



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

DETERMINACION DE MUTACIONES EN EL GEN VHL EN
PACIENTES CON DIAGNOSTICO CLINICO EN ENFERMEDAD
DE VON HIPPEL - LINDAU

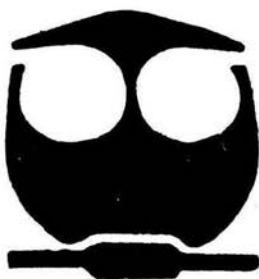
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

SONIA NAVA SALAZAR



MEXICO, D. F.



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA

2004



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.

Jurado asignado:

Presidente	Prof. Homero Hernández Montes
Vocal	Prof. Alicia Cervantes Peredo
Secretario	Prof. Astrid Rasmussen Almaraz
1er. Suplente	Prof. Jesús Fernando Montiel
2º. Suplente	Prof. Elpidio García Ramírez

Sitio en donde se desarrolló el tema: **Departamento de genética y biología molecular del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. Manuel Velasco Suárez**

Asesor del tema: M. en C. Astrid Rasmussen Almaraz

Supervisor técnico: Q.F.B. Petra Yescas Gómez

Sustentante: Sonia Nava Salazar





Este trabajo se realizó en el
Departamento de Genética y Biología Molecular del Instituto
Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco
Suárez"

*Gracias a todos los pacientes de von Hippel – Lindau
y familiares que donaron su sangre, sin ellos este trabajo
no se hubiera llevado a cabo.*

Agradecimientos

A DIOS por darme la oportunidad de vivir

A la Universidad Nacional Autónoma de México por abrirme sus puertas y por la formación académica y personal que he recibido dentro de ella

Al Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez" por dejarme realizar éste trabajo

A la Dra. Astrid Rasmussen Almaraz por confiarme la realización de ésta parte de su proyecto

A la Q.F.B. Petra Yescas Gómez por todo su tiempo, consejos y apoyo tanto en el campo profesional y en lo personal. Muchas gracias Petra eres una gran persona

A la Dra. Marisol López López por su apoyo para la realización del trabajo

A la Dra. Ma. Elisa Alonso Vilatela por dejarme realizar este trabajo en el departamento

Al Dr. Samuel Canizares por su apoyo y consejos en la realización de éste trabajo.

A mis amigos de la carrera: Blanca, Diana, Tere, Samia, Jonathan, Fernando, Rafael y Rubén, por todos los momentos que pasamos y por que a lado de ustedes todos los obstáculos fueron mas fáciles de saltar.

Al equipo de el departamento de genética: Lety, Chayito, Adriana, Jorge, Quique, Aurelio, por que en ustedes encontré no solo a unos compañeros de trabajo, si no a grandes amigos, que hicieron que el trabajo fuera pasadero; gracias por su tiempo, consejos, apoyo y sobre todo muchas risas, espero nunca perder su amistad.

A mis compañeros de tesis y amigos: Daniel, Adrián, Miguel, Memo y Manolo, gracias por ser como son, y por todos los momentos que compartimos.

Dedicatorias

A mi Padre

Por que a ti te debo lo que soy
Por que mi único anhelo es hacerte sentir orgulloso de mi
Gracias por todo tu cariño, paciencia, fortaleza
y apoyo en todos los momentos de mi vida
Gracias por ser mi amigo
Gracias Patito

Ustedes me han enseñado a disfrutar nuevamente
los pequeños detalles de la vida, y que con una sonrisa
y un beso el mundo puede ser un lugar mejor
Gracias hermanitos: Juan y Sofía

Madre es el nombre de Dios en el
Corazón y en los labios de los niños
William Thackeray
Gracias Micha

Sin la amistad, el
Mundo es un desierto.
Francis Bacon
Gracias Bota

La luz negra
es la oscuridad del día

Determinación de mutaciones en el gen *VHL* en pacientes con diagnóstico clínico en enfermedad de von Hippel - Lindau

Índice General

Tema	Página
Índice de Figuras	I
Índice de tablas	II
Índice de gráficas	III
Abreviaturas	IV
Introducción	1
1. Antecedentes	
1.1. Cáncer	3
1.1.1. Oncogenes	5
1.1.2. Genes supresores de tumores	6
1.1.2.1. Hipótesis de Knudson	7
1.1.3. Genes de reparación	8
1.1.4. Predisposición hereditaria al cáncer	9
1.2. Enfermedad de von Hippel – Lindau	
1.2.1. Definición	11
1.2.2. Historia	12
1.2.3. Cuadro clínico	14
1.2.4. Clasificación de la enfermedad de von Hippel – Lindau	17
1.2.5. Criterios de diagnóstico clínico	17
1.2.6. Tratamiento	19
1.3. Genética de la enfermedad de von Hippel – Lindau	
1.3.1. Anatomía del gen <i>VHL</i>	20
1.3.2. Proteína VHL (pVHL)	21
1.3.3. Distribución de mutaciones <i>VHL</i> en células germinales	23
1.3.4. Mutaciones somáticas en tumores de VHL	26
1.3.5. Correlación genotipo – fenotipo	27
1.3.6. Proteínas asociadas a la pVHL	29
1.3.6.1. Complejo VCB	29
1.3.6.2. Complejo pVHL/elongina/Cul2	32
1.3.6.3. pVHL y carcinogénesis.	33
1.3.6.4. Otras proteínas asociadas a la pVHL	34
a. Fibronectina	36
b. Factor de transcripción Sp1	36
c. PKC	37
1.3.7. Perspectivas	37

2. Objetivos	
2.1. Objetivos generales	38
2.2. Objetivos particulares	38
3. Desarrollo experimental y resultados	
3.1. Diagrama de flujo	39
3.2. Criterios de inclusión y exclusión de los pacientes en el estudio	40
3.3. Obtención de muestras de sangre periférica	41
3.4. Extracción de DNA	
3.4.1. Técnica de sales fenol/ cloroformo.	41
3.4.2. Extracción por columna Quiagen	42
3.5. Cuantificación del DNA	
3.5.1. Espectrofotometría	42
3.5.2. Electroforesis	43
3.6. Reacción en cadena de la polimerasa	44
3.7. Purificación de los productos de PCR	50
3.8. Secuenciación	51
4. Discusión	56
5. Conclusiones	64
6. Parte Experimental	
6.1. Equipos	65
6.2. Material de laboratorio y cristalería diversa	65
6.3. Material	66
6.4. Reactivos	66
6.5. Metodología	
6.5.1. Toma de muestras	68
6.5.2. Extracción de DNA	68
6.5.2.1. Técnica de sales	68
6.5.2.2. Técnica de columna de Qiagen	70
6.5.3. Cuantificación del DNA	
6.5.3.1. Espectrofotometría	70
6.5.3.2. Electroforesis	71
6.5.4. Reacción en cadena de la polimerasa	71
6.5.5. Purificación de los productos de PCR	72
6.5.6. Secuenciación	
6.5.6.1. Reacción de secuenciación	73
6.5.6.2. Purificación de la reacción de secuenciación.	73

7. Apéndice	
A. Carta de consentimiento	75
B. Preparación de reactivos	77
C. Secuencia del cDNA del gen <i>VHL</i>	81
8. Bibliografía	84

Índice de Figuras

Figura		Página
1	Protooncogenes y genes supresores de tumores	5
2	Representación esquemática del modelo de Knudson en la tumorigénesis del retinoblastoma	8
3	Predisposición hereditaria al cáncer	10
4	Enfermedad de von Hippel - Lindau	11
5	Hemangioblastoma de cerebelo	15
6	Angioma de retina	15
7	Quistes pancreáticos en enfermedad VHL	16
8	Esquema del brazo corto del cromosoma 3 con localización del gen <i>VHL</i> en la región 3p25-26	20
9	Función y estructura de la proteína VHL	22
10	Distribución de mutaciones en el gen VHL en carcinoma renal esporádico	26
11	Complejo VCB	30
12	Complejo VCB-Cul2 con actividad de ligasa E3 de ubiquitina	33
13	Modelo del papel de la pVHL en la degradación de HIF-1 α en el proteosoma mediada por ubiquitinación	35
14	DNA extraído por la técnicas de sales fenol - cloroformo	43
15	DNA extraído por la técnica de columna de Qiagen	44
16	Ubicación de los oligonucleótidos utilizados para amplificar el gen <i>VHL</i>	45
17	Exón 1-B: Prueba realizada para establecer las condiciones de concentración óptima de oligonucleótido	46
18	Tamaño de los productos de PCR obtenidos para cada exón	50
19	Ejemplo de productos de PCR purificados	51
20	Exón 1. Delección del triplete TCT a partir del nucleótido 440	53
21	Exón 1. Inserción de una adenina en el nucleótido 512	54
22	Árbol genealógico del paciente 3 con la mutación delPhe76	61
23	Árbol genealógico del paciente 17 con la mutación 512insA	62
24	Árbol genealógico del paciente 17 con la mutación 512insA	63

Índice de Tablas

Tabla		Página
1	Frecuencia de neoplasias asociadas a VHL	14
2	Clasificación de la enfermedad VHL	17
3	Métodos de detección para los distintos tumores que conforman la enfermedad	18
4	Mutaciones en células germinales en el gen supresor de tumores <i>VHL</i>	24
5	Características clínicas de los pacientes estudiados	40
6	Exón 1. Concentración óptima de los oligonucleótidos y tamaño del producto de PCR	47
7	Condiciones de PCR para el exón 1	47
8	Programa de PCR para el exón 1	47
9	Exón 2. Concentración óptima de los oligonucleótidos y tamaño del producto de PCR	48
10	Condiciones de PCR para el exón 2	48
11	Programa de PCR para el exón 2	48
12	Exón 3. Concentración óptima de los oligonucleótidos y tamaño del producto de PCR	49
13	Condiciones de PCR para el exón 3	49
14	Programa de PCR para el exón 3	49
15	Condiciones de secuenciación	52
16	Programa de secuenciación	52

Índice de Gráficas

Gráfica		Página
1	Distribución de los tipos de mutaciones en familias VHL	28
2	Distribución de los tipos de mutaciones en familias VHL con feocromocitoma	28
3	Distribución de los tipos de mutaciones en familias VHL sin feocromocitoma	28

Abreviaturas

λ	Longitud de onda
μL	Microlitro
μM	Micromolar
ACD	Ácido Cítrico - Dextrosa
ARNT	Transportador nuclear del receptor aril hidrocarbano
cADN	ADN complementario
CCCR	Carcinoma de células claras de riñón
C	Celsius
c.b.p.	Cuanto baste para
Del.	Delección
D.O.	Densidad óptica
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTP's	Desoxirribonucleótidos trifosfatados
EPO	Hormona eritropoyetina
Gst	Genes supresores de tumores
HB	Hemangioblastomas
HIF	Factor inducible por hipoxia
Ins.	Inserción
LOH	Pérdida de heterocigosidad (siglas del inglés)
M	Marcador de peso molecular
M	Molar (mol/l)
ml	Mililitro
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros
ODD	Degradación dependiente de oxígeno
pb	Pares de base
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa

PKC	Proteína cinasa C
PM	Peso molecular
pVHL	Proteína VHL
r.p.m.	Revoluciones por minuto
RCLB	Amortiguador para lisis de células rojas
RE	Reticulo endoplásmico
RMN	Resonancia magnética nuclear
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SIII	Complejo elongina
SNC	Sistema nervioso central
TBE	Tris - boratos – EDTA
TC	Tomografía computarizada
TGF α	Factor de crecimiento tumoral α
Tm	Temperatura media
U	Unidad
UTR	Región sin traducir
U.V.	Luz ultravioleta
VCB	Complejo pVHL-elongina C-elongina B
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular
VHL	von Hippel – Lindau

Aminoácidos

Alanina	Ala
Arginina	Arg
Asparagina	Ans
Cisteína	Cys
Fenilalanina	Phe
Glicina	Gly
Glutamina	Glu
Histidina	His
Isoleucina	Ile
Leucina	Leu
Lisina	Lys
Metionina	Met
Prolina	Pro
Serina	Ser
Tirosina	Tyr
Treonina	Thr
Trptófano	Trp
Valina	Val
Ácido Aspártico	Asp
Ácido glutámico	Glu

Introducción

Tras el retroceso de las enfermedades infecciosas, el cáncer se ha convertido en uno de los principales problemas de salud en la humanidad, especialmente en países desarrollados, donde es una de las causas más frecuente de muerte. A pesar de la existencia de tratamientos efectivos en ciertos tipos de cáncer, las cifras globales de mortalidad no han variado mucho en los últimos 30 años.

El cáncer ocurre por un descontrol en el crecimiento normal de las células. En los tejidos normales se mantiene un balance en las tasas relacionadas con el crecimiento de células nuevas y con la muerte de las células viejas; en el cáncer, este equilibrio se altera.

El estudio de los síndromes de cáncer familiar ha facilitado la identificación de los genes supresores de tumores, los cuales cuando se encuentran mutados en células germinales, confieren un incremento al riesgo de desarrollar determinados tipos de cáncer.

El clásico ejemplo de esto es el modelo de tumorigenesis del gen del retinoblastoma (*RBI*). La mutación con pérdida de función en ambos alelos del gen *RBI* es una característica tanto de los casos familiares de retinoblastoma como en los tumores esporádicos; pero en los casos familiares un alelo del gen *RBI* esta mutado en células germinales y el otro alelo en células somáticas, mientras que ambos alelos se encuentran mutados en células somáticas en los tumores esporádicos.

El gen supresor de tumores *VHL* fue caracterizado en 1993 en un estudio con 200 familias con cáncer renal; cuando este gen se encuentra mutado en la línea germinal da lugar a una predisposición a la enfermedad von Hippel – Lindau o VHL.

El VHL es un síndrome de cáncer familiar autosómico dominante. Se caracteriza clínicamente por tumores vasculares, incluyendo hemangioblastomas de retina, cerebelo y médula espinal, carcinoma de células renales, feocromocitomas y tumores pancreáticos. El cáncer renal hereditario metastásico es el más común en esta enfermedad y constituye una de las causas más frecuentes de muerte en los grupos familiares aquejados. La expectativa de vida en individuos afectados es menor a los 50 años; sin acción preventiva, el cáncer renal aparece en los pacientes con VHL a una edad promedio de 42 años.

En la literatura se han descrito mas de 200 mutaciones individuales y actualmente se estudian otras mutaciones específicas que puedan ser responsables de esta enfermedad.

La implementación del diagnóstico molecular de la enfermedad de von Hippel-Lindau en población mexicana permitirá la identificación oportuna de portadores asintomáticos. Esto es relevante porque se optimizara la vigilancia de los individuos en riesgo –reduciendo morbi-mortalidad-, a la vez que evita el uso de procedimientos costosos e invasivos en personas sin la mutación.

1.1. Cáncer

El cáncer es una familia de enfermedades caracterizadas por la proliferación celular descontrolada con formación de tumores. En México, a partir de 1989, ésta enfermedad ocupa la segunda causa de muerte, siendo los tipos más frecuentes el de pulmón, estómago y cuello uterino. Desde entonces el cáncer es responsable del 12.0 % de las defunciones que se registran en el país; de las cuales el 47.8% corresponden al sexo masculino y el 52.2 % al femenino (Base de datos del Instituto Nacional de Cancerología).

Los tumores originados por la proliferación celular descontrolada pueden ser benignos o malignos. Los benignos como las verrugas y los lunares, se desarrollan por simple expansión y a menudo permanecen encapsulados por una capa de tejido conjuntivo. Los tumores benignos pocas veces representan una amenaza para la vida, aunque sí se presentan en espacios cerrados como el cerebro o secretan grandes cantidades de ciertas hormonas, pueden resultar fatales. Los tumores malignos se desarrollan de modo invasor, produciendo células que colonizan nuevas zonas del organismo, mediante un proceso denominado metástasis (Voet, D. y Voet, J., 1992).

Los cánceres se clasifican según el tejido y el tipo celular. Los carcinomas provienen de tejidos derivados del ectodermo o el endodermo, los sarcomas provienen de tejidos derivados del mesodermo y las leucemias y linfomas, aunque son también derivadas del mesodermo se clasifican por separado porque su tratamiento clínico es diferente, y afectan a células del sistema hematopoyético (Cotran y cols, 1999).

Para que un cáncer se desarrolle, es necesaria la acumulación de varias mutaciones génicas en células somáticas (todas las células que no son reproductoras); también existen las denominadas "mutaciones en células germinales" que se transmiten a los gametos (ovocito o espermatozoide) y que por lo tanto son susceptibles de ser heredadas a generaciones sucesivas (Gardner y cols., 1998).

Prácticamente todos los cánceres son monoclonales a nivel celular, es decir, que proceden de una única célula precursora. La progenie de la célula transformada tiende a incrementar su malignidad, por el aumento en el número de alteraciones citogenéticas, elevación de la tasa de crecimiento celular y tendencia a la metástasis. La aceleración de la proliferación permite que se acumulen

I. Antecedentes

nuevas mutaciones somáticas adicionales por errores en la reparación, esto torna a las células más agresivas y genera una proliferación más rápida, pudiendo volverse resistentes al tratamiento (Brandan y cols, 2002).

Las propiedades de las células neoplásicas son diferentes de las que poseen las células normales de las que derivan. Las membranas plasmáticas de las células malignas tienen un carácter más fluido que las normales y presentan relaciones alteradas de muchos de los componentes de su superficie celular, como glucoproteínas y glucolípidos. Internamente, el citoesqueleto de las células cancerosas está menos organizado que el de las normales (Voet, D. y Voet, J., 1992).

Los tumores malignos producen también metaloproteinasas y colagenasas que facilitan la invasión del tejido adyacente. La digestión enzimática del colágeno y la membrana basal, permite la invasión de capilares y vasos linfáticos. El ingreso de las células tumorales a la circulación permite su implantación en sitios distantes del tumor primario, originando metástasis. Algunos tipos de tumor tienen preferencia por un tejido, pero no exclusividad; por ejemplo: el cáncer de mama en hígado y hueso (Darnell y cols, 2002).

La transformación neoplásica viene acompañada por una serie de cambios complejos, estructurales, bioquímicos y genéticos. Los genes relacionados con el cáncer pueden ser: oncogenes, cuyas mutaciones dan lugar a una actividad alterada con un incremento en la expresión de su correspondiente proteína, que a su vez promueve proliferación celular; genes supresores tumorales, cuyas mutaciones producen una pérdida en la capacidad de expresión de la proteína y genes de reparación del DNA, los cuales se encargan de eliminar los nucleótidos incorporados incorrectamente durante la duplicación selectivamente y al estar dañados, la célula afectada puede mostrar una tasa elevada anormal de mutaciones, lo que a su vez incrementa el riesgo de malignización (Albert y cols, 1999) (Figura 1).

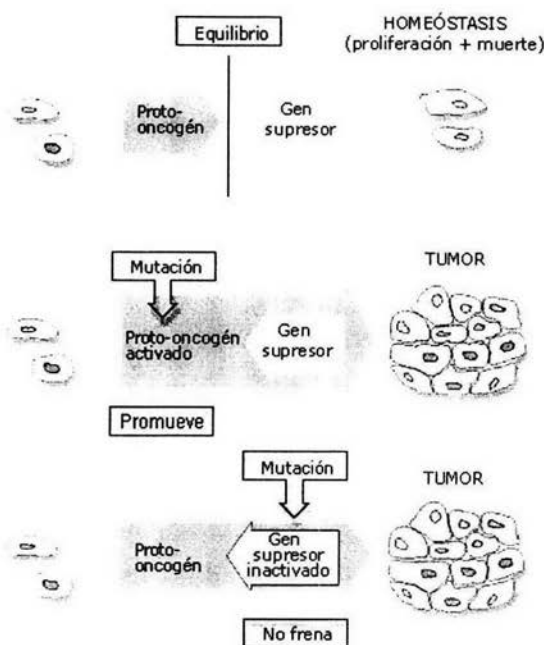


Figura 1. Protooncogenes y genes supresores de tumores.
(Tomada y modificada de <http://www.cnio.es/es/cancer/cap201.htm>)

1.1.1. Oncogenes

Se denomina oncogen a un gen que promueve la proliferación celular descontrolada. Los oncogenes derivan de los proto-oncogenes, genes celulares que promueven el crecimiento y la diferenciación normal de las células, y que se encuentran estrictamente regulados. El proto-oncogen se convierte en oncogen cuando sufre mutaciones que le confieren una ganancia de función, la activación de un oncogen puede contribuir al desarrollo de cáncer por alteraciones en los procesos de proliferación celular y por el bloqueo de la senescencia y muerte celulares (Albert y cols, 1999).

