29.3	10	ND	ND
33	Padre e hijo	F	2.5	262	O+	32.9/29.2	54.7	110	54
34	ND	M	2.1	256	O+	50.9/20.6	15.7	86	82

P: paciente; M: masculino; F: femenino; PQ: Cuenta de plaquetas por 1000; GS: grupo sanguíneo; ND: no determinado; El tiempo de sangrado Ivy esta dado en minutos. TTPa: Tiempo Parcial de Tromboplastina activada en segundos; VWF: RCo: Porcentaje de la actividad del cofactor Ristocetina, VWF: Ag: Porcentaje de la detección del Antígeno del FVW.

2. Variaciones en la secuencia del gen VWF

El DNA correspondiente a los exones 18, 19, 20, 28, 45 y 52 de VWF y a las secuencias de los intrones colindantes fue amplificado por PCR y secuenciado en los pacientes. Los exones estudiados fueron seleccionados por ser informados como los sitios que presentan mayor frecuencia de mutación en la secuencia de VWF en estudios realizados para las poblaciones de Europa, Norteamérica y de ciertas regiones de Asia.¹³ Los cambios ya informados en la secuencia de VWF se encuentran en la tabla 4.

2.1 Intrón 17 167 A/C

La transversión 167 A/C en el intrón 17 está localizada 42 nucleótidos río arriba del exón 18. Esta variación, que crea un sitio de restricción para RsaI, ha sido previamente informada como un polimorfismo en la base de datos VWF¹³, con una frecuencia de 0.54/0.46. En nuestros pacientes la encontramos en una frecuencia de 0.58/0.42.

2.2 Exón 18 292 A/G

La transición 292 A/G en el exón 18, nucleótido 2365, resulta en el cambio no conservativo de T/A 789. La variación 292 G/A en la secuencia ha sido previamente informada como un polimorfismo raro en la base de datos VWF^{13, 62}, con una frecuencia del 0.65/0.35 en población blanca norteamericana y crea un sitio de restricción para RsaI. En nuestros pacientes la encontramos en una frecuencia de 0.70/0.30.

2.3 Exón 18 312 T/C

La transición 312 C/T en el exón 18 que codifica para un cambio conservativo de Y795 ha sido previamente informada como un polimorfismo común en la base de datos VWF^{13, 62}, aunque se desconoce su frecuencia en las poblaciones. En nuestros pacientes la encontramos en una frecuencia de 0.74/0.26.

2.4 Intrón 19 187 T/C

La transición 187 T/C en el intrón 19 se encuentra localizada a 24 pb del sitio de corte del exón. Esta variante ha sido previamente informada como un polimorfismo en la base de

datos VWF¹³, con una frecuencia de 0.67/0.33 en población blanca europea y crea un sitio de restricción para MpsI. Esta variación la encontramos en una frecuencia de 0.88/0.12

Tabla 4. Variantes de VWF en individuos mexicanos y otras poblaciones.

Ref	Loc	Frecuencia	México	Nucleótido	cDNA	Aminoácido	Dominio
1	Int17	0.54/0.46	0.58 /0.42	167 A/C			
2	Ex18	0.65/0.35 E. U. A.	0.70/0.30	292 A/G	2365	T/A789	D'
2	Ex18	Común	0.74/0.26	312 T/C	2385	Y795	D'
2	Int19	0.67/0.33 Europa	0.88/0.12	187 T/C			
3	Ex28	0.99/0.01 Francia	0.99/0.01	326 G/A	3795	P1265	A1
2	Ex28	0.89/0.11 E. U. A.	0.78/0.22	945 G/C	4414	D/H1472	A1
3	Ex28	0.99/0.01 Francia	0.99/0.01	1031G/A	4500	A1500	A2
2	Ex28	0.64/0.36	0.99/0.01	1172 C/T	4641	T1547	A2
2	Ex28	0.64/0.36 Japón	0.69/0.31	1196 A/C	4665	A1555	A2
2,4	Ex28	NI	0.60/0.40	1224 G/T	4693	V/L1565	A2
3	Ex28	0.99/0.01 Francia	0.99/0.01	1247 C/T	4716	G1572	A2
4	Ex28	0.99/0.01 Suecia	0.95/0.05	1282 A/G	74751	Y/C 1584	A2
5	Ex28	NI Turquía	0.99/0.01	1332 C/T	4801	P/T1601	A2
3,5	Int45	NI	0.88/0.12	193 C/A			

Ref: Referencia; Loc: Localización; Int: Intrón, Ex: Exón; NI: No informado; Dom: Dominio.

Informados en la base de datos VWF ¹; Sadler & Ginsburg, 1993 ²; Lavergne et al ³; Donnér et al, 1993 ⁴ y Goodeve et al ⁵.

2.5 Exón 28 326 G/A

La transición 326 G/A en el exón 28, nucleótido 3795, resulta en un cambio conservativo del aminoácido P1265. La variación 326 G/A en la secuencia ha sido previamente informada como un polimorfismo en población francesa con una frecuencia de 0.99/0.1 y crea un sitio de restricción para HphI. Este polimorfismo lo encontramos en una frecuencia de 0.99/0.1.

2.6 Exón 28 945 G/C

La transversión 945 G/C en el exón 28, nucleótido 4414, resulta en un cambio no conservativo del aminoácido 1472 ácido aspártico por histidina. La variación 945 G/C en la secuencia ha sido previamente informada como un sitio de mutación al insertarse una C en un paciente hindú con EVW tipo 3, en un estudio con 108 alelos.¹³ Esta variación también ha sido referida como polimorfismo en población norteamericana con una frecuencia de

0.89/0.11 y crea un sitio de restricción para RleAI. En nuestra población lo encontramos en una frecuencia de 0.78/0.22.

2.7 Exón 28 1031 G/A

La transición 1031 G/A en el exón 28, nucleótido 4500, resulta en un cambio conservativo de A1500. La variación 1031 G/A en la secuencia ha sido previamente informada como un polimorfismo en población francesa con una frecuencia de 0.99/0.01¹³ y, misma frecuencia observada en nuestra población.

2.8 Exón 28 1172 C/T

La transición 1172 C/T en el exón 28, nucleótido 4641, resulta en un cambio conservativo del aminoácido T1547. La variación 1172 C/T en la secuencia ha sido informada como un polimorfismo con una frecuencia del 0.64/0.36 en la base de datos VWF¹³. Este polimorfismo lo encontramos en una frecuencia de 0.99/0.1.

2.9 Exón 28 1196 A/C

La transición 1196 A/C en el exón 28, nucleótido 4665, resulta en un cambio conservativo del aminoácido A1555 alanina. La variación 1196 A/C en la secuencia ha sido previamente informada como un polimorfismo en la base de datos VWF¹³, con una frecuencia del 0.64/0.36 en población japonesa y crea un sitio de restricción para HaeIII y BsrI. Este polimorfismo lo encontramos en una frecuencia de 0.69/0.31.

2.10 Exón 28 1224 G/T

La transversión 1224 G/T en el exón 28, nucleótido 4693, resulta en un cambio no conservativo V/L1565. La variación 1224 G/T en la secuencia ha sido previamente informada como un polimorfismo en la base de datos VWF y por Donnér et al, 1993^{13, 63}. El análisis hecho por la base de datos de SNPs (polimorfismos de un solo nucleótido) concluye que este polimorfismo no provoca un efecto en la agregación, en la estructura secundaria, glicosilación, etc., por lo que se espera que no exista algún defecto fenotípico⁶⁴. Este polimorfismo lo encontramos en una frecuencia de 0.60/0.40.

2.11 Exón 28 1247 T/C

La transición 1247 T/C en el exón 28, nucleótido 4716, resulta en un cambio conservativo del aminoácido G1572. La variación 1247 T/C en la secuencia ya ha sido informada con una frecuencia de 0.99/0.11 en población francesa por Lavergne en la base de datos VWF. La frecuencia de este polimorfismo en nuestra población es de 0.99/0.01.

2.12 Exón 28 1282 A/G

La transición 1332 A/G en el exón 28, nucleótido 4751, resulta en un cambio no conservativo del aminoácido Y1584C. La variación 1282 A/G crea un sitio de corte para la enzima KpnI y ha sido previamente informada como un polimorfismo por Donnér y cols.⁶³ en población sueca con una frecuencia de 0.99/0.01. En personas sin EVW la frecuencia es de 0.95/0.05.

2.13 Exón 28 1332 C/T

La transición 1332 C/T en el exón 28, nucleótido 4801, resulta en un cambio no conservativo del aminoácido P1609T. La variación 1332 C/T en la secuencia ha sido previamente informada como un polimorfismo por Goodeve y cols.⁶⁵ en la base de datos VWF¹³. La frecuencia de este polimorfismo en nuestra población es de 0.99/0.01.

2.14 Intrón 45 193 C/A

La transversión 193 C/A en el intrón 45 ya ha sido informada como un polimorfismo en la base de datos VWF¹³. La frecuencia de este polimorfismo en nuestra población es de 0.88/0.12.

3. Nuevas variaciones en la secuencia del gen VWF

Nuevas variantes en las secuencias de los exones e intrones colindantes del gen VWF 18, 28 y 52 fueron encontrados en los pacientes con EVW (Tabla 5).

3.1 Exón 28 1034 C/T

La transición 1034 G/A en el exón 28, nucleótido 4501, resulta en un cambio conservativo del aminoácido F1503. Esta variación 1034 C/T en la secuencia no ha sido informada como

un polimorfismo. Esta variante fue encontrada en el individuo 12, junto con la variante 1031 G/A, un cambio que ya ha sido informado en la base de datos de VWF (Figura 4).

3.2 Exón 28 1247 T/C

La transición 1247 T/C en el exón 28, nucleótido 4716, resulta en un cambio conservativo del aminoácido G1572. Los pacientes 9, 27, 28 y 31 presentaron esta variante. La frecuencia de este polimorfismo en nuestra población es de 0.96/0.04.

