

ANÁLISIS DEL GEN *SDHD* EN UNA FAMILIA CON PARAGANGLIOMA

**TESIS DE POSGRADO
PARA OBTENER EL DIPLOMA DE
ESPECIALIDAD EN GENÉTICA MÉDICA**

**PRESENTA:
JAIME ISAAC MENDIOLA JIMÉNEZ**

**ASESORES DE TESIS: DR SERGIO CUEVAS COVARRUBIAS
DRA MARIA DEL REFUGIO RIVERA VEGA**

MÉXICO , D.F.

NOVIEMBRE 2009



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.

DR. SERGIO ALBERTO CUEVAS COVARRUBIAS
JEFE DEL SERVICIO DE GENETICA
HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO

DRA. MARIA DEL REFUGIO RIVERA VEGA
MÉDICA ADSCRITA AL SERVICIO DE GENÉTICA
HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO
ASESORA DE TESIS

“”ANÁLISIS DEL GEN *SDHD* EN UNA FAMILIA CON PARAGANGLIOMA

PRESENTA:

JAIME ISAAC MENDIOLA JIMÉNEZ

TUTORES:

DR. SERGIO ALBERTO CUEVAS COVARRUBIAS

DRA. MARIA DEL REFUGIO RIVERA VEGA

COLABORADOR:

M en C. LUZ MARIA GONZALEZ HUERTA

Laboratorio de Biología Molecular

Departamento de Genética Médica, Hospital General de México

México D.F.

Agosto 2009

***Porque en él fueron creadas todas las cosas, las que hay en los cielos y las que hay en la tierra, visibles e invisibles; sean tronos, sean dominios, sean principados, sean potestades; todo fue creado por medio de él y para él.
Y él es antes de todas las cosas, y todas las cosas en él subsisten***

Colosenses 1:16 y 17

I.-AGRADECIMIENTOS

Gracias al Señor Jesús por darme vida un día y seguir dándomela.

A mi familia por apoyarme en todo lo que he hecho.

Al Hospital General de México por permitirme estar haciendo mis estudios.

A cada una de las personas que me ha ayudado a llegar a este punto, tengo bien claro que nadie llega solo a ningún lado.

INDICE

I.- AGRADECIMIENTOS	5
II.- SIGLAS Y ABREVIATURAS	8
III.- RESUMEN	9
IV.-ANTECEDENTES	11
1.- Incidencia y Prevalencia	11
2.-Manifestaciones Clínicas	11
3.-Fisiopatología	11
4.-Histología	
5.- Genética de los paragangliomas.	12
Genes involucrados	12
<i>SDHD</i>	14
Genotipo y Fenotipo	16
Penetrancia	17
Diagnòstico	17
V.-PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	20
VI.- OBJETIVOS GENERALES	22
VII.- OBJETIVOS PARTICULARES	22
VIII.- DISEÑO DEL ESTUDIO	
IX.-MATERIAL Y MÉTODOS	23
1.-POBLACIÓN INCLUIDA EN EL ESTUDIO	
2.- EXTRACCIÓN DEL DNA GENÓMICO	
A)Obtención de muestra	
B) Diseño de oligonucleótidos y PCR	
D) Purificación del fragmento amplificado y productos de extensión	

3-Reacción de secuenciación	
4.- Purificación de los productos de extensión	
5.-Montaje en el Equipo de secuenciación	
X.- RESULTADOS	30
XI.- DISCUSIÓN	32
XII.- APÉNDICE	
1.- Secuencia del gen <i>SDHD</i>	34
XIII .-GLOSARIO	35
XIV.-REFERENCIAS	39

II.- SIGLAS Y ABREVIATURAS

PGL Paraganglioma

PCC Feocromocitoma

AD Autosómico Dominante

LOH (LOSS OF HETEROGIGOCITY) Pérdida de heterocigocidad

VHL Von Hippel- Lindau

MEN1 Neoplasia endócrina múltiple tipo 1

MEN2 Neoplasia endócrina múltiple tipo 2

NF1 Neurofibromatosis tipo 1

PCR Reacción en Cadena de la Polimerasa

SDHA Succinato Deshidrogenasa A

SDHB Succinato Deshidrogenasa B

SDHC Succinato Deshidrogenasa C

SDHD Succinato Deshidrogenasa D

TAC Tomografía Axial Computada

IRMN Imagen por Resonancia Magnética Nuclear

III.- RESUMEN

Los Paragangliomas o tumores glómicos proceden de los cuerpos de Glomus que son estructuras baroreceptoras. La gran mayoría no presentan manifestaciones clínicas y cuando éstas se presentan dependen de la localización y de su involucramiento al sistema nervioso simpático. Su prevalencia no es conocida con exactitud sin embargo se calcula un estimado de 300,000/ año. La mayoría de los paragangliomas son esporádicos pero algunos pueden tener un patrón hereditario por mutaciones germinales en genes que codifican las subunidades B, C y D, del complejo mitocondrial II de la enzima succinato deshidrogenasa (SDH). Una hipótesis para el mecanismo de tumores propone la generación de pseudohipoxia, un estado resultante de la elevación de las concentraciones celulares de succinato y / o el aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno. Dicho aumento de las concentraciones de succinato parecen estabilizar el factor de transcripción HIF1 α mediante la inhibición de prolin hidroxilasas. El objetivo del presente estudio es describir una familia Mexicana afectada en tres generaciones por paragangliomas. Se eligió secuenciar el gen SDHD en el caso índice ya que se ha reportado que es el más asociado a paragangliomas no secretores en cabeza y cuello, que constituyen la principal afección de los pacientes estudiados. No se encontró mutación que explicase la producción de los paragangliomas en los pacientes afectados. En una paciente (hija de una afectada con paraganglioma bilateral) se encontró una variable la cual se reporta como "variable natural" que constituye un cambio de Histidina por Arginina en el codón 50. Este polimorfismo aumenta la susceptibilidad para el desarrollo de paraganglioma, carcinoma de tiroides y de mama y está asociado al Síndrome "Cowden- like"; Esto se explica ya que esta variable causa aumento de la AKt y MAPK al doble

IV.-ANTECEDENTES

Desde la primera descripción de paragangliomas realizada por Marchan en 1891, existen distintos términos para su denominación como tumores glómicos, quemodectomas o paragangliomas no cromafines ¹. La prevalencia de los paragangliomas no es conocida con exactitud. La incidencia de estos tumores se aproxima a los 300,000/ año ². Los tumores glómicos proceden de los cuerpos de Glomus que son estructuras baroreceptoras localizadas en oído medio, hueso temporal y otras regiones dentro de la vena yugular, dichos cuerpos regulan la presión de oxígeno en el oído medio y mastoides y se encuentran a lo largo de una de las ramas del IX par craneal. En el caso de paragangliomas timpánicos pueden desarrollarse en el nervio de Arnold, el cual es rama del X par craneal en la adventicia de la parte anterior del de la vena yugular.

Cuando se desarrollan a nivel de la fosa yugular, se les denomina tumores glómico yugular. Su nutrición vascular está dada por numerosas arterias siendo la arteria faríngea la más importante. Los tumores glómicos en la bifurcación carotídea son más voluminosos que los yugulares. Estos tumores pueden ser subclaviculares y asentarse en especial en el lado izquierdo en la arteria subclavia, cuando se presentan en el lado derecho se sitúan entre la subclavia y la carótida primitiva; los laríngeos se desarrollan a lo largo del nervio laríngeo superior, o bien en cualquier segmento del trayecto del vago ¹. A pesar de ser tumores de crecimiento lento (< 2 cm en 5 años) e histología benigna, son altamente destructivos por las áreas que involucran, extendiéndose por estructuras de baja resistencia, invadiendo vasos, nervio y hueso ¹⁵. Por otro lado, los feocromocitomas son paragangliomas secretores de catecolaminas limitados a la médula suprarrenal, también son conocidos como tumores adrenales cromafines.