Esta activación es el resultado de una o varias mutaciones que pueden ser causadas por agentes físicos, químicos o biológicos. Los agentes que inducen mutación sobre el DNA se llaman mutágenos. Cuando estas mutaciones conllevan oncogénesis y transformación maligna hablamos de carcinógenos. Todos los mutágenos son carcinógenos pero no todos los carcinógenos son mutágenos (DeVita y cols, 1999).

Las alteraciones genéticas que dan lugar a sobreexpresión de un oncogen son (Voet, D. y Voet, J., 1992):

Mutagénesis por inserción: La expresión inoportuna de un oncogen puede ser consecuencia de la inserción de un genoma viral en el genoma celular, de tal forma que el protooncogen se encuentra bajo el control transcripcional de la secuencia reguladora del virus.

Traslocaciones cromosómicas: son intercambios de material genético entre diferentes cromosomas, de manera que las proteínas codificadas son "quimeras" o mixtas entre las dos secuencias codificantes intercambiadas. Activación por translocación del proto-oncogen a un sitio de transcripción activa.

Amplificación Génica: Es la repetición de secuencias de oncogenes presentes en un número de copias mucho mayor al normal.

Mutaciones Puntuales: Se conocen muchos casos en que mutaciones puntuales determinan la expresión desregulada del oncogen, alterando los procesos normales de proliferación y muerte de las células.

1.1.2. Genes supresores de tumores

Son genes que regulan la proliferación celular, las funciones biológicas normales de los genes supresores de tumores son:

- Moléculas de transducción de señales de proliferación o muerte celular
- Factores de Transcripción
- Proteínas que participan en el control del progreso del ciclo celular
- Proteínas que participan en la regulación de la Apoptosis.

A nivel celular tiene un comportamiento recesivo, ya que ambos alelos del gen necesitan inactivarse para dar lugar a enfermedad. Su existencia fue demostrada por Knudson.

1.1.2.1. Hipótesis de Knudson

Knudson propuso una teoría para explicar la herencia del retinoblastoma, la cual fue posteriormente confirmada experimentalmente y hoy es conocida universalmente como la *hipótesis de Knudson*.

Knudson propuso que en el caso del retinoblastoma hereditario, una de las mutaciones se heredaría de las células germinales de un progenitor. En este supuesto, la probabilidad de mutación en el segundo alelo del gen es alta en una o más células por lo que se desarrollarán uno o más tumores. En los casos esporádicos, las dos mutaciones en ambos alelos del gen deben ocurrir al azar en una misma célula (somática) (Knudson, A.G. y cols, 1971). Figura 2.

La hipótesis de Knudson se confirmó tras la identificación del gen del retinoblastoma en el cromosoma 13 (*RBI*) y la demostración de que en el tejido tumoral del retinoblastoma los dos alelos del gen *RBI* estaban inactivados por una mutación (Fung, Y.K. y cols.; 1987).

Según lo expuesto anteriormente, el alelo localizado en el cromosoma que lleva el gen *RBI* normal podría desaparecer en una célula del tumor por diversos mecanismos, proceso que se ha denominado genéricamente "**pérdida de heterocigosidad**" (LOH del inglés Loss Of Heterozygosity), que puede ser detectada por las técnicas moleculares del Southern blot o por PCR, comparando el DNA silvestre de un paciente con retinoblastoma con el DNA procedente de las células tumorales (López-Veiga, A.; 2000).

Tras la identificación del gen *RBI*, se empleó la misma estrategia para tratar de identificar genes responsables de otros tipos de cáncer familiar.

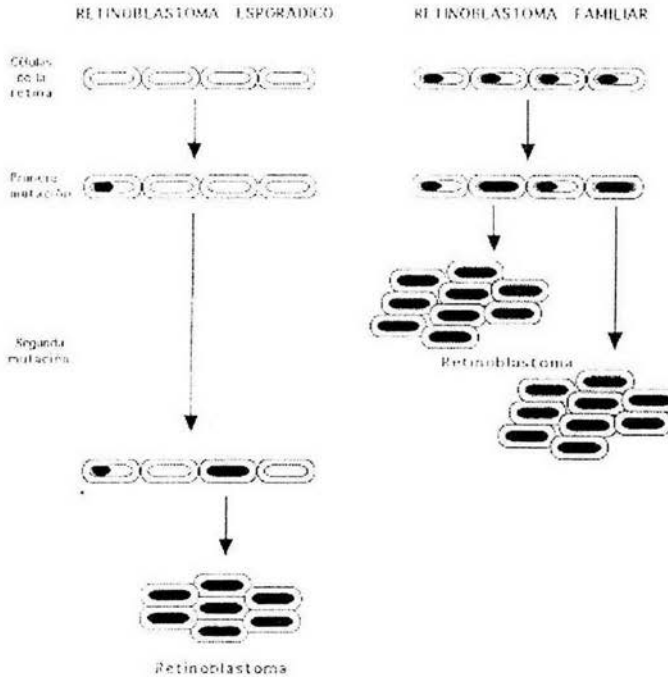


Figura 2. Representación esquemática del modelo de Knudson en la tumorigénesis de retinoblastoma.

A la izquierda, la retina normal tiene células con 2 alelos normales del gen *RBI* (núcleo blanco). Cuando se produce (raramente) una mutación somática aparecen células con una copia mutada del gen (primera mutación) (núcleo mitad-negro). Si se produce una segunda mutación en una de las células que ya tenían una copia anómala del *RBI* (núcleo negro), el resultado es la aparición de un retinoblastoma de tipo esporádico. A la derecha, en las formas de retinoblastoma familiar (hereditario), las células de la retina tienen ya una primera mutación constitucional (núcleo mitad-negro) que inactiva una copia del gen *RBI*. Cuando esto ocurre, sólo es necesaria una mutación para que aparezca el tumor. (Tomada y modificada de <http://www.opolanco.es/Apat/boletin9/oncogene.html>)

1.1.3. Genes de reparación

Estos genes tienen la función de corregir los errores producidos en los procesos de replicación y transcripción de DNA o el daño causado por agentes exógenos. La reparación de los daños requiere la acción coordinada de varias proteínas, incluyendo aquellas que reconocen la lesión, que eliminan una parte de la cadena que contiene la lesión, y que sustituyen el segmento equivocado con nucleótidos complementarios. Si estos genes fallan, las lesiones del DNA no pueden ser reparadas y permiten un cambio permanente en el DNA, a lo que se le denomina mutación. Esta mutación puede desencadenar una proliferación celular descontrolada si se localiza en secuencias codificadoras o reguladoras vitales para el organismo. (Karp, 1999; Voet y Voet, 1992).

1.1.4. Predisposición hereditaria al cáncer

Se sabe que la mayoría de los cánceres humanos no siguen un patrón de herencia mendeliano, aunque muchos de ellos tienen agregación familiar. Numerosos estudios han demostrado que los familiares más próximos al paciente afectado tienen un mayor riesgo de desarrollar el mismo tipo de cáncer. Existen componentes ambientales, como el tabaco en el cáncer de pulmón, que también influyen en su aparición, por lo que el mejor modelo para explicar el origen del cáncer es el llamado multifactorial, en el que los factores ambientales y genéticos se unen contribuyendo al riesgo de padecerlo.

Alrededor del 5-10% de los cánceres más frecuentes se acumulan en determinadas familias y son producto de lo que se denomina "Síndrome de cáncer familiar". Estos síndromes se han logrado estudiar a partir de los casos índice, los cuales son los primeros que acuden a consulta solicitando diagnóstico y a partir de ellos se estudia al resto de la familia. Por lo general los síndromes de cáncer familiar son debido a mutaciones en genes supresores de tumores, que se comportan como genes recesivos a nivel celular, pero que se transmiten de forma dominante en las familias afectadas; existe una excepción, el caso de la neoplasia endocrina múltiple tipo 2 en la cual es un oncogen (*RET* y *MET*) mutado el que causa el síndrome familiar (Mulligan y cols, 1993; Donis-Keller y cols, 1993).

Los familiares de los afectados pueden llegar a tener un riesgo del 30-40% de padecer cierto tipo de cáncer a lo largo de su vida. La predisposición en estas familias se debe generalmente al efecto de un gen hereditario dominante, lo que implica que un descendiente de un progenitor afectado tiene un riesgo del 50% de heredar la predisposición (Figura 3) y el desarrollo o no del padecimiento dependerá de la presencia de factores desencadenantes. Por lo tanto la probabilidad de que un determinado gen de lugar a la aparición de cáncer puede variar en una misma familia o entre familias diferentes y dependerá también de la edad del paciente. El riesgo de un individuo determinado debe contabilizarse a lo largo de muchos años tomando en cuenta que algunos portadores del gen mutado pueden no desarrollar cáncer (Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, 2003).

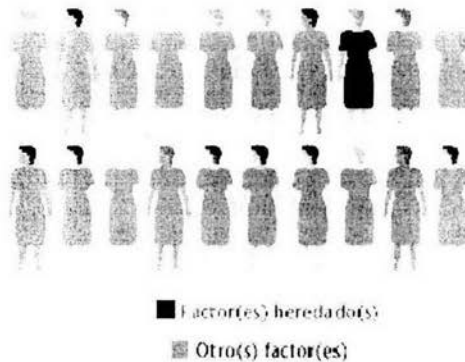


Figura 3. Predisposición hereditaria al cáncer

El cáncer es considerada una enfermedad multifactorial, en la que, el factor genético forma parte de este grupo complejo de factores

(Tomado y modificado de: <http://pressz.nci.nih.gov/sciencebehind/cancersp/cancersp36.htm>)

Asimismo, existen otros genes predisponentes comunes que tienen un menor efecto sobre la aparición de cáncer, por lo que un portador de una mutación en dicho gen tendría un riesgo menor, quizá alrededor del 10% de desarrollar la enfermedad (DeVita y cols, 1999).

1.2. Enfermedad de von Hippel – Lindau

1.2.1. Definición.

La enfermedad von Hippel – Lindau o VHL es un síndrome de cáncer familiar autosómico dominante. Se caracteriza clínicamente por tumores vasculares, incluyendo hemangioblastomas de retina, cerebelo y médula espinal, carcinoma de células renales, feocromocitomas y tumores pancreáticos. (Figura 4).

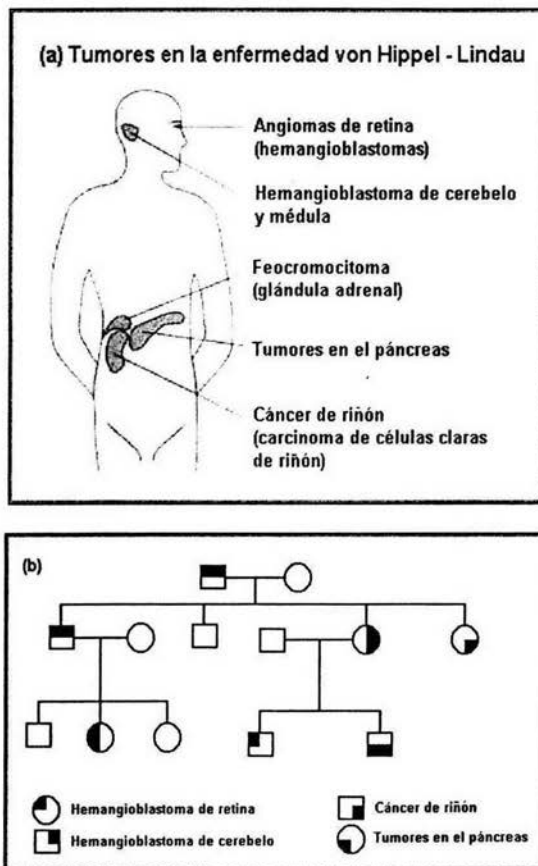


Figura 4. Enfermedad von Hippel – Lindau

(a) Lesiones más frecuentes de la enfermedad

(b) Familia VHL con herencia autosómica dominante y expresividad variable.

(Tomada y modificada de Kaelin, W.G.; 1998)

1.2.2. Historia

En 1904, Eugene von Hippel descubrió que los angiomas de retina eran hereditarios, hallazgos confirmados posteriormente por Cushing, Bailey y Collins (Cushing y Bailey, 1928; Collins, 1894). Arvin Lindau fue el descubridor de la relación entre los angiomas de retina y las lesiones en el sistema nervioso central, y Cushing propuso denominar a la enfermedad “Enfermedad de Lindau”. El término “von Hippel – Lindau” fue acuñado en 1964 por Melmon y Rosen quienes propusieron la definición diagnóstica vigente hasta la actualidad: un hemangioblastoma asociado con un tumor visceral típico, o un hemangioblastoma o tumor característico vinculado con una historia familiar de VHL. A esto se agrega la presencia eventual, peligrosa y altamente letal de feocromocitomas.

Los avances de la biología molecular, permitieron localizar en el genoma el *locus* responsable del padecimiento. El primer indicio de localización del gen *VHL* apareció en 1979 con la descripción de una familia con cáncer renal hereditario, en la que 10 miembros de tres generaciones consecutivas, desarrollaron cáncer. Los pacientes sintomáticos eran el probando y tres parientes y por medio de estudios detallados se detectaron a 3 miembros asintomáticos. El cáncer en esta familia era de inicio temprano, en ambos riñones y en diversos sitios, en comparación con los cánceres no familiares. Se realizó cariotipo a 22 adultos de la familia y 10 miembros portaban una translocación recíproca balanceada entre el cromosoma 3 y 8. Esta translocación fue detectada en los 5 miembros vivos que presentaban cáncer renal; y en 3 de 5 personas fallecidas a causa del cáncer. A partir de éste estudio, se propuso que una mutación en un gen o genes localizados en los cromosomas 3 u 8, fueron los factores predisponentes a cáncer renal familiar (Cohen y cols, 1979).

Seizinger y col. en 1988, reportaron que el gen *VHL* está ligado al *locus* que codifica para el homólogo humano del oncogén *RAF1*, el cual se localiza en el cromosoma 3p25. Por medio de análisis de ligamiento genético con marcadores polimórficos de DNA, mapearon una región vecina a *RAF1*. Éstos resultados establecieron claramente que el defecto causante de la enfermedad VHL se localiza en el brazo corto del cromosoma 3, y se excluyó al gen *RAF1* como causante de la enfermedad de VHL a pesar de que cosegrega con ésta.

Latif y cols. refinaron la región crítica del gen *VHL* en 1992 con sondas de DNA que hibridaban específicamente en posiciones genómicas muy vecinas al gen *VHL* en el brazo corto del cromosoma

3 permitieron, por primera vez, la identificación de pacientes con VHL antes de la formación de tumores. En 1993 éste grupo de investigadores, establecieron un mapa físico de la región por electroforesis en gel de campos pulsados y encontraron una delección en tres pacientes con VHL sin parentesco especulando que esta delección interrumpía el gen *VHL*. A partir de esto, buscaron la secuencia deletada en bibliotecas de DNA complementario (cDNA) de secuencias conservadas y encontraron dos clonas como posibles genes candidatos denominadas g6 y g7. Se descartó la clona g6 por que no se encontró alterada en 120 pacientes con VHL y porque presentaba una hibridación cruzada con un locus del cromosoma X (Latif y cols, 1993).

La clona g7 representó un fuerte candidato, por lo que se estudió el patrón de expresión por la técnica de hibridación Northern, en donde encontraron dos transcritos, uno de 6 y otro de 6.5 Kb, ambos se expresaban de manera tejido - específico, y se desarrollaban de modo selectivo. Estos dos transcritos representaban dos formas alternativas de corte y empalme, ya que se demostró que ambos transcritos eran codificados por un solo gen. Por medio de la técnica de Southern demostraron que g7 es una secuencia altamente conservada, lo cual sugirió que g7 codifica para un gen con una función celular fundamental, en este caso, como un posible gen supresor tumoral. Posteriormente observaron que esta clona se inactivaba por mutaciones en 221 pacientes con VHL sin parentesco (Latif y cols, 1993).

Por medio de SSCP (siglas en inglés “Single Strand – Conformational Polymorphism”) y RT-PCR (siglas en inglés “Reverse Transcription - PCR”) amplificaron cDNA de células de carcinoma de células renales, donde encontraron mutaciones que daban lugar presuntamente a proteínas truncadas por delecciones. Estos resultados llegaron a la conclusión de que g7 era el gen *VHL* y delimitaron la región en el cromosoma 3p25-26. Este gen tiene las características de un gen supresor tumoral, que responde al modelo de Knudson definido en 1971.

1.2.3. Cuadro Clínico

La incidencia estimada en varias poblaciones de la enfermedad VHL es de 1:36 000 a 1:45 000 nacidos vivos (Friedrich, C.A., 1999; Linehan, M.W. y cols, 1995; Kondo, K. y Kaelin, W.G., 2001). No se han realizado estudios similares en población latinoamericana.

La expresividad clínica de la enfermedad VHL es muy heterogénea. Cada familia afectada puede presentar diferentes manifestaciones de la enfermedad, según los distintos tipos y localizaciones de las mutaciones en el gen. El 80% de las lesiones son clínicamente aparentes antes de los 40 años (Neuman, H.P., 1987) y a los 50 años el 95% de los afectados ya ha desarrollado una o más alteraciones. A pesar de tratarse de un síndrome multitumoral, en algunas series, la mitad de los afectados presentaba alteración en un solo órgano (Neuman, H.P. y cols, 1991).

La manifestación inicial mas frecuente son los angiomas de retina y los hemangioblastomas de cerebelo. (Tabla 1)

Tabla 1. Frecuencia de neoplasia asociadas a VHL.

Lesión	Frecuencia ¹ (%)	Frecuencia ² (%)	Edad promedio de inicio (años)	Rango (años)
Angioma de retina	59	57	25.4	4 - 68
Hemangioblastoma de cerebelo	59	55	29.0	13 - 61
Hemangioblastoma de médula espinal	13	14	33.9	11 - 60
Carcinoma de células renales	28	24	44.0	23 - 68
Feocromocitoma	7	19	20.2	12 - 58

1. n= 152 (Maher y cols., 1990)

2. n= 554 (Lamiell y cols.; 1989)

Los hemangioblastomas (HB) del Sistema Nervioso Central (SNC) son tumores altamente vascularizados. Son benignos y no metastatizan pero, debido a su crecimiento en un espacio cerrado, poseen el potencial de causar hemorragias, hidrocefalia obstructiva, hipertensión intracraneal, déficits neurológicos y muerte (Figura 5) (Huson, SM. y cols, 1986; Maddock, IR. y cols, 1996).