Tabla 5. Nuevas variantes en VWF en pacientes mexicanos con EVW.

Localización	Frecuencia	Nucleótido	cDNA	Aminoácido	Dominio
Exón 28	0.99/0.01	1034 C/T	4501	F1503	A2
Exón 28	0.96/0.04	1247 C/T	4716	G1572	A2
Exón 52	0.99/0.01	794 G/A	8268	S2756	CTCK
Exón 52	0.66/0.34	850 C/G	8324	S/C2775	CTCK
Intrón 52	0.95/0.05	1027 G/A			

3.3 Exón 52 794 G/A

La transición 794 G/A en el exón 52, nucleótido 8268, resulta en un cambio conservativo del aminoácido S2756. Esta variación no ha sido previamente informada como un polimorfismo y la frecuencia de este polimorfismo en nuestra población es de 0.99/0.01.

3.4 Exón 52 850 C/G

La transversión 850 G/C en el exón 52, nucleótido 8324, resulta en un cambio no conservativo del aminoácido S/C2775. Esta variación no ha sido previamente informada como un polimorfismo y la frecuencia de este polimorfismo en nuestra población es de 0.90/0.10.

3.5 Intrón 52 1027 G/A

La transición 1027 G/A en el exón 52, localizada a +25 nucleótidos del sitio de término del mRNA. La frecuencia de este polimorfismo en nuestra población es de 0.95/0.05 (Figura 5).

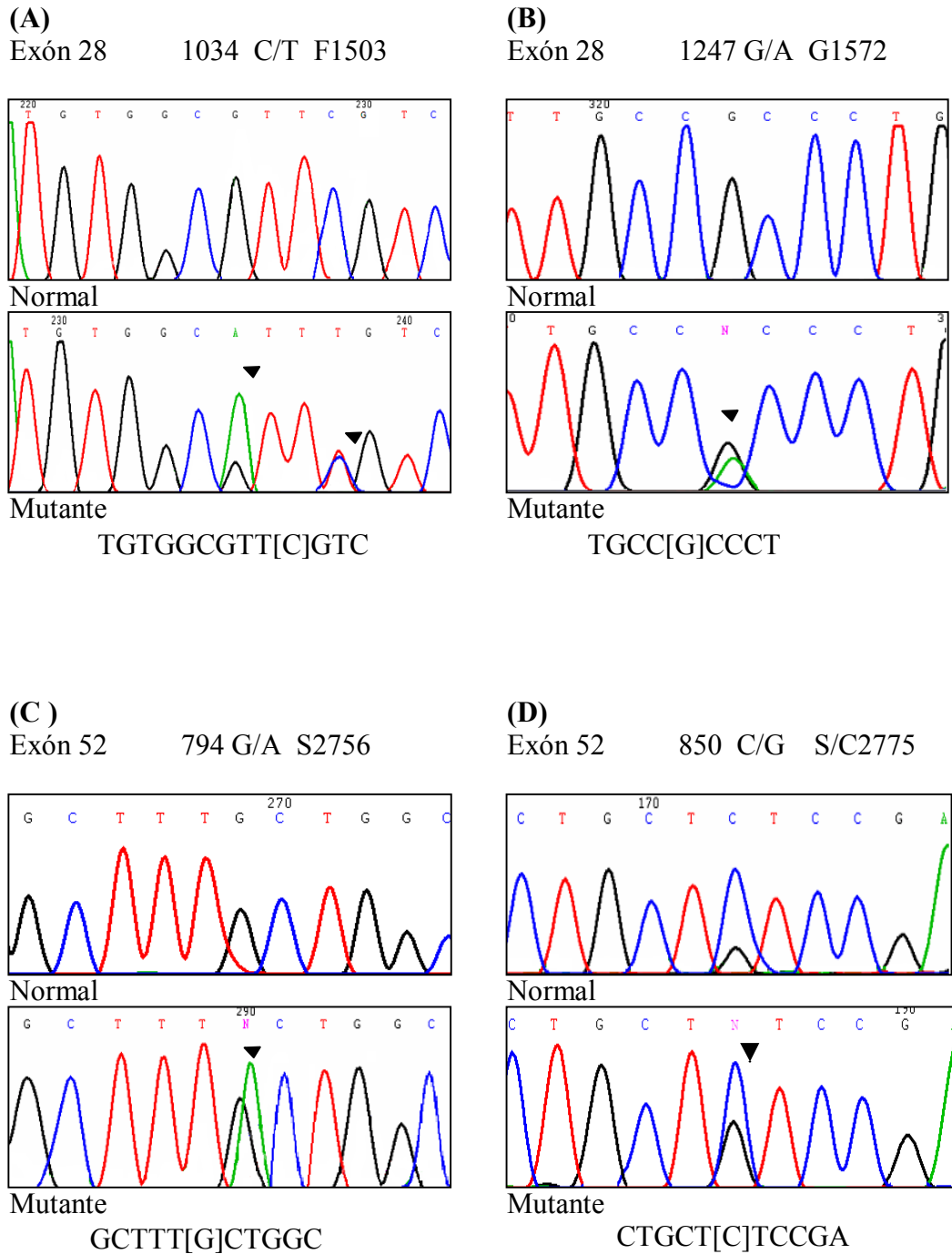


Figura 4. Secuencia de las nuevas variantes en VWF en pacientes mexicanos con EVW. (A) Variación localizada en el exón 28 1034 C/T. **(B)**Variación localizada en el exón 28 1247 G/A. **(C)**Variación localizada en el exón 52 794 G/A. **(D)** Variación localizada en el exón 52 850 C/G.

(A)
Intrón 52 1027 G/A

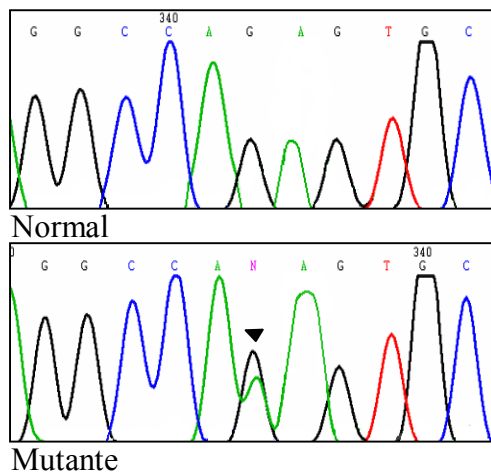


Figura 5. Secuencia de la nueva variante en VWF en pacientes mexicanos con EVW. Variación localizada en el intrón 52 en la posición 1027 G/A.

4 Mutaciones encontradas en VWF

Se lograron identificar diez mutaciones en los exones 18, 28 y 52 de las cuales 4 son nuevas mutaciones sin sentido que fueron identificadas en 4 pacientes no relacionados con EVW (Tabla 6).

4.1 Exón 18 362 C>T

La transición C>T en el exón 18, nucleótido 2435, resulta en un cambio no conservativo del aminoácido P812L. Esta mutación fue encontrada de forma heterocigota en el paciente 1, lo que es congruente con el bajo nivel de FVIII que obtuvo en las pruebas de laboratorio y con el diagnóstico 2N. La variación 2435delC en la secuencia ha sido previamente informada como una mutación que lleva a término y es considerada la mutación más frecuentemente observada en la población alemana por Schneppenheim y cols.⁶⁶ Este cambio fue encontrado en el individuo 1 y 2 quienes son diagnosticados como pacientes con EVW tipo 2N por presentar bajos niveles de FVIII: 14%. La sustitución fue comprobada por digestión enzimática (Figura 6).

con SmaI. Esta sustitución no fue encontrada en 100 alelos normales de individuos no relacionados en los productos de PCR que fueron cortados con SmaI.

Tabla 6. Mutaciones en VWF en pacientes mexicanos con EVW.

Ref	Localización	Estudio Funcional	Nucleótido	cDNA	Aminoácido	Dominio
Pt	Exon 18	No	362 C>T	2435	P 812L	D'
1	Exon 28	No	384 C>T	3854	S1285F	A1
2	Exon 28	Si	454 G>C	3923	R1308P	A1
Pt	Exon 28	No	870 G>C	4339	E1447Q	A1
1	Exon 28	No	1319 G>T	4790	R1597L	A2
3, 4, 5	Exon 28	Si	1356 G>A	4825	G1609R	A2
6	Exon 28	Si	1368 T>C	4837	S1613P	A2
7, 8, 9	Exon 28	Si	1414 T>C	4883	I1628T	A2
Pt	Exon 52	No	867 C>T	8341	P2781S	CTCK

Ref: Referencia; Pt: Presente trabajo ; Red Francesa¹ ; Hilbert et al, 1996²; Donnér et al, 1993³ ; Inbal et al, 1993⁴; Hagiwara et al, 1996⁵ ; Chang et al, 1989⁶; Iannuzzi et al, 1991⁷; Pietu et al, 1992⁸; Lyons et al, 1994⁹.

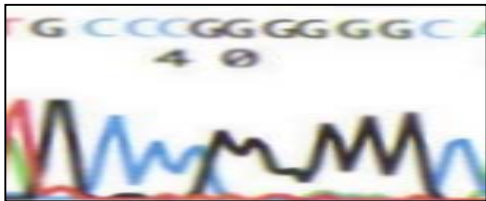
4.2 Exón 28 384C>T

La transición C>T en el exón 28, nucleótido 3854, resulta en un cambio no conservativo del aminoácido S1285F. La variación 3854 C>T en la secuencia ha sido previamente informada por la red Francesa como una mutación en la base de datos VWF en un estudio realizado con 100 alelos normales, aunque sin estudio funcional. Esta mutación está relacionada con la EVW tipo 2M y fue identificada en el paciente 22 quien presentó bajos niveles de VWF: Ag de 43% (Figura 7).