Manifestaciones Clínicas

La gran mayoría de los paragangliomas no presentan manifestaciones clínicas, sin embargo cuando éstas se presentan depende de la localización y de su involucramiento a sistema nervioso simpático. Sólo 5% de los paragangliomas en la cabeza y cuello son secretores, no así los de tórax, abdomen y pelvis los cuales son típicamente de componente secretor. Las manifestaciones clínicas pueden dividirse en:

1) Síntomas de exceso de catecolaminas, que pueden incluir hipertensión arterial paroxística o sostenida, cefalea pulsátil y síntomas adrenérgicos como taquicardia, diaforesis, aprensión y ansiedad.

2) Síntomas paroxísticos que pueden ser desencadenados por los cambios en la posición del cuerpo, aumento de presión intra-abdominal, medicamentos (metoclopramida), el ejercicio, o la micción. En el caso de paragangliomas vesicales también puede estar acompañado por hematuria.

Los paragangliomas de cabeza y cuello pueden presentarse como masas tumorales asintomáticas o con síntomas asociados al tamaño y localización de la masa tumoral. Los síntomas asociados pueden incluir la pérdida de la audición unilateral, tinnitus pulsátil, tos, disfonía, plenitud faríngea y odinofagia.

Un tumor de cuerpo carotideo puede estar asociado con soplos o thrills. Los tumores yugulotimpánicos pueden ser visibles al examen otoscópico como una masa color azul pulsátil detrás de la membrana timpánica intacta ¹⁹

Fisiopatología

Una hipótesis para el mecanismo de tumores propone la generación de pseudohipoxia, un estado resultante de la elevación de las concentraciones celulares de succinato y / o el aumento en la producción de especies reactivas de

oxígeno. Dicho aumento de las concentraciones de succinato parecen estabilizar el factor de transcripción HIF1 α mediante la inhibición de prolil hidroxilasas. HIF1 α se postula que es producida y continuamente degradadas dentro de la célula. La función de las prolil hidroxilasas es necesaria para la ubiquitinación y degradación de HIF1 α cuyo efecto es la generación de hipoxia y estimulación de angiogénesis.

Histología

Estos tipos de tumores rara vez superan los 6 cm de diámetro, son tumoraciones de color rosa rojizo y pardo. Las características microscópicas son uniformes. Están compuestos de nidos (**zellballen**) de células principales poligonales, encerradas por trabéculas de células de sostén alargadas y fibrosas. Las células tumorales poseen un citoplasma eosinófilo, claro o granular, núcleos uniformes redondos u ovoides, a veces vesiculares. En la mayoría de los tumores se aprecia poco pleomorfismo y mitosis escasas. La microscopía electrónica descubre gránulos neuroendócrinos bien demarcados. Ciertas células son argirófilas y dan tinción positiva para marcadores neuroendócrinos en el estudio inmunohistoquímico.

3.- Genética de los paragangliomas.

La mayoría de los paragangliomas son de presentación esporádica y con un modelo de transmisión multifactorial. En el caso de los paragangliomas de presentación familiar se han reportado mutaciones en distintos genes que parecen ser los responsables del padecimiento como *NF1*, *VHL*, *MEN1* y *MEN2*, en estos casos se presentan con un patrón de herencia autosómica dominante. (Tabla 1) Algunos paragangliomas múltiples pueden deberse a mutaciones germinales en genes que codifican las subunidades B, C y D, del complejo mitocondrial II de la enzima succinato deshidrogenasa (SDH)¹⁻³. Estos genes pueden comportarse como genes supresores de tumores^{1, 4}. Las mutaciones en *SDHD* son la causa más común de este tipo de neoplasias en cabeza y cuello, Sólo se han reportado paragangliomas malignos con poca

frecuencia asociados con mutaciones en este gen 5, 10-12. Las mutaciones en *SDHB* están más relacionados con feocromocitoma suprarrenal y extra adrenal⁵⁻⁹.

Tabla 1. Síndromes tumorales hereditarios con predisposición a paragangliomas/ feocromocitomas

Síndrome	Gen	Locus	Producto Proteico	Función de la Proteina	Mecanismo	*P de C	Fenotipo
NF1	<i>NF1</i>	17q11.2	Neurofibromina	Hidrólisis GTP	Tumor Supresor	+	Feocromocitoma/ Paraganglioma secretor
VHL	<i>VHL</i>	3q25-26	VHL	Supresor de transcripción	Tumor Supresor	+	Feocromocitoma/ Paraganglioma secretor
MEN1	<i>MEN1</i>	11q13	Menina	Regulador de transcripción	Tumor Supresor	+	Feocromocitoma
MEN2	<i>RET</i>	10q11.2	RET	Receptor de Tirosin-cinasa	Proto-oncogen	+	Feocromocitoma
PGL1	<i>SDHD</i>	11q23	Succinato deshidrogenasa D	Regula producción de ATP mitocondrial	Tumor supresor	+	Feocromocitomas/ Paraganglioma secretor y no secretor
PGL2	?	11q13.1	?	?	?	-	Paraganglioma no secretor
PGL3	<i>SDHC</i>	1q21	Succinato deshidrogenasa C	Regula producción de ATP mitocondrial	Tumor supresor	-	Paraganglioma no secretor
PGL4	<i>SDHB</i>	1p36.1	Succinato deshidrogenasa B	Regula producción de ATP mitocondrial	Tumor supresor	+	Feocromocitomas / Paraganglioma secretor y no secretor

*P de C = Producción de catecolaminas

El gen SDHD se localiza en 11q23.1, a 111,462,832 pares de bases a partir de pter; contiene 4 exones y 8,896 bases. Codifica para la succinato deshidrogenasa D, esta enzima de 159 aminoácidos y 17043 Daltones cataliza la conversión de succinato a fumarato en el ciclo de Krebs y sirve como complejo II de la cadena de transporte de electrones, además actúa como un vínculo entre las dos vías. El complejo de SDHD y SDHC son proteínas de membrana, subunidades D y C que se anclan a la membrana interna mitocondrial.²⁹ La SDHD es una enzima del Complejo tipo II (succinato-ubiquinona oxidoreductasa) la cual es muy importante en el ciclo del ácido tricarboxílico y en la cadena respiratoria en procariontes y eucariontes.¹² La secuencia de aminoácidos de la subunidad larga (CybL) y pequeña (CybS) del citocromo b presentan homología entre ellas. La subunidad larga y pequeña contienen 140 y 103 aminoácidos respectivamente y muestran poca homología con las subunidades de otras especies, en contraste con la flavoproteína SDHA y la subunidad de hierro-azufre de SDHB.

Se han reportado más de 70 mutaciones entre las que se encuentran inserciones, deleciones, sin sentido y de sentido equivocado. Se encuentran tres en las cuales se demostró efecto fundador en Holandeses (p.Asp92Tyr, p.Leu139Pro, p.Leu95Pro). Por otro lado, no existe evidencia de impronta en este gen ya que se identificó expresión bialélica del gen de SDHD en 3 muestras independientes de cerebro fetal, 1 de riñón fetal, 2 de cerebro adulto y linfocitos. Los autores sugirieron que la expresión monoalélica de SDHD puede limitarse al cuerpo carotídeo y paraganglioma, similar es a la impronta de UBE3A en el síndrome de Angelman.

TABLA 2 -- Población de pacientes con mutaciones de línea germinal *SDHD* y feocromocitoma y / o paraganglioma en una muestra de población caucásica(21)

Familia ID	Ciudad	mutación <i>SDHD</i>	<i>SDHD</i> mutación (cDNA nucleotido)	Exon	Edad de inicio en años	Edad de pacientes al diagnóstico	Tipos de tumores
F-32	Francia	L7fsX14	c.21delG	1	34	34	H
F-01	Francia	R22X ^a	c.64C→T	2	31	31, 34, 58	T, H
F-04	Francia	R22X	c.64C→T	2	43	43	P, A, H
F-10	Francia	W43X	c.129G→A	2	20	20	H, (M)
F-14	Francia	H50fsX68	c.148-149insA	2	17	19	A, H
F-12	Francia	IVS2+1G→T	Intron		25	25	H
F-05	Francia	IVS2-1G→T	Intron		24	25, 68	H
F-31	Francia	S68fsX113	c.202-203insA	3	25	31	A
F-52	Australia	P81L	c.242C→T	3	27	27	H
F-15	Francia	P81L	c.242C→T	3	31	32	H
F-63	UK	P81L	c.242C→T	3		41	H
F-17	Francia	Y84X	c.252T→G	3	28	28, 73	H, T
F-06	Francia	L85X	c.254T→A	3	21	22, 33	H, T, A
F-08	Francia	IVS3+1G→A	Intron		20	16, 20	H
F-18	Francia	T112fsX133	c.334-337delACTG	4	16	16, 33	P, A, H
F-58	Canada	Y114C	c.341A→G	4	40	40	H
F-38	USA	Y114CfsX162	c.341-342delAT	4	25	25	A, H
F-03	Francia	G148D	c.443G→A	4	7	10, 32	H, (M)
F-09	Francia	I149N	c.446T→A; 448delTGC	4	24	24, 25	H
		C150del					

P, Feocromocitoma; A, abdominal ; T, torácico; H, cabeza y cuello (M), metástasis.

