



00346
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA ²
DE MEXICO ₂₄

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**ESTUDIO GENETICO Y MOLECULAR DE
PACIENTES CON NEFROBLASTOMA EN
FAMILIAS MEXICANAS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
MAESTRIA EN CIENCIAS (BIOLOGIA CELULAR)

P R E S E N T A :

BIOL. CAROLINA BARRIENTOS SALCEDO

**TUTOR: DR. FABIO ABDEL SALAMANCA GOMEZ
COTUTOR: DRA. ROSENDA ISABEL PEÑALOZA ESPINOSA**

MEXICO, D. F.

1997

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Esta tesis se realizó en la Unidad de Investigación Médica en Genética Humana, Coordinación de Investigación Médica y Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social,

Bajo la tutoría de los doctores

Fabio Salamanca Gómez,

Rosenda Isabel Peñalza Espinosa y

Virginia Palma Padilla

El comité tutorial estuvo constituido por los doctores

Rosenda Isabel Peñaloza Espinosa

Alessandra Carnevale Cantoni

Fabio Salamanca Gómez

Virginia Palma Padilla

Patricio Gariglio

colaboraron amablemente también, los cirujanos oncólogos pediatras

José Vázquez Langle (CMN S.XXI, IMSS)

José Velázquez Ortega (CMN La Raza, IMSS)

José Luis Quintero Curiel (CMN La Raza, IMSS)

Los SSCPs se realizaron en la **Unidad de Investigación Médica en Biología del Desarrollo del Hospital de Pediatría de CMN S. XXI del IMSS**

contando con la asesoría de

M. en C. Leda Carolina Torres Maldonado

O.F.B. Guadalupe Maya Núñez

Los datos epidemiológicos fueron proporcionados muy amablemente por el Jefe de la **Unidad de Investigación Médica en Epidemiología Clínica del Hospital de Pediatría del CMN S. XXI del IMSS**

Dr. Arturo Fajardo Gutiérrez

AGRADECIMIENTOS

**Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)
por el apoyo otorgado al proyecto de investigación
"Estudio Citogenético y Molecular de las Neoplasias (M9108-0379)"
del Dr. Fabio Salamanca Gómez,
que permitió el financiamiento parcial de la presente tesis
y por la beca de maestría.**

**Al Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS)
a través de la División de Formación de Personal para la Investigación
dirigida por el Dr. Ramón Paniagua Sierra.**

**A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)
y a la Universidad Veracruzana (UV)
a través del Departamento de Intercambio Académico.**

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. **Fabio Salamanca Gómez**, por brindarme la oportunidad de realizar este estudio y por su guía profesional y personal.

A la **Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo**, por todo el apoyo personal brindado.

A la **Dra. Rosenda Isabel Peñaloza Espinosa**, por su paciencia y sus acertados consejos.

A la **Dra. Virginia Palma Padilla**, por su adiestramiento en Citogenética y su condescendencia.

Al Dr. **Ramón Mauricio Coral Vázquez**, por su gran camaradería y sus pertinentes observaciones en este trabajo.

A la **M. en C. Leda Carolina Torres Maldonado** por permitirme el acceso al mundo de los SSCP con ese optimismo fantástico, gracias Leda por esos breves pero lindos momentos.

A la **O.F.B. Guadalupe Maya Núñez** por sus instrucciones y enseñanza en el uso del PhastSystem, Lupita te agradezco esos instantes de tu ordenada vida, vá por las risas y las lamentaciones.

A los compañeros de Biología Molecular: **Rosenda, Ramón, Diego y Marina** por todo su apoyo.

A la **Dra. Luz Elena Hernández**, por su amabilidad y atención.

A **Victoria Torres** y **Dra. Carmen Navarrete**, porque la alegría alerta los sentidos.

A la **M. en C. Rosa María Argote**, por esos rayos de luz que emanan de su presencia.

A la **O.C. Teresa Martínez Cázares** por toda su ayuda.

Al **Dis. Gráfico Antonio Rivera**, por su amabilidad y los dibujos que aparecen en la tesis.

A las familias que participaron en el estudio.

DEDICATORIA

**A "quienes seguir en pié quiere decir coraje" : los niños con cáncer, sus padres y sus
parientes**

A la fuerza del espacio que le dió constancia a la Energía del Universo

A quienes me enseñaron a andar con los pies y con el alma

A quienes puedo contar "no hasta dos o hasta diez" sino con ellos

A quien hizo del leve sonido de las olas, el estruendoso latir del oceano

A quienes miran a la luna, su rostro sonríe y su alma está junto a la mía

INDICE

| | |
|---|----|
| RESUMEN | 11 |
| ABSTRACT | 12 |
| INTRODUCCIÓN | 13 |
| Neoplasias Embrionarias | 15 |
| Nefroblastoma o Tumor de Wilms | 16 |
| Características Clínicas y de Laboratorio | 19 |
| Incidencia | 20 |
| Lateraliadad y Edad al Diagnóstico | 21 |
| Asociación con Anormalidades Congénitas | 24 |
| Casos Familiares | 29 |
| Genética del tumor de Wilms | 30 |
| Estudios Citogenéticos | 30 |
| El gen WT1 | 30 |
| JUSTIFICACIÓN | 43 |
| HIPÓTESIS | 45 |
| OBJETIVOS | 46 |
| MATERIAL Y MÉTODOS | 47 |
| RESULTADOS | 58 |
| DISCUSION | 70 |
| CONCLUSIONES | 80 |
| BIBLIOGRAFÍA | 81 |

RESUMEN

El tumor de Wilms (WT) es una neoplasia embrionaria con etiología compleja aún no totalmente descubierta, en la que se incluyen factores genéticos como son las alteraciones en por lo menos tres genes, así como cambios cromosómicos diversos. Sólo el gen WT1 está bien caracterizado como involucrado en el desarrollo del tumor de Wilms.

Con el objeto de estudiar la etiología del tumor de Wilms, se realizó la detección de alteraciones cromosómicas constitucionales en sangre periférica de diez pacientes entre 2 y 12 años de edad con diagnóstico de tumor de Wilms unilateral y esporádico, así como el de sus padres. Además se evaluaron los polimorfismos conformacionales de cadena sencilla (SSCP) de los exones 7, 9 y 10 del gen WT1 por ser los exones con mayor número de alteraciones de acuerdo a la literatura en DNA linfocitario y tumoral. Se encontraron alteraciones cromosómicas constitucionales en dos de los diez pacientes, las que no estaban presentes en los progenitores. En uno el cariotipo fue 46,XX,t(18)(p11,q23) y en el otro paciente con diagnóstico de síndrome de Beckwith-Wiedemann, se observó el cariotipo 46,XY,t(11,21)(p15,q11). Se observaron polimorfismos en ocho de los diez pacientes, cinco en el exón 7, uno en el 9 y cuatro en el 10. El cariotipo y los polimorfismos conformacionales de cadena sencilla resultan ser buenos métodos de tamizaje en la búsqueda de los factores etiológicos del tumor de Wilms y contribuyen a la caracterización genética de la población mestiza mexicana, dadas las diferencias epidemiológicas informadas en población caucásica, negra y asiática.

ABSTRACT

The nephroblastoma or Wilms' tumor is an embryonic malignant with complex etiology, that include genetic factors as the alterations in at least three genes and several chromosomal changes

The purpose was to investigate the Wilms' tumor etiology in Mexican patients. Constitutional chromosomal alterations were detected in peripheral blood in ten patients with Wilms' tumor diagnostic (2-12 years old). The analysis of the karyotypes was also performed in their parents. In addition, the single strand conformational polymorphisms (SSCP) of 7, 9 and 10 exons in WT1 gene in tumours and lymphocytes DNA of the patients were also evaluated.

Constitutional alterations in two patients but not in their parents were observed. In one the karyotype was 46,XX,r(18)(p11,q23) and in the other was 46,XY, t(11,21)(p15,q11). The parents had normal karyotypes. Eight polymorphisms in all analyzed patients were observed. Five in 7 exon, one in 9 exon and four in 10 exon.

The karyotype and the SSCP analysis are good methods for sieve Wilms' tumor etiologic factors research and contribute in Mexican population genetic characterization corroborate exist differences with Caucasian, Asiatic and African population.

INTRODUCCIÓN

El cáncer es uno de los padecimientos más heterogéneo en cuanto a su etiología y evolución por lo que ha sido difícil encontrar los orígenes en cada uno de ellos a pesar de los múltiples esfuerzos que se han estado haciendo a lo largo de muchos años. En los niños, adquiere caracteres muy especiales a causa del impacto físico, económico y moral que ocasiona no sólo en la familia del enfermo, sino en la sociedad.

La mayor parte de los casos con cáncer en el adulto se consideran relacionados con factores ambientales, que disparan los factores genéticos predisponentes y que se asocian de alguna forma con el medio físico circundante y con el estilo de vida, en cambio en los niños, ciertos cánceres como los embrionarios están relacionados con factores genéticos, y es bien conocida la coexistencia de neoplasias con malformaciones congénitas, como los síndromes en los que hay predisposición a nefroblastoma (Beckwith-Wiedemann, WAGR y Denys-Drash).

Además, generalmente las neoplasias malignas del adulto requieren mucho tiempo para su desarrollo, y en los niños el cáncer tiende a desarrollarse más rápidamente debido a que los tejidos del organismo infantil crecen con mayor rapidez, al tiempo que el proceso proliferativo maligno crece con ellos. Dado el ritmo de desarrollo más lento en los adultos que en los niños, se ha supuesto que en este último caso los mecanismos de formación son diferentes, porque los tejidos que les dan

origen tienen características metabólicas comunes a las de los tejidos de crecimiento rápido, similares a las de los tejidos del período embrionario, fetal o posnatal temprano (Salas, 1988).

La frecuencia de cáncer en los niños y su importancia como causa de muerte varia de un país a otro de acuerdo a factores genéticos como se ha mencionado, además de los factores ambientales. En los países desarrollados la incidencia va de 8 a 20 por cada 10, 000 nacidos vivos (Breslow et al., 1988), mientras que en los subdesarrollados, las causas de muerte más frecuentes siguen siendo las enfermedades infectocontagiosas, la enteritis y la desnutrición que tienen una tasa de mortalidad de 133.3 por cada 100,000 habitantes menores de cinco años y una de cada seis defunciones en estos menores es por diarrea (Giono *et al.*, 1994).

La frecuencia de los diferentes tipos de cáncer varia de una población a otra. Sin embargo, los tumores renales se encuentran entre los tumores sólidos infantiles más comunes en todo el mundo, destacando entre ellos el neuroblastoma con una frecuencia aproximada de 1 por cada 10,000 nacidos vivos (Breslow y Langholz, 1983).

NEOPLASIAS EMBRIONARIAS.

Si bien algunos de los tumores embrionarios pueden desarrollarse tan tempranamente que alcanzan gran tamaño y llegan a producir metástasis durante la vida fetal, la gran mayoría de las neoplasias embrionarias tienen factores desencadenantes distintos de los tumores adquiridos durante la vida adulta

Esta heterogeneidad ha impedido tener un diagnóstico certero global, lo que ha llevado a realizar estudios particulares para conocer el o los mecanismos de formación del tumor, y por lo tanto poder detectar estas alteraciones en forma temprana. Se considera tumor embrionario a la neoplasia que se origina durante el desarrollo embrionario, fetal o posnatal temprano, a partir de tejido inmaduro (Salas, 1988)

El tumor embrionario difiere fundamentalmente de los otros tumores tanto etiológica como estructuralmente mientras que la mayor parte de los tumores son el resultado de la acción de agentes físicos, químicos o biológicos, los embrionarios casi siempre se relacionan con alteraciones genéticas durante el desarrollo. Por otro lado, los tumores embrionarios continúan proliferando mediante la producción de masas de tejidos con grados variables de inmadurez y con diferenciación divergente (Fig. 1) (Salas, 1988).

NEFROBLASTOMA O TUMOR DE WILMS. ANTECEDENTES HISTORICOS

El primer caso de nefroblastoma fue descrito por Gairdner en 1828 pero fue Max Wilms el primero en reconocer a este trastorno como entidad clinica y en su monografia clasica de 1899, hizo una revision de estos tumores en la literatura y adicono siete casos (Green *et al*,1993) A partir de esta publicaci3n, los tumores de este tipo se conocen como tumores de Wilms (WTs)

El termino nefroblastoma o tumor de Wilms indica una entidad patol3gica de naturaleza neopl3sica, de tipo maligno con origen en tejido renal embrionario. (Joseph, 1949)

La primera nefrectomia aplicada a tumores de Wilms fue informada en 1877 por Jessop (Green, 1993) El primer informe de tratamiento radioterap3utico en tumor de Wilms apareci3 en 1916. En 1942, Prietley y Schulte aportaron los resultados de la nefrectomia de 39 ni1os con tumor de Wilms, cuyo promedio de sobrevida en cinco a1os fue del 15 %. Ellos reconocieron que resultaba de mejor pron3stico combinar la cirugia con la radiaci3n (Kempter *et al*, 1992). En 1956 Farber y Colaboradores introdujeron el primer agente quimioterap3utico especifico para tumor de Wilms, la actinomicina. M3s tarde Sutow y Cols. (1963) emplearon la vincristina (en: Matsunaga,

1981). A finales de los 60s la cirugía se combinó con la radioterapia y múltiples drogas quimioterapéuticas. En este tiempo se iniciaron varios estudios de cooperación institucional en Estados Unidos, Canadá, Gran Bretaña y otros países europeos. Ellos investigaron la combinación de los tres métodos terapéuticos, e hicieron significativos avances en Patología, Genética e Histogénesis del tumor de Wilms (Kempter *et al.*, 1992).

Los estudios histológicos han sido determinantes en la terapia y el pronóstico. Otros parámetros como la cantidad de DNA nuclear, mediante citometría de flujo, han ayudado a dirigir la terapia. En la historia de la medicina moderna, el tratamiento del nefroblastoma constituye uno de los logros más espectaculares ya que el promedio de supervivencia pasó del 31 - 40% en la década de 1954-1963 al 90% entre 1974-1983 (Barrantes *et al.*, 1993).