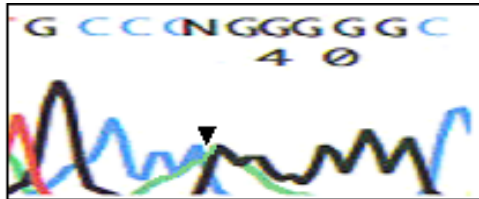
4.3 Exón 28 454 G>C

La transversión G>C en el exón 28, nucleótido 3923, resulta en un cambio no conservativo del aminoácido R1308P. La variación 3923 G>C en la secuencia ha sido previamente informada como una mutación relacionada con la EVW tipo 2B por Hilbert y cols en 1996⁶⁷, quienes realizaron el estudio funcional de la mutación. Esta mutación fue identificada en el paciente 12, quien mostró una disminución del FVW de 42%, y agregación por ristocetina de 24%.

(A) Exón 18 362 G>A P812L

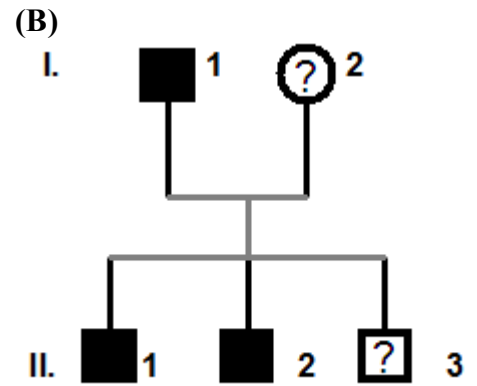


Normal

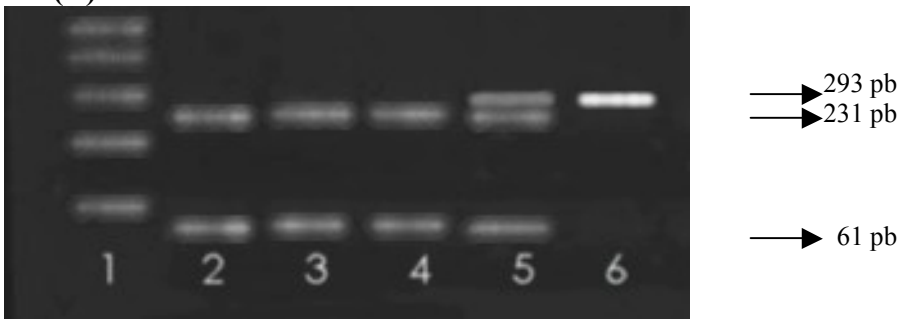


Mutante

TGCCC[G]GGGGGCA



(C)



(D)

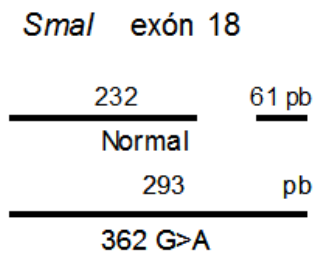
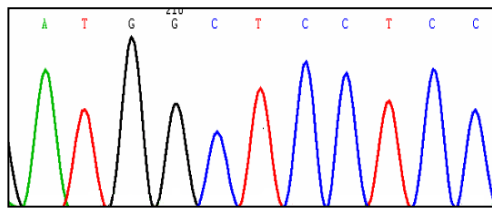
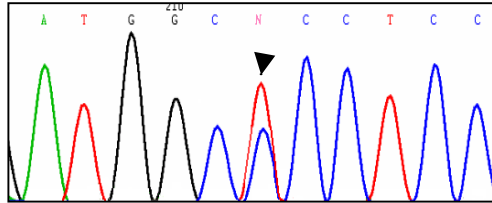


Figura 6. Análisis del DNA de la variación P812L. (A) Secuencia que muestra la mutación nueva localizada en el exón 18 362 G>A en el gen VWF. (B) Árbol genealógico del paciente con la mutación P812L. (C) Electroforesis de productos de PCR digeridos con *Sma* I en gel de agarosa al 2%. (1): Marcador de peso molecular de 100 pb. 2-4 controles donde se observan los productos de 232 y 61 pb, 5 paciente, 6 DNA sin cortar. (D) Esquema que representa los puntos de corte de *Sma* I en el producto de PCR de 293 pb en la secuencia normal generando los productos de 232 y 61 pb.

(A)
Exón 28 384 T>C S1285F



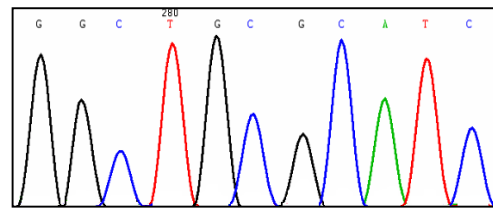
Normal



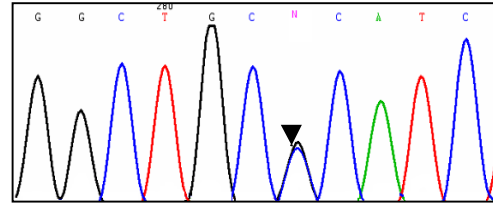
Mutante

GGATGGC[T]CCTCC

(B)
Exón 28 454 G>C R1308P



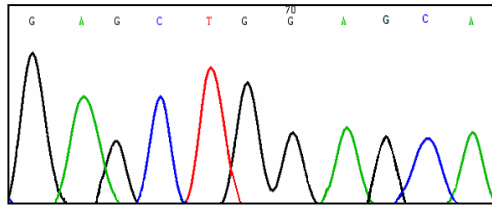
Normal



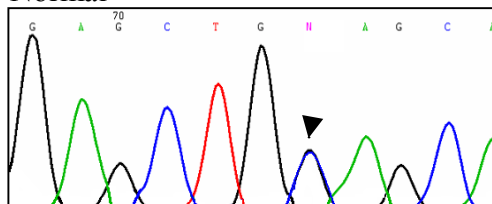
Mutante

GGCTGC[G]CATCT

(C)
Exón 28 870 G>C E1447Q



Normal



Mutante

GAGCTG[G]AGCA

(D)

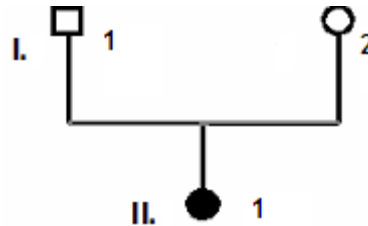


Figura 7. Secuencia de las mutaciones encontradas en VWF en pacientes mexicanos con EVW. (A) Mutación localizada en el exón 28 384 C>T. (B) Mutación localizada en el exón 28 454 G>C. (C) Mutación nueva localizada en el exón 28 870 G>C. (D) Árbol genealógico del paciente con la mutación c4339G>C.

4.4 Exón 28 870 G>C

La transversión G>C en el exón 28, nucleótido 4339, resulta en un cambio no conservativo del aminoácido E1447Q. La variación 4339 G>C en la secuencia no ha sido informada previamente fue identificada en estado heterocigoto en sólo el caso índice de la familia. Esta mutación de cambio de sentido E1447Q está localizada en el dominio A1 del FVW. Este cambio fue identificado en el paciente 28 quien se ve afectado por EVW tipo 1. El caso índice presentó valores de VWF:Ag de 78% y VWF:RCo de 98%.

4.5 Exón 28 1319 G>T

La transversión G>T en el exón 28, nucleótido 4790, resulta en un cambio no conservativo del aminoácido R1597L. La variación 4790 G>T en la secuencia ha sido previamente informada como una mutación relacionada con la EVW tipo 2A por la red Francesa en la base de datos VWF en un estudio realizado con 100 alelos normales, aunque sin estudio funcional. Esta variante fue identificada en el paciente 27 quien presento valores de FVIII de 64% y actividad de ristocetina de 102 % normales (Figura 8).

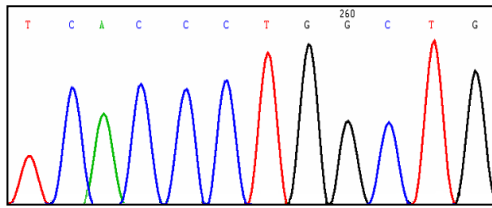
4.6 Exón 28 1356 G>A

La transición G>A en el exón 28, nucleótido 4825, resulta en un cambio no conservativo del aminoácido G1609R. La variación 4825 G>A en la secuencia ha sido previamente informada por separado como una mutación por Donnér y cols.⁶³; Inbal y cols.⁶⁸; Hagiwara y cols.⁶⁹ quienes realizaron el estudio funcional de la mutación y su estudio en 100 alelos normales. Esta mutación relacionada con la variante 2A fue encontrada en los pacientes 9, 18, 19, 29 y 30 quienes no están relacionados.

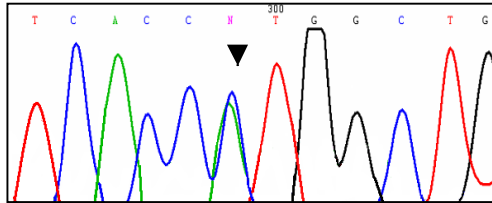
4.7 Exón 28 1368 T>C

La transición T>C en el exón 28, nucleótido 4837, resulta en un cambio no conservativo del aminoácido S1613P. La variación 4837 T>C en la secuencia ha sido previamente informada como una mutación por Chang y cols.⁷⁰; quienes realizaron el estudio funcional de la mutación. Esta mutación relacionada con la variante 2A fue encontrada en los pacientes 13 y 14 quienes son primos y presentaron valores normales en las pruebas de laboratorio.