C) Genotipo y Fenotipo

Aunque las personas con mutaciones en *SDHB*, *SDHC*, *SDHD* pueden desarrollar feocromocitomas o paragangliomas en cualquier tejido paragangliómico, las siguientes correlaciones entre los genes implicados y la localización del tumor se utilizan para orientar las pruebas diagnósticas y, en algunos casos, la atención de los pacientes: (Tabla 2). Mutaciones de línea germinal, en *SDHB* están fuertemente asociados con paragangliomas simpáticos extra-adrenal ²⁴. Los tumores Cromafines en los individuos con mutaciones germinales en *SDHB* son seis veces más propensos de producir tumores extra-adrenales en comparación con la población general ²⁵

Las mutaciones en *SDHD* y *SDHC* son más frecuentemente asociados con paragangliomas parasimpáticos de cabeza y cuello que los otros tipos de tumores ²⁶. Mutaciones germinales en *SDHD* tienen una odds ratio de aproximadamente 24 de un paraganglioma de cabeza y cuello en comparación con las personas con una mutación germinal *SDHB* ²⁷. Estos mismos pacientes tienen un odds ratio de 0,28 de desarrollo de paragangliomas abdominal en comparación con las personas con una mutación germinal en *SDHB* ²⁷

Los paragangliomas con mutaciones germinales en *SDHB* son más propensos a malignizar que paragangliomas esporádicos o los que se desarrollan en individuos con mutaciones germinales en *SDHD* y *SDHC*. Mutaciones en *SDHB* también pueden predecir una menor supervivencia en personas con feocromocitomas malignos y paragangliomas ²⁸ Sin embargo, los individuos con una mutación germinal *SDHD* pueden desarrollar la enfermedad maligna en cualquier sitio.

Los paragangliomas de cabeza y cuello son más comunes en las personas con una mutación germinal *SDHD*, en particular, tienen más probabilidades de ser multifocales que en personas con tumores esporádicos o en aquellos con una mutación germinal *SDHB* ²⁴. Sin embargo, los fenotipos varían entre los individuos e incluso entre los miembros de la familia con la misma mutación.

Aproximadamente, 75% de feocromocitomas y paragangliomas simpáticos en las personas con mutaciones germinales *SDHD* han ocurrido cuando la mutación está en el extremo 5' del gen²⁹. La penetrancia es edad dependiente. (Tabla 3)

Tabla 3. Penetrancia relacionada con la edad en pacientes con mutaciones en *SDHD* y *SDHB*⁶

<i>SDHD</i>		<i>SDHB</i>	
Edad	Penetrancia	Edad	Penetrancia
30	48%	30	29%
31	50%	35	50%
40	73%	40	45%
50	86%	50	77%

Diagnóstico

Los síndromes hereditarios de PGL / PCC deben de considerarse en todos los individuos que presenten⁶: tumoraciones múltiples, incluidos los tumores bilaterales, múltiples tumores sincrónicos o metacrónicos, tumores recurrentes, tumores de aparición temprana (<40 años) y con antecedentes familiares del tumor. El diagnóstico de feocromocitomas y paragangliomas se basa en el examen físico, estudios de imagen, y pruebas bioquímicas. La evaluación del paciente incluye:

Historia familiar detallada, incluyendo conocimientos específicos de muerte súbita en la familia. Historia médica con síntomas de exceso de catecolaminas, paroxísticos o compresivos

Examen físico dirigido a los signos sugestivos de PGL / PCC: En paragangliomas simpático y feocromocitomas, los signos pueden incluir la documentación de la elevada presión arterial, arritmias u otras taquiarritmias y masas palpables en abdomen. En paragangliomas de cabeza y cuello, los signos pueden incluir masas de cabeza y cuello. Un tumor de cuerpo carotídeo es probable que sea adherente verticalmente y puede estar asociada con soplos o thrills.

Para el diagnóstico y localización del tumor, los siguientes estudios se deben utilizar³⁰

IRM y TAC: La sensibilidades y especificidades de la TAC y la RMN son aproximadamente de 90% -100% y 70% -80%, respectivamente. Imágenes de PGL se pueden identificar en cualquier lugar a lo largo del eje paravertebral desde la cabeza hasta la pelvis, incluyendo la cadena simpática paraaórtica y en el órgano de Zuckerkandl (tejidos cromafines cerca del origen de la arteria mesentérica inferior y la bifurcación aórtica). Un sitio menos común es la pared de la vejiga.

Ecografía. La ecografía Doppler es útil para el diagnóstico de tumores del cuerpo carotídeo y paragangliomas vagales.

Angiografía digital (DSA) Este estudio es sensible para la detección de los paragangliomas pequeños.

Para detectar metástasis, los siguientes estudios se puede utilizar¹⁴

Gammagrafía con 123I-metayodobencilguanidina (MIBG), Esta técnica q mide la absorción de un tumor de catecolaminas , teniendo mayor especificidad para la localización que la TAC y la RNM, pero menor sensibilidad. Puede ser utilizado para caracterizar las masas detectadas por TC o RM, buscar otros lugares de la

enfermedad , Identificar tumores cuando la TC o RM son negativos ⁸

Biopsia. En caso de paragangliomas de cabeza y cuello no es necesario y puede ser contraindicado ya que este procedimiento invasivo tiene el riesgo de precipitar una crisis hipertensiva, hemorragia y la siembra de células tumorales.

Pruebas genéticas moleculares

Análisis de secuencias. Análisis de secuencias de los ocho exones del gen *SDHB*, los seis exones de *SDHC*, y cuatro exones de *SDHD*, y sus respectivas uniones intrón-exón se utilizan para detectar mutaciones puntuales en estos genes. Aproximadamente el 70% de los casos familiares de paraganglioma de cabeza y cuello son causados por mutaciones de línea germinal, en uno de estos tres genes ².

Tratamiento: El manejo es muy similar al de paragangliomas esporádicos³¹ aunque personas con paragangliomas familiares tienden más a presentar tumores multifocales o malignos. Para el tratamiento de los tumores secretores se recomienda el uso de antagonistas de catecolaminas previo a la resección quirúrgica. En el caso de los no secretores se prefiere la radioterapia ya que por su localización son eventos quirúrgicos los cuales presentan complicaciones, como se mencionó antes este tipo de tumores son de crecimiento lento, lo cual al producir fibrosis perilesional en el tumor, el crecimiento se limita de manera satisfactoria.³⁰

Todos estos antecedentes marcan la importancia de realizar un estudio molecular e integral para el diagnóstico de estos pacientes, esto encaminado a ofrecerles una mejor atención y asesoramiento genético de su padecimiento.

V.-PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Los PGL hereditarios son tumores difícilmente operables ya que los pacientes presentan muchas complicaciones quirúrgicas siendo diagnosticados de manera tardía dificultando el tratamiento. El gen SDHD es el más asociado a familias con paragangliomas no secretores en cabeza y cuello. Por lo que nuestro planteamiento del problema se resumiría en conocer cuales son los cambios moleculares presentes en el gen SDHD en una familia con PGL.