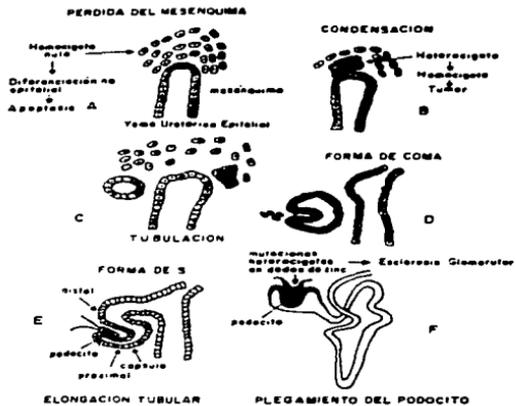


Figura 1. Representación esquemática del desarrollo embrionario del riñón. (Según descripción de Gauthier, 1990).

CARACTERISTICAS CLINICAS Y DE LABORATORIO

Las características clínicas son muy generales y no son exclusivas de la patología. A la exploración entre el 80 % y el 90 % de los pacientes presentan la masa abdominal como signo inicial (Moe, 1990). El segundo síntoma más frecuente es el dolor (20% - 30%) y hematuria macroscópica (10%). Se presenta fiebre, náuseas, pérdida de peso, anorexia e hipertensión. La hematuria se ha evaluado con citoscopia, a partir de la presentación de metástasis en el uréter ipsolateral, en vejiga y en uretra (Pagano y Penelli, 1974, Taykurt *et al.*, 1972). También se encuentran alteradas las concentraciones de creatinina, hemoglobina, calcio y electrolitos. El diagnóstico diferencial se realiza de acuerdo con los estudios de ultrasonografía, radiología y tomografía. El tratamiento varía según el estado clínico-patológico y consiste en la resección quirúrgica, quimioterapia (actinomicina D y vincristina) y radioterapia. Se clasifica a los tumores de Wilms de acuerdo con sus características anatomopatológicas en cinco estadios como se muestra en la tabla 1 (Velázquez, 1996).

Tabla I. Estados anatomoclinicos de los tumores de Wilms.

| ESTADO | ANATOMOCLINICO | CLASIFICACION |
|--------|----------------|--|
| I | | Tumor Unilateral |
| II | | Extensión local resecable |
| III | | Confinado al abdomen pero no totalmente resecable. Diseminación del tumor durante la intervención quirúrgica |
| IV | | Metástasis |
| V | | Tumor Bilateral |

INCIDENCIA.

En un principio se consideró que ocurría una frecuencia de tumores de Wilms uniforme en todo el mundo, por lo que fué utilizado como índice de tumores infantiles. Sin embargo, esto varía ya que en Estados Unidos la incidencia es de 1 en 10,000 nacidos vivos y hay una baja frecuencia en la población del este de Asia y en la escandinava y más alta en la africana y sudamericana de origen negro. La población

caucásica de Europa y Norteamérica tiene una incidencia intermedia (Breslow y Langholz, 1983). En general los tumores renales ocupan el sexto lugar en el esquema de clasificación de cáncer en la niñez basado en la segunda revisión de la Clasificación Internacional de Enfermedades Oncológicas (WHO, 1976, Birch y Marsden, 1987). En un estudio realizado en la Ciudad de México, el tumor de Wilms ocupó el séptimo lugar de frecuencia de las neoplasias malignas en niños, con el 5.5% en 276 casos en diez años (Fajardo, *et al.*, 1996). Este tumor se presenta ligeramente con mayor frecuencia en mujeres que en hombres aunque este es otro de los aspectos discutibles de la enfermedad (Breslow *et al.*, 1988, 1990, 1992, Fajardo *et al.*, 1996).

LATERALIDAD Y EDAD AL DIAGNOSTICO.

La mayoría de los tumores de Wilms se presentan en un solo riñón; aproximadamente el 7% de los casos son bilaterales. El 10% de todos los tumores son multicéntricos, presentándose varios tumores en un riñón como resultado de metástasis en el mismo o del desarrollo de tumores independientes (Breslow *et al.*, 1993).

La edad a la que aparecen con mayor frecuencia es a los 33 meses (2.75 años). Los tumores bilaterales se manifiestan antes que los unilaterales (Breslow y

Langholz, 1983). En la figura 2 se muestra que el pico mayor por edad es de 2 a 3 años, con una edad media de 36 meses para los niños y de 43 meses para las niñas en los casos unilaterales y de 23 meses para los niños y 30 meses para las niñas en los casos bilaterales (Green *et al.*, 1993).

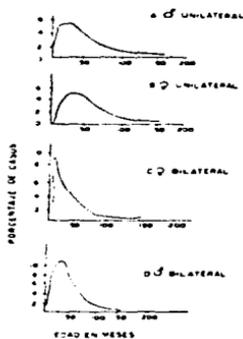


Figura 2. Representación esquemática de la distribución de la lateralidad del nefroblastoma, respecto a la edad y al sexo (según resultados de Green *et al.*, 1993).

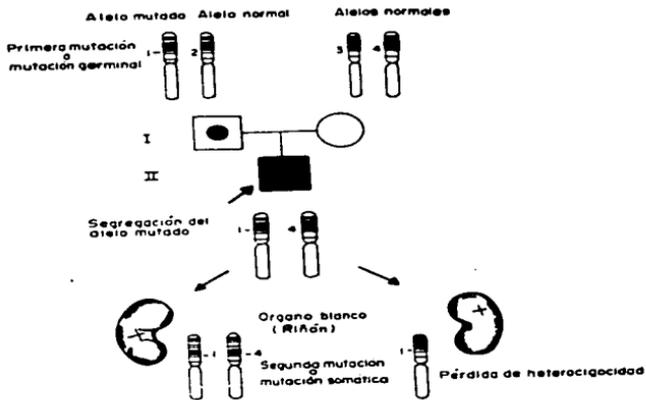


Figura 3. Representación esquemática del modelo de Knudson. El padre es portador de un alelo mutado, mismo que segrega al hijo en cuyo riñón puede ocurrir la segunda mutación o la pérdida del alelo materno normal, lo que desencadena una desregulación celular y se desarrolla la neoplasia.

ASOCIACIÓN CON ANORMALIDADES CONGÉNITAS.

En pacientes con tumor de Wilms se observa alta incidencia de aniridia, una anomalía congénita del iris, de hemihipertrofia, de anomalías genitourinarias y de retraso mental (Miller *et al.*, 1964). Posteriormente, a tales manifestaciones juntas se les denominó síndrome de WAGR (Wilms, Aniridia, anomalías Genitourinarias y Retraso mental) (Fraumeni *et al.*, 1967). Aproximadamente el 1% de los pacientes con WAGR presentan tumor de Wilms, y el 5-7% tienen solo anomalías genitourinarias (Breslow *et al.*, 1988). El tumor de Wilms está asociado además con los síndromes de Beckwith-Wiedemann y de Denys-Drash.

SÍNDROME DE DENYS-DRASH (DDS).

El síndrome de Denys-Drash es una patología rara caracterizada por lesiones renales que conducen a la degeneración progresiva del riñón y se presentan anomalías genitourinarias (GU) que se manifiestan generalmente como un pseudohermafroditismo masculino (Jadresic *et al.*, 1990).

Los pacientes con DDS tienen predisposición a tumor de Wilms y los que lo desarrollan tienen tumores bilaterales. La nefropatía puede estar asociada con

las GU y con el tumor de Wilms y algunos pacientes presentan los tres fenotipos (Jadresic *et al.*,1990). La observación de que un paciente con DDS también tenía una delección constitucional en la banda 13 del cromosoma 11 hizo suponer que el gen WT1 podría estar involucrado (Jadresic *et al.*,1991). En otro estudio con el tumor de Wilms de un paciente con DDS se observó pérdida de heterocigocidad en el brazo corto del cromosoma 11 (Baird *et al.*, 1992). Pelletier y colaboradores (1991 a y b) informaron que todos los pacientes con DDS tienen deleciones constitucionales en WT1, que involucran en particular a dos nucleótidos en los exones 8 y 9. La mutación más común, que ocurre en el 50% de los casos analizados, es el cambio de un aminoácido arginina a triptófano en la posición 394 (Pelletier *et al.*, 1991b). Se ha especulado mucho acerca de cómo el cambio de estos aminoácidos provoca el desarrollo anormal del riñón y de las gónadas. Estas mutaciones afectan el dominio de unión de la proteína WT1 al DNA, la cual está involucrada en la regulación de la expresión de otros genes. Es evidente que las mutaciones en el gen WT1 observadas en los pacientes con DDS tienen un efecto más allá de la simple reducción de la expresión génica como resultado de la inactivación. En los pacientes con síndrome de WAGR, las anomalías asociadas con el desarrollo son menos severas que las que se presentan en DDS. Se ha sugerido que la principal causa de la alteración en el sistema urogenital es la ganancia más que la pérdida de una función génica. De esta forma, la proteína WT1 adquiriría la capacidad para unirse a nuevas

secuencias, lo que puede afectar la transcripción de los genes a los que regula (Jadresic *et al.*, 1991).

SINDROME DE BECKWITH-WIEDEMANN (BWS).

En la década de los 60, Beckwith y Wiedemann describieron de forma independiente una enfermedad congénita poco común caracterizada por el crecimiento excesivo de los tejidos lo cual da como resultado organomegalia, hemihipertrofia y predisposición a desarrollar tumores intraabdominales (Wiedemann, 1964) tales como tumor de Wilms, carcinoma adrenocortical, rabdomiosarcoma embrionario, hepatoblastoma y pancreatoblastoma (Wiedemann, 1983). En los casos esporádicos de estos tumores se observó pérdida de heterocigocidad en los marcadores del brazo corto del cromosoma 11, lo cual involucra a los mismos genes responsables del desarrollo del nefroblastoma en la tumorigénesis de estos tejidos. En el rabdomiosarcoma la región de pérdida de heterocigocidad está en 11p15.5 (Ping *et al.*, 1989). Aunque la mayoría de los casos de BWS son esporádicos, en aproximadamente el 15% de los casos, hay evidencia de una predisposición hereditaria con expresión autosómica dominante, penetrancia baja y expresividad variable. El análisis de ligamiento genético demostró que el locus de BWS está en 11p15 (Koufus, *et al.*, 1984). En raras ocasiones los pacientes con BWS tienen anomalías constitucionales en el brazo corto del

cromosoma 11 en donde lo más frecuente son las duplicaciones de la región 11p15 la cual contiene al gen del factor 2 de crecimiento de tipo insulina (IGF2) (Cowell *et al.*, 1993).

Como lo indicó Junien (1992) el origen de todas las alteraciones en los pacientes con BWS no está en un solo *locus*; siendo por lo menos dos los genes involucrados con funciones diferentes. Un gen podría ser promotor de crecimiento, por lo que un buen candidato es el gen IGF2 que se expresa exclusivamente del homólogo paterno (Cattanach *et al.*, 1992; Little *et al.*, 1991). El segundo gen podría ser supresor con impronta opuesta (con expresión alélica exclusivamente materna) y el gen candidato es H19 porque está localizado en esta región y se expresa maternalmente en humanos y ratones (Zhang *et al.*, 1993), aunque se desconoce su función, se sabe que se expresa en varios tejidos fetales (Junien, 1992; Zhang *et al.*, 1993).

SINDROME DE WAGR

Este síndrome toma su nombre de la primera letra de cada una de las patologías que lo conforman: tumor de Wilms (WT), Aniridia de tipo 2 (AN2), anomalías Genitourinarias (GU) y Retardo mental (RM). La AN2 es una alteración bilateral del ojo caracterizada por la aplasia o displasia total o parcial del iris e hipoplasia del nervio óptico; en algunos pacientes el fenotipo puede ser progresivo y presentarse cataratas, opacificación de la córnea, dislocación ocular y glaucoma (Nelson *et*

et al., 1984); por lo que la AN2 es el equivalente humano de la mutación murina del ojo pequeño (Glaser *et al.*, 1990). Las anomalías genitourinarias que se observan en los pacientes con WAGR son: genitales ambiguos (pseudohermafroditismo), testículos no descendidos, hipospadia, fusión renal, anomalías del tracto urinario y gonadoblastoma (Anderson *et al.*, 1978; Junien *et al.*, 1980; Pendegrass, 1976; Riccardi *et al.*, 1978; Turleau *et al.*, 1981). A partir de que se observó pérdida de heterocigocidad en la región 11p13, se buscaron los genes presentes y relacionados con este síndrome (Fig. 4).

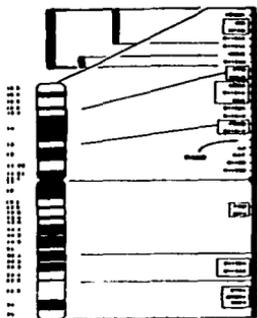


Fig. 4. Representación esquemática del locus del síndrome de WAGR en el cromosoma 11. (Tomado de Call, *et al.*, 1990).

CASOS FAMILIARES.

La mayoría de los casos de tumores de Wilms son esporádicos, sin historia familiar y menos del 1 % son casos familiares (Matsunaga, 1981)

En el análisis de segregación se observan amplios árboles genealógicos con transmisión vertical. En la figura 5 se presenta el árbol genealógico de una familia en el que se observa que el nefroblastoma familiar, es el resultado de una mutación autosómica dominante con penetrancia incompleta (Knudson y Strong, 1972; Matsunaga, 1981).

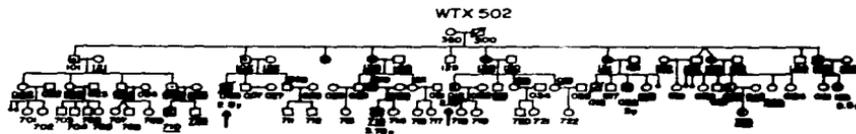


Figura 5. Arbol genealógico de una familia con nefroblastoma familiar.

LA GENÉTICA DEL TUMOR DE WILMS.