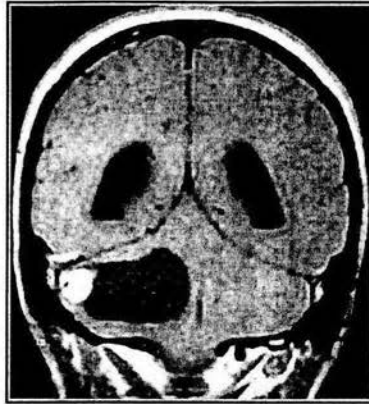


Figura 5. Hemangioblastoma de cerebelo
(Tomada de los archivos del Instituto Nacional de Neurología
y Neurocirugía, Manuel Velasco Suárez, 2003)

Los angiomas de retina son tumores vasculares benignos, si no se identifican en fases tempranas y sin tratamiento, pueden causar disminución de la agudeza visual, o alteraciones del campo visual, hemorragias en la vecindad del mismo, desprendimiento de retina, llevando a la ceguera (Figura 6) (Huson, SM. y cols, 1986).

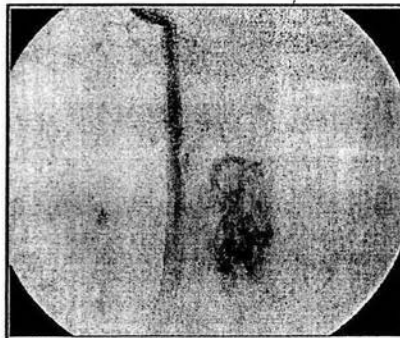


Figura 6. Angioma de retina
(Tomada de los archivos del Instituto Nacional de Neurología
y Neurocirugía, Manuel Velasco Suárez, 2003)

El 50 - 70 % de los pacientes eventualmente desarrollan quiste renales. El riesgo de carcinoma de células claras de riñón es mayor al 70 % y el carcinoma de células renales (CCR) junto con los hemangioblastomas de cerebelo, es la causa más común de muerte en la enfermedad de VHL (Neuman, H.P. y cols, 1987; Poston, CD. y cols, 1995; Maddock, IR. y cols, 1996).

Los feocromocitomas son tumores relativamente raros, generalmente benignos, no obstante ocasionalmente pueden malignizar. La presentación clínica de éste tipo de tumores en la enfermedad VHL se diferencia de los casos aislados en que son de aparición temprana, incluso aparecen durante la primera década. Su morbilidad está asociada a hipertensión arterial de difícil control (Figura 7) (Chen, F. y cols, 1995).

En el páncreas también pueden aparecer tumores. Los más frecuentes se denominan adenomas microquísticos y son benignos (Figura 7) (Girelli, R. y cols, 1977; Neumann, H.P. y cols, 1991).

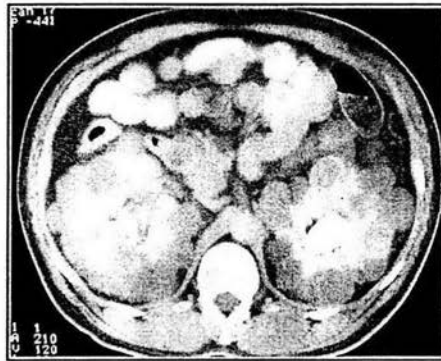


Figura 7. Quistes pancreáticos en enfermedad VHL.
(Tomada de los archivos del Instituto Nacional de Neurología y
Neurocirugía, Manuel Velasco Suárez, 2003)

Los tumores de saco endolinfático recientemente se han identificado como parte del síndrome que conforma la enfermedad. Cuando se estudió detenidamente la función auditiva de una serie de 121 pacientes con enfermedad VHL, la prevalencia de trastornos auditivos fue muy elevada ($> 65\%$ de los casos y bilateral en $> 50\%$), con una incidencia de tumores del saco endolinfático del 11% (Manski, T.J. y cols, 1997).

Otros tumores asociados a la enfermedad VHL son los cistadenomas del epidídimo que aparecen en la mitad de los varones afectados y se localiza principalmente en la cabeza del conducto (Choyke, P.L. y cols, 1997). En las mujeres, se han descrito algunos casos de cistadenomas papilares en el ligamento ancho uterino, de características histológicas muy semejantes a las descritas en el epidídimo (Werness, B.A. y cols, 1997).

1.2.4. Clasificación de la enfermedad de von Hippel - Lindau

Clínicamente las familias VHL pueden ser caracterizadas por la ausencia (tipo 1) o presencia (tipo 2) de feocromocitoma. Esta variación fenotípica tiene correlación con el genotipo subyacente (Tabla 2).

Tabla 2. Clasificación de la enfermedad VHL

Tipo	Tipos de tumores observados			Tipos de mutaciones Asociadas
	HB en SNC	CCR	Feocromocitoma	
1	+	+	-	mutaciones sin sentido, deleciones, microdeleciones o inserciones
2 A	+	-	+	sentido erróneo
2 B	+	+	+	
2 C	-	-	+	

HB: Hemangioblastoma

SNC: Sistema Nervioso Central

CCR: Carcinoma de células renales

(Chen, F. y cols., 1995; Linehan, WM. y cols., 1995)

1.2.5. Criterios de diagnóstico clínico.

Hasta el descubrimiento del gen causante de la enfermedad, el diagnóstico se realizaba con base en los criterios clínicos de Melmon y Rosen (Melmon y Rosen, 1964) que son: en presencia de una historia familiar positiva, el diagnóstico de la enfermedad VHL puede hacerse por la identificación de un solo hemangioblastoma de retina o cerebelo, carcinoma de células renales, o feocromocitoma en individuos en riesgo.

Los quistes pancreáticos múltiples se consideran sospechosos de la enfermedad, ya que son poco comunes en la población general. En contraste, los quistes renales y del epidídimo ocurren con mayor frecuencia en la población y por consiguiente no son un indicador confiable (Seizinger, B.R. y cols, 1991).

En casos esporádicos (historia familiar negativa) son necesarios 2 ó mas hemangioblastomas de retina o cerebelo, o un hemangioblastoma más un tumor visceral típico de enfermedad VHL para el diagnóstico. La desventaja en estos casos, es que la ausencia de historia familiar disminuye la sospecha del clínico y el diagnóstico de la enfermedad VHL es frecuentemente tardío; asimismo, las mutaciones *de novo* tienden a ser subdeterminadas comparadas con las mutaciones asociadas a casos

familiares. Algo similar ocurre en sujetos con feocromocitoma esporádico, en quienes se han reportado mutaciones del gen *VHL* en aproximadamente 3% de los casos, por lo cual Brauch (1997) y Bar (1997) sostienen que la enfermedad VHL no debe descartarse clínicamente en los casos de feocromocitoma aislado.

Una vez realizado el diagnóstico, es importante estudiar integralmente al paciente en virtud de que muchas de las manifestaciones pueden y deben diagnosticarse antes de su expresión clínica. Esto cobra relevancia en la reducción de la morbi-mortalidad del padecimiento, ya que la mayoría de las lesiones tiene un mejor pronóstico cuando se tratan de manera precoz .

En la tabla 3 se muestran los métodos de detección para los distintos tumores que conforman la enfermedad. .

Tabla 3. Métodos de detección para los distintos tumores que conforman la enfermedad de VHL.

Lesión	Método de detección
Hemangioblastomas del SNC	Resonancia Magnética Nuclear (RMN) con contraste Estudio angiográfico
Feocromocitoma	Determinación periódica de catecolaminas en orina
Angiomas retinianos	Oftalmoscopia indirecta
Carcinoma Renal Quistes pancreáticos Quistes hepáticos	Tomografía computarizada (TC),
Cistadenoma del epidídimo	Ultrasonido
Tumor del saco endolinfático	Estudios audiométricos Potenciales evocados auditivos RMN

Spetzger, U. y cols, 1996

El seguimiento de los individuos clínicamente afectados y de los portadores asintomáticos de la mutación debe ser multidisciplinario y el seguimiento se debe prolongar cuando menos hasta los 50 años de edad, ya que es raro que aparezcan manifestaciones por encima de esta edad, si bien se han descrito casos de portadores que no manifiestan la enfermedad hasta los 65 años (Huson, SM. y cols, 1986).

1.2.6. Tratamiento

Los hemangioblastomas de cerebelo, carcinomas de células renales, feocromocitomas y ocasionalmente otros tumores asociados a la enfermedad VHL requieren de tratamiento quirúrgico. Este tiene mejores resultados en lesiones tempranas en virtud del menor tamaño del tumor que permite una resección radical con menor riesgo de complicaciones. En algunos casos, por ejemplo cáncer renal y feocromocitoma maligno, el tratamiento se complementa con quimioterapia y/o radioterapia.

Por otra parte, las lesiones retinianas se manejan mediante radiación del angioma en diversas modalidades (fotocoagulación, crioterapia, etc). Es indispensable su manejo temprano, porque el crecimiento tumoral tracciona la retina ocasionando desprendimientos y hemorragias que frecuentemente generan glaucoma secundario, acompañado por la pérdida completa o casi completa de la visión.

Los quistes hepáticos, pancreáticos y del epidídimo habitualmente son asintomáticos y solo ameritan vigilancia. Algo similar ocurre con los quistes renales benignos (Persad, RA. y cols, 1997; Schiff, D. y cols., 1995).

El diagnóstico temprano de los casos índice y el diagnóstico molecular de portadores y su seguimiento estricto, son los mejores medios para combatir la enfermedad de VHL.

1.3. Genética de la enfermedad de von Hippel – Lindau

1.3.1. Anatomía del gen *VHL*.

El gen *VHL* codifica para un mRNA de 4.7 kb, abarcando menos de 20 kb de DNA genómico en el cromosoma 3p25-p26.

La secuencia codificadora del gen *VHL* esta compuesta por tres exones (Figura 8); el exón 1 tiene 70 pb de la región 5' no traducida (UTR) y 340 pb de secuencia codificadora; el exón 2 contiene 123 pb de secuencia codificadora; y el exón 3 contiene 179 pb de secuencia codificadora y se expande hasta 4 kb formando el extremo 3' UTR (Latif y cols, 1993).

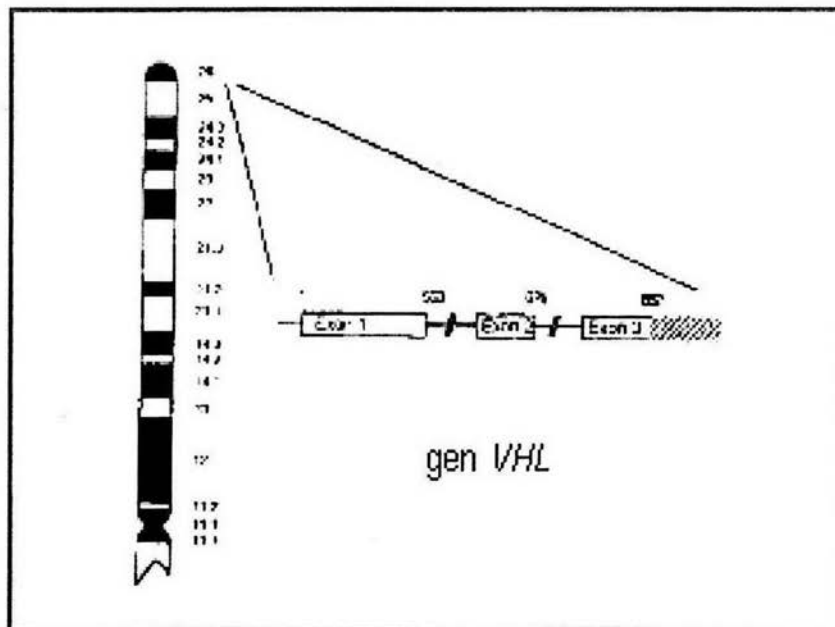


Figura 8. Esquema del brazo corto del cromosoma 3 con localización del gen *VHL* en la región 3p25-26. (Tomada y modificada de VHL Family Alliance, 2001)

1.3.2. Proteína VHL (pVHL)

El mRNA VHL codifica para una proteína de 213 aminoácidos, con un peso molecular de aproximadamente 28 – 30 kd (pVHL₃₀). Existe una segunda isoforma de la pVHL, la cual es generada como resultado de la traducción a partir de un sitio de inicio interno localizado en el codón 54, ésta isoforma tiene un peso molecular de aproximadamente 18 – 20 kd (pVHL₁₉) (Schoenfeld, A. y cols, 1998).

La secuencia primaria de la pVHL no es similar a ninguna otra proteína conocida, por lo tanto la comparación con otras proteínas no proporciona ninguna clave inmediata acerca de la función bioquímica de ésta.

Los codones 14 al 53 del gen *VHL* humano codifican para ocho copias de un repetido pentamérico de aminoácidos [Gly-X-Glu-Glu-X]; (GXEEX)₈, el cual muestra homología con una proteína de superficie de membrana de *Trypanosoma*. Esta región, a diferencia del COOH-terminal de la pVHL, no está altamente conservada entre humanos y roedores, y no se encuentra mutada con frecuencia en las neoplasias asociadas a VHL. La función de esta región, no es aún clara *brucei* (Latif y cols, 1993).

El fraccionamiento bioquímico y los estudios inmunohistoquímicos sugieren que la pVHL es principalmente, pero no exclusivamente, una proteína citoplasmática (Iliopoulos y cols, 1995). Se ha observado que en cultivos con células dispersas, la pVHL es predominantemente nuclear, mientras que en cultivos abundantes su localización es citoplasmática. Aún no es claro el mecanismo por el cual la pVHL se relocaliza en respuesta a la densidad celular pero se ha encontrado que el transporte nuclear es regulado por la actividad de la RNA polimerasa II, en la que la inhibición de la RNA polimerasa II disminuye la exportación nuclear de la pVHL, mientras que cuando la RNA polimerasa II está activa, causa que la pVHL sea exportada al citoplasma vía facilitada por una secuencia del exón 2. También se ha encontrado que una fracción de la pVHL está asociada a membranas celulares, incluyendo aparato de Golgi y retículo endoplásmico (Favor, M. y Henderson, B., 2003).

La pVHL tiene dos dominios: un dominio formado por una α -hélice (dominio α) que comprende de los aminoácidos 157 a 189 y es codificado por el exón III. Los aminoácidos 64 al 154, codificados por el exón I y II forman el dominio β , rico en láminas β . Ambos dominios se sostienen por dos enlaces y una interfase polar. (Hansen y cols, 2002). Figura 9.

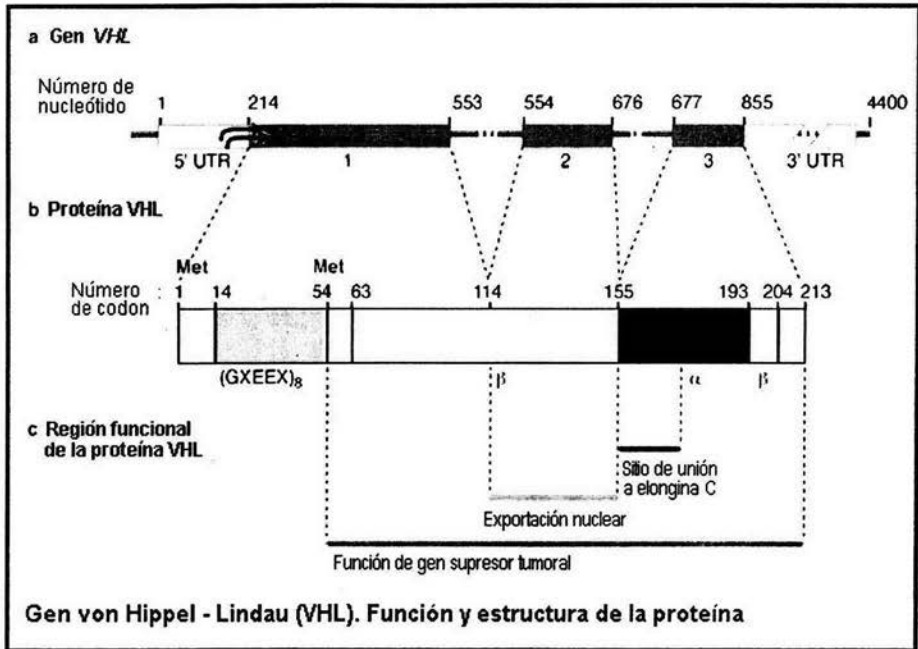


Figura 9. Función y estructura de la proteína VHL
(Tomada y modificada de Expert Reviews in Molecular Medicine 2001
Cambridge University Press: <http://www-ermm.cbcu.cam.ac.uk/01002654h.htm>)

El mRNA VHL está ampliamente expresado durante la embriogénesis y en el tejido adulto, sin embargo su expresión no está restringido a los órganos afectados por la enfermedad (Latif y cols, 1993; Richards, F.M. y cols, 1996).

La pVHL puede ser fosforilada en residuos de serina. Las cinasas que fosforilan la pVHL, actualmente son desconocidas, así como las consecuencias funcionales de esta fosforilación (Kondo, K. Y Kaelin Jr. W.G., 2001).

1.3.3. Distribución de mutaciones VHL en células germinales

Las mutaciones en células germinales se han identificado en más de 500 familias con VHL de todo el mundo. Generalmente las mutaciones son extremadamente heterogéneas en su tipo y se distribuyen ampliamente a través de la secuencia codificante, especialmente en los exones 1 y 3, siendo más raras en el exón 2. Se han encontrado mutaciones de sentido erróneo en un 39%, mutaciones sin sentido en un 14%, microdeleciones en un 10%, deleciones en un 9%, inserciones y mutaciones en el sitio de splicing en un 2% (Stolle, C. y cols, 1998). No se han reportado mutaciones en los codones del 1 al 54, lo cual sugiere que esta región no se requiere para la función de gen supresor de tumores.

La mayoría de las mutaciones recurrentes, son el resultado de mutaciones *de novo* en regiones susceptibles a mutaciones, conocidos como puntos calientes (“hot spots”). Los “hot spots” mas comunes son: delPhe76, Asn78Ser/His/Thr, Pro86Leu, Arg161Stop, Cys162Tyr/Phe/Trp, Arg167Gln/Trp y Leu78Pro (Zbar, B. y cols., 1996).

Las mutaciones C712T, G713A (Richards, F. Y cols, 1995) , Arg238Trp, Arg238Gln (Crossey, PA y cols., 1994) están asociadas a un alto riesgo a feocromocitoma.

Brauch y cols. (1995) reportaron 14 familias alemanas y 2 Americanas que presentaban una mutación de efecto fundador: C505T, la cual se asocia a un bajo riesgo en carcinoma de células claras de riñón (CCCR).

El 15% de los casos de VHL que no tienen historia familiar de la enfermedad podría representar los casos de mutación de novo. Sin embargo, el análisis cuidadoso de los parientes clínicamente sanos puede revelar algunos casos de mosaicismo (Murgia y cols, 1999).

En la tabla 4 se muestran las mutaciones en las células germinales en el gen supresor de tumores *VHL*, que se han reportado en más de una familia con VHL.