VI.- OBJETIVOS GENERALES

Analizar el gen SDHD en una familia con paraganglioma

VII.- OBJETIVOS PARTICULARES

Identificar alteraciones moleculares en el gen SDHD asociadas al paraganglioma

Identificar la presencia de polimorfismos en el gen SDHD

VIII.- DISEÑO DEL ESTUDIO

1.- Tipo de investigación : Reporte de caso

2.-Universo

La población incluida en este estudio son miembros de dos generaciones de una familia afectada con PGL

2.1.- Criterios de inclusión:

Pacientes con diagnóstico de paraganglioma familiar

Mayores de 18 años

Familiares que deseaban realizarse el estudio.

2.2.- Criterios de exclusión:

Familiares que no deseaban realizarse el estudio o por motivos ajenos no se tomó la muestra sanguínea.

3.- Variables del estudio

Independiente

Secuencia del gen de la SDHD, 4 exones.

Dependiente

Mutación del gen *SDHD*

IX.-MATERIAL Y MÉTODOS

1.-POBLACIÓN INCLUIDA EN EL ESTUDIO

A) Miembros de la Familia Mestiza Mexicana Sintomáticos

B) Miembros de la Familia Mestiza Mexicana Asintomáticos

Todos los miembros de la familia que se encuentran en el grupo A y B recibieron asesoramiento genético previo y posterior a la toma de muestra sanguínea. La muestra se tomó con consentimiento informado . Además se interrogó a cada uno de ellos y se realizó estudio molecular.

Pacientes con diagnóstico de paraganglioma familiar

Mayores de 18 años

Familiares que deseaban realizarse el estudio.

2.2.- Criterios de exclusión:

Familiares que no deseaban realizarse el estudio o por motivos ajenos no se tomó la muestra sanguínea.

3.- Variables del estudio

Independiente

Secuencia del gen de la SDHD, 4 exones.

Dependiente

Mutación del gen *SDHD*

IX.-MATERIAL Y MÉTODOS

1.-POBLACIÓN INCLUIDA EN EL ESTUDIO

A) Miembros de la Familia Mestiza Mexicana Sintomáticos

B) Miembros de la Familia Mestiza Mexicana Asintomáticos

Todos los miembros de la familia que se encuentran en el grupo A y B recibieron asesoramiento genético previo y posterior a la toma de muestra sanguínea. La muestra se tomó con consentimiento informado . Además se interrogó a cada uno de ellos y se realizó estudio molecular.

2.- EXTRACCIÓN DEL DNA GENÓMICO

El aspecto fundamental de este trabajo es la obtención de DNA en cantidades razonables y de alta pureza. Existen varias metodologías que permiten su obtención partiendo de diferentes fuentes: gotas de sangre seca, semen, tumores, pelo o tejidos antiguos. En este caso se obtuvo DNA de todos los sujetos a partir de leucocitos obtenidos de sangre periférica. El método consiste en la eliminación de los eritrocitos mediante choque hipotónico para dejar limpios los leucocitos. Posteriormente se lisan los leucocitos para liberar el DNA. La lisis puede llevarse a totalidad utilizando detergentes iónicos como el SDS. Alternativamente pueden lisarse con detergentes no iónicos como el NP-40 o el Tritón X-100.

A)Obtención de muestra

- 1.-Se toman 20 ml de sangre periférica en tubos “vacutainer” que contengan EDTA como anticoagulante
- 2.-Transferir 3 ml de sangre a un tubo cónico de 15 ml.
- 3.- Agregar 3 ml de amortiguador TTS.
- 4.- Homogeinizar (agitar) de manera gentil
- 5.- Centrifugar a 3,000 r.p.m. durante 5 minutos. Desechar cuidadosamente el sobrenadante.
- 6.- Al paquete leucocitario agregar 1 ml. De TTS
- 7.- Agitar de manera vigorosa y transferir a un tubo de 15 ml.
- 8.-Centrifugar a 10,000 r.p.m. durante 3 min.
- 9.-Decantar el sobrenadante

10. Repetir los pasos 6,7 y 9 hasta que se obtengan células blancas libres de eritrocitos (por lo general con 2 pasos es suficiente)

11. Al paquete leucocitario se le agregan 570 microlitros de NaCl al 5Mm y se agita por 2 min.

12.- Adicionar 30 microlitros de SDS al 10 % y agitar 5 min. Vigorosamente

13.- Adicionar 200 microlitros de NaCl saturado y agitar 10 minutos vigorosamente

14.- Centrifugar a 11,000 r.p.m. durante 30 min. A 4° C.

15.- Decantar el sobrenadante cuidadosamente en un tubo de 13 X 100 mm estéril y añadir 2 ml de etanol absoluto a -20 ° C.

En este paso se pueden congelar las muestras a -20 ° C o se puede continuar con la extracción. La congelación se puede hacer directamente en los tubos en los que se tienen las muestras. No se debe descongelar antes del momento de finalizar la extracción.

Si se decide continuar la extracción al momento de agregar el etanol absoluto a -20 ° C. se observa precipitar el DNA.

16.- Capturar el DNA con una varilla de vidrio y enjuagar en etanol al 70 % dejando evaporarlo en condiciones esteriles.

17.- Resuspender el DNA en un microtubo de 200 microlitros de agua esteril.

18.- Colocarlo en un termobloque a 60 ° C durante dos horas.

Todos los materiales que se utilicen deben estar estériles para evitar la presencia de nucleasas. Es importante trabajar con guantes durante trabajar el proceso de extracción. La pureza de los reactivos debe ser muy alta , de lo contrario la calidad del DNA disminuye o puede degradarse.

A) Diseño de oligonucleótidos y PCR

Los alelos pueden identificarse por la técnica de PCR usando las secuencias flanqueadoras previamente diseñadas y flanqueadas dependiendo del exón que se busca amplificar.

1.- Calcular el volumen correspondiente a 500 ng de DNA genómico

2.- Adicionar en un tubo de 2 mL.

a) El volumen equivalente a 500 ng de DNA genómico

b) 1 mM MgCl₂ (1 microlitro)

c) dNTPs a una concentración de 2.5 mM. Llevarlos a una concentración de 125 microMoles (1 microlitro)

d) Buffer 10X llevarlo a una concentración de 0.5 X (1 microlitro)

e) Oligonucleótidos F a una concentración de 20 Mm, llevarlos a 10 mM.

f) Oligonucleótidos R a una concentración de 20 Mm, llevarlos a 10 mM.

g) 0.75 unidades de Taq polimerasa (1 unidad = 0.3 microlitros)

h) Aforar con agua esteril hasta 50 microlitros

Colocar el termociclador (Ependorf, Mastercycle gradient) en el siguiente programa

Desnaturalización 95° C 30 segundos

Alineación 55° a 57° 1 minuto

Extensión 72° C 2 minutos

30 ciclos

Una vez que concluye el programa los productos son sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % con objeto de confirmar la presencia de los alelos. El peso esperado de los fragmentos amplificados varía de 62 a 145 pb. Una vez que se confirmó el producto de amplificación, se procede a la purificación del fragmento.

C) Purificación del fragmento amplificado y productos de extensión

La purificación del fragmento observado se realizó mediante el kit QUIAEX II ; esto evita contaminantes en la reacción de secuenciación . Esta técnica remueve el exceso de dNTP`s, oligonucleótidos, enzima, ADN , etc., de esta manera obteniendo una secuencia limpia.

- 1) Cortar la banda del fragmento amplificado del gel y pesarla
- 2) Agregar 3 veces el peso de la banda en Buffer QXI y 5 microlitros de QUIAEX II en un tubo de 2 mL.
- 3) Incubar por 10 minutos a 50° C agitando cada 2 minutos el tubo.
- 4) Centrifugar durante 1 minuto a 10 000 r.p.m. , decantar y añadir 500 microlitros de buffer QXI.
- 5) Centrifugar durante 1 minuto a 10 000 r.p.m., decantar y eliminar los residuos
- 6) Eliminar los residuos de buffer PE y secar la muestra a temperatura ambiente. Resuspender con 20 microlitros de agua estéril, centrifugar 2 minutos a 10 000 r.p.m. y el sobrenadante se coloca en un microtubo.
- 7) Verificar que la purificación haya sido exitosa , electroforesis del producto obtenido en un gel de agarosa usando un marcador de peso y cantidad (low- mass) de 100 pb.