El tumor de Wilms es una entidad patológica mendeliana autosómica dominante con penetrancia incompleta y expresividad variable (Haber y Housman, 1991)

Se ha observado un incremento en la frecuencia de la tumoración bilateral en pacientes con anomalías congénitas o historia familiar, además de una aparición temprana de la neoplasia. Esto llevó a postular que era necesaria la presencia de dos mutaciones en cada uno de los alelos para el desarrollo del tumor (Knudson y Strong, 1972) (Fig.3). Estas mutaciones pueden ser aportadas por los progenitores o aparecer *de novo*. Sin embargo, no todos los tumores de Wilms pueden explicarse por mutaciones en el gen WT1 (Bickmore *et al.*, 1992; Cowell *et al.*, 1993)

EL GEN WT1 ESTUDIOS CITOGENÉTICOS

Los estudios citogenéticos fueron fundamentales para ubicar la localización cromosómica de un gen involucrado en el desarrollo del tumor de Wilms, al observarse pérdidas constitucionales en el brazo corto del cromosoma 11 de pacientes con aniridia y tumor de Wilms (AN/WT) (Riccardi *et al.*, 1978, 1980). Posteriormente se informaron pérdidas en 11p13 en pacientes con WT y sin AN (Kaneko *et al.*, 1981). En diferentes estudios de pacientes con nefroblastoma se ha informado la alteración de uno o

más cromosomas en los tumores (Fig. 6). Existen varios informes de alteraciones cromosómicas constitucionales en pacientes con tumor de Wilms generalmente asociado a otras patologías, la mayoría son traslocaciones que involucran al brazo corto del cromosoma 11, aunque en algunos casos se ha informado la presencia de material cromosómico extra, como el anillo informado por Kakati y Cols (1991) o en los que se involucran otros cromosomas como la traslocación X,1 (Punnett *et al.*, 1974)

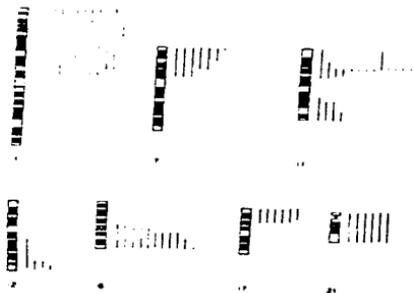


Figura 6. Representación esquemática de las regiones cromosómicas perdidas con mayor frecuencia en los tumores de Wilms (Kaneko *et al.*, 1991).

EL GEN WT1: ESTUDIOS DE PERDIDA DE HETEROCIGOCIDAD (LOH)

Los estudios moleculares apoyaron la localización del gen WT1 en 11p13. En el 25-35% de los casos analizados, el DNA tumoral presentó pérdida de heterocigocidad para los marcadores localizados en la banda 13 del brazo corto del cromosoma 11 (11p13) (Koufos *et al.*, 1984, Fearon *et al.*, 1984, Orkin *et al.*, 1984; Raizis *et al.*, 1985; Dao *et al.*, 1987) Y en el 10 - 15 % hubo pérdida de heterocigocidad en los marcadores 11p15 (Henry *et al.*, 1989a), lo que sugiere que la inactivación de ambas copias del gen WT1 no es suficiente para inducir el desarrollo del nefroblastoma y que la homocigocidad del gen alterado en 11p15 puede contribuir a la tumoración en algunos casos (Fig. 7).

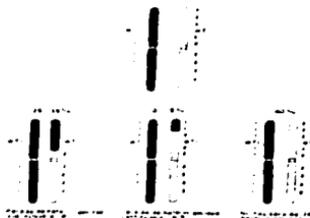


Figura 7. Representación esquemática de los estudios de pérdida de heterocigocidad informados en la literatura.

EL GEN WT1 AISLAMIENTO.

Se utilizó el método de sobrelapamiento de las regiones más pequeñas (SRO) para buscar en bibliotecas de cDNA e identificar clones que expresaran el gen WT1. En dos de ellos (WT33 y LK15) se expresó un transcrito de 2.9 Kb en riñón fetal, en bazo y en algunas líneas celulares leucémicas (Call *et al.*, 1990, Gessler *et al.*, 1990)

Se encontró que el *locus* WT1 consta de 10 exones extendidos en 50 Kb (Haber y Housman, 1991, Gessler *et al.*, 1992) El marco de lectura de dicha secuencia es de 1347 pb (449 aa) que codifican para dos motivos estructurales, uno rico en prolina y otro de dedos de zinc (Fig 8), esto le confiere una función de regulación transcripcional. La evidencia contundente de que el gen WT1 se encontraba en ese *locus* se demostró en un paciente que presentó nefroblastoma bilateral y pérdidas germinales en la región SRO: LK15/WT3 (Gessler, *et al.*, 1990).

EL GEN WT1: TRANSCRITOS

En análisis de hibridación RNA-DNA de tejidos humanos se observó un sólo mRNA de WT1 de 2.9 Kb. Sin embargo, utilizando distintos cDNA como sonda se demostró la presencia de cuatro variantes con el mismo marco de lectura; cada uno en la

misma proporción tanto en tumores de Wilms como en tejido renal normal (Haber y Housman, 1991; Gessler *et al.*, 1992). Se demostró la presencia de dos sitios de corte y empalme y que la eliminación del exón cinco no afecta a ningún dominio funcional de la proteína, pero si afecta la estabilidad estructural, de ahí su importancia biológica. El segundo sitio de corte y empalme involucra la inserción o la pérdida de tres aminoácidos entre el tercer y cuarto dedo de zinc (Fig 9) lo que tiene importancia funcional (Gessler *et al.*, 1992).

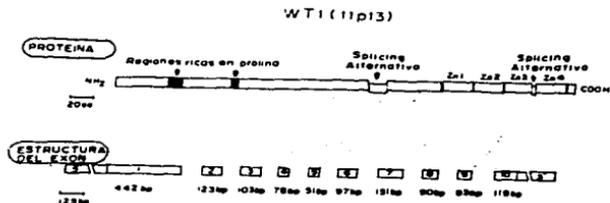


Figura 8. Representación esquemática de la estructura del gen *WT1* (Huff *et al.*, 1991).



Figura 9. Representación esquemática del transcrito del gen WT1. Las barras inferiores indican los diferentes mRNA producidos de los cortes y empalmes alternativos (Tomado de Haber *et al.*, 1991).

EL GEN WT1: **FUNCIÓN.**

La posible función reguladora del producto del gen WT1 se confirmó en ensayos de transfección transitoria, en los que se observó que la proteína podía reprimir la expresión de varios genes que promueven la división celular: EGF-1 (factor 1 de crecimiento epidérmico), IGF-2 (factor 2 de crecimiento de tipo insulina) y PDGF-A

(factor A de crecimiento derivado de plaquetas) (Drummond *et al.*, 1992, Gasher *et al.*, 1992). Esta unión se lleva a cabo a través de los dominios de dedos de zinc, mientras que el dominio rico en prolina le confiere la actividad de represor transcripcional, según se demostró utilizando proteínas híbridas (Fraizer *et al.*, 1994). Se ha propuesto que WT1 es un regulador negativo del crecimiento celular, ya que su pérdida o alteración provoca que continúe la división celular en los tejidos en los que se está expresando y que se inhiba la diferenciación celular (Haber *et al.*, 1991).

EL GEN WT1 EXPRESIÓN

Los análisis de hibridación RNA-DNA detectaron transcritos de WT1 en riñón fetal, bazo y en dos líneas celulares leucémicas (Call *et al.*, 1990, Gessler *et al.*, 1990). Estudios de hibridación *in situ* demostraron que se expresa específicamente en células relacionadas con el origen del nefroblastoma. En el mesotelio fetal y las gónadas también se expresa el gen WT1 (Pritchard-Jones y Hastie 1990, Pritchard-Jones *al.*, 1991). Los tumores presentan un patrón de expresión similar al del riñón normal; en los blastomales o epiteliales hay niveles más altos que en los estromales (Pritchard-Jones y Hastie, 1990, Miwa, 1992a). Y se ha observado expresión en líneas celulares eritroleucémicas humanas, tal como K562 (Miwa *et al.*, 1992b). En ratones, el nivel más alto de expresión es en las primeras etapas de desarrollo embrionario, bajando

considerablemente al nacimiento (Fig. 10). En humanos se inicia la expresión el día 16 de gestación y baja a partir del cuarto mes (Haber *et al.*, 1992).

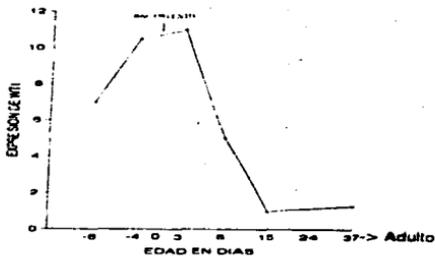


Figura 10. Expresión del gen WTL durante el desarrollo del riñón en ratones. Los datos se obtuvieron del análisis cuantitativo de Northern blots realizados por Buckler y Cols.(1991)

EL GEN WT1: REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN.

La expresión de WT1 está fuertemente regulada, espacial y temporalmente. En estudios moleculares de tejido testicular y de ovario de ratón y de riñón embrionario y células leucémicas humanas se han identificado varios sitios de inicio de la transcripción en regiones ricas en guanina (G) y citosina (C), las cuales están conservadas entre ambas especies (Pelletier *et al.*, 1991; Gessler *et al.*, 1992b). Ensayos de transfección transitoria con un gen reportero, han demostrado una región promotora esencial, rica en GC y carente de TATA y CCAAT (Fraizer *et al.*, 1994) (Fig. 12). La especificidad del promotor, la confiere el amplificador y otros elementos reguladores no descritos (Fraizer *et al.*, 1994).

AAGGCTTGACTGAGTTCITTTCTGCGCTTTCCTGAAGTTC~~CCGCCCTCTTGGAGC~~
 CTACCTG~~CCCC~~T~~CCCT~~CCAACCACCTC~~TTTT~~AGATTAACAAC~~CCCATCT~~CTACTC
 CCACCGCATTGACCC~~TGCC~~GGACTCACTGCTTACCTGAACGGACTCTCCA
 GTGAGACGAGGGCT~~CCCA~~CAC~~TGCC~~GAAGGCCAAGAAGGGGAGGTGGGGGG
 AGGGTTGTGCCA*~~CACCGGCC~~AGCTGAGAGCGCGTGTGGGTTGAAGAGGA
 GGGTGTCTGGGAGAGGGACGCT~~CCCT~~CGGAC~~CCGCCCT~~CACCCAGCTGC
 GAGGGCG~~CCCC~~CAAGGAGCAGCGCGCTGCCTGGCCGGGCTTGGGCTGC
 TGAGTGAATGGAGCGGCCGAGCCTCCTGGCTCCTCCTTTC~~CCCGCGCCG~~
 CCGGCCCTCTTTAATTGAGCTTGGGAAGCTGAGGGCAGCCAGGCAGCT
 GGGTAAGGAGTTCAAGGCAGCGGCCACACCCGGGGGCTCTCCGCAACCC
 GACCGCCTGTCCGCT~~CCCC~~ACTTCCCGCCCTCCCTCCACCTACTCATT
 CACCCACCCACCCACCCAGAGCCGGGACGGCAGCC~~CAGGCGCCCGGGCC~~
 CGCCGTCTCCGCCGCTCGATCCTGGACTTCCCTTGGCTGCAG

Figura 11. Secuencia del promotor del gen WT1. Lo subrayado indica los sitios potenciales de unión a factores de transcripción, la Δ^* señala el sitio +1. (Fraizer, *et al.*, 1994).

EL GEN WT1: MUTACIONES

Aproximadamente el 10 % de los tumores de Wilms tienen una deleción que involucra el cromosoma 11, detectable citogenéticamente (Solis *et al.*, 1988). Las alteraciones del locus WT1 detectadas con Southern blots utilizando sondas de cDNA, son poco frecuentes. En un estudio con 55 tumores, uno de ellos tenía una deleción homocigota de la región 3' del locus WT1 y tres presentaban rearrreglos de un *locus* homólogo; ninguna de estas se detectó en tejido renal normal. En otros 25 tumores, tres presentaron deleciones genómicas de ambos alelos (Kikuchi, 1992). De otros ocho tumores, en uno se observó una pérdida de 25 pb en uno de los alelos WT1 (Haber, 1990).

El análisis de los productos de RNA-PCR de otros 20 tumores, reveló la pérdida somática de 226 pb en uno de los alelos de un caso (Brown, 1992). En otros pacientes, se han hecho análisis de mutaciones en la región de dedos de zinc (Zfr), presentes en células somáticas y germinales (Huff *et al.*, 1991, Little *et al.*, 1992).

En pacientes con síndrome de WAGR (tumor de Wilms, aniridia, retardo mental y/o anomalidades genitourinarias), se distinguen las mutaciones en los genes de la aniridia de tipo 2 (AN2), y del tumor de Wilms (WT1), pero no las que originan anomalidades genitourinarias, por lo que se ha propuesto que ambos fenotipos se deben a una alteración en el mismo *locus* WT1. (van Heyninghen, 1990).

Además de la participación del gen WT1 en el desarrollo de los tumores de Wilms, tanto los estudios citogenéticos como los moleculares han demostrado que existen por lo menos otros dos genes involucrados directamente y otros de forma indirecta como es el caso de p53 (Tabla II).