(A)
Exón 28 1319 C>A R1597L



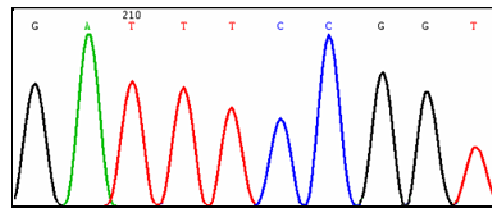
Normal



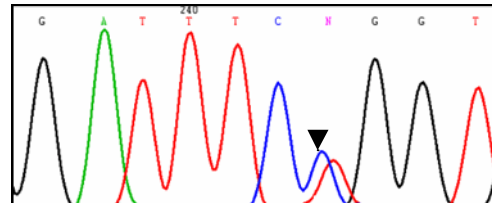
Mutante

TCACC[C]TGGCT

(B)
Exón 28 1356 C>T R1609G



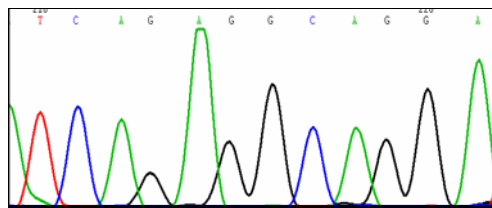
Normal



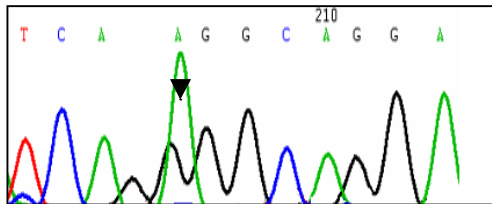
Mutante

GATTTC[C]GGTG

(C)
Exón 28 1368 A>G S1613P



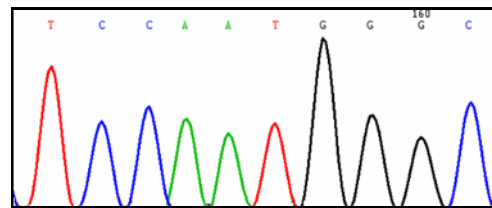
Normal



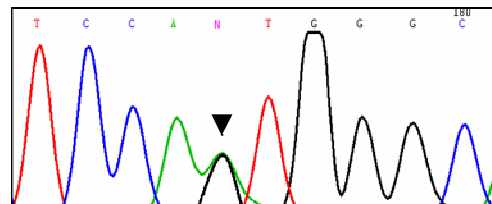
Mutante

TCAG[A]GGCAGGA

(D)
Exón 28 1414 A>G I1628T



Normal



Mutante

TCCA[A]TGGGC

Figura 8. Secuencia de las mutaciones encontradas en VWF en pacientes mexicanos con EVW. (A) Mutación localizada en el exón 28 1319 C>A. (B) Mutación localizada en el exón 28 1356 C>T. (C) Mutación localizada en el exón 28 1368 T>C. (D) Mutación localizada en el exón 28 1414 T>C.

4.8 Exón 28 1414 T>C

La transición T>C en el exón 28, nucleótido 4883, resulta en un cambio no conservativo del aminoácido I1628T. La variación 4883 T>C en la secuencia ha sido previamente informada como una mutación por Pietu y cols.⁷¹ Esta mutación relacionada con la variante 2A fue encontrada en el paciente 31 quien presentó una disminución muy notable del FVW y del FVIII de 49%.

4.9 Exón 528 867 C>T

La transición C>T en el exón 52, nucleótido 8341, resulta en un cambio no conservativo del aminoácido P2781S. La variación 8341 C>T fue identificada en estado heterocigoto en el caso índice y en su hermana. Esta mutación de cambio de sentido P2781S está localizada en el CTCK del FVW. Este cambio fue identificado en el paciente 26 quien se ve afectado por EVW tipo 2B. El caso índice presentó valores de VWF:Ag de 23%, FVII de 117% y VWF:RCo de 5%. El cambio no fue encontrado en 100 alelos normales de individuos no relacionados que fueron amplificados por PCR y secuenciados (Figura 9).

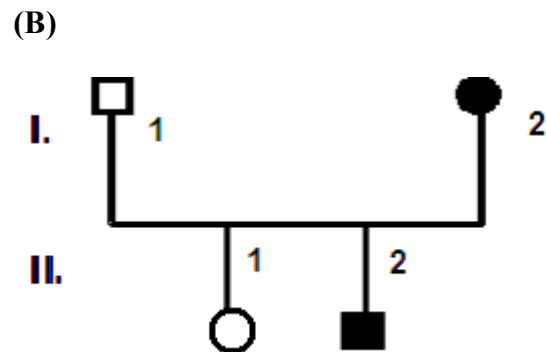
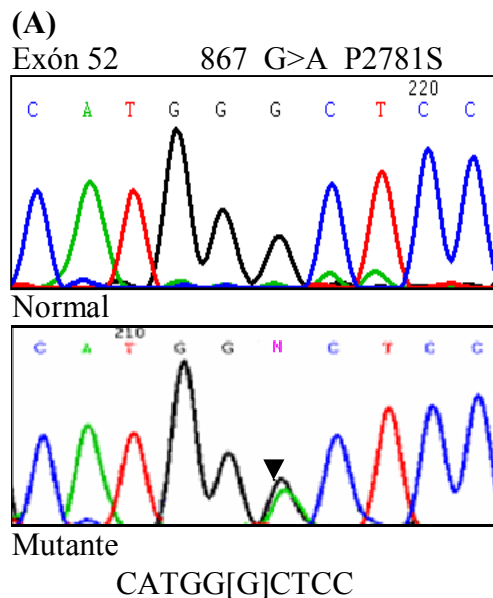


Figura 9. Secuencia de la mutación 867 G>A encontradas en el exón 52. (A) Secuencia que muestra la mutación en el exón 52 867 G>A (D) Árbol genealógico del paciente con la mutación c8341 C>T.

Los resultados obtenidos en las secuencias mostraron que la causa molecular de la EVW es variante. Se obtuvo el cambio molecular en 12 de los 27 individuos no relacionados y se encontró que todas estas mutaciones eran puntuales, 3 de las cuales son nuevas (Tabla 6). Las variantes encontradas en el gen VWF resultaron ser una mezcla de polimorfismos y mutaciones presentes en otras poblaciones y de cambios en la secuencia que parecen ser propios de la población mestizo mexicana.

5 Clasificación de la EVW

5.1 Pacientes con variante tipo 1

La variante 1 de la EVW fue diagnosticada en el 48% (16/34) de los pacientes, el 75% de estos individuos posee grupo sanguíneo tipo O, con una prevalencia en mujeres del 50 %. También se observó una disminución en los niveles del VWF: Ag mayor en el grupo O que en otro tipo.

5.2 Pacientes con variante tipo 2.

La variante 2 fue diagnosticado en el 52% (18/34) de los casos índices. Los tiempos de sangrado prolongado estuvieron presentes en todos los pacientes, el 78 % de estos pacientes son tipo O. El 66% (12/18) de pacientes con variante tipo 2 presentaron cambios en su secuencia que se deben a variantes que afectan la multimerización y se deben a mutaciones del tipo 2A.

La variante 2N fue diagnosticada en el paciente 1, en su hermano el paciente 2, en el 32 y en el 34 con un VWF: FVIII de 14, 14, 10 y 15 % respectivamente.

La proporción de los valores de VWF:RCo/ VWF:Ag en los pacientes 12, 18 y 26 fue <0.6 , en los que se observa que se encuentra disminuida la función plaquetaria, siendo clasificados como pacientes con EVW 2B, 2A y 2A respectivamente.

Tabla 7. Mutación y Diagnóstico en los pacientes con EVW.

Paciente	Origen	Mutación	Dominio	EVW	FWW:Ag
1	D. F.	P812L	D'	2N	71
2	D. F.	P812L	D'	2N	76
3	Jalisco	ND	-	1	142
4	Jalisco	ND	-	1	110
5	D. F.	ND	-	1	117
6	D. F.	ND	-	1	92
7	Chiapas	ND	-	1	80
8	D. F.	G1609R	A2	2A	123
9	D. F.	G1609R	A2	2A	101
10	D. F.	ND	-	1	121
11	D. F.	ND	-	1	89
12	D. F.	R1308P	A1	2B	42
13	D. F.	S1613P	A2	2A	92
14	D. F.	S1613P	A2	2A	117
15	D. F.	ND	-	1	56
16	D. F.	ND	-	1	78
17	D. F.	ND	-	1	90
18	Morelos	G1609R	A2	2A	38
19	Colima	G1609R	A2	2A	30
20	Colima	G1609R	A2	2A	100
21	Sonora	ND	-	1	82
22	D. F.	S1285F	A1	2M	43
23	ND	ND	-	1	66
24	D. F.	ND	-	1	99
25	ND	ND	-	1	36
26	D. F.	P2781S	CTCK	2A	23
27	Jalisco	R1597L	A2	2A	ND
28	Jalisco	E1447Q	A1	1	ND
29	D. F.	G1609R	A2	2A	ND
30	D. F.	G1609R	A2	2A	51
31	Aguascalientes	I1628T	A2	2A	1
32	Jalisco	ND	-	2N	ND
33	Nayarit	ND	-	1	54
34	Chiapas	ND	-	2N	82

6 Variantes en el extremo 3' del exón 28.

Las amplificaciones de las secuencias del exón 28 que es altamente homóloga con la secuencia del pseudogen requirió un análisis específico de la secuencia. Identificamos variaciones en la secuencia, la mayoría de las cuales ya han sido informadas como polimorfismos (Tabla 8) y localizados en alelos normales.

Tabla 8. Variantes en la secuencia del extremo 3' del exón 28.