3.-Reacción de secuenciación

Teniendo la muestra purificada, todo el producto de PCR contiene el ADN correspondiente a los alelos de los exones de *SDHD*. Preparamos la muestra para la secuenciación automática. La tecnología de secuenciación del ADN nos permite saber el orden o secuencia de los nucleótidos que forman parte del gen.

Las condiciones de la reacción son las siguientes

- 1) Adicionar un tubo de de 200 microlitros
 - a) Mezcla de reacción del kit Big Dye Terminator (2 microlitros)
 - b) Purificado de PCR 100 ng/ microlitro (1 microlitro)
 - c) Oligonucleótidos F a una concentración de 10 microM (1 microlitro)
 - d) Oligonucleótidos R a una concentración de 10 microM (1 microlitro)
 - e) Agregar agua estéril (16 microlitros)
 - f) Adicionar un tubo de de 200 microlitros
- 2) Colocar en el termociclador el siguiente programa

Desnaturalización	96° C	30 segundos
Alineación	55° a 57° C	15 segundos
Extensión	60° C	4 minutos
		25 ciclos

4.- Purificación de los productos de extensión

La purificación se realiza por el método de columnas Centri Sep para eliminar la fluorescencia en exceso y permitir una secuenciación limpia

- 1.- Pesar una columna de 0.06 g de sephadex
- 2.- Agregar 800 microlitros de agua inyectable, esperar por lo menos dos horas a que se hidraten
- 3.- Centrifugar durante 3 minutos a 3000 r.p.m para retirar el exceso de agua.
- 4.- Colocar el producto de la PCR en las columnas y centrifugar durante 3 minutos a 3000 r.p.m. para obtener el producto purificado.
- 5.- Centrifugar la muestra en una centrifuga al vacío (Opied Vac.), esperar hasta que el producto seque y tapar con una septa.

5.- Montaje en la Muestra en el equipo de Secuenciación

- 1.- Añadir 20 microlitros de amortiguador de carga TSR Applied Biosystems.
- 2.- Transferir a un tubo de secuenciación y colocar una septa.
- 3.- Desnaturalizar la muestra a 94° C por 2 minutos y colocar inmediatamente en hielo
- 4.- Colocar la muestra en el secuenciador automatizado ABI PRISM modelo 310 de acuerdo a las instrucciones del equipo

X.- RESULTADO

El árbol genealógico de la familia con paraganglioma se describe a continuación

4.- Purificación de los productos de extensión

La purificación se realiza por el método de columnas Centri Sep para eliminar la fluorescencia en exceso y permitir una secuenciación limpia

- 1.- Pesar una columna de 0.06 g de sephadex
- 2.- Agregar 800 microlitros de agua inyectable, esperar por lo menos dos horas a que se hidraten
- 3.- Centrifugar durante 3 minutos a 3000 r.p.m para retirar el exceso de agua.
- 4.- Colocar el producto de la PCR en las columnas y centrifugar durante 3 minutos a 3000 r.p.m. para obtener el producto purificado.
- 5.- Centrifugar la muestra en una centrifuga al vacío (Opied Vac.), esperar hasta que el producto seque y tapar con una septa.

5.- Montaje en la Muestra en el equipo de Secuenciación

- 1.- Añadir 20 microlitros de amortiguador de carga TSR Applied Biosystems.
- 2.- Transferir a un tubo de secuenciación y colocar una septa.
- 3.- Desnaturalizar la muestra a 94° C por 2 minutos y colocar inmediatamente en hielo
- 4.- Colocar la muestra en el secuenciador automatizado ABI PRISM modelo 310 de acuerdo a las instrucciones del equipo

X.- RESULTADO

El árbol genealógico de la familia con paraganglioma se describe a continuación

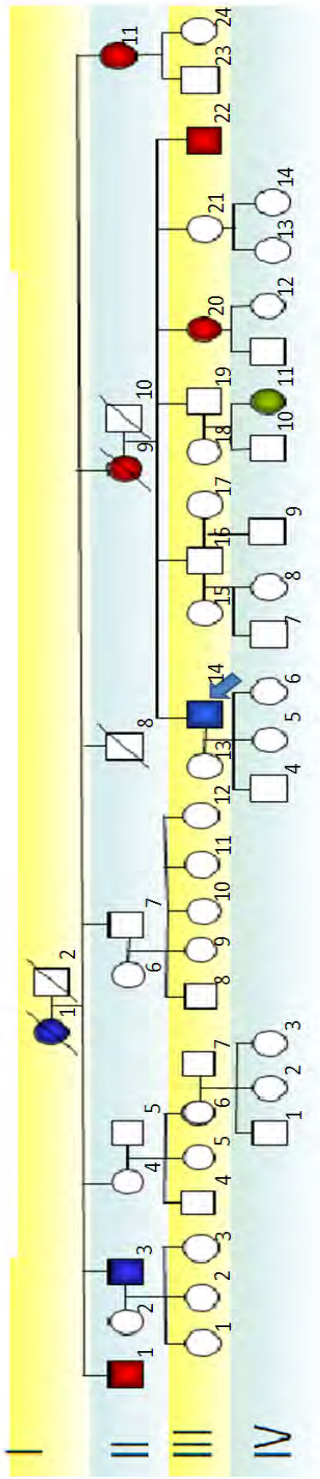


Figura 1. Árbol Genealógico

Se realizó historia clínica completa en los pacientes afectados, en familiares de primer grado y en controles sanos.

Las características clínicas de los familiares afectados fueron:

II.1) Masculino de 54 años que presenta paraganglioma carotideo bilateral , inicio a los 42 años de edad con cefalea pulsátil holocraneana intensidad 4 de 10 en base a escala subjetiva del dolor de difícil control, no aumentaba ni mejoraba ante ninguna maniobra

II.3) Masculino de 58 años que presenta paraganglioma carotideo izquierdo , inicio a los 47 años de edad con cefalea pulsátil holocraneana intensidad 2 de 10 en base a escala subjetiva del dolor de difícil control, no aumentaba ni mejoraba ante ninguna maniobra

II.3) Masculino de 58 años que presenta paraganglioma carotideo izquierdo , inicio a los 47 años de edad con cefalea pulsátil holocraneana intensidad 4 de 10 en base a escala subjetiva del dolor de difícil control, no aumentaba ni mejoraba ante ninguna maniobra

II.11) Femenino de 37 años que presenta paraganglioma carotideo bilateral, inicio de la sintomatología a los 29 años de edad con cefalea pulsátil holocraneana intensidad 1 de 10 en base a escala subjetiva del dolor de difícil control, no aumentaba ni mejoraba ante ninguna maniobra .

III.14) Masculino de 42 años que presenta paraganglioma carotideo izquierdo , inicio de la sintomatología a los 41 años con cefalea pulsátil holocraneana intensidad 2 de 10 en base a escala subjetiva del dolor de difícil control, no aumentaba ni mejoraba ante ninguna maniobra

III.20) Femenino de 47 años que presenta paraganglioma carotideo bilateral, se desconoce la edad de inicio, ya que no presentó sintomatología, su diagnóstico fue por hallazgo de imagen.

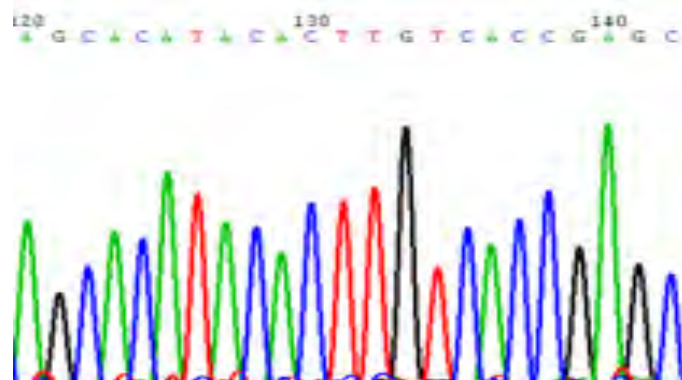
III.22) Masculino de 25 años que presenta paraganglioma carotideo bilateral, diagnóstico a los 15 años de edad por hallazgo imagen.

IV.11) Femenino de 18 años de edad con feocromocitoma, inicio de la sintomatología dudoso (10-13 años) con taquicardia y ansiedad.