Tabla 4

Número De codón	Cambio de aminoácido	Número de nucleótido	Cambio de Nucleótido
55	Cambio en el marco de lectura, terminación prematura.	378	Ins A
56	Cambio en el marco de lectura, terminación prematura.	380	Ins A
59	Cambio en el marco de lectura, terminación prematura.	388	Del C
65	Ser - Trp	407	C - G
66	Val - Stop	409	Del G
72	Cambio en el marco de lectura, terminación prematura.	427	Del T
73	Gln - alto	430	C - T
76	Del Phe	440	Del TCT
76	Cambio en el marco de lectura, terminación prematura.	441	Ins C
78	Asn - His	445	A - C
78	Asn - Ser	446	A - G
79	Arg - Pro	449	G - C
80	Ser - Arg	453	T - G
82	Del Arg, Val, Val	456	Del 9bp
84	Val - Leu	463	G - T
89	Leu - Pro	479	T - C
94	Glu - Stop	493	G - T
96	Gln - Pro	500	A - C
98	Tyr - His	505	T - C
103	Cambio en el marco de lectura, terminación prematura.	522	Del TG
111	Ser - Asn	545	G - A
113	Arg - Stop	550	C - T
114	Gly - Cys	553	G - T *
-	-	553 + 5	G - C *
116	Leu - Val	559	C - G
117	Trp - Stop	564	G - A
118	Leu - Pro	566	T - C
118	Leu - Arg	566	T - G
121	Cambio en el marco de lectura, terminación prematura.	574	Del G
125	Cambio en el marco de lectura, terminación prematura.	588	Ins C
130	Cambio en el marco de lectura, terminación prematura.	603	Del TA
136	Phe - Ser	620	T - C
141	Cambio en el marco de lectura, terminación prematura.	634	Del A
152	Cambio en el marco de lectura, terminación prematura.	668	Ins A
153	Cambio en el marco de lectura, terminación prematura.	670	Del C
154	Pro - Leu	674	C - T

Continuación Tabla 4

-	-	677-1	G - T *
158	Cambio en el marco de lectura, terminación prematura.	685	Ins N
158	Leu - Val	685	C - G
161	Arg - Stop	694	C - T
162	Cys - Tyr	698	G - A
166	Val - Phe	709	G - T
167	Arg - Gly	712	C - G
167	Arg - Trp	712	C - T
167	Arg - Gln	713	G - A
170	Val - Phe	721	G - T
170	Val - Asp	722	T - A
176	Cambio en el marco de lectura, terminación prematura.	741	Del G
177	Arg - Stop	742	A - T
178	Leu - Pro	746	T - C
180	Ile - Val	751	A - G
184	Leu - Arg	764	T - G
185	Tyr - Stop	768	C - G
186	Del Glu	771	Del AGA
188	Leu - Val	775	C - G
188	Cambio en el marco de lectura, terminación prematura.	776	Del T
195	Gln - Stop	796	C - T
-	Del exon 1	-	Del exon 1
-	Del exon 1+2	-	Del exon 1+2
-	Del exon 2	-	Del exon 2
-	Del exon 3	-	Del exon 3
-	Del 120kb	-	Del 120kb
-	Del 50kb	-	Del 50kb

Ins: Inserción

Del: Delección

Stop: codon de paro

* : mutación en el sitio de splicing

Base de datos: University of Birmingham, Division of Medical and Molecular Genetics

Actualmente existen bases de datos que describen mas de 700 mutaciones en células germinales.

1.3.4. Mutaciones somáticas en tumores de VHL

Gnarra y cols, en 1994, identificaron mutaciones somáticas en el gen *VHL* en 57% de los casos esporádicos de carcinoma de células claras de riñón, y encontraron que el 98% presentó pérdida de heterocigosidad. (Figura 10).

En pacientes con VHL las mutaciones somáticas se observaron en los tres exones. Las transiciones y transversiones se identificaron con la misma frecuencia, mientras que las deleciones o inserciones dentro del marco de lectura de la región codificadora sumaron el 48%.

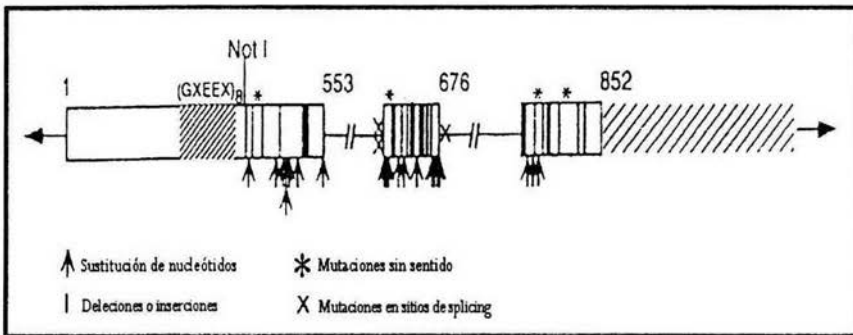


Figura 10. Distribución de mutaciones en el gen *VHL* en carcinoma renal esporádico.

Los tres exones son indicados por cuadros, y en el exón 1 se muestra el repetido de aminoácidos pentamérico y la región 3' UTR en el tercer exón están indicados con líneas inclinadas. El número se refiere al nucleótido del marco de lectura abierta. (Tomada y modificada de: Gnarra y cols, 1994)

Existen otros mecanismos por el cual el gen *VHL* se inactiva, Herman y cols en 1994 demostraron la inactivación del gen *VHL* en carcinoma renal asociada con hipermetilación de una isla CpG no metilada normalmente en la región 5' del gen *VHL*, en 5 de 27 tumores analizados. En cuatro casos de carcinoma de células claras de riñón con hipermetilación no se identificaron mutaciones, sin embargo la expresión de la pVHL, no era detectable en ninguno de los cinco tumores. Cuando una de las líneas celulares de carcinoma renal con hipermetilación del gen *VHL* fue tratada con un agente hipometilante, hubo reexpresión del gen, lo cual indicó que la metilación del promotor es la causa del silenciamiento del gen. La hipermetilación ha sido detectada en 33 % de los tumores *VHL* que no muestran pérdida de heterocigosidad, incluyendo los carcinomas de células renales y hemangioblastomas.

1.3.5. Correlación genotipo – fenotipo

Chen y cols. (1995) identificó mutaciones en células germinales en 85 de 114 familias con VHL (75%). Ellos encontraron que los tipos de mutaciones responsables del VHL sin feocromocitoma (tipo 1) difieren de las responsables del VHL con feocromocitoma (tipo 2). Encontraron mutaciones sin sentido, microdeleciones/ inserciones y deleciones en un 56% de las familias con VHL tipo 1; las mutaciones de sentido erróneo se encontraron en un 96% en familias con VHL tipo 2 (Gráfica 1, 2 y 3).

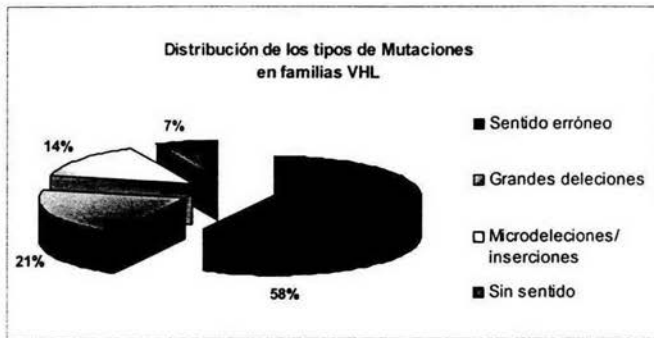
Zbar y cols. (1996) realizaron un análisis de las mutaciones en células germinales en 469 familias con VHL de Norteamérica, Europa y Japón. Identificaron mutaciones en un 63% de las familias estudiadas. En esta muestra, fue posible comparar el efecto de una misma mutación germinal en diferentes poblaciones, donde encontraron que las mutaciones VHL producen similares fenotipos en familias caucásicas y japonesas. También identificaron que las familias con mutaciones en células germinales producen tres tipos diferentes de cáncer: carcinoma renal sin feocromocitoma, carcinoma renal con feocromocitoma y sólo feocromocitoma.

En un estudio de riesgo acumulativo de feocromocitoma en pacientes con una edad promedio de 50 años, el 59 % de los pacientes presentó mutaciones de sentido erróneo y 9% de éstos, deleciones o mutaciones sin sentido. No todas las mutaciones de sentido erróneo deben asociarse a un alto riesgo de feocromocitoma, mientras que las mutaciones intragénicas más comunes 712C-T y 713G-A, que cambian un residuo de arginina en el codón 167 se asocian con un alto riesgo de feocromocitoma (82 % en una edad de 50 años) (Richards, F. Y cols, 1995).

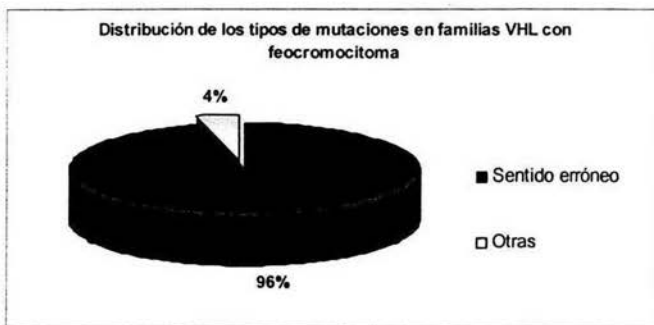
La mayoría de las mutaciones de sentido erróneo asociadas a feocromocitoma están además vinculadas con un alto riesgo de carcinoma de células renales (RCC) y hemangioblastomas (VHL tipo 2B), aunque las mutaciones (Try98His y Tyr111His) se asocian con un bajo riesgo de RCC (fenotipo tipo 2A).

Brauch (1997) y Bar (1997), estudiaron sujetos con feocromocitoma esporádico, sin antecedentes familiares, y sólo encontraron mutaciones del gen *VHL* en un 3-3.7% de los casos. En familias VHL con feocromocitoma se han encontrado mutaciones germinales en aproximadamente 50%. Ciertas

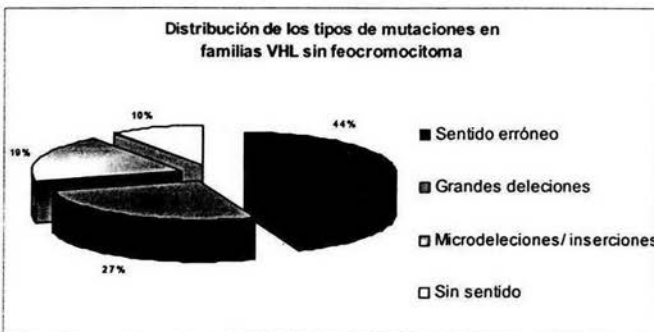
mutaciones, sin embargo, parecen ser exclusivamente asociadas con el fenotipo de solo feocromocitoma (tipo 2C) (Crossey, P. y cols, 1995; Gross, D. Y cols, 1996).



Gráfica 1. Distribución de los tipos de mutaciones en familias VHL (Datos tomados de Chen y cols, 1995).



Gráfica 2. Distribución de los tipos de mutaciones en familias con feocromocitoma (VHL tipo 2) (Datos tomados de Chen y cols, 1995)



Gráfica 3. Distribución de los tipos de mutaciones en familias sin feocromocitoma (VHL tipo 1) (Datos tomados de Chen y cols, 1995)

Existe una correlación entre el fenotipo y la localización de la mutación, 10 de 23 mutaciones (43%) identificadas para VHL tipo 2 ocurren en el codón 238, de 12 familias que tienen mutación en el codón 238, 10 tienen VHL tipo 2, por lo que éste codón se considera un “hot spot” asociado a VHL tipo 2 (Linehan y cols, 1995).

1.3.6. Proteínas asociadas a la pVHL

La función de una nueva proteína puede dilucidarse a menudo por la identificación de las proteínas celulares con las que actúa recíprocamente. Los experimentos de inmunoprecipitación revelan un gran número de proteínas que se unen a la pVHL (directamente o indirectamente), que no se han caracterizado en su totalidad (Duan y cols, 1995; Kishida y cols, 1995).

1.3.6.1. Complejo VCB

Estudios bioquímicos han revelado que la pVHL forma un complejo ternario con las proteínas elongina C y elongina B. El complejo VHL –Elongina C- Elongina B (llamado complejo VCB) tiene un papel central en la función de la pVHL, esto se deduce del hecho de que las mutaciones encontradas en este gen, de las cuales derivan los tumores, desestabilizan este complejo (Stebbins y cols., 1999). (Figura 11)

En este complejo ternario, la elongina C se une a la elongina B y a la pVHL en dos interfases distintas, mientras que la pVHL y la elongina B no interactúan directamente (Duan, D.R. y cols, 1995; Kibel, A. y cols, 1995; Kishida, T. y cols, 1995).

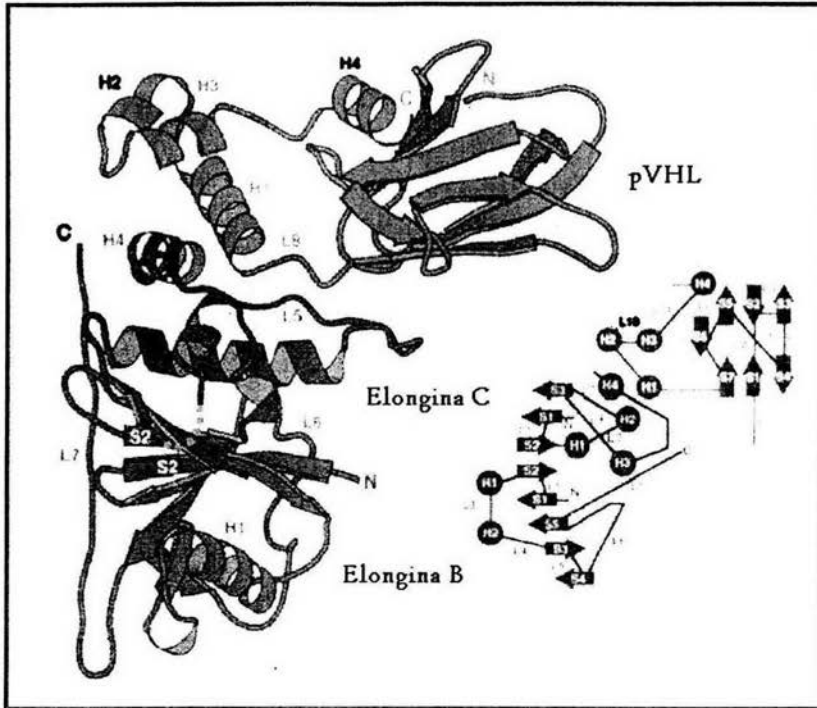


Figura 11. Complejo VCB.

Consiste de dos interfaces, una entre la pVHL y la elongina C y otra entre la elongina C y la elongina B. A la izquierda se muestra la estructura secundaria del complejo VCB. Y a la derecha los círculos indican las hélices y las hebras, los arreglos de las proteínas. (Tomada y modificada de Stebbins y cols., 1999)

Como se mencionó anteriormente, la pVHL tiene dos dominios: el dominio α y el dominio β . Una gran parte de la superficie del dominio α , y una pequeña porción del dominio β , interaccionan con la elongina C. Cerca de la mitad de las mutaciones que causan tumores se encuentran localizadas en el dominio α , en los aminoácidos que están en contacto con la elongina C. El resto de las mutaciones se encuentran en una parte de la superficie del dominio β que también implica la unión con la elongina C (Stebbins y cols, 1999).

El dominio β de la pVHL consta de siete cadenas β en forma de sándwich (aminoácidos 63 a 154) y una α hélice (H4: aminoácido 193 a 204) que están condensadas contra una lámina β , a través de interacciones hidrofóbicas. El dominio α de la pVHL (aminoácidos 155 a 192) consiste en tres α hélices (H1, H2 y H3). Una hélice de la elongina C (H4) encaja a través de una abertura y completa

un arreglo de cuatro hélices, dando dos pares de hélices condensadas en un ángulo perpendicular. Los dominios α y β son conectados por dos pequeños polipéptidos unidos (aminoácidos 154 a 156 y 189 a 194) y por una interfase polar que es estabilizada por puentes de hidrógeno de la hélice α , el sándwich β , y la elongina C (Stebbins y cols, 1999).

La estructura de la elongina C consiste de tres cadenas de láminas β condensadas contra cuatro hélices α , en la cual, la última está separada por una larga asa en conformación extendida (asa L5). El asa L5 extendida, junto con las hélices H2, H3 y H4 forman una superficie cóncava con una cavidad central. Aquí es donde la pVHL se une, y las mutaciones en estos elementos causan disrupción en la unión (Takagi, Y. y cols, 1997).

La elongina B contiene dos hélices y varias asas condensadas contra cinco laminas β , además, esta elongina tiene un tracto de 30 aminoácidos en el COOH- terminal. Parte de esta extensión adopta una conformación extendida que corre a un lado y a lo largo de la molécula, interaccionado con la elongina C, y casi se extiende hasta la pVHL (Stebbins y cols, 1999).

Cada uno de los dominios contiene como mínimo tres de las seis mutaciones más frecuentes. En el dominio α , la hélice H1 es el blanco primario de las mutaciones que causan tumores. En esta hélice se encuentra el aminoácido más frecuentemente mutado Arg¹⁶⁷, el cual, tiene un papel de estabilizador en la hélice H1 y en la interfase del dominio α - β , y adicionalmente el punto de mutación Cys¹⁶², este residuo está en contacto con la elongina C. El tercer punto de mutación en el dominio α es Leu¹⁷⁸, el cual juega un doble papel interaccionando con la elongina C y además estabilizando la condensación de las hélices H2 y H3 en el dominio α (Stebbins y cols, 1999).

El resto de las mutaciones en el dominio α corresponde a los aminoácidos que participan en la condensación de las hélices (tales como Val¹⁷⁰, Ile¹⁸⁰, Leu¹⁸⁴ y Leu¹⁸⁸), o en la inestabilidad de la interfase del interdominio α - β (Arg¹⁶¹ y Gln¹⁶⁴). En el dominio β , las mutaciones son en los aminoácidos importantes para la integridad del sándwich β , tales como el centro de aminoácidos hidrofóbicos (Pro⁸⁶, Phe⁷⁶, Phe¹¹⁹, Trp¹¹⁷, y Val¹³⁰), o en los aminoácidos polares ocultos que sostienen en conjunto las asas (Asn⁷⁸) (Stebbins y cols, 1999).

La mutación Tyr⁹⁸, es el segundo punto más mutado en la enfermedad VHL y muestra una excepción significativa del resto de las mutaciones que influyen en la estructura del dominio β . Este aminoácido se encuentra en la superficie del sándwich β , opuesto al sitio donde se une la elongina C; debido a que no tiene un papel significativo estructuralmente se sugiere que su importancia radica en su capacidad para unirse a la elongina C *in vivo* (Stebbins y cols, 1999).

1.3.6.2. Complejo pVHL/elongina/Cul2.

Una vez formado el complejo VCB, éste interacciona con una cuarta proteína llamada Cul2, dando lugar al complejo VCB-Cul2. La Cul2, es miembro de la familia de las culinas, la cual está involucrada en el control del ciclo celular en las levaduras; esta proteína es similar a la proteína Cdc53 de levaduras. La proteína Cul2 no se une a la pVHL en ausencia de las elonginas B y C (Lonergan, y cols, 1998; Pause y cols, 1999).

Existe evidencia de que la elongina C tiene similitud con la proteína de levadura Skp1. Las proteínas Cdc53 y Skp1, en las levaduras, se unen a otras ligasas de ubiquitina, llamadas complejos SCF (Skp1/Cdc53/F-box). Este complejo es reconocido o unido por la proteína F-box, y las proteínas blanco son destinadas a poliubiquitinación, y destrucción dentro del proteosoma 26S (Bai y cols, 1996; Pause y cols, 1999).

De manera similar el complejo VCB-Cul2 tiene actividad de ligasa E3 de ubiquitina. La degradación de proteínas mediada por ubiquitinación está involucrada en una gran variedad de funciones celulares, incluyendo la progresión del ciclo celular y la transducción de señales (Iwai y cols, 1999).

De acuerdo a lo anterior, hay dos puntos importantes que nos proporcionan evidencia del papel de la pVHL en la poliubiquitinación. Primero, el complejo pVHL/elongina/Cul2 interacciona con una proteína llamada Rbx1 (también llamada Hrt1 o ROC1) la cual facilita la poliubiquitinación. En segundo, se ha demostrado que los inmunoprecipitados anti-pVHL exhiben actividad de ligasa de ubiquitina si se suplementan con una enzima exógena conjugada con una ubiquitina *in vitro* (Lisztwan, J y cols, 1999; Iwai, K. y cols, 1999) (Figura 12).