Localización	Frecuencia	Nucleótido	cDNA	Aminoácido	Dominio
Exón 28	0.90/0.10	1330 C/T	4799	A/V1600	A2
Exón 28	0.91/0.19	1374 A/G	4883	E/K1615	A2
Exón 28	0.87/0.13	1386 C/T	4855	L1619	A2
Exón 28	0.92/0.08	1457 T/C	4926	I1642	A2
Exón 28	0.90/0.10	1474 T/C	4944	P1648	A2

7. DISCUSIÓN

En el mundo se estima que la EVW es 10 veces más frecuente que las hemofilias consideradas en conjunto ⁴⁶; en México carecemos de los datos estadísticos ⁵⁷ ya que sólo los casos graves acuden al servicio médico, lo que dificulta que se establezcan cifras de pacientes con EVW. Con el estudio molecular de VWF se ha podido realizar un diagnóstico preciso del tipo de EVW que esta afectando a cada paciente, proceso que es muy difícil de realizar en una enfermedad que es afectada por diversos factores.

La mayoría de los estudios epidemiológicos realizados en población caucásica han mostrado que la EVW tipo 1 afecta con mayor frecuencia a la población, alrededor del 75%. Nuestros datos son de un centro de tercer nivel donde asisten los pacientes con mayor severidad, donde encontramos que la variante 1 se presenta en el 48% y la variante 2A en una proporción del 35% que es muy alta. Esto no es poco probable, ya que en la India, es más frecuente la variante tipo 3 debido que la mayoría de los pacientes afectados con una ligera o moderada EVW tipo 1 no asisten a los hospitales.⁷² En la determinación de la variantes tipo 2 las técnicas de biología molecular son de gran ayuda por que es posible reclasificar a pacientes mal diagnosticados con EVW tipo1 y clasificarlos como tipo 2. Efecto que repercute en el cálculo de la prevalencia de la enfermedad, especialmente del tipo 2.⁷ Un estudio epidemiológico en la población en general necesita realizarse para conocer la prevalencia en México.

En el diagnóstico de la enfermedad es importante tomar en cuenta el conjunto de pruebas realizadas en el laboratorio y su relación con otros componentes, por ejemplo, la asociación de los bajos niveles de FVW con el grupo sanguíneo, hecho importante que nos permite conocer más acerca del origen de la patología.⁷³ La asociación ente el hipopituitarismo, hipotiroidismo y los niveles de estrógenos en la EVW es algo que también ya es conocido.^{74, 75}

Es conocido que aproximadamente el 60 % de la heredabilidad de los niveles en el plasma del FVW se encuentra ligado al locus ABO y el promedio del nivel del FVW en personas tipo O es del 25%-35% menor que las personas A, B o AB y esto explica un poco

la variación genética del FVW.⁷⁶ Hay que hacer notar que el tipo sanguíneo más común de nuestros pacientes fue el O con un 77%.

El 48% de nuestros pacientes fue diagnosticado con EVW tipo 1. El diagnóstico de la EVW tipo 1 se realiza si hay reducción en los niveles de VWF: Ag, y VWF: RCo, tamaño normal de los multímeros y niveles disminuidos del FVIII.^{77, 78} En nuestros pacientes con EVW tipo 1, se observó que poseen valores muy cercanos a lo normal de FVIII, VWF: RCo y VWF: Ag, que son de 40-150%, 60-150% y 50-150% respectivamente. Esto puede ser explicado por que la penetrancia de la variante tipo 1 es variable, y puede ser ocultada en un estado heterocigoto. Además de que es difícil hacer una asociación entre los alelos afectados y la disminución en el valor de VWF: Ag.⁷⁸

Es por ello, que en este tipo de pacientes es más difícil realizar un diagnóstico. Sólo en algunos casos se puede facilitar el diagnóstico si se observa un patrón de herencia dominante con penetrancia elevada y bajos niveles del FVW así, como hemorragias. De manera general, se considera que las mutaciones que causan EVW tipo 1 producen un FVW defectuoso que puede interferir con la actividad de un FVW codificado por un alelo normal.^{31, 78}

Sólo en 12 de los pacientes no relacionados fue posible encontrar el tipo de mutación que estaba alterando la producción adecuada del FVW. En 13 de nuestros pacientes no relacionados no encontramos mutaciones. De hecho, ninguna mutación dominante ha sido identificada en una proporción significativa en pacientes con EVW tipo 1.^{13, 34, 79} Pero si sería necesario estudiar la secuencia del promotor y la secuencia completa de VWF para conocer que variantes son las que se estarían expresando en pacientes mexicanos con este tipo de enfermedad. Aunque hay que considerar que el tamaño del mRNA es de 52 exones distribuidos en 8923 pb, y que no hay secuencias que son reconocidas como de elevada frecuencia de mutación para EVW tipo 1. Podemos mencionar el estudio de Simon y cols del 2003 quienes buscaron una asociación entre polimorfismos localizados en la secuencia del promotor en pacientes con EVW tipo 1 y no encontraron relación entre polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) y la enfermedad.⁸⁰

También es importante mencionar que existe alguna proporción de la enfermedad que no se debe a defectos en el locus VWF como lo muestran los resultados de la investigación en el estudio multicéntrico de marcadores clínicos y moleculares para el diagnóstico y manejo de la EVW tipo 1 realizado en 154 familias por 12 centros de investigación en Europa.⁷⁹

La mayoría de los defectos identificados en VWF que se encuentran relacionados con el desarrollo de la enfermedad se deben a pequeñas inserciones, deleciones y mutaciones puntuales dentro del gen.^{31,42} La disminución cuantitativa del FVW en la EVW tipo 1 puede deberse a una variedad de defectos que pueden estar localizados en cualquier parte de los 178 kb que comprende el gen. Además de que al igual que el modelo de enfermedad en ratón, la deficiencia cuantitativa puede originarse por defectos en cualquiera de los genes involucrados en la vía de biosíntesis del FVW.⁸¹

La transversión G>C en el exón 28, nucleótido 4339 que resulta en un cambio no conservativo del aminoácido E1447Q fue identificada en estado heterocigoto sólo en el caso índice de la familia. El caso índice presentó valores de VWF:Ag de 78% yVWF: RCo de 98%.

La mutación de cambio de sentido E1447Q está localizada en el dominio A1 del FVW. El caso índice presentó valores de laboratorio normales. La mutación cambia un residuo ácido por uno hidrofílico, lo que podría estar afectando la estructura de alfa hélice de la proteína y por lo tanto la estructura de la proteína podría alterarse junto con las capacidades de unión del dominio A1.⁸²

En nuestros resultados observamos la variante E1447Q que se presentó en un paciente con datos de laboratorio normales y que por lo tanto podría clasificarse como una variante tipo 1. Sólo estudios más específicos podrían ayudarnos a conocer las consecuencias de este cambio. El tipo de mutaciones que han sido informados en pacientes con EVW 1 son del tipo de pequeñas deleciones o cambios de aminoácido que producen un efecto dominante negativo, o algunas variaciones que se deben a variaciones en la

secuencia que se deben a mecanismos de conversión génica. En el caso de E1447Q no es un cambio que corresponda a la secuencia del pseudogen. Otro posible efecto de mutaciones que se relacionan con la EVW 1 es la reducción en los niveles de mRNA que se debe a que algún alelo mutado interfiere con la transcripción y el mRNA producido es inestable. Una afirmación similar fue hecha por O'Brien y cols³⁴ quienes mencionan que este tipo de mutaciones podrían estar localizadas dentro de secuencias intrónicas o en la secuencia codificante.⁷⁵

La postulación de que E1447Q es una mutación que está afectando el fenotipo de EVW sólo puede asegurarse si se realizan ensayos con la producción de la proteína recombinante. Lo ideal sería que pudieran encontrarse a otros pacientes con esta misma variante. En el análisis de esta variante hay que mencionar que no se pudo detectar en los parientes no afectados cercanos al paciente ni en muestras de 50 controles normales. Además de que las bases afectadas por la mutación son altamente conservadas. El alineamiento múltiple entre las secuencias de *P. troglodytes*, *M. musculus*, *R. norvegicus*, *S. scrofa* y *C. familiaris* demostró que las bases localizadas en el nucleótido del mRNA 4339 G incluye esa misma base en las secuencias.

Sin embargo, el conocimiento de defectos moleculares y la relación entre genotipo/fenotipo es importante para establecer una clasificación adecuada y más confiable del diagnóstico de la enfermedad. De las secuencias analizadas en nuestros pacientes no encontramos las mutaciones que ya han sido informadas para el tipo 1. En el estudio multicéntrico de estudios de EVW tipo 1 se ha informado que la incidencia del polimorfismo Y/C1584 es de 7% en 400 individuos afectados y en 0.4% de 1070 controles.⁷⁹ En nuestros pacientes estudiados no encontramos ese cambio y en nuestros controles la frecuencia fue de 0.95/0.05.

En el diagnóstico de la enfermedad no fue posible observar una disminución en la mayoría de los datos de laboratorio que nos indicaran que variante estaba afectando a cada paciente, con excepción de las variantes tipo 2, donde se observaron niveles <0.6 en la proporción VWF:RCo/VWF: Ag en sólo 3 pacientes con EVW tipo 2.

La variante 2A es la forma más común con un 35% de diagnóstico en nuestros pacientes. La mayoría de las mutaciones responsables se encuentran en el exón 28. Este exón contiene los dominios A1, A2 y el sitio de proteólisis del FVW que participan de manera importante en la actividad del factor y que verían afectadas por el cambio de aminoácido.

Cerca de la tercera parte de nuestros pacientes (12/34) (7 de ellos no relacionados), presentaron las siguientes alteraciones G1609R, S1613P, R1597L y I1628T. Las mutaciones presentes parecen afectar la biosíntesis de los multímeros o la secreción de estos, de manera que se altera la presencia de los multímeros de elevado peso molecular.