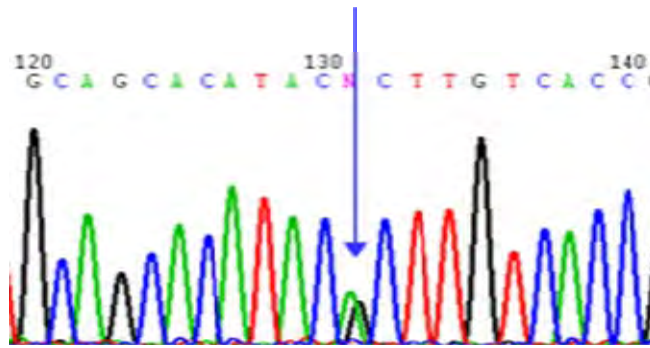
Análisis molecular

No se encontró mutación en ninguno de los exones analizados del gen *SDHD* ni en las uniones exón-intrón que explicase la producción de los paragangliomas en los pacientes afectados. Sólo se detectó un cambio de secuencia en una paciente femenina de 20 años (**VI.13**) clínicamente sana la cual es hija de una afectada de paraganglioma bilateral (**III.20 de inicio a los 29 años de edad**). La variable que se encontró en la paciente es una transición de Adenina por Guanina en el codón 50 que condiciona un cambio de Histidina por Arginina, cambiando la conformación proteica y por consiguiente la función de la misma, ocasionándole una ganancia de función.

A continuación se muestran los electroferogramas que corresponden al exón 2 del gen de *SDHD* los pacientes III.20, IV.13, II.11 y un control femenino



III.20, BEATRIZ CASTRO LINARES (Afección bilateral)

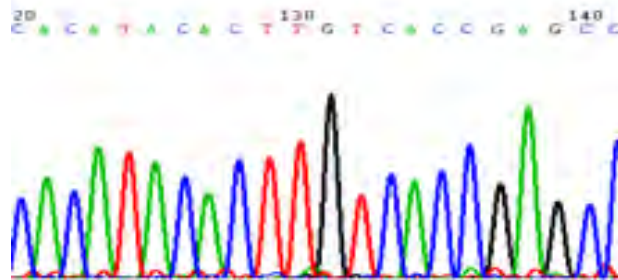


VI.13, JESSICA JUANA HIDALGO (Hija de III.20)

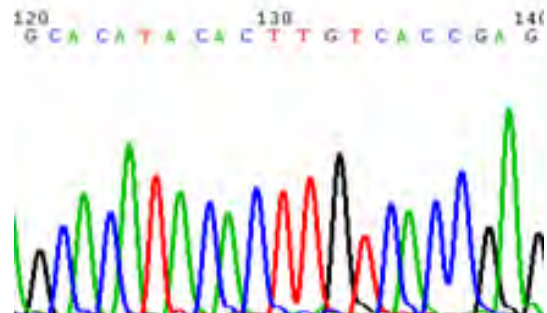
CODON 50

CAC= HISTIDINA

CGC= ARGININA



II.11, BLANCA E. ROSALES CASTRO (Afección bilateral)



CONTROL FEMENINO

XI.- DISCUSIÓN

El reconocimiento de mutaciones en los 4 exones y regiones intrónicas de los genes de la SDHD en pacientes con paragangliomas de cabeza y cuello no secretores ha sido básico para entender ciertos aspectos moleculares de la enfermedad. Este mecanismo biológico parece explicar el comportamiento del tumor y la etiología del mismo.

En el estudio que realizamos en los 4 exones y uniones intrón exón del gen *SDHD* no se logró encontrar mutación alguna que explicara la producción de los paragangliomas en los pacientes afectados.

En la paciente **VI.13** (hija de una afectada con paraganglioma carotideo bilateral) se encontró una variable la cual se reporta como “variable natural” Un cambio de Histidina por Arginina en el codón 50. El polimorfismo aumenta la susceptibilidad para el desarrollo de paraganglioma, carcinoma de tiroides y de mama; ya está asociado a Síndrome “Cowden- like”; se explica ya que la variable H50R causa aumento de la expresión de la manganeso superoxido dismutasa asociado a un aumento de especies reactivas de oxígeno aumentando la expresión de AKt y MAPK al doble ³². Dichas cinasas controlan la respuesta celular a señales externas entre las cuales se encuentran : factores de crecimiento, señales inductoras, y estado nutricional; estas cinasas tienen la capacidad de translocarse al núcleo y modular la acción de factores de transcripción que intervienen en crecimiento, división celular y angiogénesis. La evidencia muestra que la hiperactividad de AKt se encuentra en múltiples tipos de neoplasias ya que contiene un dominio que se une a PI3K , lo que ocasiona que sea secuestrada en membrana plasmática donde se activa por fosforilación. PI3K es degradado por PTEN, de ahí su asociación con la posibilidad de presentar Síndrome “Cowden Like”. Otra de las acciones de AKt que explica la producción de cáncer es que fosforila la Caspasa 9, bloqueando la vía intrínseca de la apoptosis³³.

A pesar de que la mutación causante del padecimiento no se encontró en ninguno de los cuatro exones del gen *SDHD*, sabemos que la probabilidad diagnóstica al secuenciar la *SDHB*, *SDHC* y *SDHD* es de 70 %² Por lo cual se podría continuar el estudio secuenciando los 6 exones de el gen *SDHC* que aunque no es el más afectado en el caso de para gangliomas de cabeza y cuello no secretores puede ser el causante de dicho padecimiento.

Cabe resaltar la variable que se halló en la paciente **VI.13**, que no se encontró en ningún otro miembro de la familia, llama la atención porque la paciente no presenta manifestaciones clínicas, lo que no descarta que en un futuro pueda desarrollar la enfermedad, pero los afectados no presentan dicha variable. Probablemente este polimorfismo es consecuencia de una mutación *de novo* en la paciente.

Las medidas que se sugieren en esta paciente son sobretodo del tipo preventivas en cuanto al diagnóstico temprano de posibles neoplasias ya antes descritas entre las que se encuentran los paragangliomas, cáncer de mama y tiroides, por lo que se sugiere tomar medidas higiénicas con respecto a estas patologías y un seguimiento más estrecho por parte de endocrinología y oncología.

XII.- APÉNDICE

1.- Secuencia del gen *SDHD*

EXON 1 62 bp(ESTANDARIZADO) 55 °C

Ggccattgttcgcctcaggctcgc**caccttccgacagctgtg**tttgcgcatgcg
cgacgggtgtgcaccgcctctcgacttccgggtcaccagcatttctcttccc
tgtttcttctcgtcgctcgtgggtgggaattgtcgcctaagtgggtccgggttg
tggatgacctgagccctCAGGAACGAG**ATGGCGGTTCTCTGGAGGCTGAGTGC**
CGTTTGCGGTGCCCTAGGAGGCCGAGgtgaggggtcttcccacc**ctgaggtgct**
tagcgtagcctccagccaggaaggggatggaagtgaggactcatctgccgggt
gggagatctcttgaggagaagaaaataccgaaatcacagcaatgaccactgtag
tctaggggtccagatgtttaccgaaggtatatttcaactgctg
257 PB

EXON 2 117 bp 57°C

Gcagatgttccctggctctaacttcacagtaaccccagtgaaatagatgctatc
ttcattttacaataagatgttatcccattttattgtaagtagcttacctat
ggtcatttagaaagttt**gtcagtcctgttaaaggag**aggttcttatgatcatcc
taatgactcttctcctcag**CTCTGTTGCTTCGAACTCCAGTGGTCAGACCTGCTC**
ATATCTCAGCATTCTTCAGGACCGACCTATCCAGAATGGTGTGGAGTGCAGC
ACATACACTTGTACCGAGCCACCATTgtatggtctctccatcgctgctgcttt
ctgggctctagccatctttaccttcactaatggatgcctttagcaggacttc
ctacctgtagggg**ggactcttgtgtccaactttgt**caaatgaagacctagttaa
cacctttgggcagacagtgccattatgggtgaaatgatgccattta
288 PB