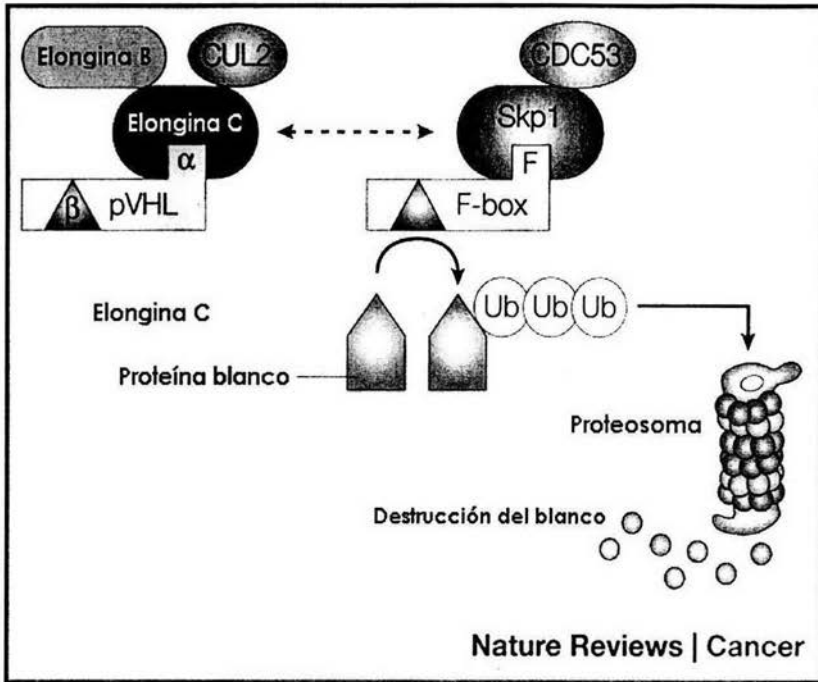


Figura 12. Complejo VCB-Cul2 con actividad de ligasa E3 de ubiquitina
(Tomada y modificada de Kaelin, Jr. W. G.; 2002)

1.3.6.3. pVHL y carcinogénesis.

Haciendo un análisis de las características clínicas asociadas a las neoplasias del síndrome VHL, se puede deducir información acerca del complejo pVHL/elongina/Cul2.

Los hemangioblastomas y el carcinoma de células renales son lesiones altamente vascularizadas y que sobreproducen péptidos angiogénicos tales como VEGF (factor de crecimiento del endotelio vascular). En ocasiones, estos tumores también sobreproducen la hormona eritropoyetina (EPO), que lleva a un exceso de producción de eritrocitos por el hospedero (policitemia). Ambos, VEGF y EPO son codificados por genes inducibles por hipoxia (HIF). Los genes inducidos por hipoxia, tales como VEGF y EPO contienen sitios de unión para secuencias específicas, llamados activadores transcripcionales HIF (Illipoulos, O. y cols, 1996; Sato, K. y cols, 1994; Siemeister, G. y cols, 1996; Wizigmann-Voos, S. y cols, 1995).

El HIF o factor inducible por hipoxia, juega un papel importante en la regulación de genes implicados en el metabolismo de energía, angiogénesis y apoptosis en respuesta a hipoxia. (Huang y cols, 2002).

El HIF se une al DNA como un heterodímero, el cual consta de una subunidad α (HIF1 α) y la subunidad β (llamada HIF1 β , o transportador nuclear del receptor aril hidrocarburo o ARNT). La subunidad α es rápidamente degradada en presencia de oxígeno, pero se estabiliza en condiciones de hipoxia; mientras que la subunidad β está presente constitutivamente. La degradación es controlada por un dominio de degradación único dependiente de oxígeno (ODD), el cual consiste de aproximadamente 200 aminoácidos dentro de la subunidad HIF1 α (Huang y cols, 1996; Salceda y cols, 1997).

Maxwell y colaboradores (1999) demostraron que las células carentes de pVHL son incapaces de degradar la subunidad HIF α en presencia de oxígeno, lo cual explica la sobreexpresión de los genes blanco de HIF en células con la pVHL defectuosa. Posteriormente, se confirmó que el complejo VCB-Cul2 se une directamente y poliubiquitila a la subunidad HIF α (Figura 13). Entre los genes blanco del HIF α se encuentra el TGF α , el cual está sobreexpresado en los hemangioblastomas (de Paulsen y cols, 2001).

Los trastornos en el riñón por quistes, son caracterizados típicamente por una proliferación anormal de células epiteliales e interacciones anormales entre matriz y células. Con respecto a esto, el TGF α es un mitógeno de células epiteliales de riñón. La conexión entre la inactivación del gen *VHL* y la presencia de feocromocitoma se desconoce. No está aún claro si el desarrollo de feocromocitoma en el cuadro de la enfermedad de VHL es debido a una ganancia o pérdida de función de la pVHL (Kondo, K. y Kaeling, Jr. W.G., 2001).

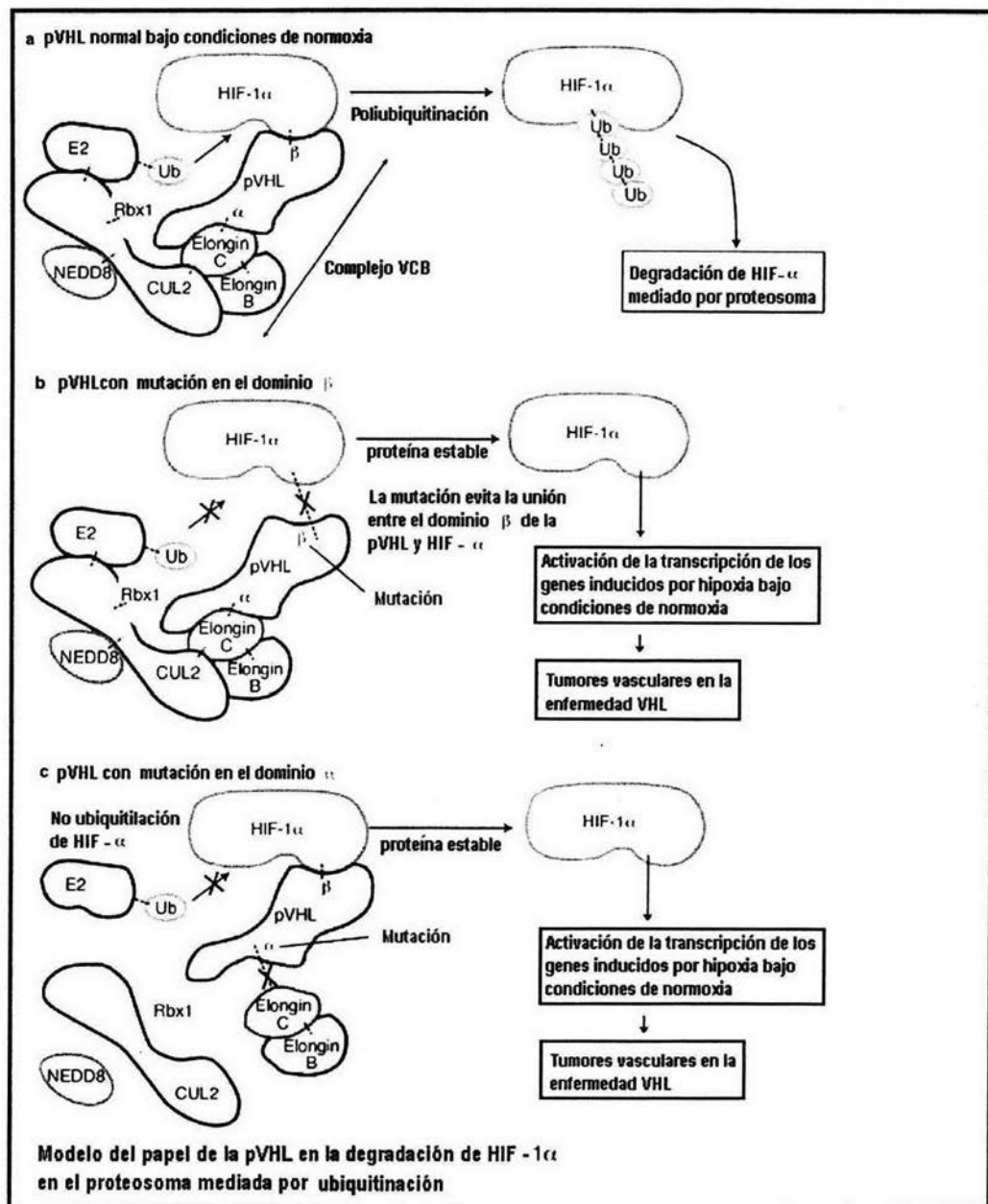


Figura 13. Modelo del papel de la pVHL en la degradación de HIF - 1α en el proteosoma mediada por ubiquitinación.
 (Tomada y modificada de Expert Reviews in Molecular Medicine 2001
 Cambridge University Press: <http://www-ermm.cbcu.cam.ac.uk/01002654h.htm>)

1.3.6.4. Otras proteínas asociadas a la pVHL

a. Fibronectina

La glicoproteína de adhesión extracelular fibronectina, es una proteína multifuncional que juega un papel en el control de la migración de las células tumorales y metástasis. Se ha demostrado que la fibronectina se une a la pVHL normal pero no a la proteína mutada; ésta unión probablemente ocurre en una fracción de la pVHL asociada con el retículo endoplásmico (RE) durante la exportación mediada por el RE de fibronectina a la superficie celular (Ohh y cols, 1998).

La fibronectina es normalmente depositada dentro de la matriz extracelular, donde puede interactuar con ciertos receptores de la superficie celular, conocidos como integrinas. Las células malignas, producen bajos niveles de fibronectina en la matriz. Recíprocamente, las señalizaciones entre la fibronectina y las integrinas pueden, en ciertos experimentos, suprimir la malignidad de las células. Sin embargo el mecanismo de interacción entre la pVHL y la fibronectina, en la supresión tumoral, no se conoce aún (Ohh y cols, 1998).

b. Factor de transcripción Sp1.

Se ha reportado que la pVHL es un inhibidor directo del factor de transcripción Sp1; la sobreexpresión de éste factor, debido a la pérdida de la función normal de la pVHL, contribuye a la patogénesis de la enfermedad. Por otro lado, la actividad del promotor del VEGF es activada por el factor Sp1 e inhibida por la pVHL. Por lo tanto, la pVHL puede disminuir la transcripción de VEGF por unión directa o indirectamente por la unión a Sp1 (Mukhopadhyay y cols, 1997).

c. Proteína Cinasa C (PKC)

Existe evidencia de que parte del dominio β de la pVHL interacciona directamente con varias isoformas de PKCs. Sin embargo, no es claro si las PKCs son ubiquitinadas para su degradación o si las PKCs pueden fosforilar otras proteínas blanco de la pVHL desconocidas para ser ubiquitinadas. Estas isoformas de PKC han sido implicadas en la regulación del crecimiento celular y la apoptosis. (Okuda y cols, 1999; Pal, S. y cols, 1997).

1.3.7. Perspectivas

El diagnóstico molecular de la enfermedad de von Hippel-Lindau, se lleva a cabo en diversos países. En nuestro país aún no se tiene un protocolo bien definido para el diagnóstico molecular de la enfermedad, por lo que una meta a futuro es poder predecir con mayor certeza el riesgo de desarrollar los tumores que componen la enfermedad de von Hippel – Lindau, así como su relación con mutaciones específicas en el gen *VHL*. Esto puede lograrse por el establecimiento de una base de datos, la cual contenga información sobre el tipo de tumores desarrollados por los pacientes y las mutaciones encontradas, con el fin de establecer una mejor correlación genotipo – fenotipo.

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

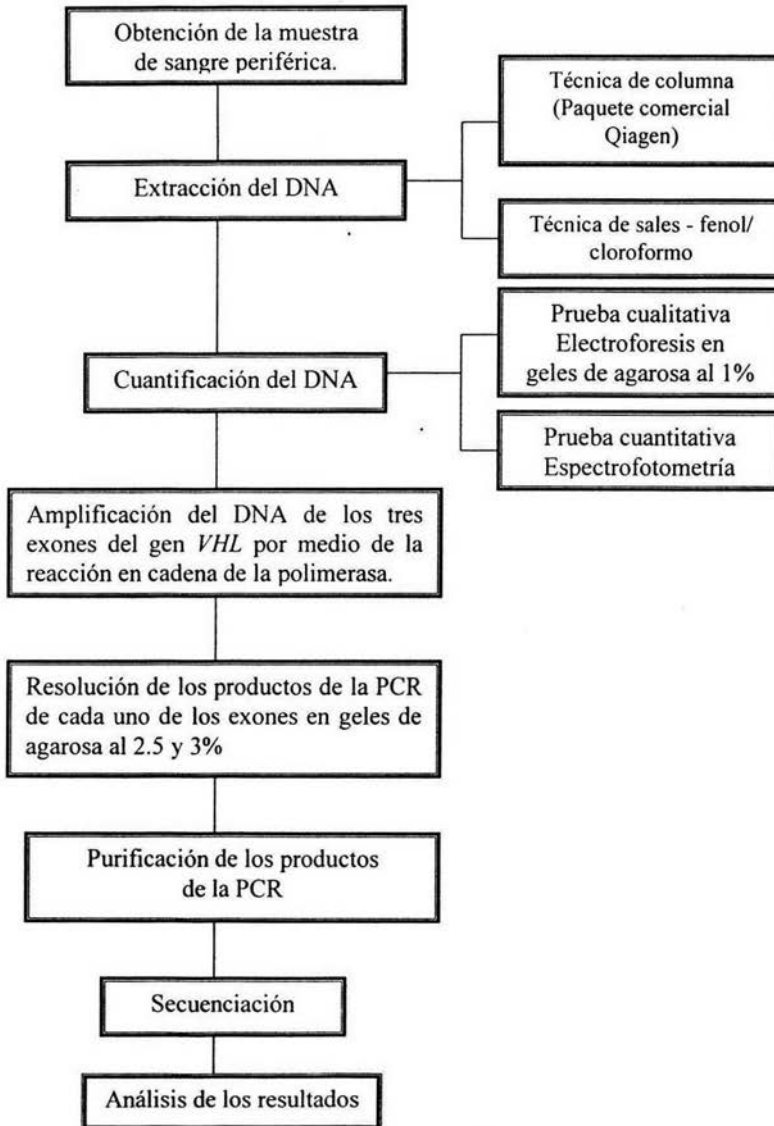
- Identificar mutaciones en la región codificadora del gen *VHL* en pacientes índices con diagnóstico clínico de enfermedad de von Hippel – Lindau y/o hemangioblastoma cerebeloso.

2.2. Objetivos particulares.

- Buscar mutaciones en los 3 exones que componen el gen *VHL* en pacientes índice con diagnóstico clínico de enfermedad de von Hippel – Lindau y hemangioblastoma de cerebelo por medio de su secuenciación directa.
- En caso positivo, establecer la frecuencia con la que se presentan dichas mutaciones en pacientes mexicanos y compararlos con los reportados en otras poblaciones

3. Desarrollo experimental y resultados

3.1. Diagrama de flujo



3.2. Criterios de inclusión y exclusión de los pacientes en el estudio.

La selección de los pacientes fue realizada por un médico genetista aplicando los criterios clínicos de Melmon y Rosen (1964). Se captaron los pacientes admitidos al Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía en el periodo del 2002 al 2003, en quienes se confirmó el diagnóstico de hemangioblastoma del sistema nervioso central mediante reporte histopatológico.

Se elaboró la historia clínica y el árbol genealógico de cada paciente, en aquellos casos en que demuestren antecedentes heredofamiliares de padecimiento similar. El estudio se extenderá a los familiares afectados o en riesgo los cuales acepten participar. En esta fase del estudio se analizó el DNA de 5 pacientes de 4 familias que cubrían los criterios de Melmon y Rosen (1964), 3 pacientes con hemangioblastoma esporádico, 4 pacientes con diagnóstico de probable VHL, pero en los cuales la historia familiar no fue comprobable y un familiar clínicamente sano de un paciente con HB esporádico (Tabla 5).

Tabla 5. Características clínicas de los pacientes estudiados

Paciente	Diagnóstico	Edad	Sexo	Tipo de tumor
3	VHL	35	F	HB (3)
10	VHL	43	F	HB (2), QP
65		28	F	HB (1)
13	Esporádico	42	M	HB (1)
14	Probable VHL	71	F	HB (1), QR (1)
15	Probable VHL	47	M	HB (1)
17	VHL	43	F	ARB, HB, QP, QR
21	VHL	45	M	CCCR, HB, QP, QR
24	Esporádico	47	M	HB (1)
58	Probable VHL	38	M	HB (1)
63	Probable VHL	31	M	HB múltiple, HBM
66	Esporádico	29	M	HB
67	Hermana del 66	36	F	Sana

(): número de tumores
 ARB: angiomas de retina bilateral
 CCCR: carcinomas de células claras de riñón
 F: femenino
 HB: hemangioblastoma de cerebelo
 HBM: hemangioblastoma de médula
 M: masculino
 QP: quistes pancreáticos
 QR: quistes en el riñón

De los pacientes estudiados ninguno presenta feocromocitoma, por lo que se descarta probables pacientes VHL tipo 2.

Los pacientes participantes firmaron la hoja de consentimiento aprobada por el Comité de Investigación del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía y se les explicaron las características y objetivos del estudio, así como los procedimientos implicados en el mismo. La información obtenida de los pacientes durante el estudio se mantiene en confidencia por los investigadores participantes. (Anexo A)

Se excluyeron a aquéllos pacientes que no desearon participar en el estudio o que no cumplieron con los criterios clínicos de diagnóstico. Los pacientes hasta ahora incluidos tienen la opción de abandonar el estudio.

3.3. Obtención de muestras de sangre periférica.

Se obtuvieron aproximadamente 20 ml de sangre periférica por punción venosa en tubos vacutainer con anticoagulante ACD (Ácido cítrico/ dextrosa) de los pacientes seleccionados.

3.4. Extracción de DNA.

La extracción de DNA se realizó por dos técnicas: precipitación con sales y su extracción con fenol/ cloroformo y la extracción por columna con un Paquete Comercial (Qiagen).

3.4.1. Técnica de extracción con Sales Fenol/ cloroformo.

La extracción por medio de sales se basa en la utilización de altas concentraciones de NaCl y SDS, las cuales alteran la permeabilidad de la membrana celular de los leucocitos y con ayuda de la acción mecánica conlleva a la lisis de éstos, con el fin de liberar el DNA.

Como primer paso se realizó la lisis de eritrocitos por medio del amortiguador RCLB (Amortiguador de lisis de células rojas), con el fin de eliminarlos y dejar sólo los leucocitos, en donde se encuentra el DNA. Posteriormente al botón de leucocitos formado se le agregó los

reactivos en el siguiente orden: SDS al 10%, NaCl 5 mM y saturado (7M) para lizarlos y liberar el DNA.

El DNA fue extraído sucesivamente con fenol saturado (elimina restos celulares y proteínas), fenol - cloroformo (elimina residuos de fenol saturado) y cloroformo – alcohol isoamílico (elimina residuos de fenol – cloroformo existentes en la muestra, dando un ligero ambiente alcohólico para la precipitación). El DNA obtenido fue precipitado con isopropanol y lavado con etanol al 70% (Sambrook, J. y cols.; 1989).

El DNA se secó por medio de calor y vacío, se resuspendió en agua estéril y se disolvió a 50° C.