TABLA 2. Genes involucrados en la predisposición al tumor de Wilms.

| Localización cromosómica | Alteración genética | Gen | Mecanismo de alteración | Función del gen |
|--------------------------|---|-------------|---|--|
| 11p13 | Deleciones en pacientes con WAGR | WT1 (I) | Deleciones intragénicas y/o mutaciones puntuales en tumores esporádicos y heredados y en pacientes con DDS. | Codifica para un factor de transcripción con dedos de zinc, necesario para el desarrollo genitourinario. Gen supresor. |
| 11p15 | Disomia uniparental en pacientes con BWS | 1) IGF2 (C) | Imprinting génico; pérdida de imprinting en los tumores. Factor de crecimiento embrionario involucrado en el mantenimiento de la embriogénesis. | Se expresa el alelo paterno en el riñón en desarrollo; posible blanco para la represión por WT1. |
| | | 2) H19 (C) | Puede suprimir la tumorigénesis de rhabdomyosarcoma | Codifica RNA funcional pero no proteína. Se expresa el alelo materno. Gen impreso en BWS interrumpido por traslocación balanceada. |
| | | 3) ? | | Aproximadamente en 1% de todos los tumores. |
| 16q | LOH en 5-20% de los WT. Gen familiar. Mutaciones sin sentido en los WT. | ? | | |
| 17p | | p53 | Mutaciones sin sentido en varios tumores. | Codifica para una proteína que regula el ciclo celular y la apoptosis. |

JUSTIFICACIÓN

A partir de la observación del ligamiento de la pérdida de la banda 13 del cromosoma 11 en los pacientes con nefroblastoma, se sabe que el gen WT1 participa en el desarrollo de esta neoplasia embrionaria (Riccardi *et al.*, 1978, 1980; Kaneko *et al.*, 1981; Koufos *et al.*, 1984; Fearon *et al.*, 1984; Orkin *et al.*, 1984; Reeve *et al.*, 1984; Raizis *et al.*, 1985; Dao *et al.*, 1987).

En diferentes estudios se ha demostrado que existen mutaciones en el gen WT1 que lo modifican o lo inactivan y son constantes en los tumores, principalmente los unilaterales y esporádicos, como lo son los comprendidos en este estudio (Haber *et al.*, 1990; Huff *et al.*, 1991; Kikuchi *et al.*, 1992; Little *et al.*, 1992a). Estos eventos pueden detectarse por la metodología de los polimorfismos conformacionales de cadena sencilla (SSCP) del DNA posterior a la amplificación de los exones del gen con la reacción en cadena de la polimerasa.

Además, como se describe en los antecedentes, existen otras regiones cromosómicas y génicas relacionadas con el desarrollo de este tumor (Solís *et al.*, 1988; Bonetta *et al.*, 1990; Huff *et al.*, 1991; Maw *et al.*, 1992; Yun *et al.*, 1993; Campbell *et al.*, 1994; Rupprecht *et al.*, 1994), por lo que es útil el análisis cromosómico como búsqueda inicial de estas otras regiones.

Este tipo de estudios han sido informados en población caucásica y asiática; por lo que es importante realizarlo en nuestro medio dado que la población mexicana está constituida por una mezcla de genes caucásicos, indígenas y africanos, principalmente.

HIPÓTESIS

Debido a que la región de dedos de zinc, correspondiente a los exones en estudio, es importante en la unión a secuencias génicas para su regulación transcripcional; y a que se han reportado mutaciones en esta región que inactivan al gen, se espera encontrar mutaciones que impliquen variaciones conformacionales, mismas que pueden diferir de las reportadas en caucásicos (ingleses y norteamericanos) dada la diferencia en la incidencia del tumor con respecto a las etnias.

Además, dada la heterogeneidad poblacional y cromosómica en el nefroblastoma, se espera encontrar alteraciones en cromosomas diferentes al once.

OBJETIVOS

1. **Analizar el cariotipo constitucional en sangre periférica de los pacientes en estudio y el de sus padres.**
2. **Analizar los polimorfismos conformacionales de cadena sencilla (SSCP) de los exones 7, 9 y 10 del gen WT1 en tumores de Wilms y sangre periférica de pacientes mexicanos.**

MATERIAL Y METODOS

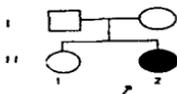
PACIENTES Se estudiaron diez pacientes con nefroblastoma esporádico unilateral, con una edad al diagnóstico de 2 0 a 12 años, referidos a los Centros Médicos Nacionales S XXI y La Raza del IMSS, durante mayo de 1994 a junio de 1995. Los familiares de los pacientes otorgaron su consentimiento, teniendo todo el conocimiento necesario de la investigación y los motivos de la misma. Se realizó el diagnóstico clínico y la histología tumoral en todos los casos.

DESCRIPCIÓN DE LAS FAMILIAS

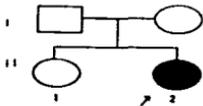
FAMILIA 1 El caso índice (II-1) es un paciente de 3.5 años de edad, producto de la primera gestación que presentó nefroblastoma unilateral izquierdo en estado IV, de tipo epidérmico/blastemal, tuvo buena respuesta al tratamiento y sin complicaciones. De padre con 32 años de edad, empleado de oficina y madre de 25 años, ama de casa. Ambos padres sin antecedentes familiares de neoplasias o de malformaciones congénitas. Todos originarios del Distrito Federal.



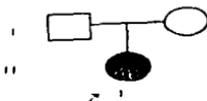
FAMILIA 2. El propósito (II-2) es de sexo femenino, 2.8 años de edad al diagnóstico, producto de la segunda gestación. Presentó nefroblastoma unilateral derecho en estado II de tipo trifásico. El padre de 25 años de edad es empleado de oficina y la madre de 25 años es ama de casa. Ambos sin historia familiar de neoplasia ni de malformaciones congénitas. Todos originarios del Distrito Federal.



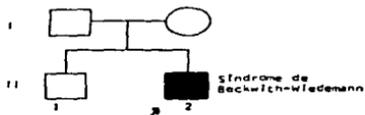
FAMILIA 3. El propósito (II-2) es de sexo femenino, 4.4 años de edad al diagnóstico, producto de la segunda gestación, con una hermana de 5.1 años de edad clinicamente sana. Presentó nefroblastoma unilateral derecho en estado II, de tipo epitelial/blastemal. El padre falleció por enfermedad mental a los 35 años y la madre de 26 años es obrera. No existen antecedentes de neoplasias o de malformaciones congénitas. Son originarios de Yauhtepec, Morelos



FAMILIA 4. El propósito (II-1) de 4.5 años de edad al diagnóstico, de sexo femenino, es producto de la primera gestación. Presentó nefroblastoma unilateral izquierdo en estado III, de tipo no clasificado con tejido heterólogo nervioso. Además clínicamente presentó desarrollo neuromotor lento. El padre de 25 años es empleado de oficina y la madre de 25 años es ama de casa. Sin historia familiar de neoplasias o malformaciones congénitas. Son originarios del Distrito Federal.



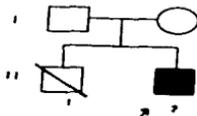
FAMILIA 5. El propósito (II-2) de dos años de edad al diagnóstico es de sexo masculino, producto de la segunda gestación, con un hermano referido como sano. Presentó nefroblastoma unilateral derecho en estado II, de tipo blastemal; asociado a síndrome de Beckwith-Wiedemann ya que presentaba gigantismo, macroglosia, hemihipertrofia y retardo mental. El padre de 24 años de edad es empleado y la madre de 21 años es obrera. Sin antecedentes familiares de neoplasias o malformaciones congénitas. Son originarios de Toluca, Estado de México.



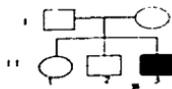
FAMILIA 6 El propósito (II-1) de 3.6 años de edad al diagnóstico es de sexo masculino, producto de la primera gestación. Presentó nefroblastoma unilateral derecho en estado II, de tipo trifásico. El padre de 28 años de edad es empleado y la madre de 26 años es ama de casa. No hay antecedentes familiares de neoplasias o malformaciones congénitas. Son originarios de Naucalpan, Estado de México.



FAMILIA 7 El propósito (II-2) de 3.8 años de edad al diagnóstico es de sexo masculino, producto de la segunda gestación, tuvo un hermano con luxación congénita de cadera quien murió por causas desconocidas antes de los dos años de edad, la abuela paterna falleció por cáncer cervico-uterino y la tía materna por cáncer de estómago. El paciente presentó nefroblastoma unilateral derecho en estado II, de tipo trifásico. El padre de 28 años de edad es comerciante y la madre de 32 años, ama de casa. Son originarios del Estado de México.

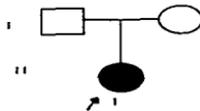


FAMILIA 8. El propósito (II-3) de siete años de edad al diagnóstico es de sexo masculino, producto de la tercera gestación; con hermanos de nueve y diez años de edad, referidos como sanos. Presentó nefroblastoma unilateral derecho en estado II, de tipo trifásico. El padre de 36 años y la madre de 32 años son empleados. Sin historia familiar de neoplasias o de malformaciones congénitas. Son originarios de Ciudad Sahagún, Hidalgo.



FAMILIA 9. El propósito es de sexo femenino, con doce años de edad. Presentó nefroblastoma unilateral izquierdo en estado IV, de tipo epitelial, con posible metástasis a tejido nervioso. No se proporcionaron datos de los familiares.

FAMILIA 10. El propósito (II-1) de cuatro años de edad es de sexo femenino, producto de la primera gestación. Presentó tumor unilateral izquierdo en estado II, de tipo blastemal. El padre de 25 años de edad es empleado y tiene cardiopatía congénita y la madre de 27 años de edad es enfermera y padece asma. No tienen historia familiar de neoplasias ni de malformaciones congénitas. Son originarios de Tehuacán, Puebla.



MUESTRAS

Para el estudio molecular las muestras de sangre fueron tomadas con EDTA como anticoagulante; y las de tumor se obtuvieron directamente del quirófano, siendo congeladas inmediatamente en recipientes con nitrógeno líquido. Para el análisis cromosómico se extrajeron de cada niño 2 ml de sangre periférica con jeringa heparinizada estéril y se mantuvo a temperatura ambiente hasta su procesamiento.

EXTRACCIÓN DE DNA

El DNA se extrajo por el método de Kempter y cols. (1992) con ligeras modificaciones en cuanto a tiempos de extracción, en la que se utilizó fenol según lo recomendado por Sambrook y cols. (1989).

OLIGONUCLEÓTIDOS Y PCR

Para la amplificación se emplearon los primers informados por Coopes y cols. (1993a): 7s ACC TAC GTG AAT GTT CAC ATG TGC TTA, 7a TCT TGA ACC ATG TTT GCC CAA GAC TGG A (exón 7), 9s TGC AGA CAT TGC AGG CAT GGC AGG, 9a GCA CTA TTC CTT CTC TCA ACT GAG (exón 9), 10s GTT GCA AGT GTC TCT GAC TGG CAA TGT y 10a TGA AAG CAG TTC ACA CAC TGT GCT GCC T (exon 10) (Fig.13). La reacción en cadena de la polimerasa se realizó en un termociclador GeneAmp 9600 (Perkin Elmer) en reacciones con un volumen final de 25 ul que contenían 2.5 UI de Taq polimerasa, 2.5 mM de dNTPs, 1 X de amortiguador Taq Pol

, 1.5 mM de MgCl₂, 250 μM de cada oligonucleótido y 200-400 ng de DNA. Se corrieron 30 ciclos con las siguientes condiciones: (94°-7', 94°-1', 57°-1', 72°-1') 30 x, 72°-5' y 4°.

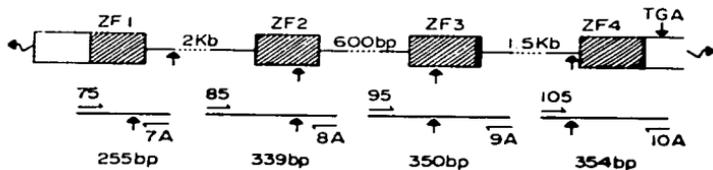


Fig. 13. Representación de la región de dedos de zinc del gen *WT1* corresponden a los exones 7-10. Las flechas indican el sitio amplificado, en la parte inferior se muestran los primer utilizados y el número de pb amplificadas. TGA es el codón de terminación.

POLIMORFISMOS CONFORMACIONALES DE CADENA SENCILLA EMPLEANDO EL SISTEMA PHAST-SYSTEM (PHARMACIA).

En este estudio se hizo el análisis de los exones 7, 9 y 10 del gen WT1 de muestras tanto de tumor como de sangre periférica de pacientes diagnosticados con tumor de Wilms, para saber si existía algún cambio en estas regiones relacionado con la etiología de la neoplasia. Para ello se eligió el método de polimorfismos conformacionales de cadena sencilla de regiones amplificadas con la reacción en cadena de la polimerasa (SSCP-PCR) dado que el DNA de cadena sencilla tiende a plegarse y formar estructuras complejas estabilizadas por uniones intramoleculares débiles como son los puentes de hidrógeno. La movilidad electroforética de tales estructuras en geles no desnaturizantes depende no solamente de la longitud de la cadena, sino también de su conformación, la cual está dada por la secuencia nucleotídica. Por lo que el método consiste en desnaturizar el DNA de doble cadena y separar los productos mediante electroforesis en geles de poliacrilamida. En este caso, se utilizó un método no radioactivo que es una modificación del original desarrollado por Orita y Cols. (1989) cuyas principales ventajas son el que no se maneja radioactividad, así como la rapidez, ya que el proceso completo se lleva a cabo en aproximadamente 2-3 horas, así como la sensibilidad, al reportarse una eficacia en la detección de mutaciones mayor al 90 % (Vidal-Puig y Moller, 1994).

Las ampliificaciones por PCR de los exones 7, 9 y 10 del gen WT1, se diluyeron en 1 ul de reacción con 2 ul de formamida al 98 % y colorante. Estas muestras

fueron sometidas a ebullición durante 10 minutos e inmediatamente después colocadas en hielo. Por cada corrimiento se pusieron dos controles negativos de un mismo individuo sano, a uno de éstos controles se le trataba de la forma descrita y al otro se le corrió sin formamida y sin hervir (doble cadena).

Después se hizo el corrimiento en geles de poliacrilamida en gradiente de 10% al 15% (Pharmacia) prefabricados de un tamaño de 5x4.2 cm y con buffer nativo (Pharmacia). Se utilizaron condiciones de corrimiento preestablecidas por Maya y Torres (1995) incluidas en el programa 5 del PhastSystem en donde están ligados cuatro métodos programados automáticamente como sigue: A) Método 5 1, precorrimiento hasta 98 Avh, 400 V, 10 mA, 1.5 W y 15°C B) Método 5 2, baja el peine que coloca las muestras en el gel y se inicia el corrimiento con 100 Avh, 400 V, 10 mA, 1W y 20°C C) Método 5 3, levanta el peine y varía el Avh a 102, continuando el corrimiento. D) Método 5 4, 400 V, 10 mA, 2.5 W y 165 Avh

El revelado se llevó a cabo con el programa número 2 preestablecido, que consta de fijación con ácido tricloroacético y con ácido acético y etanol, de tinción con solución de nitrato de plata y de reducción de fondo con tiosulfato.