Muchas mutaciones ocurren en el dominio A2 y afectan la biosíntesis o estabilidad de los multímeros causando el fenotipo EVW 2A por lo que es muy posible que las variaciones en la secuencia del dominio A puedan estar relacionadas.⁸³ En nuestros pacientes la mutación más frecuente fue G1609R presentada en 4 pacientes no relacionados, lo que sugiere un origen múltiple e independiente de la mutación. En este caso el cambio variación 4825 G>A es una transición que se realizó en un dinucleótido CG.

Las otras mutaciones detectadas fueron en dos individuos relacionados S1613P. Un sólo paciente presentó R1597L y un paciente I1628T, mutaciones que ya han sido informadas previamente.

El paciente 24 presentó la mutación P2781S, quién también mostró una relación <0.6 de VWF: RCo/VWF:Ag con una actividad de unión a las plaquetas alterada. Proponemos que esta alteración se debe a que el cambio se localiza en el dominio CTCK entre los residuos 2724-2812 de dimerización. Tanto el paciente como su madre presentan la mutación de manera heterocigota. La manifestación fenotípica muestra que la actividad de ristocetina se encuentra gravemente disminuida lo que altera la función del FVW con las plaquetas. El conteo plaquetario es normal y aunque el valor del FVIII no se encuentra disminuido, el valor del FVW si lo está. Por lo tanto, la alteración en el residuo 2781 está

afectando los codones del extremo carboxilo de la proteína, en el dominio CTCK que participa de manera importante en la dimerización.

La mayoría de las mutaciones en EVW tipo 2B han sido localizadas en el dominio A1 que interactúa con la glicoproteína Ib/IX. Estas mutaciones aumentan la unión del FVW con el receptor de las plaquetas en circulación. La mutación R1308P que ya ha sido previamente informada fue encontrada en el paciente 12, que también presentó alteraciones en VWF: RCo.

La variante 2M de la EVW está definida por la alteración en la función de unión a las plaquetas y no por la presencia alterada de los multímeros. Se observa una desproporción entre el nivel de VWF:Ag y VWF:RCo. Las mutaciones que producen esta variante han sido localizadas principalmente en el dominio A1 que contiene el dominio de unión a las glicoproteínas GpIb.⁸⁴ En este trabajo informamos el caso de un paciente con EVW tipo 2M quien presentó niveles de VWF:Ag de 43% y VWF:RCo de 80% que si bien la relación VWF:RCo/VWF:Ag no es < 0.7 . En este caso la presencia de la mutación S1285F localizada en el dominio A1 y presente en forma heterocigoto c3854 C>T hace que la alteración en el fenotipo no sea tan grave y por lo tanto no se alteren de forma drástica los valores de VWF:Ag. Por lo que es importante señalar que los estudios moleculares ayudan en el diagnóstico y la clasificación de la EVW.

En la variante 2N hay una disminución muy marcada de los niveles de FVIII, debido a que se encuentran alterados los sitios de unión con el FVW que le permite evitar la degradación proteolítica del FVIII circulante. En sólo 1 de nuestros 3 pacientes no relacionados afectados con esta variante, pudimos detectar la mutación P812L que afecta el dominio D' de unión al FVIII.

En la variante 2N, el FVW mutante P812L es estructuralmente normal y funcional, excepto que no se une adecuadamente al FVIII de la coagulación, proceso que es necesario para la permanencia del factor en la circulación.⁸⁵ En esta familia no hay historia de consanguinidad, aunque ambos padres son del Distrito Federal, sólo se pudo hacer la

secuencia al hermano y la madre, no se pudo comprobar la presencia del cambio en el padre ni en el resto de la familia. Aunque la madre tiene una secuencia normal, es probable que la manifestación del fenotipo 2N se deba a que el paciente sea un heterocigoto compuesto a cualquier otro cambio relacionado con la EVW y al cambio en el dominio de unión al FVIII.

La complejidad de la clasificación de la EVW y sus limitantes en las pruebas diagnósticas sugieren que la combinación de las pruebas de laboratorio y la búsqueda molecular de mutaciones en el material genético puede ser una herramienta muy importante en el diagnóstico de la enfermedad.

Otro elemento a tomar en cuenta en el estudio de las secuencias del exón 28, altamente homólogo a la secuencia del pseudogen localizado en el cromosoma 22, fue la presencia de variantes que son de origen del pseudogen. Eikemboom y cols en 1994 obtuvieron cDNA de pacientes con EVW y concluyeron que existen múltiples sustituciones en el gen VWF que mimetizan la secuencia del pseudogen.⁸⁶ Es difícil asegurar que la presencia de múltiples sustituciones refleja eventos mutacionales simples, por lo que se postula que tales sustituciones son el resultado de un evento recombinante entre el gen y el pseudogen.^{86, 87} Este mecanismo de conversión génica también ha sido informado en otros genes humanos como en los genes de histocompatibilidad, deficiencia de la 21 hidroxilasa de esteroides y en el gen de la beta globina.⁸⁸ En todos estos ejemplos las conversiones ocurren entre genes multialélicos o entre genes y pseudogenes localizados en el mismo cromosoma. En este caso la conversión intercromosómica se realiza entre los cromosomas 12 y 22. Evento común entre organismos como las levaduras y la *Drosophila*.⁸⁹

Una hipótesis que sostiene este evento recombinacional son las secuencias Chi (5'-GTCGGTTGG-3') o secuencias similares a Chi estimulan eventos de recombinación.⁹⁰ En la secuencia del gen que es homóloga al pseudogen se han encontrado 4 secuencias Chi. Dos de estas secuencias se encuentran muy próximas en las regiones de conversión génica (una en el intrón 17 y otra en el exón 28). Además una secuencia tipo Chi (5'-CCTGGTGG-3') se encuentra entre nucleótidos 3726-3733 del exón 28.

La EVW es un desorden altamente heterogéneo con más de 20 variantes clínicamente descritas. Debido a su complejidad y a las limitaciones en las pruebas diagnósticas, proponemos que la búsqueda molecular de mutaciones en el gen es de gran utilidad en el diagnóstico. En este caso la secuenciación es un método específico que puede ser muy práctico en la identificación de mutaciones sobre todo las relacionadas con variantes cualitativas de la proteína en las cuales se conocen los dominios involucrados.

8. CONCLUSIONES

Este es el primer estudio realizado en México en el que se ha identificado a nivel molecular las variantes que se encuentran presentes en la secuencia de VWF en pacientes mexicanos con EVW.

1. La clasificación realizada en los pacientes con EVW mostró que 16 de ellos son tipo 1, 11 pacientes 2A, 2 pacientes 2B, 1 paciente 2M y 4 pacientes 2N.
2. En el análisis de las secuencias de pacientes con EVW 2A se encontraron las mutaciones G1609R, S1613P, R1697L, I1628T y P2781S., en pacientes con EVW 2B R1608P y en la variante 2 M se encontró la mutación S1285F.
3. En este estudio se presentaron 3 nuevas mutaciones en el gen VWF. En el exón 18 se identificó la mutación P812L relacionada con la EVW 2N, en el exón 28 a E1447Q en un paciente con EVW tipo 1 y en el exón 52 P2781S relacionada con la variante 2A.
4. Los resultados obtenidos en las secuencias mostraron que la causa molecular de la EVW es variante. El diagnóstico genético directo puede ser una opción para las variantes cualitativas, mientras que en las cuantitativas los estudios indirectos supondrían una alternativa para el diagnóstico, especialmente en los casos de alta penetrancia.

9. REFERENCIAS

1. Von Willebrand E. Hereditar pseudohefemofili. Finska Lakar. Hand. 1926; 68: 87-112.
2. Federici A. The factor VIII/von Willebrand Factor complex: basic and clinical issues. Haematologica 2003; 88: 3-12.
3. Castaman G, Federic A, Rodegheiro F, Mannuccio P. Von Willebrand's disease in the year 2003: towards the complete identification of gene defects for correct diagnosis and treatment. Haematologica 2003; 88:90-108.
4. Ingerslev J. Von Willebrand's disease-is a new classification system required? Haematologica. 2005; 1: 38-41.
5. Sadler J. A revised classification of von Willebrand disease. J Thromb Haemost 1994; 71:520-525.
6. Montgomery R, Cox J, Scott J. Hemostasis. En Sciber C. The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. Edit McGraw-Hill. USA. 2000. p 1631-1655.
7. Zimmerman T, Ruggeri Z. Von Willebrand's disease. Clin Haemat 1983; 12: 1.
8. Baronciani L, Cozzi G, Canciani T, Peyvandi F, Srivastava A, Federici A, Mannucci PM. Molecular defects in type 3 von Willebrand disease: updated results from 40 multiethnic patients. Blood Cells Mol Dis. 2003; 30:264-270.
9. Berntorp E, Ölundarson P. Prevalence of von Willebrand disease in the Nordic Region. Haematologica 2005; 1: 4-6.
10. Ambríz R. Enfermedad de von Willebrand informe de 60 casos de 24 familias en México; Rev Med IMSS 1984; 22: 241-247.
11. Benítez H, Fernández G, López A, Nieva B, Shum L, Rodríguez M, Trejo J, Bernáldez R. Gravedad del sangrado y su asociación con las distintas variantes de la enfermedad de von Willebrand en pacientes pediátricos. Bol Med Hosp. Infant Mex 2004; 61: 297-306.
12. Mancuso D, Tuley E, Westfield L, Worrall N, Shelton B, Sorace J, Avely Y, Sadler J. Structure of the gene for human von Willebrand factor. J Biol Chem 1989; 264: 19514-19527.
13. Base de datos de VWF por la Universidad de Sheffield. UK: 2004. <http://www.shef.ac.uk/vwf/>