3.4.2. Extracción por columna Qiagen

En este método se emplea una proteasa, la cual se encarga de degradar las proteínas contenidas generalmente en las muestras biológicas. Se precipita el DNA con etanol y es traspasado a una columna, donde se fija a una membrana para ser lavado y posteriormente diluido con agua para liberarlo de la membrana (Manual Qiagen).

3.5. Cuantificación del DNA

3.5.1. Espectrofotometría

El DNA está compuesto por purinas y pirimidinas, las cuales son moléculas altamente conjugadas (deslocalización de los electrones). Esta propiedad tienen efectos importantes sobre la estructura, distribución de los electrones y la absorción de luz de los ácidos nucleicos. Los ácidos nucleicos se caracterizan por tener una absorción a una longitud de onda de 260 nm (Strachan y Read, 2004).

Por lo tanto para cuantificar el DNA se debe leer a una longitud de onda de 260 nm y 280 nm. La lectura a 260 nm permite el cálculo de la concentración de DNA y la lectura a 280 nm nos indica si existen restos proteicos en la muestra. Una D.O. (Densidad Óptica) de 1 corresponde a aproximadamente 50 µg/ml de DNA de doble cadena.

El cociente entre las lecturas de 260 y 280 nm nos da una estimación de la pureza de la muestra. Una muestra de DNA con buena pureza da una razón entre 1.8 y 2.0 (Sambrook, J. y cols.; 1989).

De las muestras extraídas con la técnica de sales se obtuvieron concentraciones entre 800 – 1600 ng/ μ L y de las muestras extraídas por Columna (Paquete de Qiagen) se obtuvieron concentraciones entre 150 – 250 ng/ μ L. La pureza de las muestras extraídas por sales y Columna (Qiagen) se encontraron dentro del rango de 1.8 y 2.0.

3.5.2. Electroforesis

La electroforesis es un método utilizado para la separación, identificación y purificación de fragmentos de DNA (Strachan y Read, 2004). Se utilizó agarosa como medio de soporte al 1%, el cual se saturó con el amortiguador TBE (Tris-Borato-EDTA) y se realizó la electroforesis a 100 volts. Posteriormente el gel de agarosa fue teñido con bromuro de etidio y observado en un transiluminador de luz ultravioleta.

Ésta técnica nos permite observar cualitativamente la cantidad e integridad del DNA. La intensidad de la fluorescencia emitida por el DNA con el bromuro de etidio nos da una estimación de la cantidad de DNA en la muestra.

En las figuras 15 y 16 se muestran fotografías de geles de agarosa al 1%, en donde podemos apreciar la calidad del DNA de diferentes pacientes de VHL extraídas por la técnica de sales y columna, respectivamente.

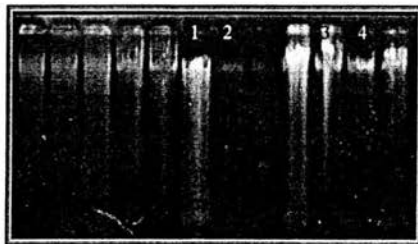


Figura 14. DNA extraído por la técnicas de sales fenol – cloroformo.
(1) DNA degradado, (2) Baja concentración de DNA,
(3) DNA parcialmente degradado, (4) DNA íntegro.

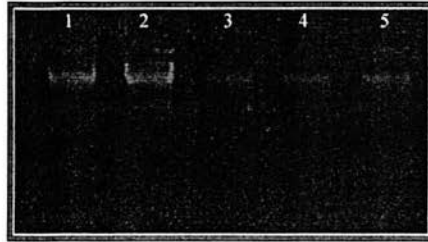


Figura 15. DNA extraído por la técnica de Columna de Qiagen.
 (1) y (2) Buena concentración de DNA e integro,
 (3) a (5) menor concentración de DNA e integro

3.6. Reacción en cadena de la Polimerasa

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite la amplificación de una región particular de DNA, esto se logra imitando la replicación del DNA *in vivo*. La secuencia seleccionada es delimitada en ambos extremos por un par de oligonucleótidos sintéticos complementarios que actúan como iniciadores de la enzima DNA polimerasa.

El procedimiento de amplificación está compuesto de 3 etapas. La primera consiste en la desnaturalización del DNA de doble cadena, por lo que se necesita una temperatura de 93 – 95° C. La segunda etapa es la alineación, y como su nombre lo dice, los oligonucleótidos sintéticos se alinean específicamente a la región complementaria a ellos. La temperatura para esta etapa varía según la longitud y la secuencia de los oligonucleótidos. La tercera etapa es la extensión, donde la enzima Taq polimerasa agrega a los oligonucleótidos sintéticos los nucleótidos (dNTP's) de la cadena complementaria. La temperatura a la cual se lleva a cabo esta etapa es de 72° C, por ser la temperatura óptima de esta enzima (Strachan, T. y Read, P., 1998).

Para obtener las condiciones necesarias de PCR para amplificar las diferentes regiones del gen *VHL* se utilizaron los oligonucleótidos descritos por Gnarra y cols (1994):

Exón 1-A

VHL # 104 5' _ AGT GGA AAT ACA GTA ACG AGT TGG CCT _ 3'
 VHL # 105 5' _ GTC CCA GTT CTC CGC CCT CCG GGG CAT _ 3'

Exón 1-B

VHL # 3 5' _ GCG GCG TCC GGC CCG GGT GGT CTG GAT _ 3'
 VHL # 8 5' _ CCT CGG CGC CCG ACT CCT CCC CGC CGT _ 3'

Exón 1-C

VHL # 1 5' _ GAG GCA GGC GTC GAA GAG TAC GGC CCT _ 3'
 VHL # 10 5' _ GAC TGC GAT TGC AGA AGA TGA CCT GGG _ 3'

Exón 1-D

VHL # 9 5' _ CAT CTT CTG CAA TCG CAG TCC GCG CGT _ 3'
 VHL # 101 5' _ TGG GTC GGG CCT AAG CGC CGG GCC CGT _ 3'

Exón 2

VHL # 102 5' _ CTT TAA CAA CCT TTG CTT GTC CCG ATA _ 3'
 VHL # 103 5' _ GTC TAT CCT GTA CTT ACC ACA ACA ACC T _ 3'

Exón 3

VHL # 107 5' _ CTG AGA CCC TAG TCT GTC ACT GAG GAT _ 3'
 VHL # 6 5' _ CAA AAG CTG AGA TGA AAC AGT GTA AGT _ 3'

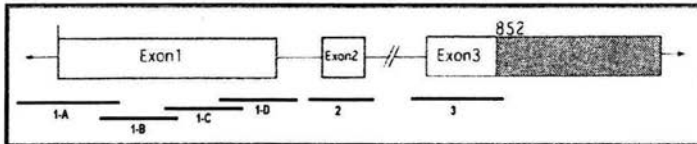


Figura 16. Ubicación de los oligonucleótidos utilizados para amplificar el gen *VHL*.

Los oligonucleótidos para amplificar el fragmento 1-A abarcan 92 pb río arriba del promotor hasta el nucleótido 240 del exón 1, el oligonucleótido reversa para la región 1-D abarca 27 pb río abajo del exón 1. Los oligonucleótidos para amplificar el exón 2 abarcan 28 pb río arriba y 57 pb río abajo de la región codificadora, los oligonucleótidos para el exón 3 abarcan 45 pb río arriba y 41 pb río debajo de la región codificadora.

Para estandarizar el PCR de cada una de las regiones se partió de las condiciones descritas por Gnarra y cols (1994), se fijó el número de ciclos de PCR, la cantidad de DNA y la concentración de la Taq polimerasa y se probaron distintas concentraciones de oligonucleótidos, con el fin de determinar la concentración óptima para la reacción de PCR. Cada reacción se realizó por duplicado.

Los productos de PCR para el exón 1, región 1-B, 1-C, 1-D y exón 2 fueron resueltos por electroforesis en geles de agarosa al 3% en TBE 1X a 120 volts, para el exón 1 región 1-A y exón 3 se utilizó geles de agarosa al 2.5% en TBE 1X a 120 volts; en ambos casos los productos amplificados se flanquearon por un marcador de peso molecular (Marcador V y/o VIII de Roche) para verificar el tamaño de los productos de PCR.

Los geles de agarosa fueron teñidos con bromuro de etidio y observados en un transiluminador de luz U.V.

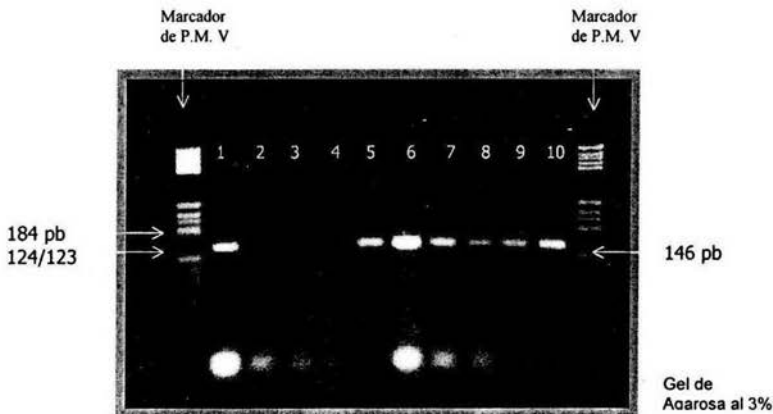


Figura 17. Exón 1-B: Se muestra la prueba realizada para establecer las condiciones de concentración óptima de oligonucleótido para este exón.

Muestra	Carril	Conc. oligonucleótido	Muestra	Carril	Conc. oligonucleótido
VHL-1	1	250 μ M	VHL-63	6	250 μ M
	2	100 μ M		7	100 μ M
	3	50 μ M		8	50 μ M
	4	25 μ M		9	25 μ M
	5	5 μ M		10	5 μ M

Las condiciones de PCR que consideramos óptimas para cada uno de los exones del gen *VHL* son:

a) Exón: 1-A, 1-B, 1-C, 1-D

Tabla 6. Exón 1. Concentración óptima de los oligonucleótidos y tamaño del producto de PCR

Exón	Nombre oligonucleótido	Concentración oligonucleótido óptima * [μ M]	Tamaño del producto de PCR [pb]
1-A	VHL # 104	50	269
	VHL # 105		
1-B	VHL # 3	5	146
	VHL # 8		
1-C	VHL # 1	50	193
	VHL # 10		
1-D	VHL # 9	25	148
	VHL # 101		

Tabla 7. Condiciones de PCR para el exón 1

H ₂ O	c.b.p. 25 μ L	
DMSO	5 %	1.25 μ L
Oligo 1	Concentración oligonucleótido óptima *	1 μ L
Oligo 2		1 μ L
Mezcla de reacción (Hotstar)	1 U	10 μ L
DNA	300 – 800 ng	

Programa # 1

Tabla 8. Programa de PCR para el exón 1

Desnaturalización Inicial	95 ° C	10 minutos
30 Ciclos	95 ° C	30 segundos
	68 ° C	30 segundos
	70 ° C	30 segundos
Extensión final	72 ° C	10 minutos
	4 ° C	enfriar

b) Exón 2

Tabla 9. Exón 2. Concentración óptima de los oligonucleótidos y tamaño del producto de PCR

Exón	Nombre oligonucleótido	Concentración oligonucleótido [μM]	Tamaño del producto de PCR [pb]
2	VHL # 102	100	208
	VHL # 103		

Tabla 10. Condiciones de PCR para el exón 2

H ₂ O	c.b.p. 35 μL	
DMSO	5 %	1.75 μL
VHL # 102	100 μM	1 μL
VHL # 103	100 μM	1 μL
Mezcla de reacción (Master Mix)	1 U	20 μL
DNA	400 – 1000 ng	

Programa # 2

Tabla 11. Programa de PCR para el exón 2

Desnaturalización Inicial	95 ° C	5 minutos
30 Ciclos	95 ° C	30 segundos
	61.8 ° C	30 segundos
	70 ° C	30 segundos
Extensión final	72 ° C	10 minutos
	4 ° C	enfriar

c) Exón 3

Tabla 12. Exón 3. Concentración óptima de los oligonucleótidos y tamaño del producto de PCR

Exón	Nombre oligonucleótido	Concentración Primer [μM]	Tamaño del producto de PCR [pb]
3	VHL # 6	50	266
	VHL # 107		

Tabla 13. Condiciones de PCR para el exón 3

H ₂ O	c.b.p. 25 μL	
DMSO	5 %	1.25 μL
VHL # 6	50 μM	1 μL
VHL # 107	50 μM	1 μL
Mezcla de reacción (Hotstar)	1 U	10 μL
DNA	400 – 1000 ng	

Programa # 3

Tabla 14. Programa de PCR para el exón 3

Desnaturalización Inicial	95 ° C	10 minutos
30 Ciclos	95 ° C	30 segundos
	64 ° C	30 segundos
	70 ° C	30 segundos
Extensión final	72 ° C	10 minutos
	4 ° C	enfriar

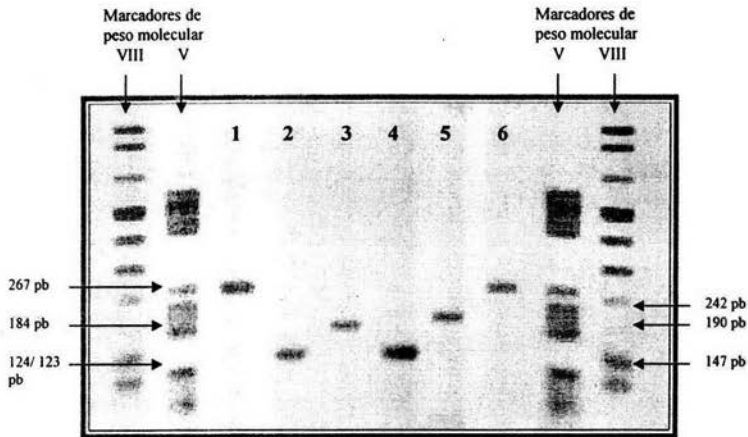


Figura 18. Tamaño de los productos de PCR obtenidos para cada exón
Gel de Agarosa al 2.5 %.

Carril	Región	Tamaño (pb)	Carril	Región	Tamaño (pb)
1	1-A	269	4	1-D	148
2	1-B	146	5	2	208
3	1-C	193	6	3	266

Una vez establecidas las condiciones óptimas de PCR para cada exón se procedió a amplificar todas las muestras de los pacientes.

3.7. Purificación de los productos de PCR

Los productos de PCR suelen contener restos de nucleótidos y oligonucleótidos que interfieren en la secuenciación, por tal motivo, es necesario llevar a cabo un paso de purificación previa a la secuenciación.

Existen diferentes procedimientos para purificar productos de PCR, en este trabajo se realizó por columna con un Paquete comercial de la marca Qiagen, con el cual se purificaron directamente los productos de PCR para los exones 1-A, 1-B, 1-D y 2.

Los productos de PCR del exón 1-C y 3 se purificaron con un Paquete comercial de la marca Qiagen de purificación del producto de PCR del gel de agarosa debido a que se observaba DNA degradado, y en el caso del exón 3 se observaba un producto de PCR inespecífico de peso molecular inferior al esperado en algunas muestras.

Posteriormente, para confirmar que los productos de PCR estuvieran libres de productos inespecíficos y de impurezas, se resolvieron nuevamente (por electroforesis) en geles de agarosa al 3% (región 1-B, 1-C, 1-D y exón 2) y 2.5% (región 1-A y exón 3).

En la electroforesis en geles de agarosa no se observó DNA inespecífico, ni residuos de oligonucleótidos; se observó una sola banda y la concentración del producto de PCR (intensidad de la banda en el gel) se vió ligeramente disminuida.

En algunas muestras, en las que hubo una disminución considerable de la concentración de DNA en el producto de PCR, se volvió a hacer la reacción de PCR y la purificación, con el fin de tener la cantidad suficiente de producto de PCR para la reacción de secuenciación (Figura 22)

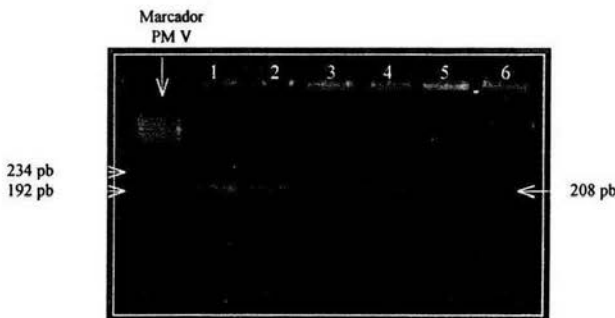


Figura 19. Ejemplo de productos de PCR purificados. Exón 2, 208 pb, marcador de P.M. V. Se observan productos de PCR sin DNA inespecífico y sin residuos de oligonucleótidos. En los carriles 1, 2, 4 y 5 se observan muestras con cantidad de DNA suficiente para la reacción de secuenciación. En el carril 3 y 6 se observa una muestra con disminución considerable en la cantidad de DNA, y que por lo tanto tuvo que ser repetida.

3.8. Secuenciación

En la secuenciación del DNA, el objetivo es determinar el orden en que están dispuestos los nucleótidos. La técnica enzimática es la más utilizada, la cual consiste en sintetizar la cadena complementaria del DNA que se quiere secuenciar, en condiciones en las que se pueda detener el crecimiento de la cadena en posiciones específicas.

Esto se logra con la utilización de nucleótidos modificados o didesoxinucleótidos marcados con fluorocromos (ddNTPs) que competirán con su homólogo normal (dNTP) por incorporarse a la cadena de DNA que se está sintetizando, produciendo la terminación de la síntesis en el momento y en el lugar donde se incorporan. El resultado final son cadenas de DNA que inician todas en el mismo sitio, pero con longitud variable porque se detuvo su crecimiento en diferentes momentos y el último nucleótido incorporado en cada cadena es un ddNTP marcado con un fluorocromo.

El secuenciador automatizado analiza la marca fluorescente de los fragmentos generados (Stratchand y Read, 1998).

Para la reacción de secuenciación se utilizó el Paquete BigDye Terminator de Applied BioSystems. Las condiciones de secuenciación que se utilizaron para los tres exones fueron similares, en las cuales, la cantidad de DNA varió de acuerdo a la concentración estimada por electroforesis en geles de agarosa al 2.5 y 3%. Las condiciones de secuenciación fueron:

Tabla 15. Condiciones de Secuenciación

H ₂ O	c.b.p. 20 µL	
Oligonucleótido	Dilución 1:50	1 µL
Amortiguador	3.5 µL	
Big Dye	2 µL	
DNA	3-6 µL	

El programa que se utilizó para la reacción de secuenciación es:

Tabla 16. Programa de secuenciación

Desnaturalización inicial	96 ° C	1 minutos
25 Ciclos	94 ° C	30 segundos
	52 ° C	10 segundos
	60 ° C	4 minutos
Extensión final	60 ° C	3 minutos
	4 ° C	enfriar

Posteriormente los productos de la reacción de secuenciación se purificaron por columnas Centri Sep de Princeton Separations y fueron secados en un concentrador de vacío. Se resuspendió el producto de la reacción de secuenciación con formamida y se traspasó a una gradilla para el termociclador, en la cual, la muestra se desnaturalizó y se cargó en el secuenciador automático para ser procesada.

Una vez procesadas las muestras, se obtuvieron los electroferogramas del secuenciador para ser analizados. Las secuencias obtenidas fueron comparadas con la secuencia del gen *VHL* de la base de datos del NCBI con número de acceso L15409, en la cual los codones son numerados desde la primera metionina de la secuencia del cDNA (nucleótido 214) (Apéndice C).