Los geles ya teñidos se dejaron secar al aire en la obscuridad y después se observaron con un analizador de geles Digital Imaging System IS-1000 (Alpha Innotech Corporation).

ANÁLISIS CROMOSÓMICO.

Se realizó el estudio citogenético en linfocitos de sangre periférica de los pacientes referidos anteriormente, con el siguiente protocolo:

El cultivo de linfocitos se llevó a cabo según la técnica de Arakaki y Sparkes (1963) para la siembra y la de Moorhead y cols. (1960) en la cosecha, con algunas modificaciones de Palma (1995)

SIEMBRA. En condiciones óptimas de esterilidad trabajando en la campana de flujo laminar, se sembraron por duplicado 1.0 ml de sangre total heparinizada en cada frasco que contenía: 5 ml de medio de cultivo McCoy 5a (GIBCO); 1.0 ml de suero fetal de ternera (GIBCO); 0.3 ml de fitohemaglutinina (Microlab) y 0.02 ml de antibiótico (10 UI/ml de penicilina y 20 ug/ml de estreptomina). Los frascos de cultivo fueron homogeneizados e incubados a una temperatura constante de 37 °C.

COSECHA. A partir de las 48 horas de cultivo, se inició la cosecha. Se agregaron a cada cultivo 40 ul de colchicina 15 minutos antes de procesarlo. La suspensión celular se pasó a tubos cónicos y se centrifugó durante diez minutos a 1,200 rpm. Se desechó el sobrenadante, el botón se resuspendió en 10.0 ml de solución hipotónica de KCl 0.075 M y se le dejó actuar durante 15 minutos a 37 °C. Se separó el botón al que se le agregaron 4.0 ml de solución fijadora (metanol-acido acético 3:1); se hicieron tres cambios más de fijador para eliminar restos celulares, en el último cambio se

celular limpio y blanco que se resuspendió en un volumen final de 0.5 ml, de donde se tomó 0.1 ml para elaborar cada una de las laminillas.

PROCESAMIENTO DE LAMINILLAS PARA VISUALIZAR LAS ABERRACIONES CROMOSOMICAS. Se realizó la técnica de tinción con Giemsa y para bandas G (Tripsina-Giemsa) de Seabright (1971) con algunos ajustes, esta consta de los siguientes pasos: 1) Las laminillas se sumergen en una solución salina isotónica 0.9% que contiene tripsina-EDTA 0.0025% a 37° C en baño de ebullición 3-4 minutos. 2) Se enjuagan dos veces en solución salina isotónica a temperatura ambiente. 3) Se tiñen con colorante Giemsa al 2% en amortiguador de fosfatos Sorensen pH 6.8 durante 3-5 minutos.

ANALISIS AL MICROSCOPIO. Las metafases se analizaron en un fotomicroscopio Carl Zeiss Universal III y se tomaron fotografías en todos los casos de hallazgos importantes. La identificación de los cromosomas bandeados y la nomenclatura se llevó a cabo siguiendo los lineamientos del Sistema Internacional de Nomenclatura Citogenética Humana (ISCN). Y las aberraciones cromosómicas se clasificaron según el criterio de Savage (1976) examinando 100 metafases.

RESULTADOS

De los pacientes analizados, cinco fueron de sexo femenino y cinco de sexo masculino; y la edad promedio fue de 4.8 años. De acuerdo con los resultados del análisis histológico, el tipo celular más frecuente en los tumores fue el trifásico (compuesto por células epiteliales, células blastemales y estroma) y el estado clínico tumoral que predominó fue el II.

Respecto al análisis cromosómico se hicieron los cultivos de linfocitos de los diez pacientes, cuyos cariotipos se presentan en la tabla III. En dos pacientes el cariotipo constitucional resultó alterado (Figs. 13 y 14), confirmandose seis meses después del primer análisis. El cariotipo de sus padres fue normal. Se probaron los métodos directo y el cultivo a largo plazo de tejido tumoral para la obtención de cromosomas, sin embargo, no se obtuvieron resultados.

En el análisis de los polimorfismos conformacionales de cadena sencilla (SSCP), se observaron las siguientes migraciones diferentes: exones 7 (N4-WT4) y 9 (N9-WT9) del tumor (Fig. 15), exón 7 del tumor en N7-WT7, y N8-WT8 (Fig. 16), exón 10 del tumor en N9-WT9 y N10-WT10 (Fig. 17), N3-WT3 y N5-WT5 (Fig. 18) exones 7 y 9 de linfocitos en N9-WT9 (Fig. 19), exón 10 de linfocitos en N10-WT10 (Fig. 20), como se muestra en la tabla IV. Ningún paciente tuvo antecedentes familiares de neoplasias y se

trata de familias recién formadas: cuatro de los pacientes son producto de la primera gestación, como se describió en la sección material y métodos.

Tabla III. Características de los pacientes analizados en este estudio con sus cariotipos correspondientes.

| PACIENTE | EDAD (AÑOS) | SEXO | ESTRUC. CLÍNICA | ESTRUC. CITOGÉNICA | ANÁLISIS | CARIOTIPO | COMENTARIOS | |
|----------|-------------|------|------------------|--------------------|-------------------|-----------|----------------------------|---|
| N1-WT | 3.6 | M | IV- Laguerde | SI | 47,X,Y 47,X,Y | NO | 46,XY | SI, 5 Días antes del análisis citogenético |
| N2-WT | 2.8 | F | IV- Laguerde | F | Tribitico | NO | 46,XX | NO |
| N3-WT | 4.4 | F | II- Laguerde | F | Epilepto/Elástico | NO | 46,XX | NO |
| N4-WT | 4.5 | F | III- Laguerde | F | No Clonificado | SI | 46,XX, +18p11: (q23) | SI, 7 Días antes del análisis citogenético |
| N5-WT* | 2.0 | M | II- Laguerde | SI | Elástico | N.D. | 46,XY,(11): 11p11q11 | Diversos |
| N6-WT | 3.6 | M | II- Laguerde | SI | Tribitico | N.D. | 46,XY | NO |
| N7-WT | 3.8 | M | I- Laguerde | SI | Tribitico | N.D. | 46,XY | NO |
| N8-WT | 7.0 | M | II- Laguerde | SI | Tribitico | N.D. | 46,XY | SI, 10 Días antes del análisis citogenético |
| N9-WT | 12.0 | F | III- Laguerde | F | Epilepto | N.D. | 46,XX | NO |
| N10-WT | 4.8 | F | II- Laguerde | F | Elástico | N.D. | No creado | NO |

N D = No Determinado

N5WT* paciente con síndrome de Beckwith-Wiedemann

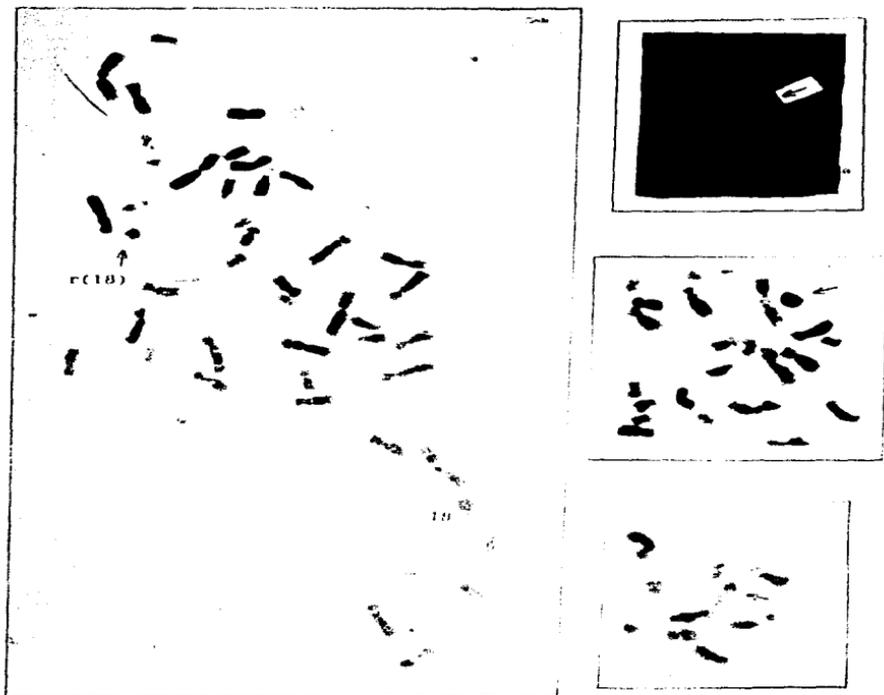


Figura 13. Fotografía del complemento cromosómico constitucional del paciente N4-WT: 46,XY, r(18)(p11,q23). Las flechas muestran al cromosoma 18 en anillo.



Figura 14 . Fotografía del complemento cromosómico constitucional del paciente N5-WT:
46,XX,t(11;21)(p15;q11)



Figura 15 Fotografía del gel en el que se muestran los polimorfismos del exon siete en los pacientes N4-WT4 y N6-WT6 y del exon nueve del paciente N9WT9 en los tumores



Figura 16. Polimorfismos del exón siete en los tumores de los pacientes N7-WT, N8-WT y N9-WT.

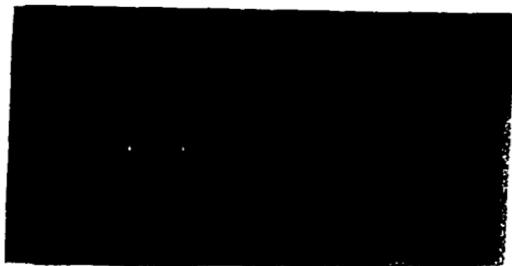


Figura 17. Polimorfismos en el exón diez de los tumores de los pacientes N9-WT9 y N10-WT-10.



Figura 18. Polimorfismos del exón diez en los tumores de los pacientes N3-WT3 y N5-WT5.



Figura 19. Polimorfismo en el exón 7 de linfocitos del paciente N9-WT9.



Figura 20. Polimorfismo en el exón diez de linfocitos del paciente N10-WT10.

TABLA IV EVALUACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS CONFORMACIONALES DE CADENA SENCILLA EN CADA UNO DE LOS PACIENTES.

| PACIENTE | EXON 7 | | EXON 9 | | EXON 10 | |
|----------|--------|---|--------|---|---------|---|
| | L | T | L | T | L | T |
| N1-WT1 | - | - | - | - | - | - |
| N2-WT2 | - | - | - | - | - | - |
| N3-WT3 | - | - | - | - | - | + |
| N4-WT4 | - | + | - | - | - | - |
| N5-WT5 | - | - | - | - | - | + |
| N6-WT6 | - | + | - | - | - | - |
| N7-WT7 | - | + | - | - | - | - |
| N8-WT8 | - | + | - | - | - | - |
| N9-WT9 | + | + | - | + | + | + |
| N10-WT10 | - | - | - | - | - | + |

L = LINFOCITOS

T = TUMOR

- = NEGATIVO

+ = POSITIVO, POLIMORFISMO

DISCUSIÓN

El análisis citogenético en linfocitos de sangre periférica (s.p) indicó resultados interesantes. Uno de los pacientes quien presentó síndrome de Beckwith-Wiedemann (BWS) y tumor de Wilms unilateral derecho en estado II tuvo el cariotipo 46,XY, t(11,21)(p15,q11), los padres tuvieron cariotipo normal. El síndrome de Beckwith-Wiedemann (BWS) es una patología caracterizada por el crecimiento excesivo de los órganos y tejidos, lo que origina organomegalia, hemihipertrofia y predisposición a tumores intraabdominales, tales como tumor de Wilms (WT), carcinoma adrenocortical (ACC), rabdomyosarcoma embrionario, hepatoblastoma y pancreatoblastoma. Existen informes en la literatura de alteraciones cromosómicas constitucionales en niños con BWS y que involucran al brazo corto del cromosoma 11 (Saal *et al.*, 1984, Martínez *et al.*, 1985, Turleau *et al.*, 1984, Hadro *et al.*, 1985, Olney *et al.*, 1985, Nukawa *et al.*, 1986, Winter *et al.*, 1986). En este paciente, el cariotipo normal de los padres indica que la traslocación fue *de novo* y se trata de BWS esporádico por lo que es un buen caso para el estudio de la etiología del tumor de Wilms.

La duplicación parcial de 11p15 como resultado de traslocación ha sido informada en varios casos de BWS, y el análisis del mapeo genético ha conducido a la hipótesis de que esta región cromosómica está involucrada en BWS. En este lugar cromosómico se encuentran los genes que codifican para las beta-globinas, la hormona

paratiroidea, la lactato deshidrogenasa A, el factor de crecimiento de tipo insulina II, la insulina y el oncogen II-ras (Klinger, *et al*, 1991), entre otros (Tabla V). Los genes de la insulina y el de crecimiento de tipo insulina son de gran interés, ya que el paciente que se presenta desarrolló hipoglucemia además de hemihipertrofia, macroglosia hepatomegalia y gigantismo. Los factores de crecimiento de tipo insulina son potentes mitógenos y se han evidenciado altos niveles del factor II (IGF-II) en el tejido renal embrionario normal, así como en los tumores de Wilms, muchas de las funciones de este factor se inician al unirse al receptor IGF1R el que contiene varios sitios potenciales de unión para WT1. Werner y cols (1993) informaron que los niveles de mRNA de WT1 y de IGF1R son inversamente proporcionales, lo que sugiere a WT1 como regulador negativo de este receptor. Al activarse la expresión de WT1 durante el desarrollo del riñón normal, se reduce el crecimiento potencial de las células y se lleva a cabo la diferenciación. El paciente al que nos referimos, desarrolló un tumor de Wilms de tipo blastemal, lo que pudo deberse a que los niveles de IGF-II fueron mayores a los de WT1, evitando la diferenciación normal y estimulando la tumorigénesis. Este paciente no presentó inmunodeficiencia ni problemas con el metabolismo del calcio, por lo que al parecer, ni los genes beta-globinicos ni el de la hormona paratiroidea están alterados.