EXON 3 145 bp (ESTANDARIZADO) 55 °C

Gccttcaaaaa**cagagatagcttctctcaact**actattttgatattttacttc
ctttgtactcagagttatatcctatatgtacactgcctgtcagtttgggttact
gtgtggcatatggtgaacatgaaagatgtgtgtttctcacatcaactttatga
atctggtcctttttgtag**CTGGCTCCAAGGCTGCATCTCTCCACTGGACTAGCG**
AGAGGGTTGTCAGTGTTTTGCTCCTGGGTCTGCTTCCGGCTGCTTATTTGAATC
CTTGCTCTGCGATGGACTATTCCCTGGCTGCAGCCCTCACTCTTCATGGTCACT
Ggcaagtatagcaattccaaatatagttgtctgctcagtttgggttggctgtgagc
ttgtcttatgtattata**tatgagggagaagttgattga**aatgccctaaatttgt
tgaaaactttaaaatataataaaaatatgtatatgcctagatttatatatctgc
ctgcctattcaatgtcttt

494 PB

EXON 4 989 bp (ESTANDARIZADO) 55° C

catacacacgcaaaaggctatacagaatcccctaagaagcaaacagtgacagt
ggagtggcaaatggagacattgcatttgaacttgacagattgtttttttgcagc
caagttatctgtatagtcttctaatttcactgtgggttttttattgatggtatga
ttttttctttttcttttagGGGCCTTGGACAAGTTGTTACTGACTATGTTTCATGG
GGATGCCTTGCAGAAAGCTGCCAAGGCAGGGCTTTTGGCACTTTCAGCTTTAAC
CTTTGCTGGGCTTTGCTATTTCAACTATCACGATGTGGGCATCTGCAAAGCTGT
TGCCATGCTGTGGAAGCTCTGACCTTTTTGACTTCATACTTTGAAGAATTGATG
TATGCCTCTTTGCCTCTGCTTTGTTCATGCCATTAAGCTCACAATAAGGAAGAAA
TAACAGATAAGTCCATTGGTGGACAGCCTTCTTCTTTAATCACAAGATTATTT
TCAGAATTTAATCTTTGAGGAAAAGGTTTGAGAGGAATTATATCTAAGTTGTGA
GACTGAGTTCTATATTCTGGTGAGTTAATGGGGTTGCCTCCCAGCTTCTTATAA
GACTCACAGTATAACTAAACATGATATATCAGCTTTTGCCTTTCAATTTATCAA
TCTCTTAAAGAGAATCCAACCTTTATTACGATTAGTATATGATCAAACCTTCCATA
TTTGCCTTGGGAATAATGGACAAAGGGAAATACTCTTAATTCATGAATAAAAAC
TTTGCAGAAAATTAGACAGTGTTT
AATTTTCGAAAACCTTCCCTCTCTAGACAGTAGATACCACCTACTGATGGTTACA
TATACTAGGGAAATTTTAAAATTAGGAAATGCTGATAGCTCATATTATAAATTT
CTAAATCCTAGGAAGAAACGCTTGGAGTGCTTCTGAATATACAGAAGTTCCATT
TAAGGGCAAGTTTCCCCTGTAGATGTATCAAATACTACCAACTGTAAATTGAGA
TTTAATTCCAAATGTATTCTACTTGTCTAAAACAATCTGTCCACAAATATAA
AACTATAAGTAATAAATTGTTATTTTCGCACAATGGGAATCTCTAATGTGAAAA
TGTATTCTATGAAAATAATTTTTTTTAAATAAAATGTTATATAATAAAAGTGTCT
TCTATGCTTTTatatattagctatcagtagtbtattcattagaattaggtgtc
cattgcatccacagcatgaaaacaaaattgggtttttttttttttttttttgagacgg
agtcgcactctgtcaccaggttggagtgcagtggcgtgatctcggagcactgc
aagctccgcctcccaggttcatgtcattc

561 PB

XIII .-GLOSARIO

Alelos

Versión específica de un gen que ocupa una localización determinada en el genoma . Se diferencia de otros alelos del mismo gen por ser distinta su secuencia de nucleótidos . En general uno de los estados alternativos de un mismo gen.

Amplificación de DNA

Proceso por el cual se generan copias de un fragmento de ADN, Puede producirse *in vivo* o realizarse *in vitro* mediante diversas técnicas.

Cromosoma

Elemento que existe en el núcleo de la célula en el momento de su división o mitosis, que contiene el material genético.

Enzima

Catalizador biológico, normalmente una proteína , que mediatiza y promueve un proceso químico sin ser ella misma alterada o destruida. Son catalizadores extremadamente eficientes y muy específicamente vinculados a reacciones particulares.

Gen

Secuencia de nucleótidos que codifica un producto funcional . Incluye regiones anteriores (5`no traducida) posteriores (3`no traducida) a la región codificante , así como secuencias interpuestas (intrones) entre exones. Unidad de transmisión hereditaria; ocupa un sitio determinado en los cromosomas llamados locus.

Genotipo

Conjunto de genes de un individuo que puede expresarse o no. La contribución genética de la descendencia. La constitución genética de un locus en particular. La constitución genética de un organismo.

Heterocigoto

Un individuo que ha recibido información genética diferente de cada uno de sus padres, para la unidad en cuestión. Tener dos alelos diferentes de un gen específico.

Homocigoto

Un individuo que ha recibido la misma información genética de cada uno de sus padres, para la unidad en cuestión. Tener dos alelos idénticos de un gen específico.

Kilodaltones

Es una pequeña unidad de masa usado para expresar masas atómicas y masas moleculares . Es definido como $\frac{1}{16}$ de la masa de un átomo de oxígeno.

Loci

El plural de locus.

Locus

En genética, punto de un cromosoma ocupado por un gen.

Multifactorial

Causado por interacción de múltiples genes y factores del medio ambiente.

Nervio de Arnorld

Nervio occipital mayor ; es la continuación del ramo dorsal de C₂ aunque también tiene un componente C₃. Emerge entre el atlas y el músculo oblicuo inferior de la cabeza, perfora el músculo esplenio de la cabeza y la aponeurosis del músculo trapecio e inerva la piel del occipucio, así como parte de los músculos de la nuca.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Amplificación enzimática de fragmentos de DNA localizado entre un par de iniciadores

Secuenciación

Secuenciación de DNA. Determinación del orden en el cual se disponen las bases de una molécula de DNA. Proceso mediante el cual se determina el orden de los nucleótidos o de los aminoácidos de una molécula de ácido nucléico o proteína según sea el caso.

Taq polimerasa

Una DNA polimerasa termoestable aislada de una bacteria utilizada en PCR

Tumores Cromafines

Término para cualquier (catecolaminas-secretor) neuroendocrino de células o tumores, independientemente de su ubicación. Cromafines se refiere a la de color marrón-negro que es el resultado de la oxidación y polimerización de las catecolaminas que figuran en las células / los tumores por sales de cromo (como el dicromato de potasio).

“Zellballen”

Patrón en que células pequeñas se agrupan en nidos y lóbulos, lo cual es característica distintiva de los paragangliomas