En el caso de la región 1-C, no se obtuvieron buenos resultados en el proceso de secuenciación, ya que se observaban dos secuencias de nucleótidos traslapadas en todas las muestras, por lo que se procedió a modificar la estrategia de secuenciación de esa región. Se utilizó el oligonucleótido sentido de la región 1-B (*VHL*#3) y el antisentido de la región 1-D (*VHL*#101), dando lugar a un producto de PCR de 406 pb, el cual se secuenció de acuerdo con el proceso previamente descrito. Los resultados obtenidos en la secuenciación con este cambio fueron satisfactorios.

Para el exón 1 se secuenciaron los 13 pacientes con el oligonucleótido sentido y se encontró un cambio en la secuencia codificante en los pacientes 3, 17 y 21.

El paciente 3 presentó una delección de los nucleótidos TCT (nucleótidos 440, 441, 442) localizados en los codones 76 y 77 (Figura 20).

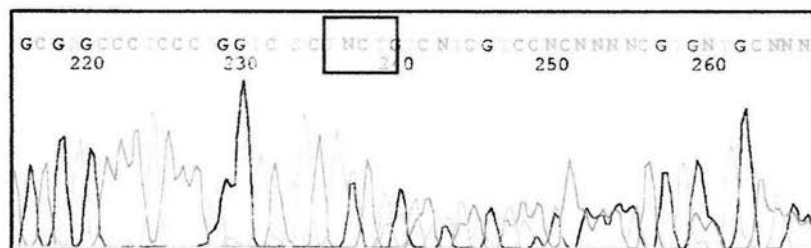


Figura 20. Exón 1. Delección del triplete TCT a partir del nucleótido 440

Para los exones 2 y 3 se analizaron 10 pacientes, de las cuales ninguna presentó cambios en la región codificadora.

Para los cambios encontrados en el exón 1, se buscaron en las bases de datos: “The Human Gene Mutation Database” y “von Hippel – Lindau germline mutation database of University of Birmingham”, para determinar si ya habían sido reportados previamente. El cambio delPhe76 ya estaba reportado por Crossey, PA. y cols. (1994), Maher, ER. y cols. (1996) y Chen, F. y cols. (1995), el cambio 512insA no se encuentra reportado en la literatura.

4. Discusión

4. Discusión

En nuestro país no existen reportes previos sobre el diagnóstico molecular de la enfermedad de von Hippel – Lindau. Debido a la gran variedad de síntomas que desarrollan estos pacientes y a la falta de conocimiento de la misma, la mayoría de los pacientes mueren sin un diagnóstico certero, dejando a sus descendientes sin conocimiento del riesgo del 50% de desarrollar la enfermedad. Por lo tanto es importante la caracterización molecular de pacientes índice con diagnóstico clínico en enfermedad de von Hippel – Lindau, con el fin de identificar las mutaciones responsables de esta enfermedad en población mexicana para desarrollar posteriormente un programa de diagnóstico predictivo para individuos en riesgo de familias afectadas con esta enfermedad.

Los resultados obtenidos en este trabajo son los siguientes:

El cambio realizado para amplificar la región 1-C, permitió determinar el cambio delPhe76, ya que éste se localizaba en la región donde se alinean los oligonucleótidos antisentido de la región 1-C y el oligonucleótido sentido de la región 1-D, lo cual dificultaba la amplificación y secuenciación del alelo mutado. Este cambio permitió secuenciar satisfactoriamente el exón 1 en dos fragmentos, en lugar de cuatro, como se ha descrito generalmente en la literatura, basándose en las condiciones descritas por Gnarr y cols (1994).

La delección del triplete TCT se localiza en los codones 76 (TTC) y 77 (TGC), que codifican para los aminoácidos fenilalanina y cisteína, al perderse éste triplete, el primer nucleótido del codón 76 y los dos nucleótidos del codón 77 restantes vuelven a formar el resto de aminoácido cisteína, por lo que a pesar de que esta delección abarca dos codones, solo un aminoácido se ve afectado, en este caso la fenilalanina.

El cambio encontrado en la región codificadora delPhe76 en el paciente 3, se encuentra reportado en la literatura en familias con VHL (Crossey, PA. y cols., 1994, Maher, ER. y cols., 1996; Chen, F. y cols, 1995), por lo que se considera una mutación patogénica asociada a la enfermedad de von Hippel – Lindau, que compromete la integridad del sándwich β del mismo dominio de la pVHL, ya que forma parte del centro de aminoácidos hidrofóbicos.

De acuerdo a las bases de datos “The Human Gene Mutation Database” y “von Hippel – Lindau germline mutation database of University of Birmingham”, el codón 76 es considerado como un sitio caliente (“hot spot”), en el cual se han descritos las mutaciones: 441InsC, las sustituciones cTTC-ATC, TTCt-TTG, TTC-TCC y 441delG.

En las dos familias con la mutación delPhe76 descritas en la literatura por Chen, F. y colaboradores en 1995, el 33.3% de los miembros presentaban angiomas de retina, 53.3% Hemangioblastoma del SNC, 46.7% CCCR, y ninguno presentaba feocromocitoma. Esto contrasta con el paciente de nuestro estudio con esta mutación, quien no presenta angiomas de retina, ni CCCR, y en su lugar presenta quistes renales. Las manifestaciones clínicas que comparten son el hemangioblastoma de cerebelo y la ausencia de feocromocitoma.

Este paciente cumple con los criterios clínicos de diagnóstico de enfermedad de von Hippel – Lindau. En la figura 22 se muestra el árbol genealógico, en el cual se observan 2 familiares afectados, confirmando antecedentes heredofamiliares (figura 22).

La inserción de una Adenina en el nucleótido 512 localizado en el codón 100, encontrado en dos pacientes de 2 familias diferentes, ocasiona un corrimiento en el marco de lectura, generando como consecuencia un codón de terminación en el nucleótido 131. Este cambio en la región codificadora no se encuentra reportado en la literatura, por lo que para determinar si es una mutación patogénica, es necesario determinar como segrega este cambio en la familia; pero debido a que da lugar a una proteína truncada, éste tipo de mutaciones se consideran como patogénicas y daría lugar a un paciente con VHL tipo 1.

La proteína que se produciría con esta mutación le restarían los aminoácidos 132 al 213, por lo tanto carecería de la región implicada en la exportación nuclear y en el sitio de unión a la elongina C (Stebbins y cols, 1999) y por lo tanto el complejo VCB no se formaría y no habría interacción con las subsecuentes proteínas que participan en la función de la pVHL.

A pesar de que dos pacientes comparten el mismo cambio de 512insA, presentan diferente cuadro clínico, mientras que un paciente presenta angiomas de retina, el otro paciente no presenta éste tipo de lesión; y a diferencia del primero, éste último presenta CCCR. En la figura 23 se muestra el árbol genealógico del paciente 17, y en la figura 24 el del paciente 21.

Como podemos observar el fenotipo varía, a pesar de presentar el mismo cambio, lo que apoya la teoría de que la enfermedad VHL tiene expresividad variable (Lamiell, JM. y cols, 1989; Glenn, GM. y cols, 1990 y 1991), ya que cada familia, así como los miembros de la misma, pueden presentar diferentes manifestaciones de la enfermedad, esto también se debe a que el cáncer es multifactorial. Algunos de los factores que se deben de considerar para éste hecho es la existencia de genes de susceptibilidad o de protección y mecanismo por el cual se da la pérdida de heterocigocidad en los tumores.

Los cambios encontrados se clasifican como una microdelección y una inserción; este tipo de mutaciones se han asociado a familias sin feocromocitoma, llamadas VHL Tipo 1 (Zbar, B y cols, 1996; Chen, F. y cols, 1995), lo cual concuerda con el fenotipo observado, ya que ninguno de los pacientes ha presentado este tipo de lesión.

Se ha descrito en la literatura que el exón 1 presenta una mayor frecuencia de mutaciones (Ma, X, y cols, 2001; Kondo, K. y cols, 2002), lo cual coincide con los resultados obtenidos, ya que en este exón se encontraron los tres cambios descritos.

Las mutaciones en células germinales en el gen *VHL* se han detectado en un 39-80%, dependiendo de la estrategia utilizada para la identificación de dichas mutaciones en familias con VHL de Europa, Estados Unidos y Asia (Whaley, JM. y cols, 1994; Chen, F. y cols, 1995; Crossey, PA. y cols., 1994, Maher, ER. y cols., 1996; Zbar, B. y cols., 1996).

De los 5 pacientes analizados, pertenecientes a las 4 familias que cubrían los criterios clínicos de diagnóstico para la enfermedad de von Hippel – Lindau de Melmon y Rosen (1964), 3 presentaron mutaciones, lo cual corresponde al 75% (3 familias de 4).

El porcentaje de mutaciones en células germinales estimado en nuestros pacientes se encuentra dentro del rango de lo reportado para otras poblaciones (39-80%).

Los dos pacientes de una misma familia que cubren los criterios clínicos de VHL que no presentaron mutaciones, puede ser debido a que en la literatura se ha descrito que el gen *VHL* puede sufrir deleciones parciales o completas, las cuales se ha reportado que ocurren en un 25% (Stolle, C y cols., 1998) y en un 3-9% (Richard, FM. y cols, 1993; Yao, B. y cols, 1993; Stolle, C. y cols, 1998) respectivamente. Este tipo de mutaciones, por medio de la metodología empleada en este trabajo (secuenciación directa) no pueden ser detectadas, por lo que se tendría que aplicar otras técnicas como Southern o FISH para estudiar esta posibilidad.

Otros grupos de investigadores han sugerido que las familias con VHL, en las cuales no se han detectado mutaciones en células germinales, pueden tener mutaciones en la región promotora del gen *VHL*, en la literatura se ha reportado sólo una mutación de este tipo (Klein, B. y cols, 2001); esta posibilidad se descartó en nuestros pacientes, debido a que el fragmento 1-A contiene al promotor completo y en las secuencias obtenidas no se observaron cambios en esta región.

También se han descrito mutaciones en las uniones intrón - exón (Zbar y cols, 1996; Crossey y cols., 1994), pero las secuencias obtenidas abarcan de 5 a 10 pb río arriba o abajo de la región codificante y no observaron cambios, por lo que esta posibilidad se descarta.

Los pacientes con diagnóstico de hemangioblastoma esporádico de cerebelo y aquéllos con antecedentes familiares insuficientes para discernir entre un hemangioblastoma esporádico o uno asociado a la enfermedad VHL, no deben ser descartados de padecer la enfermedad, sin antes considerar otros mecanismos de inactivación del gen *VHL*, lo cual será el objetivo de un trabajo posterior.

La importancia de este trabajo, es que es el primero en que se hace un análisis molecular del gen *VHL* en población mexicana, el cual tiene como objetivo determinar las mutaciones características de la población, con el fin de establecer en un futuro un método de diagnóstico molecular.

Para determinar con mayor precisión la tendencia de la distribución y frecuencia de las mutaciones características de nuestra población, es necesario aumentar el tamaño de muestra y extender el estudio a los familiares de los pacientes índice estudiados para comenzar un estudio predictivo de la enfermedad VHL.

Uno de los retos a seguir es esclarecer los mecanismos de acción de la proteína codificada por el gen *VHL* para desarrollar nuevas estrategias terapéuticas dirigidas a inhibir el crecimiento tumoral. Por el momento, el diagnóstico temprano y el diagnóstico molecular de portadores y su seguimiento estricto, son los mejores medios para combatirla.

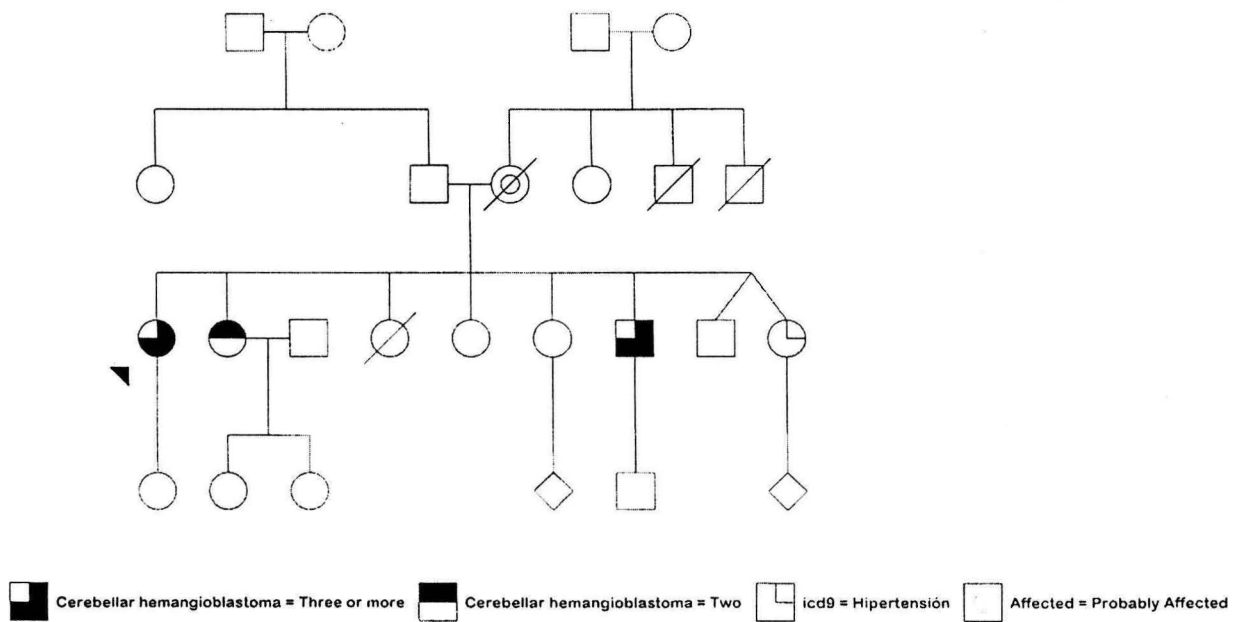


Figura 22. Árbol genealógico del paciente 3 con la mutación delPhe76.

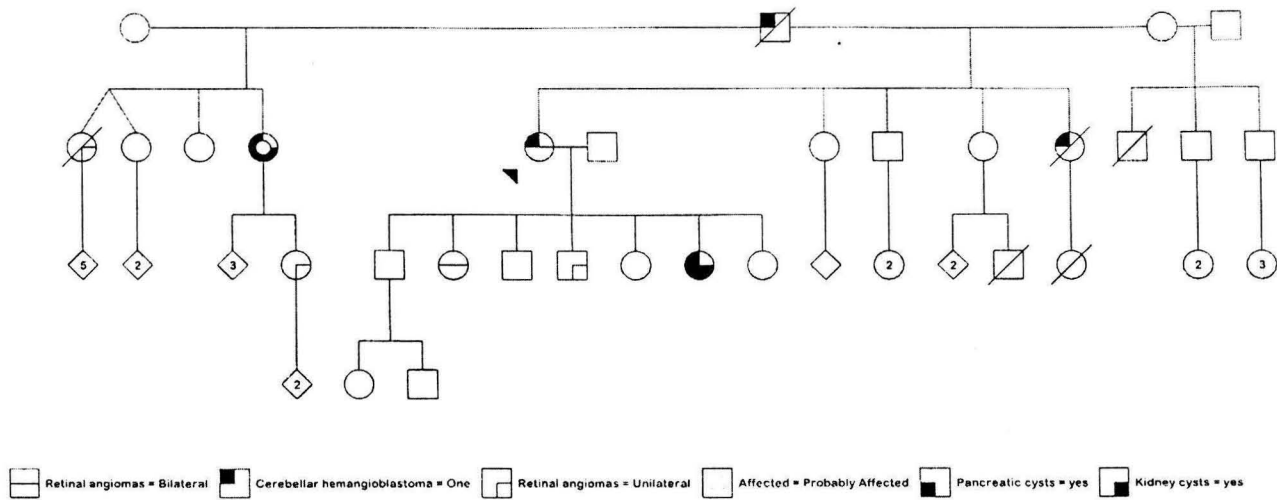


Figura 23. Árbol genealógico del paciente 17 con la mutación 512insA

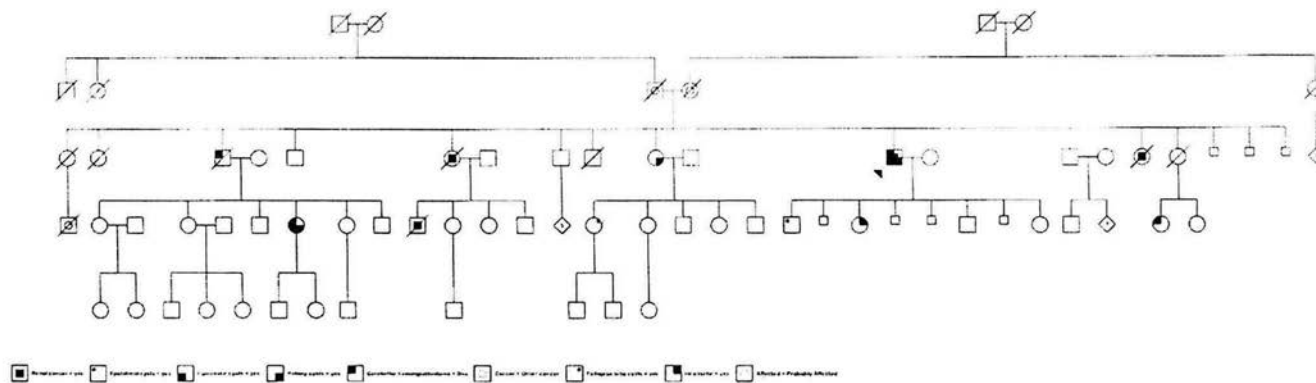


Figura 24. Árbol genealógico del paciente 21 con la mutación 512insA.

5. Conclusiones

5. Conclusiones

- ▶ Las mutaciones en células germinales en el gen *VHL* en pacientes mexicanos con diagnóstico clínico de enfermedad de von Hippel – Lindau se detectaron con una frecuencia del 75%.

- ▶ Las mutaciones encontradas son: 512insA y delPhe76 y ambas se localizan en el exón 1.

- ▶ Los pacientes con dichas mutaciones pertenecen al VHL Tipo 1, debido a que las mutaciones encontradas se clasifican como microdelecciones e inserciones y no presentan feocromocitoma.

- ▶ La mutación 512insA en el codón 100 no se ha descrito en la literatura y por lo tanto es una contribución al conocimiento molecular de la enfermedad.

- ▶ La implementación del diagnóstico molecular de la enfermedad de von Hippel-Lindau permitirá la identificación oportuna de portadores asintomáticos. Esto es relevante porque permite optimizar la vigilancia de los individuos en riesgo – reduciendo morbi-mortalidad-, a la vez que evita el uso de procedimientos costosos e invasivos en personas sin la mutación.