En este mismo paciente se identificó un polimorfismo conformacional en el exón 10 del gen WT1 del tumor. Este polimorfismo puede indicar una mutación en WT1 relacionada con la génesis del tumor.

En la literatura no se encontraron informes de pacientes con BWS y traslocación constitucional 11p15.21q21. Pero sí hay varios en los que se informa de traslocaciones que involucren a 11p como las que se muestran en la tabla VI.

La concordancia entre la localización cromosómica de oncogenes y de genes supresores y las alteraciones cromosómicas en diversos cánceres es bien conocida. El nefroblastoma está asociado en algunos casos con la pérdida de 11p13, lugar donde se encuentra WT1, un gen supresor involucrado en el desarrollo de esta neoplasia. La duplicación de 11p15 ya analizada en párrafos anteriores, involucra al oncogen HRAS-1, sin embargo no existen evidencias moleculares del incremento en la dosis de este gen en los pacientes que presentan fenotipo de BWS (Jeanpierre *et al.*, 1985), pero se ha informado de la pérdida de HRAS-1 en tumores de Wilms (Eccles *et al.*, 1984; Reeve *et al.*, 1984).

Como es bien conocido, el funcionamiento de los genes puede modificarse por mutaciones y por otros mecanismos, tal como el imprinting genómico, esta es una modificación gameto específica que provoca la expresión diferencial de los alelos de un gen (Sapienza, 1989). Pal y cols. (1990) observaron que los tumores que presentaban pérdida

de heterocigocidad para los marcadores 11p, perdían siempre la región cromosómica materna y en los pacientes con síndrome de WAGR la deleción 11p13 siempre se deriva de la línea germinal paterna (Huff, *et al.* 1991) Por lo que deChiara y cols (1990,1991) sugieren que existe un imprinting de la región 11p15.5 específico de tejido, como lo indican los estudios en ratones

Un paciente con retraso neuromotor y tumor de Wilms unilateral izquierdo en estado III y tejido heterólogo nervioso presentó cariotipo 46,XX,t(18)(p11,q23) sin otros datos fenotípicos. El cariotipo de los padres fue normal. Se ha discutido mucho sobre la heredabilidad de los cromosomas en anillo y es frecuente que dos o más pacientes con un anillo cromosómico idéntico no tengan fenotipo común (Zackai y Breg, 1973, Dallapiccola, *et al.* 1977)

Los anillos cromosómicos pueden ser estables o inestables con diferentes grados entre tipos iguales, pero en general tienen poca inestabilidad, esta depende principalmente del tamaño de la pérdida, del promedio de intercambios de cromátidas hermanas en el anillo y de la viabilidad de las líneas celulares con anillos. Existe un informe de Kakati y Cols (1991) quien reportó la presencia de un cromosoma extra en anillo en una familia en la que dos hijos presentaban tumor de Wilms, uno de ellos unilateral y el otro bilateral y tanto en ellos en linfocitos como en los tumores y la madre en sangre periférica, se observó este anillo cromosómico, no determinando el grupo al cual pertenecía. En la

paciente con este hallazgo citogenético, se identificó un polimorfismo conformacional en el exón 7 del gen WT1 del tumor, lo que confirma que el gen WT1 está alterado en los tumores esporádicos, independientemente del estado general del paciente. En ambos extremos terminales del cromosoma 18 existen genes de gran interés, tales como el que codifica para la timidilato sintetasa (TYMS) en 18p11.32, proteína que cataliza la transferencia de grupos metilo a la desoxi-5'-monofosfato para formar timidina-5'-monofosfato en la vía sintética de los 5'-trifosfatos de desoxirribonucleósido, que son los precursores directos en la biosíntesis de DNA. En el otro extremo cromosómico se encuentra el *locus* del gen de la leucemia de células B (BCL2) en 18q21.3, cuya proteína es importante en la inhibición de la muerte celular programada.

Sin embargo, operan múltiples mecanismos en la compleja red de controles que regulan la proliferación celular, y la falla en un sólo componente no refleja toda la alteración fenotípica.

En una paciente (N9-WT9) se observaron polimorfismos tanto en leucocitos como en el tumor, lo que hace suponer que en ella una o ambas mutaciones fueron germinales. El no haber observado alteraciones cromosómicas pudo deberse a que ocurrieron microdeleciones o bien, sólo mutaciones puntuales.

Los exones en los que se identificó mayor número de polimorfismos conformacionales fueron el 7 y el 10, como se observa en la figura 21. Los exones 9 y 10

son los alterados con mayor frecuencia segun lo informado en la literatura. Es interesante que los tumores de Wilms en niños mexicanos son diagnosticados en estadios más avanzados que en los niños norteamericanos, ello puede deberse al hecho de que los padres llevan a los niños al hospital tardamente, sin embargo se propone realizar estudios que relacionen el grado de alteración patológica del tumor con el exón del gen WT1 que se presenta alterado, ya que de existir alguna vinculación, tendría importancia pronóstica relevante

En general los resultados indican que los exones analizados del gen WT1 en esta población, están involucrados directamente en la etiología de los tumores de Wilms esporádicos solo en algunos casos, esto está de acuerdo a lo informado por Brown y Cols. (1993) quienes con estudios de polimorfismos conformacionales demostraron que las mutaciones en el gen WT1 están involucradas en los tumores de Wilms

Es evidente la heterogeneidad genética en la etiología del tumor de Wilms, y que existen otros genes de predisposición a esta neoplasia embrionaria, es por ello que el estudio se continuará analizando otros posibles genes de predisposición. La causa de que fuera analizado este gen y no otros, es que es el único con secuencia conocida

El que no se hayan evidenciado polimorfismos conformacionales en algunos de los pacientes estudiados, puede deberse también a que es la primera vez que se emplea el método Phast-System (Pharmacia) para el análisis del gen WT1 y el grado de confiabilidad

es de 90%. Por ello se ha iniciado el análisis con los métodos de Orita y colaboradores (1989), el D-Gene (Bio-Rad) y el el PCR-SSCP (Stratagene) para corroborar los resultados (datos no presentados). Otras causas de no haber identificado alteraciones es que se localicen en los exones no analizados o que existan otros factores involucrados.

Es importante señalar que este es el primer estudio molecular del gen WT1 en pacientes mexicanos con tumor de Wilms, y abre un amplio panorama de estudios; el inmediato será el análisis de las secuencias de las regiones que presentaron polimorfismos conformacionales. La continuación del proyecto será la secuenciación total de los exones, la detección de mutaciones en los genes candidatos de predisposición a tumor de Wilms y el análisis del mRNA y de la proteína WT1.

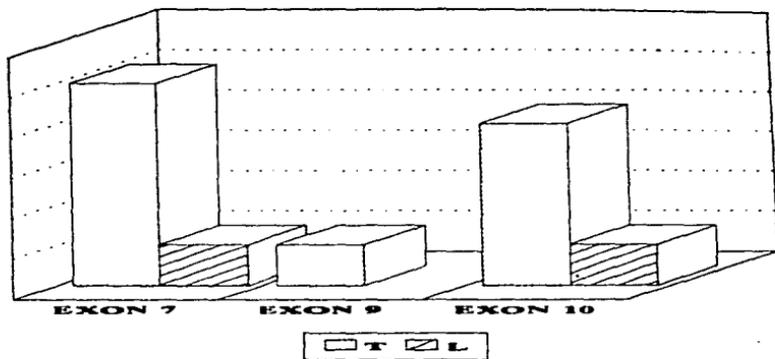


Fig. 21. Número de polimorfismos observados en los exones 7, 9 y 10 del gen WT1 en este estudio.

Tabla V. Loci génicos en el cromosoma 11p15

| Nombre del Gen | Localización |
|----------------|---------------|
| BWS | 11pter-p15.5 |
| CTSD | 11p15.5 |
| DRD4 | 11p15.5 |
| HBB | 11p15.5 |
| HBBP1 | 11p15.5 |
| HBD | 11p15.5 |
| HBE1 | 11p15.5 |
| HBG1 | 11p15.5 |
| HBG2 | 11p15.5 |
| HRAS | 11p15.5 |
| IGF2 | 11p15.5 |
| INS | 11p15.5 |
| LQT | 11p15.5 |
| MER2 | 11p15.5 |
| MTACR1 | 11p15.5 |
| MUC2 | 11p15.5 |
| RNH | 11p15.5 |
| TH | 11p15.5 |
| RRM1 | 11p15.5-p15.4 |
| LDHC | 11p15.5-p14.3 |
| SMPD1 | 11p15.4-p15.1 |
| CALCA | 11p15.2-p15.1 |
| CALCB | 11p15.2-p15.1 |
| CALCP | 11p15.2-p15.1 |
| PTH | 11p15.2-p15.1 |
| FRA11C | 11p15.1 |
| FRA11I | 11p15.1 |
| TPH | 11p15.1-p14.3 |
| LDHA | 11p15.1-p14 |
| SSA | 11p15.1-p14 |
| KRN1L | 11p15 |
| MUC5 | 11p15 |
| MYOD1 | 11p15 |
| PNAI4 | 11p15 |

Continuación

Tabla V. Loci génicos en el cromosoma 18.

| Nombre del Gen | Localización |
|----------------|----------------|
| TYMS | 18p11.32 |
| LAMA | 18p11.32-p11.2 |
| BCL2 | 18q21.3 |
| DCC | 18q21-qter |
| ERV1 | 18q22-qter |
| FECH | 18q21 |
| MBP | 18q22-qter |

Datos de Klinger H.P. (Editor) 1991 Cytogenetics and Cell Genetics. Vol. 58.

Tabla VI Alteraciones cromosómicas constitucionales en pacientes con síndrome de Beckwith-Wiedemann informadas en la literatura

| CARIOTIPO | REFERENCIA |
|---|--------------------------------|
| 46, X, t(X;1)(q26;q26)* | Punnet <i>et al.</i> , 1974 |
| 46, XY, -12, +der(12)t(8;12)(q23;p12.5)pat | Healy <i>et al.</i> , 1984 |
| 46, XX,t(11p;22q)mat | Pueschel y Padre Mendoza, 1984 |
| 46,XY,-11+rec(11),dup(p13-p15),del(q23-q25) | Turleau <i>et al.</i> , 1984 |
| 46,XX,-11,+der(11),dup(p15?) | Turleau <i>et al.</i> , 1984 |
| 46,XX,-11,+der(11),dup(p15) | Waziri <i>et al.</i> ,1983 |
| 46,XY,-11,+der(11),t(4;11)(q33;p14)pat | Waziri <i>et al.</i> , 1983 |

CONCLUSIONES

1. Las alteraciones cromosómicas observadas en linfocitos de sangre periférica indican sitios de interés para el estudio de la etiología del nefroblastoma o tumor de Wilms.
2. El exón 7 presentó mayor número de polimorfismos en este estudio, mientras que en los informados en la literatura es el exón 10. La diferencia puede deberse a la sensibilidad metodológica o a la composición genética particular de la población mexicana estudiada.
3. Existe participación importante del gen WT1 en el desarrollo del nefroblastoma o tumor de Wilms en los pacientes estudiados.
4. El presente trabajo contribuye a evidenciar al gen WT1 como factor importante en la carcinogénesis embrionaria.

BIBLIOGRAFIA

- Anderson SR, Geertinger P, Larser HW, Mikkelsen M, Parving A, et al 1978. Aniridia, cataract and gonodblastoma in a mentally retarded girl with deletion of chromosome 11 - A clinicopathological report *Ophthalmologica* 176:171.
- Arakaki DT and Sparkes RS 1963. Microtechnique for culturing leukocytes from whole blood. *Cytogenetics* 2:57-60
- Baird PN, Santos A, Groves N, Jadresic L, Cowell JK 1992. Constitutional mutations in WT1 gene in tumors from patients with WAGR syndrome. *Oncogene* 7:2141-49.
- Barrantes JC, Muir KR, Toyn CE, Parkes SE, Cameron AH, et al 1993. Thirty-year population-based review of childhood renal tumours with an assessment of prognostic features including tumor DNA characteristics. *Med Pediatr Oncol* 21:24-30.
- Beckwith J. 1963. Extreme cytomegaly of the adrenal fetal cortex, omphalocele hyperplasia of kidneys and pancreas, and Leydig-cell hyperplasia - another syndrome? *West. Soc. Pediatr. Res.* 14:1.
- Beckwith JB, Kiviat NB, Bonadio JF. 1990. Nephrogenic rest, nephroblastomatosis, and the pathogenesis of Wilms' tumor. *Pediatr. Pathol.* 10:1-36.

- Bickmore W, Oghene K, Little M, Seawright A, van Heyningen V, Hastie N. 1992. Modulation of DNA binding specificity by alternative splicing of the Wilms tumor wt1 gene transcript. *Science* 257:235-37.
- Birch JM, Marsden HB. 1987. A classification scheme for childhood cancer. *Int J Cancer* 40:620-24.
- Birch JM. 1990. Epidemiologia del cáncer en la infancia. *Anales Nestlé* 48:133-47.
- Bonetta L, Kuehn SE, Huang A, Law DJ, Kalikin LM, et al. 1990. Wilms' tumor locus on 11p13 defined by multiple CpG island-associated transcripts. *Science* 250:994-97.
- Bove KE, Kofler H, MaAdams AJ. 1969. Nodular renal blastema: definition and possible significance. *Cancer* 24:323-332.
- Breslow N, Beckwith J. 1982. Epidemiological features of Wilms' tumor. Results of the National Wilms' Tumor Study. *J Natl Cancer Inst* 68:429-36.
- Breslow N, Langholz B. 1983. Childhood cancer incidence: geographical and temporal variations. *Int. J. Cancer* 32:703-16.
- Breslow N, Churchill F, Nesmith B, Thomas P, Beckwith J, et al. 1986. Clinico pathologic features and prognosis for Wilms' tumor patients with metastases at diagnosis. *Cancer* 58:2501.
- Breslow N, Beckwith JB, Ciol M. 1988. Age distribution of Wilms' tumor: report from the National Wilms' tumor study. *Cancer Res* 48:1653-57.