XIV.-REFERENCIAS

1. . Wayllace L (1992) Contribution á l' étude du corps carotidien et de ses tumeurs. Tesis de Doctorado Universidad Católica de Lovaina (Bélgica)
 2. **Niemann S, Muller U** 2000 Mutations in SDHC cause autosomal dominant paraganglioma, type 3. *Nat Genet* 26:268–270
 3. **Astuti D, Latif F, Dallol A, Dahia PL, Douglas F, George E, Skoldberg F, Husebye ES, Eng C, Maher ER** 2001 Gene mutations in the succinate dehydrogenase subunit SDHB cause susceptibility to familial pheochromocytoma and to familial paraganglioma. *Am J Hum Genet* 69:49–54
 4. **Koch CA, Vortmeyer AO, Zhuang Z, Brouwers FM, Pacak K** 2002 New insights into the genetics of familial chromaffin cell tumors. *Ann NY Acad Sci* 970:11–28
 5. **Benn DE, Gimenez-Roqueplo AP, Reilly JR, Bertherat J, Burgess J, Byth K, Croxson M, Dahia PL, Elston M, Gimm O, Henley D, Herman P, Murday V, Niccoli-Sire P, Pasiaka JL, Rohmer V, Tucker K, Jeunemaitre X, Marsh DJ, Plouin PF, Robinson BG** 2006 Clinical presentation and penetrance of pheochromocytoma/paraganglioma syndromes. *J Clin Endocrinol Metab* 91:827–836
 6. **Neumann HP, Pawlu C, Peczkowska M, Bausch B, McWhinney SR, Muresan M, Buchta M, Franke G, Klisch J, Bley TA, Hoegerle S, Boedeker CC, Opocher G, Schipper J, Januszewicz A, Eng C** 2004 Distinct clinical features of paraganglioma syndromes associated with SDHB and SDHD gene mutations. *JAMA* 292:943–951
 7. **Amar L, Bertherat J, Baudin E, Ajzenberg C, Bressac-de Paillerets B, Chabre O, Chamontin B, Delemer B, Giraud S, Murat A, Niccoli-Sire P, Richard S, Rohmer V, Sadoul JL, Strompf L, Schlumberger M, Bertagna X, Plouin PF, Jeunemaitre X, Gimenez-Roqueplo AP** 2005 Genetic testing in pheochromocytoma or functional paraganglioma. *J Clin Oncol* 23:8812–8818
 8. **Young AL, Baysal BE, Deb A, Young Jr WF** 2002 Familial malignant catecholamine-secreting paraganglioma with prolonged survival associated with mutation in the succinate dehydrogenase B gene. *J Clin Endocrinol Metab* 87:4101–4105
- . **Brouwers FM, Eisenhofer**
12. Hirawake, H.; Taniwaki, M.; Tamura, A.; Kojima, S.; Kita, K. :
Cytochrome b in human complex II (succinate-ubiquinone oxidoreductase): cDNA cloning of the components in liver mitochondria and chromosome assignment of the genes for the large (SDHC) and small (SDHD) subunits to 1q21 and 11q23. *Cytogenet. Cell Genet.* 79: 132-138, 1997.
PubMed ID : [9533030](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9533030/)

13. Aguiar, R. C. T.; Cox, G.; Pomeroy, S. L.; Dahia, P. L. M. :

Analysis of the SDHD gene the susceptibility gene for familial paraganglioma syndrome (PGL1), in pheochromocytomas. *J. Clin. Endocr. Metab.* 86: 2890-2894, 2001.
PubMed ID : [11397905](#)

14.- Gujrathi CS, Donald PJ. Current trends in the diagnosis and management of head and neck paragangliomas. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 2005; 13: 339-42

15.- Jimenez C, Cote G, Arnold A, Gagel RF. Should patients with apparently sporadic pheochromocytomas or paragangliomas be screened for hereditary syndromes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006; 91: 2851-8

16.-Young WF Jr. Paragangliomas: clinical overview. *Ann NY Acad Sci.* 2006; 1073: 21-9.

17.- DeLellis RA, Lloyd RV, Heitz PU, Eng C (eds) World Health Organization (2004) WHO Classification of Tumours, Pathology and Genetics of Tumours of Endocrine Organs. IARC Press, Lyon, Francia.

18.-Kimura N, Capella C, De Krijger RR, Thompson LDR, Lam KY, Komminoth P, Tischler AS, Young WF (2004a) Extra-adrenal sympathetic paraganglioma: Superior and inferior paraaortic. In: DeLellis RA, Lloyd RV, Heitz PU, Eng C (eds) World Health Organization Classification of Tumours, Tumours of Endocrine Organs. IARC Press, Lyon, Francia, pp 164-5.

19.- Gujrathi CS, Donald PJ. Current trends in the diagnosis and management of head and neck paragangliomas. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 2005; 13: 339-42.

20.- Baysal, B. E.; Ferrell, R. E.; Willett-Brozick, J. E.; Lawrence, E. C.; Myssiorek, D.; Bosch, A.; van der May, A.; Taschner, P. E. M.; Rubinstein, W. S.; Myers, E. N.; Richard, C. W., III; Cornelisse, C. J.; Devilee, P.; Devlin, B. :

21.-Mutations in SDHD, a mitochondrial complex II gene, in hereditary paraganglioma.
Science 287: 848-851, 2000.
PubMed ID

22.- Clinical Characteristics of Pheochromocytoma Patients With Germline Mutations in SDHD

Hilde Dannenberg, Francien H. van Nederveen, Mustaffa Abbou, Albert A. Verhofstad, Paul Komminoth, Ronald R. de Krijger, Winand N.M. Dinjens

Journal of Clinical Oncology, Vol 23, No 9 (March 20), 2005: pp. 1894-1901
© 2005 [American Society of Clinical Oncology](#).

23.-REVIEW Should Patients with Apparently Sporadic Pheochromocytomas or Paragangliomas be Screened for Hereditary Syndromes?

Camilo Jimenez, Gilbert Cote, Andrew Arnold, and Robert F. Gage¹ *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 91: 2851-2858

24.-Jimenez-Roqueplo AP, Favier J, Rustin P, Rieubland C, Crespin M. Mutations in the *SDHB* gene are associated with extra-adrenal and/or malignant pheochromocytomas. *Cancer Res*. 2003; 63: 5615–21. [[PubMed](#)]

25.-Van Nederveen FH, Dinjens WNM, Korpershoek E, De Krijger RR. The occurrence of *SDHB* gene mutations in pheochromocytoma. *Ann NY Acad Sci*. 2006; 1073: 177–82. [[PubMed](#)]

26.-Neumann HP, Pawlu C, Peczkowska M, Bausch B, McWhinney SR, Muresan M, Buchta M, Franke G, Klisch J, Bley TA, Hoegerle S, Boedeker CC, Opocher G, Schipper J, Januszewicz A, Eng C. European-American Paraganglioma Study Group; Distinct clinical features of paraganglioma syndromes associated with *SDHB* and *SDHD* gene mutations. *JAMA*. 2004; 292: 943–51. [[PubMed](#)]

27.-Benn DE, Jimenez-Roqueplo AP, Reilly JR, Bertherat J, Byth K, Croxson M, Dahia PL, Elston M, Gimm O, Henley D, Herman P, Murday V, Niccoli-Sire P, Pasiaka JL, Rohmer V, Tucker K, Jeunemaitre X, Marsh DJ, Plouin PF, Robinson BG. Clinical presentation and penetrance of pheochromocytoma/paraganglioma syndromes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006; 91: 827–36. [[PubMed](#)]

28.-Amar L, Bertherat J, Baudin E, Ajzenberg C, Bressac-de Paillerets B, Chabre O, Chamontin B, Delemer B, Giraud S, Murat A, Niccoli-Sire P, Richard S, Rohmer V, Sadoul JL, Strompf L, Schlumberger M, Bertagna X, Plouin PF, Jeunemaitre X, Jimenez-Roqueplo AP. Genetic testing in pheochromocytoma and functional paraganglioma. *J Clin Oncol*. 2005; 23: 8812–8. [[PubMed](#)]

29.-Ing C, Kiuru M, Fernandez MJ, Aaltonen LA. A Role for Mitochondrial Enzymes in Inherited Neoplasia and Beyond. *Nat Rev Cancer*. 2003; 3: 193–202. [[PubMed](#)]

30.-Lenders JWM, Eisenhofer G, Mannelli M, Pacak K. *Lancet*. 2005; 366: 665–75. [[PubMed](#)]

31.-Young WF Jr (2008) Endocrine hypertension. In: Kronenberg HM, Melmed S, Polonsky KS, Larsen PR (eds) *Williams Textbook of Endocrinology*, 11 ed. Saunders Elsevier, Philadelphia, PA, pp 505-37.

32 "Germline mutations and variants in the succinate dehydrogenase genes in Cowden and Cowden-like syndromes."

[33] "Alterations of the SDHD gene locus in midgut carcinoids, Merkel cell carcinomas, pheochromocytomas, and abdominal paragangliomas."

Kytoelae S., Nord B., Elder E.E., Carling T., Kjellman M., Cedermark B., Juhlin C., Hoeoeg A., Isola J., Larsson C.

Genes Chromosomes Cancer 34:325-332(2002) [PubMed: 12007193] [Abstract]

Cited for: INVOLVEMENT IN INTESTINAL CARCINOID TUMOR, VARIANTS SER-12 AND ARG-50.