-
14. Collins C, Underdahl J, Levene R, Ravera C, Morin M, Dombagalian J, Ricc G, Livingston D, Lyncj D. Molecular cloning of the human gene for von Willebrand factor and identification of the transcription initiation site. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 1987; 84: 4394-4397.
 15. Peng Y, Jahroudi N. The NFY transcription factor inhibits von Willebrand factor promoter activation in non-endothelial cells through recruitment of histone deacetylases. *J Biol Chem* 2003; 278:8385-8394.
 16. Wang X, Peng Y, Ma Y, Jahroudi N. Histone H1-like protein participates in endothelial cell-specific activation of the von Willebrand factor promoter. *Blood* 2004; 104:1725-1732.
 17. Mancuso J, Tuley A, Westfield A. Human von Willebrand factor gene and pseudogene: structural analysis and differentiation by polymerase chain reaction. *Biochemistry* 1991; 30:253-269.
 18. Ginsburg D. The molecular biology of von Willebrand disease. *Haemophilia* 1999; 5:19-27.
 19. Jenkins V, Pasi J, Perkins S. Molecular modeling of ligand and mutation sites of the type A domains human von Willebrand factor and their relevance to von Willebrand's disease. *Blood* 1998; 6: 2032-2044.
 20. Enayat M, Guilliat A, Surdhar, Hill H. A new candidate missense mutation (Leu 1657 Ile) in an apparently asymptomatic type 2A (phenotype IIA) von Willebrand disease family. *J Throm Haemost* 2000; 84:369-373.
 21. Bowen D, Collins P. An amino acid polymorphism in von Willebrand factor correlates with increased susceptibility to proteolysis by ADAMTS 13. *Blood* 2004; 103: 941-947.
 22. Schmugge M, Rand L, Bang W, Mody M, Dunn S, Amankwah S, Blanchette S, Freedman J. The relationship of von Willebrand factor binding to activated platelets from healthy neonates and adults. *Pediatr Res* 2003; 54:474-479.
 23. Cruz M, Chen J, Whitelock J, Morales L, Lopez J. The platelet glycoprotein Ib-von Willebrand Factor interaction activates the collagen receptor alpha 2 beta1 to bind collagen: activation-dependent conformational change of the alpha2-I domain. *Blood* 2005; 105:1986-1991.

-
24. Ruggeri Z, Ware J. Von Willebrand Factor. *FASEB* 1993; 7: 308-316.
 25. Andrews R, Berndt M. Platelet physiology and thrombosis. *Thromb Res*; 2004, 114: 447-453.
 26. Oury C, Sticker E, Cornelissen H, De Vos R, Vermeylen J, Hoylaerts M. ATP augments von Willebrand factor-dependent shear-induced platelet aggregation through Ca²⁺-calmodulin and myosin light chain kinase activation. *J Biol Chem* 2004; 279: 26266-26273.
 27. Resendiz J, Feng S, J, Kroll M. von Willebrand factor binding to platelet glycoprotein Ib-IX-V stimulates the assembly of an alpha-actinin-based signaling complex. *J Thromb Haemost* 2004; 2:161-169.
 28. Canobbio I, Reineri S, Sinigaglia F, Balduini C, Torti M. A role for p38 MAP kinase in platelet activation by von Willebrand factor. *J Thromb Haemost* 2004, 91:102-110.
 29. Komiya T, Negoro N, Kondo K, Miura K, Hirota Y, Yoshikawa J. Clinical significance of von Willebrand factor in patients with adult dermatomyositis. *Clin Rheumatol* 2005; 24: 352-357.
 30. Sociedad Internacional de Trombosis y Hemostasia. [http: www.med.unc.edu.isth](http://www.med.unc.edu.isth)
 31. Keeney S, Cumming A, Hay C. Mutations in von Willebrand Factor multimerization domains are not a common cause of classical type 1 von Willebrand disease. *J Thromb Haemost* 1999; 82:1446-1450.
 32. Goodeve A. Genotypic classification of von Willebrand disease. *Haematologica* 2005; 1:16-19.
 33. Tjernberg P, Vos H, Castaman G, Bertina R, Eikenboom J. Dimerization and multimerization defects of von Willebrand factor due to mutated cysteine residues. *J Thromb Haemost* 2004; 2:257-265.
 34. O'Brien L, James P, Othman M, Berber E, Cameron C, Notley C, Hegadorn C, Sutherland J, Hough C, O'Shaunessey D. Founder vonWillebrand factor haplotype associated with type 1 vonWillebrand disease. *Blood* 2003; 102: 549-557.
 35. Eikeboom J, Matsushita T, Reitsma P, Tuley E, Castaman G, Brief E. Dominant type 1 von willebrand disease caused by mutated cysteine residues in the D3 domain of von willebrand factor. *Blood* 1996; 88: 2433-2441.

-
36. Gill J, Endres J, Bauer P, Marks W, Montgomery R. The effect of ABO blood group on the diagnosis of von Willebrand disease. *Blood* 1987; 69: 1691-1695.
37. Lillicrap D. The basic science, diagnosis, and clinical management of von Willebrand disease. *Treatment of Hemophilia*. World Federation of Hemophilia. 2004; no 35, pp 1-12. [consulta 13 octubre 2006] Disponible en internet <http://www.wfh.org/2/docs/Publications/VWD_WomenBleedingDisorders/TOH-35_English_VWD.pdf
38. Rosenberg J, Haberichter L, Joswiak M. The role of the D1 domain of the von willebrand factor propeptide in multimerization of VWF. *Blood* 2002; 100: 1699-1706.
39. Cooney K, Nichols W, Bruck M, Bahou W, Shapiro A, Bowle W, Granick H, Ginsburg D. The molecular defect in type IIB von Willebrand disease. *J Clin Invest* 1991; 81:1226-1233.
40. Randi A, Rabinowitz I, Mancuso D, Mannuci P, Sadler E. Molecular basis of von Willebrand disease type IIB. *J Clin Invest* 1991; 87: 1220-1226.
41. Hillery C, Mancuso D, Sadler E, Ponder J, Jozwiak M, Christopherson P, Gill C, Scott P, Montgomery R. Type 2M von Willebrand Disease: F606I and I662F Mutations in the Glycoprotein Ib Binding Domain Selectively Impair Ristocetin but not Botrocetin-Mediated Binding of von Willebrand Factor to Platelets. *Blood* 1998; 91: 1572-1581.
42. Nichols W, Lyons S, Harrison J, Cody R, Ginsburg D. Severe von Willebrand disease due to a defect at the level of von Willebrand factor mRNA expression: Detection by exonic PCR-restriction fragment length polymorphism analysis. *Proc Nat Acad Sci. USA* 1991; 88: 3857-3861.
43. Sadler E. Von Willebrand disease type 1: a diagnosis in search of a disease. *Blood* 2003; 101: 2089-2093.
44. Rodeghiero F. Epidemiological investigation of the prevalence of von Willebrand's disease. *Blood* 1987; 69: 454-459.
45. Budde U, Drewke E, Mainusch K, Schneppenheim R. Laboratory diagnosis of congenital von Willebrand disease. *Sem Thromb Hemost* 2002; 28: 173-189.
46. Jiménez R. Actualidades en el diagnóstico y la clasificación de la enfermedad de von Willebrand. *Gac Med Mex* 2002; 138: 55-57.

-
47. Woods A, Meschengieser S, Blanco N, Kempfer A, Lazzari M. Clinical features and laboratory patterns in a cohort of consecutive Argentinean patients with von Willebrand disease. *Hematologica* 2001; 86: 420-427.
 48. Schneppenheim R, Budde U, Obster T, Brassard J, Kerstin M, Ruggeri M, Schneppeinhem S, Schwaab R, Olderburg J. Expression and characterization of von Willebrand factor dimerization defects in different types of von Willebrand disease. *Blood* 2001; 97: 2059-2066.
 49. Kasper C. Von Willebrand disease. An introductory discussion for young physicians. ISTH SSC Publications 2005, pp 1-57. [consulta 13 octubre 2006] Disponible en internet. http://www.med.unc.edu/wrkunits/journals/isth/publications/vwd_monograph/VWD_monograph_2005.pdf
 50. Paper R. Gynecological complications in women with bleeding disorders. Treatment of Hemophilia World Federation of Hemophilia. 2004; no 5, pp 1-8. [consulta 13 octubre 2006]. Disponible en internet. http://www.wfh.org/2/docs/Publications/VWD_WomenBleedingDisorders/TOH_English_gynecological.pdf
 51. Ni X, Guo J, Xia J, Li L. Prenatal determination of a variable number of tandem repeats in intrón 40 of the von Willebrand Factor gene from maternal peripheral blood using the Polymerase Chain Reaction. *Hum Hered* 2000; 50: 201-204.
 52. Wang Y, Li Z, Gu J, Ruan C. Von Willebrand disease in China, *Chin Med J* 2000; 113: 677-680.
 53. Palacios J. Frecuencia de heterocigocidad del polimorfismo TCTA del intrón 40 del gen VWF en pacientes con enfermedad de von Willebrand y en población indígena mexicana. Tesis de Especialización en Genética. Facultad de Medicina. UNAM. México D.F. 2005. pp 42.
 54. Mannhalter C Kirle P, Brenner B, Lecher K. Rapid neonatal diagnosis of type IIB von Willebrand disease using the polymerase chain reaction. *Blood* 1991; 77: 2539-2540.
 55. De Meyer S, Vanhoorelbeke K, Marinee K, Pareyn I, Gillijns V, Hebbel C, Deckmyn H. Phenotypic correction of von Willebrand disease type 3 blood-derived endothelial cells with lentiviral vector expressing von Willebrand factor. *Blood* 2006; 107: 4728-4736.
 56. Montgomery R. A package for VWD endothelial cells. *Blood* 2006; 107: 4580-4581.