- Breslow N.** 1990. Statistical issues in the analysis of data from occupational cohort studies. *Recent Results Cancer Res.* 120: 78-93.
- Breslow N, Olshan A, Beckwith JB.** 1993. Epidemiology of Wilms tumor. *Med. Pediatr. Oncol.* 21: 173-81
- Breslow N, Olshan A, Beckwith JB.** 1994. Ethnic variation in the incidence, diagnosis, prognosis, and follow-up of children with Wilms' tumor. *J. Natl. Cancer Inst.* 86: 49-51
- Brown KW, Watson JE, Poirier V, Mott MG, Berry PJ, Maitland MJ.** 1992. Inactivation of the remaining allele of the WT1 gene in a Wilms' tumor from a WAGR patient. *Oncogene* 7: 763-68
- Brown KW, Wilmore HP, Watson JE, Mott MG, Berry J et al.** 1993. Low frequency of mutations in the WT1 coding region in a Wilms' tumor. *Genes Chromosom. Cancer* 8: 74-79.
- Buckler A, Pelletier J, Haber D, Glaser T, Housman D.** 1991. Isolation, characterization, and expression of the murine Wilms' tumor gene (WT1) during kidney development. *Mol. Cell Biol.* 11: 1707-21
- Call KM, Glaser T, Ito CY, Buckler AJ, Pelletier J, et al.** 1990. Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus. *Cell* 60: 590-620

- Campbell CE, Huang A, Gurney AL, Kessler PM, Hewitt JA, Williams B. 1994 Antisense transcripts and protein binding motifs within the Wilms' tumor (WT1) locus**
Oncogene 9:583-95.
- Cassady JR, Tefft M, Filler RM, Jaffe N, Paed D, Hellman S. 1973 Considerations in the radiation therapy of Wilms' tumor**
Cancer 32:598
- Cattanach BM, Barr JA, Evans EP, Burtenshaw M, et al. 1992 A candidate mouse model for Prader-Willi syndrome which shows an absence of snrpn expression**
Nat Genet 2:270
- Chapman RM. 1982 Effect of cytotoxic therapy on sexuality and gonadal function**
Sem Oncol 9:84
- Clayman RV, Sheldon CA, Gonzalez R. 1982 Wilms' tumor an approach to vena caval intrusion**
Prog Ped Surg 15:285
- Compton O, Weil M, Jones C, Riccardi V, Strong L. 1988. Long range physical map of the Wilms' tumor-aniridia region on human chromosome 11.**
Cell 55:827
- Compton DA, Weil MM, Bonetta L, Huang A, Jones C, Yeger H, Williams B, String LC, Saunders GF. 1990 Definition of the limits of the Wilms tumor locus on human chromosome 11p13.**
Genomics 6:309-15.

- Coopes MJ, Liefers GJ, Paul P, Yeger H, Williams BR. 1993a. Homozygous somatic WT1 point mutations in sporadic unilateral Wilms' tumor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:1416-1**
- Coopes MJ, Ye Y, Rackley R, Zhao XI, Liefers G, et al 1993b. Analysis of WT1 in granulosa cell and other sex cord-stromal tumors. Cancer Res 53:2712-14.**
- Cowell JK, Wadey RB, Haber DA, Call KM, Housman DE, Pritchard J 1991. Structural rearrangements of the WT1 gene in Wilms' tumour cells. Oncogene 6:595-99**
- Cowell JK, Groves N, Baird PN 1993. Loss of heterozygosity at 11p13 in Wilms' tumour does not necessarily involve mutations in the WT1 gene. Br J Cancer 67:1259-61.**
- Cowell J 1994. Repression versus activation in the control of the gene transcription. Trends Biochem. Sci 19:38-42**
- Dannof BF, Cowchock FS, Marquette C, Mulgrew L, Kramer S 1982. Assessment of the long-term effects of primary radiation therapy for brain tumors in children. Cancer 49:1580.**
- Dao DD, Schroeder WT, Chao LY, Kikuchi H, Strong LC, Riccardi VM, Pahtak S, Nichols WW, Lewis WH, Saunder GF 1987. Genetic mechanism of tumor specific loss of 11p DNA sequences in Wilms' tumor. Am J Hum Genet 41:202-17.**
- Dallapiccola B 1987. Cytogenetics of Mendelian mutations associated with cancer proneness. Cancer Genet. Cytogenet. 26:85-94.**

- Davies LM, Stallard R, Thomas GH, Coullin P, Junien C et al. 1988. Two anonymous DNA segments distinguish the Wilms' tumor and aniridia loci *Science* 241:840-42.
- De Chiara M, Efstratiadis A, Roberson E. 1990. A growth-deficiency phenotype in heterozygous mice carrying an insulin-like growth factor II gene disrupted by targeting. *Nature* 345:78-80.
- De Chiara M, Robertson J, Efstratiadis A. 1991. Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene. *Cell* 64:849-859.
- Drummond IA, Madden SL, Rohwer-Nutter P, Bell GI, Sukhatme VP, Rausher FJ III. 1992. Repression of the insulin-like growth factor II gene by the Wilms' tumor suppressor WT1. *Science* 257:674-78.
- Eccles MR, Millow LJ, Wilkins RJ, Reeve AE. 1984. Harvey-ras allele deletion detected by in situ hybridization to Wilms' tumor chromosomes. *Hum. Genet.* 67:190-192.
- Fajardo-Gutiérrez A, Mejía AM, Gómez DA, Mendoza SH, Garduño EJ, García MM. 1995. Epidemiología de las neoplasias malignas en niños residentes del Distrito Federal (1982-1991). *Bol. Med. Hosp. Infant. Mex.* 52:507-516.
- Fajardo-Gutiérrez A, Mendoza SH, Valdez ME, Mejía AM, Yamamoto KL. 1996. Frecuencia de neoplasias malignas en niños atendidos en hospitales del Distrito Federal. Estudio Multicéntrico. *Bol. Med. Hosp. Infant. Mex.* 67:1240-45

- Farber S, Toch R, Sears E, Pinkel D. 1956. Advances in chemotherapy of cancer in man. *Adv. Cancer Res* 4:1
- Fearon E, Vogelstein B, Feinberg A. 1984. Somatic deletions and duplication of genes on chromosome 11 in Wilms' tumours. *Nature* 309:176.
- Fraizer GC, Wu-YJ, Hewitt-SM, Maity-T, Ton-CC, et al 1994. Transcriptional regulation of the human Wilms' tumor gene (WT1). Cell Type-specific enhancer and promiscuous promoter. *J Biol. Chem* 269:8892-00
- Francke U, Holmes LB, Atkins L, Riccardi UM. 1979. Aniridia-Wilms' tumor association: evidence for specific deletion of 11p. *Cytogenet. Cell Genet.* 24:185-92.
- Fraumeni JF Jr, Geiser CF, Manning MD. 1967. Wilms' tumor and congenital hemihypertrophy: reports of five new cases and review of literature. *Pediatrics* 40:886
- Gauthier DA. 1990. *Embryology*. Springer-Verlag. págs. 51-101
- Gasher AL, Bonthron DT, Madden SL, Rausher FJ III, Collins T, Sukhatme VP. 1992. Human platelet-derived growth factor A chain is transcriptionally repressed by the Wilms' tumor suppressor WT1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10984-88.
- Gessler M, Poustka A, Cavenee W, Neve RL, Orkin SH, Bruns G. 1990. Homozygous deletion in Wilms' tumours of a zinc-finger gene identified by chromosome jumping. *Nature* 343:774-78.

- Gessler M, Koning A, Bruns GA. 1992. The genomic organization and expression of the WT1 gene. *Genomics* 12: 807-13.
- Gessler M, Bruns G. 1993. A physical map around the WAGR complex on the short arm of chromosome 11. *Genomics* 5: 4-3.
- Gessler M, Koning A, Moore J, Qualman S, Arden K. 1993. Homozygous inactivation of WT1 in a Wilms' tumor as associated with the WARG Syndrome. *Genes Chromosome. Cancer*. 7:131-36.
- Gessler M, Konig A, Arden K, Grundy P, Orkin S, et al. 1994. Infrequent mutation of the WT1 gene in 77 Wilms' tumors. *Hum Mutat*. 3:212-22.
- Gessler M, Bruns G. 1989. A physical map around the WAGR complex on the short arm of chromosome 11. *Genomics* 5:43-51.
- Gessler M, Thomas GH, Covillin P, Junien C, Mc Gillivray BC, et al. 1989. A deletion map of the WAGR region on chromosome 11. *Am. J. Hum. Genet.* 44:486-95.
- Giono CS, Escobar GA y Valdespino GJ. (Eds) 1994. Diagnóstico de infecciones gastrointestinales. *INDRE. Pags.* 3-32.
- Glaser T., Lane J, Housman D. 1990. A mouse model of the aniridia-Wilms tumor deletion syndrome. *Science* 250: 823-27.
- Green DM, D'Angio GJ, Beckwith JB, Breslow EN, Kelalis P, et al. 1993. Wilms' tumor. *Med. Pediatr. Oncol.* 21:713-37.

- Haber DA, Buckler AJ, Glaser T, Call KM, Pelletier J, et al. 1990. An internal deletion within an 11p13 zinc finger gene contributes to the development of Wilms' tumor. *Cell* 61:1257-69.
- Haber DA, Housman D. 1991. Rate-limiting steps: The genetics of pediatric cancers. *Cell* 64:5.
- Haber DA, Sohn RL, Buckler AJ, Pelletier J, Call KM, Housman DE. 1991. Alternative splicing and genomic structure of the Wilms tumor gene WT1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 9618-22.
- Haber DA, Timmers HT, Pelletier J, Sharp PA, Housman DE. 1992. A dominant mutation in the Wilms tumor gene WT1 cooperates with the viral oncogene E1A in transformation of primary kidney cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:6010-14.
- Haber DA, Park S, Mahervaren S, Englert C, Re GG, et al. 1993. WT1-mediated growth suppression of Wilms' tumor cells expressing a WT1 splicing variant. *Science* 262:2057-59.
- Hadro T, Kleck KA, Khanna N, Pardo J. 1985. Wiedemann-Beckwith syndrome: evidence for ovum-mediated autosomal dominant inheritance. *Am. J. Hum. Genet.* 37:A56.
- Hamington MA, Konicek B, Song A, Xia X, Fredericks WJ, Rauscher FJ III. 1993. Inhibition of colony-stimulating factor 1 promoter activity by the product of the Wilms' tumor locus. *J. Biol. Chem.* 268:21271-75.

- Healy NP, Hatcher NH, Willey AM 1984. Differential diagnosis of Beckwith-Wiedemann syndrome and duplication 8q. *Am J Hum Genet* 36:925
- Heaston DK, Lihshitz H, Chan RC 1979. Skeletal effects of megavoltage irradiation in survivors of Wilms' tumor. *Amer. J. Roentgen* 133:389
- Henry I, Gradjouan S, Coullin P, Basichard F, Huerre-Jean Pierre C, et al 1989a. Tumor-specific loss of 11p15.5 alleles in the 11p13 Wilms' tumor and in familial adrenocortical carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:3247-51.
- Henry I, Jean Pierre M, Coullin P, Basichard F, Serre JL, et al 1989b. Molecular definition of the 11p15.5 region involved in Beckwith-Wiedemann syndrome and probably in predisposition to adrenocortical carcinoma. *Hum Genet* 81:273-77.
- Huang A, Campbell CE, Bonetta L, McAndrews MS, Chilton S, Coopes MJ, Law DJ, Feinberg AP, Yeger H, Williams BR. 1990. Suppression of the neoplastic phenotype by replacement of the RB gene in human cancer cells. *Science* 250:991-94.
- Huff V, Miwa H, Haber DA, Call KM, Housman D, et al 1991. Evidence for WT1 as Wilms tumor (WT) gene: intragenic germinal deletion in bilateral WT. *Am. J. Hum. Genet.* 48:997-03.
- Huff V, Reeve AE, Leppert M, Strong LC, Douglass EC, et al 1992. Non-linkage of 16q markers to familial predisposition to Wilms' tumor. *Cancer Res.* 52:6117-20.

- Jadresic L, Leake J, Gordon Y, Dillon MJ, Grant DB. 1990. Clinicopathologic review of twelve children with nephropathy, Wilms' tumor, and genital abnormalities (Drash syndrome). *J. Pediatr.* 117:717-25.
- Jadresic L, Wadey RB, Buckle JL, Barratt TM, Mitchel CD, Cowell JK. 1991. Molecular analysis of chromosome region 11p13 in patients with Denys-Drash syndrome. *Hum. Genet.* 86:497-506.
- Jayabose S, Shende A, Lanzkowsky P. 1976. Hepatotoxicity of chemotherapy following nephrectomy and radiation therapy for right-sided Wilms tumor. *J. Ped.* 88:898.
- Jeanpierre M, Henry Y, Turleau C, Ullrich A, de Grouchy J, Junien C. 1985. Beckwith-Wiedemann syndrome (BWS) and 11p15 markers. 8th International Human Gene Mapping Workshop, Helsinki (abstr. 173). *Cytogenet. Cell Genet.* 40.
- Joseph C. 1949. Embryoma of the kidney with symptoms at birth. *Arch. Dis. Childh.* 24:312.
- Junien C, Turleau C, de Grouchy J, Said R, Retbors MO, et al. 1980. Regional assignment of catalase (CAT) gene to band 11p13. Association with Aniridia-Wilms' tumor-gonodblastoma (WAGR) complex. *Ann. Genet.* 23:165.
- Junien C. 1992. Beckwith-Wiedemann syndrome: tumorigenesis and imprinting. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 7:763.

- Kakati S, Xiao H, Siddiqui C, Weier H, Green D, Fisher J and Allen J. 1991
Constitutional extra chromosomal element in a family with Wilms' tumor. *Hum. Genet.* 87:183-188
- Kaneko Y, Egues M, Rowley JD. 1981. Interstitial deletion of short arm of chromosome 11 limited to Wilms' tumor cells in a patient without aniridia. *Cancer Res.* 41:4577
- Kaneko Y, Homma C, Maseki N, Sakura M, Hata J. 1991. Correlation of chromosome abnormalities with histological and clinical features in Wilms' and other Childhood renal tumors. *Cancer Res.* 51: 5937-42.
- Kikuchi H, Akasaka Y, Nagai T, Umezawa A, Iri H, et al. 1992. Genomic changes in the WT gene (WT1) Wilms' tumors and their correlation with histology. *Am. J. Pathol.* 140:781-86
- Knudson AG Jr. 1971. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 68:820-23.
- Knudson AG Jr., Strong LC. 1972. Mutation and cancer a model for Wilms' tumor of the kidney. *J. Natl. Cancer Inst.* 48: 313-24.
- Koufus A, Hansen M, Lampkin B, Workman M, Jenkins N, et al. 1984. Development of homozygosity for chromosome 11p markers in Wilms' tumour. *Nature* 309:172.
- Little M, van Heyningen V, Hastie N. 1991. Disomy and disease. *Nature* 351:609.

- Little MH, Dunn R, Byrne JA, Seawright A, Smith PJ, et al 1992a. Equivalent expression of paternally and maternally inherited WT1 alleles in normal fetal tissue and Wilms' tumours. *Oncogene* 7 635-41
- Little MH, Prosser J, Condie A, Smith PJ, van Heyningen V, Hastie ND. 1992b. Zinc finger point mutations within the WT1 gene in Wilms tumor patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 89 4791-95
- Little MH, Williamson KA, Mannens M, Kelsey A, Gosden C, et al. 1993. Evidence that WT1 mutations in Denys-Drash syndrome patients may act in a dominant-negative fashion. *Hum Mol Genet* 2 259-64
- Madrazo A, Schwartz G, Churg J. 1975. Radiation nephritis: a review. *J Urol* 114 822
- Martinez RM, Ocampo R, Perez R, Corona E, Cantu JM. 1985. The Wiedemann-Beckwith syndrome in four sibs including one with associated congenital hypothyroidism. *Eur J Pediatr* 143 233-235
- Matsunaga E. 1981. Genetics of Wilms' tumor. *Hum Genet* 57 231
- Maw MA, Grundy PE, Millow LJ, Eccles MR, Dunn RS, et al. 1991. A third Wilms' tumor locus on chromosome 16q. *Cancer Res* 53 3094-98
- Miller RW, Fraumeni JF Jr, Manning MD. 1964. Association of Wilms' tumor with aniridia, hemihypertrophy and other congenital malformations. *N. Engl. J. Med.* 270 922.

- Miwa H, Tomlinson GE, Timmons CF, Huff V, Cohn SL, et al. 1992a RNA expression of the WT1 gene in Wilms' tumor in relation to histology. J. Natl Cancer Inst. 84:181-87**
- Miwa H, Beran M, Saunders GF. 1992b Expression of the Wilms' tumor gene (WT1) in human leukemias. Leukemia 6:405-09**
- Moe PJ. 1990 Diagnostico precoz de los tumores abdominales en la infancia. Anales Nestlé 48:159-170**
- Moorhead PS, Nowell PC, Mellman D, Battips DA. 1960 Chromosome preparation of leukocytes cultured from human peripheral blood. Exp. Cell Res 20:613-616**
- Nelson LB, Spaeth GL, Nowinski TS, Margo CE, Jackson L. 1984 Aniridia: A review. Surv. Ophthalmol 28:2766-70**
- Niikawa N, Ishikiriyama S, Takahashi S, Inagawa A, Tonoki H, Ohta Y, Hase Y, Kamei N, Kajii T. 1986 The Wiedemann-Beckwith syndrome: pedigree studies on five families with evidence for autosomal dominant inheritance with variable expressivity. Am J Med Genet 24:41-55**
- Olney AH, Buehler BA, Waziri M. 1985 Beckwith-Wiedemann syndrome in discordant monozygotic twins. David W Smith Workshop on malformations and Morphogenesis. Santa Fé, USA.**

- Orita M, Kanazawa H, Hayash K, Sekiya T. 1989. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 86:2766-70
- Orkin S, Goldman D, Sallan S. 1984. Development of homozygosity for chromosome 11p markers in Wilms' tumor. *Nature* 309:172
- Pagano F, Penelli N. 1974. Ureteral and vesical metastases in nephroblastoma. *Brit J Urol* 46:409
- Pal N, Wadey B, Buckle B, Yeomans E, Pritchard J, Cowell J. 1990. Preferential loss of maternal alleles in sporadic Wilms' tumours. *Oncogene* 5:1665-68.
- Palma PV. (1995) Comunicación personal
- Park S, Bernard A, Bove KE, Sens DA, Hazen-Martin DJ, et al. 1993. Inactivation of WT1 in nephrogenic rest, genetic precursors to Wilms' tumour. *Nature Genet* 5:363-67.
- Pavletich NP, Pabo CD. 1991. Zinc finger-DNA recognition: crystal structure of Zif268-DNA complex at 2.1 Å. *Science* 252:809-17
- Pelletier J, Bruening W, Kashtan CE, Mauer SM, Manivel JC. 1991a. Germline mutations in the Wilms' tumor suppressor gene are associated with abnormal urogenital development in Denys-Drash syndrome. *Cell* 67:437-47.

- Pelletier J, Bruening W, Li FP, Haber DA, Glaser T, Housman DE. 1991b. WT1 mutations contribute to abnormal genital system development and hereditary Wilms' tumour. Nature 353:431-34**
- Pendergrass TW. 1976. TW. Congenital anomalies in children with Wilms' tumor, a new survey. Cancer 37:403**
- Phillips TL. 1977. Chemical modification of radiation effects. Cancer 39:987**
- Ping AJ, Reeve AE, Law DJ, Young MR, Boehnke M, Feinberg AP. 1989. Genetic linkage of Beckwith-Wiedemann syndrome to 11p15. Am J Hum Genet 44:720-26**
- Porteous DJ, Bickmore WA, Christie S, Boyd PA, Cranston G, et al. 1987. HRAS-1 selected chromosome transfer generates markers that colocalise aniridia and genitourinary dysplasia-associated translocation breakpoints and the Wilms' tumor gene within band 11p13. Proc Natl Acad Sci USA 84:5355**
- Pritchard - Jones K, Fleming S, Davidson D, Bickmore W, Porteous DJ, et al. 1991. The candidate Wilms' tumor gene is involved in urogenital development. Nature 346:194-97.**
- Pritchard - Jones K, Hastie ND. 1990. Wilms' tumour as a paradigm for relationship of cancer to development. Cancer Surv. 9:555-78.**
- Pueshel SM, Padre-Mendoza T. 1984. Chromosome 11 and Beckwith-Wiedemann syndrome. J. Pediatr. 104:484-485.**

- Punnett H, Kistnermarcher M, Greene A, Coriell. 1974. An (X:1) translocation balanced. Cytogenet. Cell Genet. 13:406-407.**
- Raizis AM, Becroft DM, Shaw RL, Reeve AE. 1985. A mitotic recombination in Wilms tumor occurs between the parathyroid hormone locus and 11p13. Hum. Genet. 70:344-46.**
- Reeve AE, Housiaux PJ, Gardner RJ. 1984. Loss of a Harvey ras allele in sporadic Wilms' tumor. Nature 309:174-76.**
- Reeve AE, Eccles MR, Wilkins RJ, Bell GI, Millow LJ. 1985. Expression of insulin-like growth factor-II transcripts in Wilms' tumour. Nature 317:258-60.**
- Reeve AE, Sig SA, Raizis AM, Feinberg A. 1989. Loss of heterozygosity at a second locus on chromosome 11 in sporadic Wilms' tumor cells. Mol. Cell. Biol. 9:1799-03.**
- Riccardi VM, Sujansky E, Smith AC, Francke U. 1978. Chromosomal imbalance in the aniridia-Wilms tumor association: 11p interstitial deletion. Pediatrics 61:604.**
- Riccardi VM, Hittner HM, Franck V, Yunis J, Ledbetter D, et al. 1980. The aniridia Wilms tumor association: The critical role of chromosome band 11p13. Cancer Genet. Cytogenet. 2:131.**
- Rose EA, Glaser T, Jones C, Smith CL, Lewis WH, et al. 1990. Complete physical map of the WAGR- region of 11p13 localizes a candidate Wilms' tumor gene. Cell 60:495-508.**

- Royer-Pokora B, Raggs, Heckl-Ostricher B, Held M, Loos U, et al. 1991. Direct electrophoresis of Wilms' tumor shows that DNA deletions in 11p13 are rare. *Genes chromosomes cancer* 3: 89-100.
- Ruffie J, Virenque J, Gardier A, Colombies P. 1966. Temaniements chromosomiques complexes portant sur les autosomes s'accompagnant d'un omphalocèle. *Acad. Sci. Paris* 262:386-387.
- Rupprecht HD, Drummond IA, Madden SL, Rauscher SL, Sukhatme VP. 1994. The Wilms' tumor suppressor gene WT1 is negatively autoregulated. *J. Biol. Chem.* 269:6198-06.
- Saal H, Adler D, Distèche C. 1984. High resolution cytogenetics molecular hybridization studies of Beckwith-Wiedemann syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 36:110s.
- Salamanca GF. 1990. *Citogenética Humana*. Médica Panamericana. México, D.F. pág. 238-240.
- Salas MM. 1988. *Neoplasias Malignas en los Niños*. Interamericana. México, D.F. 361 pp.
- Sambrook B, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor. Tomo 1.
- Sapienza C. 1989. Genome imprinting and dominance modification. *Ann. NY Acad. Sci.* 564:24-38.

- Savage JR. 1976. Classification and relationships of induced chromosomal structural changes. *J. Med. Genet.* 13:103-112.
- Scott J, Cowell J, Robertson MR, Priestley LM, Wade R, et al. 1985. Insulin-like growth factor-II gene expression in Wilms' tumour and embryonic tissue. *Nature* 317:260-62.
- Scrabble HJ, Witte DP, Lampkin BC and Kavenee WK. 1987. Chromosomal localization of the human rhabdomyosarcoma locus by mitotic recombination mapping. *Nature* 329:644.
- Scrabble H. 1989. A model for embryonal rhabdomyosarcoma tumorigenesis that involves genome imprinting. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:7480-84.
- Seabright MA. 1971. A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet* 11:971-972.
- Solis V, Pritchard J, Cowell J. 1988. Cytogenetic changes in Wilms' tumors. *Cancer Genet. Cytogenet.* 34:223.
- Tadokoro K, Fujii H, Oshima A, Kakizawa Y, Shimizu K, et al. 1992. Intragenic homozygous deletion of the WT1 gene in Wilms' tumor. *Oncogene* 7:1215-21.
- Taykurt A, Schwarz G, Churg J. 1972. Wilms tumor at lower end of the ureter extending to the bladder: case report. *J. Urol.* 107:142.

- Therman E. 1980 Human Chromosomes Structure, Behavior, Effects. Spring Verlag**
194-206
- Turleau C, de Grouchy J, Dufler JR, Phuc LH, Rappaport R, et al 1981 Aniridia,
male-pseudohermaphroditism, gonodblastoma, mental retardation and deletion**
11p13 Hum Genet 57 300
- Turleau C, de Grouchy J, Chavin F, Martelli H, Voyer M, Charlas R. 1984.**
Trisomy 11p15 and Beckwith-Wiedemann syndrome. A report of two cases.
Hum Genet 67 219-221
- van Heyningen V, Bickmore WA, Seawright A, Fletcher Jm, Maule J, et al 1990 Role for
the Wilms' tumor gene in genital development ? Proc Natl Acad Sci USA**
87 5383-86
- Varanasi R, Bardeesy N, Ghahremani M, Petruzzi MJ, Nowak N, et al 1994 Fine structure
analysis of the WT1 gene in sporadic Wilms' tumor Proc Natl Acad Sci USA**
91 3554-58
- Velázquez J. 1996. Comunicación personal**
- Vidal-Puig A, Moller D 1994 Comparative Sensitivity of Alternative single-strand
conformation polymorphism (SSCP). BioTechniques 17:490-96**
- Wang ZY, Madden SL, Devel TF, Rauscher FJ III. 1992. The Wilms' tumor gene product,
WT1, represses transcription of the platelet-derived growth factor A-chain gene. J.
Biol. Chem. 267:1999-02.**

- Waziri M, Patil S, Bartley J. 1983. Abnormality of chromosome 11 in patients with features of Beckwith-Wiedemann syndrome. *J. Pediatr.* 102:873-876.
- Werner H, Re G, Drummond Y. 1993. Increased expression of the insuline-like growth factor Y receptor gene, IGF1R in Wilms' tumour is correlated with modulation of IGF1R promoter activity by the WT1 Wilms' tumour gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90:5828-32.
- Wiedemann H. 1964. Complexe malformatif familial avec hernie ombilicale et macroglossie-Un syndrome nouveau? *J. Genet. Hum.* 13:223-36.
- Wiedemann H. 1983. Tumor and hemihypertrophy associated with Wiedemann-Beckwith's syndrome. *Eur. J. Pediatr.* 141:129-34.
- Winter S, Curry C, Smith J, Kassel S, Miller R, Andrea J. 1986. Prenatal diagnosis of the Wiedemann-Beckwith syndrome. *Am. J. Med. Genet.* 24:137-141.
- World Health Organization. 1976. ICD-O. International Classification of Diseases for Oncology. Geneva: WHO.
- Yun K, Fidler AE, Eccles MR, Reeve AE. 1993. Insulin-like growth factor II and WT1 Transcript localization in human fetal kidney and Wilms' tumor. *Cancer Res.* 53:5166-71.
- Zhang Y, Tycko B. 1992. Monoallelic expression of the human H19 gene. *Nat. Genet.* 1:270.

Zhang Y, Shields T, Crenshaw T, Hao Y, et al. 1993. Imprinting of human H19: allelic specific CpG methylation, loss of the active allele in Wilms' tumor and potential for somatic allelic switching. *Am J Hum Genet* 1:40-44.