-
57. Majluf A, Jaloma R, Martínez C, Quintana S, Ambriz R. Hematología. Panorama de la hemofilia y trastornos hemorrágicos hereditarios en México. Agrupación Mexicana para el Estudio de la Hematología. México; 2005: 72-81.
 58. Santiago R. Haplotipos del gen VWF en población mexicana. Tesis de Especialización en Bioquímica Clínica. Facultad de Química. UNAM. México D. F. 2005. 33p.
 59. Secretaría de Salud. Sistema Nacional de Información en Salud. México: 2001. <http://www.salud.gob.mx/>
 60. National Center of Biotechnology Information. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
 61. European Molecular Biology Laboratory. <http://www.ebi.ac.uk/embl/>
 62. Sadler E, Ginsburg D. A database of polymorphisms in the von Willebrand factor gene and pseudogene. For the Consortium on von Willebrand Factor Mutations and Polymorphisms and the Subcommittee on von Willebrand Factor of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *J Thromb Haemost* 1993; 69, 185-191.
 63. Donner M, Kristoffersson A, Berntorp A, Scheibel E, Thorsen S, Dahlback B, Nilsson I, Holmberg L. Two new candidate mutations in type IIA von Willebrand's disease Arg834>Gly, Gly 846>Arg and one polymorphism Tyr821>Cys in the A2 region of the von Willebrand factor. *Eur. J. Haematol* 1993; 51:38-44.
 64. SNPs Database. http://www.embl_heidelberg.de/predicprotein/html
 65. Goodeve A, Eikenboom J, Ginsburg D, Hilbert L, Mazurier C, Peaje I, Sadler J, Rodeghiero. A standar nomenclature for von Willebrand factor gene mutations and polymorphisms. *J Thromb Haemost* 2001, 85: 929-931.
 66. Schneppenheim R, Budde U, Obster T, Brassard J, KerstinM, Ruggeri M, Schneppeinhem S, Schwaab R, Olderburg J. , Genetic heterogeneity of severe von Willebrand disease type III in German population. *Hum Genet* 1994; 94: 640-652.
 67. Hilbert L, Gaucher C, De Romeuf C, Parquet A, Abgrall J, Trzeciak J, Mazurier C. Identification of "new" type 2B vWD mutations: R543Q, R545P and R578L. *Br. J. Haematol* 1996; 93 (Suppl.2,310): 1175 a.

-
68. Inbal A, Englender T, Kornbrot N, Randi M, Castaman G, Mannucci M, Sadler E. Identification of three candidate mutations causing type IIA von Willebrand disease using a rapid, nonradioactive, allele-specific hybridization method. *Blood* 1993; 82:830-836.
69. Hagiwara T, Inaba H, Yoshida S, Nagaizumi K, Arai M, Hanabusa H, Fukutake K. A novel mutation Gly1672>Arg in type 2A and a homozygous mutation in type 2B von Willebrand disease. *J Thromb.Haemost* 1996; 76:253-257.
70. Chang H, Chen Y, Chediak J, Levene R, Lynch D. Molecular analysis of von Willebrand factor produced by endothelial cell strains from patients with Type IIA von Willebrand disease. *Blood* 1989; 74 (Suppl.1): 482a.
71. Pietu G, Ribba A, de Paillette L, Cherel G, Lavergne J, Bahnak B, Meyer D. Molecular study of von Willebrand disease: identification of potential mutations in patients with type IIA and type IIB. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1992; 3:415-21.
72. Trasi S, Shetty S, Knjaksha G, Mohanty D. Prevalence and spectrum of von Willebrand disease from Western India. *India J Med Res* 2005; 121: 653-658.
73. Eikenboom J, Van Marion V, Putter H, Peake I, Goodeve A, Rodeghiero F, Castaman G, Federici A, Battle J, Meyer D, Mazurier C, Goudemand J, Schneppenheim R, Budde U, Ingerslev J, Vorlova Z, Habart D, Holmberg L, Lethagen S, Pasi J, Hill F. Linkage Analysis of von Willebrand Disease Type 1 Phenotype, von Willebrand Factor Levels and Bleeding Symptoms with Von Willebrand Factor Gene Locus in the European Multicenter MCMDM-1VWD Study. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2005; 3(Supp 1): 279a.
74. Setian N, Tanaka M, Damiani D, Dichtchekian V, Carneiro D, D'Amico A. Hypopituitarism, deficiency of factors V and VIII and von Willebrand factor: an uncommon association. *Pediatr Endocrinol Metab* 2002; 5:331-3.
75. Ewenstein B, Inbal A, Pober J, Handin R. Molecular studies of von Willebrand disease: reduced von Willebrand Factor biosynthesis, storage, and release in endothelial cells derived from patients with type I von Willebrand disease. *Blood* 1990, 75: 1466-1472.
76. Nitu-Whalley C, Lee A, Griffien A, Jenkins V, Pasi J. Type 1 von Willebrand disease - a clinical retrospective study of the diagnosis, the influence of the ABO blood group and the role of the bleeding history. *Br J Haematol* 2000; 108: 259-264.

-
77. Mannucci P, Lombardi R; Bader R, Vianello L, Federici A, Solinas S, Mazzucconi M, Mariani G. Heterogeneity of type I von Willebrand disease: evidence for a subgroup with an abnormal von Willebrand factor. *Blood* 1985; 66: 796-802.
78. Eikenboom J, Matsushita T, Reitsma P, Tuley E, Castaman G, Briët E, Sadler E. Dominant type 1 von Willebrand disease caused by mutated cysteine residues in the D3 domain of von Willebrand factor. *Blood* 1996; 7: 2433-2441.
79. Hashemi M, Peake I, Goodeve A, Rodeghiero F, Castaman G, Federici A, Batlle J, Meyer D, Mazurier C, Goudemand J, Eikenboom J, Schneppenheim R, Budde U, Ingerslev J, Vorlova Z, Habart D, Holmberg L, Lethagen S, Pasi J, Hill F. The incidence and penetrance of common VWF gene mutations in a cohort of type 1 VWD patients. Results from the EU funded MCMDM-1VWD Project. *J Thromb Haemost* 2005; 3(Supp 1): 1469a.
80. Simon D, Bandinelli E, Roisenberg I. Polymorphism in the promoter region of von Willebrand factor gene and von Willebrand disease type 1. *Genet Mol Biol* 2003; 26: 397-401.
81. Denis C, Methia N, Frenette P, Rayburn H, Ullman M, Hynes R, Wagner D. A mouse model of severe von Willebrand disease: Defects in hemostasis and thrombosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 9524-9529.
82. Protein Data Bank
<http://www.rcsb.org/pdb/Welcome.do;jsessionid=1A+YnINiEy6zZcJWOgnBIQ>
83. Hilbert L, Federici A, Baronciani L, Dallagiovanna S, Mazurier C. A new candidate mutation, G1629R, in a patient with type 2A von Willebrand disease: basic mechanisms and clinical implications. *Haematologica* 2004; 89: 1128-1133.
84. Tait S, Cranmer S, Jackson S, Dawes I, Chong B. Phenotype changes resulting in high-affinity binding of vonWillebrand factor to recombinant glycoprotein Ib-IX: analysis of theplatelet-type vonWillebrand disease mutations. *Blood* 2001; 98:1812-1818.
85. Predict Protein Database. <http://www.predictprotein.org/>
86. Eikenboom J, Vink T, Briet E, Sixma J, Reitsma P. Multiple substitutions in the von Willebrand dactor gene that mimic the pseudogene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 2221- 2224.

-
87. Holmberg L, Dent J, Schenppenheim R, Ulrich B, Ware J, Ruggeri Z. Von Willebrand factor mutation enhancing interaction with platelets in patients with normal multimeric structure. *J Clin Invest* 1993; 91: 2169-2177.
88. Pease L, Horton R, Pullen K, Yun T. Unusual mutation clusters provide insight into class I gene conversion mechanisms. *Mol Cell Biol.* 1993; 13: 4374–4381.
89. Schaeffer S, Anderson W. Mechanisms of Genetic exchange within the chromosomal inversions of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics* 2005; 171: 1729-1739.
90. Lao P, Forsdyke D. Crossover Hotspot Instigator (Chi) sequences in *E. coli* occupy distinct recombination/transcription islands. *Gene* 2000; 243:47-57

ANEXOS

1. Carta de consentimiento informado para la toma de muestra de 5ml de sangre periférica.

CMN SXXI 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 SXXI HP. Los médicos de su hijo han determinado que presenta la 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 el estudio molecular para la búsqueda de la causa de la enfermedad; 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). Al término del estudio, el investigador le proporcionará la información completa sobre los resultados.

Beneficios.

El presente estudio representa un beneficio directo para el diagnóstico y/o tratamiento del paciente y/o sus familiares de manera inmediata.

Confidencialidad.

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

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.

Firma del padre o tutor

Testigo

Firma de la madre o tutora

Testigo

**2. Cuestionario General de Pacientes con Enfermedad de von Willebrand.
CMN SXXI Hospital de Pediatría.**

FECHA _____
NÚMERO DE PACIENTE _____

Nombre _____

Edad _____

Sexo _____

Lugar de Residencia _____

Dirección _____

Teléfono _____

Correo electrónico _____

Lugar de origen del Padre _____

Lugar de origen de Abuelos paternos _____

Lugar de origen de la Madre _____

Lugar de origen de los Abuelos maternos _____

Consanguinidad Si No

Historia Familiar de Sangrado Si No

Especificar _____

Ingesta de anticoagulantes Si No

Especificar _____

Tratamiento hormonal Si No

Especificar _____

TIPO DE SANGRADO

Sangrado espontáneo Epistaxis

Equimosis Gingivorragias

Petequias Hematurias

Metrorragias Sangrado Post parto

Sangrado por trauma Sangrado Post extracción dental
 Sangrado Post quirúrgico Hemartrosis

DATOS DE LABORATORIO

Tiempo de Sangrado	Cuenta de Plaquetas	TP	TPPa	FVIII:C	VWF:RCo	VWF:Ag

Tratamiento para la Enfermedad Si No

Especificar _____

ÁRBOL GENEALÓGICO