6. Parte experimental

6.1. Equipos

- Balanza analítica Shimadzu LIBROR AFG-220
- Balanza granataria Ohaus
- Baño María con agitación circular Polystat 1200-00
- Bomba de vacío
- Cámara fotográfica Polaroid instantánea DS-34
- Campana de Flujo Laminar VECO
- Centrífuga y microcentrífuga Eppendorf 5415 C
- Centrífugas refrigeradas: Bekman 65-6R y Eppendorf 5804 R
- Concentrador de vacío Hetovac VR-1
- Espectrofotómetro UV/visible Beckman DU-40
- Fuente de poder BIO-RAD Power/Pac 3000
- Horno de microondas Sharp
- Parrilla con agitación Thermolyne
- pHmetro
- Secuenciador: ABIPRISM Model 3100
Versión 3.7
- Sistema de electroforesis horizontal Gibco BRL 58
- Termociclador Perkin Elmer 9600
- Termociclador Perkin Elmer 9700
- Transiluminador de luz UV
- Vortex Fisher Scientific

6.2. Material de laboratorio y cristalería diversa

- Celdas de cuarzo para espectrofotómetro
- Cristalería diversa
- Micropipetas de 1000, 500, 200, 100, 20, 10 μ L

6.3. Material

- Agujas estériles para punción venosa
- Contenedores para hielo
- Gradillas
- Guantes
- Parafilm
- Pipetas de transferencia
- Puntas para micropipetas
- Tubos eppendorf de 1.5, 0.5 0.25 mL
- Tubos Falcon de 45 ml
- Tubos para centrifuga de 15 ml
- Tubos para PCR de 0.2 mL de pared delgada
- Tubos vacutainer con anticoagulante ACD
- Películas fotográficas instantáneas de cartucho blanco y negro Polaroid 665

6.4. Reactivos

- Agarosa ultra pura (Gibco BRC)
- Agua desionizada y estéril
- Ácido bórico (J.T. Baker)
- Alcohol isoamilico (J.T. Baker)
- BLCR (Amortiguador de Lisis de Células Rojas)
- Bromuro de etidio (SIGMA)
- Cloroformo (Hycel de Mex.)
- Colorante de carga (azul de bromofenol, xilén cianol FF, Ficoll)
- Columnas para purificar reacción de secuenciación: Centri Sep columns marca Princeton Separations
- Dimetil sulfóxido (DMSO) (SIGMA)
- Etanol absoluto y al 70% (J.T. Baker)
- Fenol (Técnica Química)
- HotStar Taq Master Mix: 1 U/ μ L Taq polimerasa (Qiagen)
 - 1.5 mM MgCl₂
 - 200 μ M de cada dNTP
 - Amortiguador para Taq polimerasa
- Isopropanol (J.T. Baker)

- Marcador de peso molecular V y VIII (Roche)
- Paquete de extracción de DNA Qiagen: Proteasa, amortiguador AL, AW1, AW2 y AE
- Paquete de purificación de DNA Qiagen: amortiguador PB, PE y EB
- Paquete de purificación de DNA Qiagen desde gel de agarosa: Amortiguador QG, PE y EB
- Paquete de secuenciación de Applied BioSystem: Big Dye Terminator
- Taq PCR Master Mix: 0.05 U/ μ L Taq polimerasa
1.5 mM MgCl₂
200 μ M de cada dNTP
Amortiguador para PCR
- Tris base (Promega)
- MgCl₂ 1 M (Merck)
- NaCl 5 M, 5 mM y 7 M (Merck)
- Oligonucleótidos: VHL # 104, VHL # 105, VHL # 3, VHL # 8, VHL # 10, VHL # 1, VHL # 9, VHL # 101, VHL # 102, VHL # 103, VHL # 6, VHL # 107 (BIOSOURCE)
- SDS (J.T. Baker)
- TBE 10X y 1X

6.5. Metodología

6.5.1. Toma de muestras

1. Tomar los datos del paciente: Nombre, fecha de nacimiento, registro, sexo y fecha de la toma de muestra.
2. Preparación del material para punción venosa: tubos vacutainer con anticoagulante ACD, aguja para punción venosa, liga, torundas de algodón, alcohol, base para el tubo vacutainer.
3. Selección de la vena para la punción
4. Extracción de aproximadamente 20 ml de sangre periférica (4 Tubos vacutainer)
5. Agitación por inmersión para mezclar la sangre con el anticoagulante.
6. Etiquetar y almacenar a 4° C.

6.5.2. Extracción de DNA

6.5.2.1. Técnica de sales

1. Lisis celular
2. Extracción de DNA
3. Precipitación de DNA

1. Lisis celular

- 1.1. 20 ml de sangre periférica se traspasan a tubos Falcon de 45 ml
- 1.2. Agregar RCLB volumen a volumen.
- 1.3. Nivelar los tubos en una balanza granataria de dos platos
- 1.4. Mezclar por inversión de 5 – 10 minutos
- 1.5. Centrifugar a 5000 r.p.m., durante 10 minutos a 4° C
- 1.6. Eliminar el RCLB hasta la mitad aspirando con vacío, cuidando de no despegar el botón.
- 1.7. Repetir el proceso 3 veces más.
- 1.8. Una vez limpio el botón de leucocitos, se elimina por completo el RCLB con vacío y se almacena a 4°C.

2. Extracción de DNA

- 2.1 Al botón de leucocitos se le agregan 886 μ L de NaCl 5 mM, 46 μ L de SDS al 10 % y 308 μ L de NaCl saturado.
- 2.2 Se homogeniza hasta disolver el botón
- 2.3 La mezcla se pasa a tubos ependorff de 1.5 ml
- 2.4 Centrifugar de 20 – 30 minutos, a 4° C a 11000 r.p.m..
- 2.5 El sobrenadante se pasa a otro tubo previamente rotulado
- 2.6 Agregar fenol saturado (volumen a volumen) y agitar suavemente durante 10 minutos hasta formar una emulsión.
- 2.7 Centrifugar a 11 000 r.p.m., a 4° C, durante 10 minutos.
- 2.8 Pasar la fase acuosa (fase superior) a un tubo limpio y desechar la fase orgánica (fase inferior)
- 2.9 Agregar una mezcla de fenol saturado/ cloroformo/ alcohol isoamílico (volumen a volumen) y agitar suavemente durante 10 minutos.
- 2.10 Centrifugar a 11 000 r.p.m. a 4° C durante 10 minutos
- 2.11 Pasar la fase acuosa a un tubo limpio y desechar la fase orgánica
- 2.12 Agregar una mezcla de cloroformo/ alcohol isoamílico (24:1) y agitar suavemente durante 10 minutos
- 2.13 Centrifugar a 11 000 r.p.m. a 4° C durante 10 minutos
- 2.14 Pasar la fase acuosa a un tubo limpio y desechar la fase orgánica

3. Precipitación de DNA

- 3.1. Agregar isopropanol.
- 3.2. Agitar suavemente hasta que se forme un precipitado blanco
- 3.3. Centrifugar a 11 000 r.p.m. durante 20 minutos a 4° C
- 3.4. Decantar el isopropanol cuidando de no tirar el botón
- 3.5. Agregar etanol al 70 % para lavar el DNA
- 3.6. Centrifugar a 11 000 r.p.m. durante 15 minutos a 4° C
- 3.7. Repetir el procedimiento 3 veces más.
- 3.8. Evaporar el etanol en un concentrador de vacío con calor
- 3.9. Resuspender el DNA en agua estéril y disolver a 50° C

6.5.2.2. Técnica de Columna de Qiagen

1. Se toman 2 ml de sangre y se adicionan a un tubo falcon de 15 ml
2. Se adiciona 200 μL del stock de Proteinasa K y 2.4 ml del amortiguador AL a la muestra y se mezcla
3. Incubar a 70° C por 10 minutos.
4. Adicionar 2 ml de etanol y mezclar
5. Transferir la mitad de la solución a la columna colocada sobre un tubo de 15 mL
6. Centrifugar a 3000 r.p.m. por 3 minutos
7. Descartar el filtrado y adicionar el resto de la mezcla (paso 5) y repetir el paso 6
8. Remover el filtrado y agregar a la columna 2 ml del amortiguador AW1
9. Centrifugar a 5000 r.p.m. durante 1 minuto
10. Remover el filtrado y agregar a la columna 2 ml del amortiguador AW2
11. Centrifugar a 5000 r.p.m. durante 15 minutos
12. Colocar la columna en un tubo limpio de 15 ml y se adicionan 300 μL del amortiguador AE o agua estéril y se deja reposar 5 minutos a temperatura ambiente
13. Centrifugar a 5000 r.p.m. durante 5 minutos
14. Para obtener una mayor concentración, se toman los 300 μL eluidos y se colocan nuevamente en la columna y se deja reposar 5 minutos a temperatura ambiente
15. Centrifugar a 5000 r.p.m. durante 5 minutos
16. Almacenar el DNA a 4° C

6.5.3. Cuantificación de DNA

6.5.3.1. Espectrofotometría

1. Del volumen de DNA obtenido de la muestra se realizó una dilución 1:100 (5 μL de DNA + 495 μL de H_2O)
2. Se realizaron dos lecturas en el espectrofotometro a $\lambda_1 = 260 \text{ nm}$ y $\lambda_2 = 280 \text{ nm}$, utilizando agua estéril como blanco.
3. Para obtener la concentración de DNA de las muestras se realizó el siguiente cálculo:

$$[\text{Lectura obtenida}]D.O. \times \frac{50 \frac{\text{ng}}{\mu\text{L}}}{1D.O.} \times \frac{500 \mu\text{L}}{5 \mu\text{L}} = [\text{Lectura obtenida}]D.O. \times 5000 = [\text{ADN}] \frac{\text{ng}}{\mu\text{L}}$$

4. Se calcula la relación λ_1/λ_2 (260/280) para obtener la pureza de la muestra.

6.5.3.2. Electroforesis

1. Pesar la cantidad indicada en la siguiente tabla para obtener la concentración de agarosa deseada:

Cantidad de agarosa [gr]	[Agarosa] %
1.0	1.0
2.5	2.5
3.0	3.0

2. Adicionar 100 ml de TBE 1X
3. Calentar la mezcla hasta que se disuelva la agarosa
4. Verter la mezcla en el molde de la cámara de electroforesis horizontal, colocar los peines y dejar solidificar
5. Retirar los peines y agregar el TBE necesario a la cámara de electroforesis para cubrir el gel de agarosa
6. Preparar una mezcla de DNA y colorante de carga (azul de bromofenol – xilen cianol y ficol) en una proporción 2:1.
7. Cargar el gel con la mezcla en cada uno de los pozos y correr a 100 volts aproximadamente 40 minutos.
8. Teñir el gel con bromuro de etidio
9. Observar en el transiluminador U.V..

6.5.4. Reacción en cadena de la polimerasa

Para establecer las condiciones necesarias de PCR para amplificar las diferentes regiones del gen VHL se realizo lo siguiente:

1. Se utilizaron los oligonucleótidos descritos por Gnarra y colaboradores en 1994.
2. Se partió de las condiciones de PCR descritas por Gnarra y cols.
3. Se fijó el número de ciclos de PCR (30 ciclos), la cantidad de DNA (300 ng) y la concentración de Taq polimerasa (1 U) y la cantidad de DMSO (5%)
4. El programa de PCR se elaboró de acuerdo a la temperatura media (T_m) de cada uno de los oligonucleótidos
5. Se probaron las concentraciones de oligonucleótido: 100, 50, 25, 5 μ M, con el fin de determinar la concentración óptima para la reacción de PCR.
6. Se escogieron dos muestras de pacientes VHL al azar

7. Los productos de PCR fueron resueltos en geles de agarosa al 2.5 % y 3 % y se corrieron junto el marcador de peso molecular V y/o VIII para determinar el tamaño del producto amplificado; posteriormente el gel fue teñido con bromuro de etidio (Ver técnica de electroforesis)
8. Una vez establecida la concentración de los oligonucleótidos se procedió a amplificar todas las muestras.
9. Se realizaron las mismas pruebas para cada una de las regiones a amplificar.

6.5.5. Purificación de los productos de PCR

Purificación directa de los productos de PCR con columnas marca Qiagen.

1. Adicionar 5 volúmenes del Amortiguador PB por 1 volumen de reacción.
2. Colocar la columna del paquete Qiagen en un tubo colector de 2 ml
3. La mezcla del punto 1 se adiciona a la columna y se centrifuga a 13 000 r.p.m. durante 1 minuto
4. Se elimina el filtrado
5. Se adiciona a la columna 0.75 ml del amortiguador PE y se centrifuga durante 1 minuto a 13 000 r.p.m.
6. Se coloca la columna en un tubo ependorf nuevo y previamente rotulado
7. Se adiciona 30 μ L de Amortiguador EB para eluir el DNA
8. Se centrifuga a 13 000 r.p.m. durante 1 minuto
9. Se desecha la columna y se almacena el producto de PCR purificado a 4° C

Purificación desde gel de agarosa de los productos de PCR con columnas marca Qiagen.

1. Por medio de electroforesis se resuelve el producto total de PCR que se va a purificar en un gel de agarosa al 2.5% a 100 volts
2. Se corta el producto de PCR con un bisturí estéril, tratando de eliminar la mayor cantidad de agarosa posible y se coloca en un tubo ependorf de 1.5 ml
3. Se pesa el gel de agarosa que contiene al producto de PCR que se va a purificar.
4. Se adiciona por cada 100 mg de peso de gel de agarosa, 300 μ L del amortiguador QG.
5. Se incuba en un baño maría a 50° para disolver el gel de agarosa por 10 minutos o hasta disolución total. Se puede agitar con vortex a lo largo de la incubación con el fin de facilitar la disolución.
6. Una vez terminada la incubación se le agrega 100 μ L de isopropanol por cada 100 mg de peso de el gel de agarosa.
7. La mezcla anterior se adiciona a la columna y se centrifuga a 13 000 r.p.m. durante 1 minuto

8. Se elimina el filtrado
9. Se agrega 500 μL del amortiguador QG y se centrifuga a 13 000 r.p.m. durante 1 minuto
10. Se elimina el filtrado
11. Se adiciona a la columna 0.75 ml del amortiguador PE y se centrifuga durante 1 minuto a 13 000 r.p.m.
12. Se elimina el filtrado y centrifuga durante 1 minuto a 13 000 r.p.m.
13. Se coloca la columna en un tubo ependorf nuevo , previamente rotulado
14. Se adiciona 30 μL de amortiguador EB para eluir el DNA
15. Se centrifuga a 13 000 r.p.m. durante 1 minuto
16. Se desecha la columna y se almacena el producto de PCR purificado a 4° C

6.5.6. Secuenciación

6.5.6.1. Reacción de secuenciación

1. Se resolvieron los productos de PCR por electroforesis en un gel de agarosa al 2.5% y 3% respectivamente a 120 Volts para determinar la cantidad de producto de cada muestra
2. La cantidad de producto de PCR utilizado en la reacción de secuenciación varió de acuerdo a la concentración estimada por electroforesis.
3. Se realizo una prueba inicial con una muestra escogida al azar, para determinar con cual oligonucleótido (forward o reverse) se obtenía una mejor secuencia.
4. Se realizo una dilución del oligonucleótido de acuerdo a su concentración inicial, se fijo la cantidad de Big Dye y del Amortiguador.
5. Se utilizó un programa predeterminado para la reacción de secuenciación.

6.5.6.2. Purificación de la reacción de secuenciación.

Una vez terminada la reacción de secuenciación se purifico con columnas Centri Sep columns de Princeton Separations

1. Hidratación de las columnas Centri Sep
 - a. Se agrega a cada una de las columnas 700 μL de agua estéril.
 - b. Se agitan con vortex con el fin de eliminar las burbujas formadas
 - c. Se dejan reposar como mínimo 2 horas

- d. Para eliminar el exceso de agua se quita el tapón inferior de las columnas y se colocan en un tubo colector
 - e. Se centrifugan durante 1 minuto a 3000 r.p.m.
 - f. Se elimina el filtrado y se vuelve a centrifugar durante 1 minuto a 3000 r.p.m.
-
2. Se coloca la columna en un tubo eppendorf de 1.5 ml previamente rotulado
 3. La reacción de secuenciación se pasa por la columna cuidando de no romper la columna con la punta de la micropipeta.
 4. Se centrifuga durante 1 minuto a 3000 r.p.m
 5. Se desecha la columna y el filtrado se coloca en un concentrador de vacío hasta su evaporación total
 6. Se agrega 16 μ L de formamida
 7. Se traspasa la reacción de secuenciación a una charola para la secuenciación automatizada
 8. Se incuba a 95° C por 2 minutos en un termociclador para llevar a cabo la desnaturalización del DNA
 9. Se traspasa inmediatamente después a hielo
 10. Se coloca la charola en el secuenciador y se procesan las muestras
 11. Una vez procesadas las muestras se procede a la lectura de los electroferogramas

7. Aréndice

A. Carta de consentimiento**HOJA DE CONSENTIMIENTO PARA PARTICIPAR EN EL ESTUDIO:****“CARACTERIZACIÓN CLÍNICA Y MOLECULAR DE ENFERMEDAD DE VON HIPPEL - LINDAU”.****INVITACIÓN A PARTICIPAR.**

Usted y/o su hijo (a) están invitados a participar en el estudio que incluye a pacientes y sus familiares con Enfermedad de von Hippel – Lindau, pacientes con diagnóstico de hemangioblastoma del sistema nervioso central, angiomas retinianos, feocromocitoma o cáncer renal no papilar. La enfermedad de von Hippel – Lindau es un síndrome de cáncer familiar, en la cual hay un riesgo aumentado de padecer una variedad de tumores tanto benignos como malignos, que afectan al sistema nervioso, ojo, riñón, páncreas y otros órganos abdominales. Este estudio está diseñado con el objeto de identificar las alteraciones en el material hereditario que son la causa de la enfermedad, con el propósito de identificar a las personas con riesgo elevado de tener tumores, mismas a las que les beneficiará con un programa de vigilancia médica.

Su aceptación en el estudio no implica la administración de medicamentos diferentes a los que usted recibe hasta la actualidad, pero si se tiene influencia sobre los tratamientos futuros que puedan implementarse.

La decisión de participar implica que usted tenga un conocimiento completo de los riesgos y beneficios, los cuales se detallan en esta carta. Cualquier duda adicional puede ser aclarada por los investigadores responsables. Una vez que usted lea este escrito y aclare sus dudas podrá decidir si desea participar en el estudio o no.

PROCEDIMIENTO A REALIZARSE

Inicialmente se realizará una historia clínica completa y el árbol genealógico de la familia, identificando a los familiares que posiblemente estén afectados con la misma enfermedad y se colectará una muestra de sangre. Con su consentimiento, es posible que en un futuro se contacte a sus familiares para invitarles a participar en el estudio, en el caso de menores de 18 años se requerirá de la autorización firmada de los padres o responsables legales. Asimismo, se revisará los estudios de rutina a los cuales ha sido sometido en esta Institución, y será revisado por un médico neurólogo. En una consulta posterior en el servicio de genética, se le brindará información acerca de los mecanismos de herencia del padecimiento.

EFFECTOS INDESEABLES Y RIESGOS.

Cuando la sangre es obtenida, usted podrá experimentar un leve dolor en el sitio de punción. Raras veces ocurren infecciones o inflamación local. Estos riesgos se reducen al emplear al personal especializado para la obtención de muestras. Mediante este estudio se detectará a un grupo de familias en las cuales el riesgo de que sus hijos estén afectados con la enfermedad es alto, por lo cual es importante que la familia esté enterada de dicha posibilidad.

BENEFICIOS PARA LAS PERSONAS PARTICIPANTES EN EL ESTUDIO

La identificación de alteraciones en el material genético que dan lugar a la enfermedad de von Hippel–Lindau, permitirá establecer el riesgo de que un individuo dentro de la familia pueda heredar el padecimiento, así como establecer quienes no están en riesgo de transmitirlo.

CONSIDERACIONES ECONÓMICAS

Este estudio no representará costo adicional para el paciente o su familia.

CONFIDENCIALIDAD

Todos los expedientes serán mantenidos con carácter estrictamente confidencial. Solo los investigadores tendrán acceso a los datos generados durante el estudio.

DERECHO A ABANDONAR EL ESTUDIO.

Su participación se considera completamente voluntaria y usted puede desistir de participar o continuar en el estudio en el momento que lo desee. Esta determinación no afectará de ninguna manera su relación con el hospital o el grupo médico.

Si usted considera que cualquiera de los puntos antes mencionados no está claro, o le surgen dudas nuevas, le suplicamos aclararlas con los investigadores responsables antes de determinar si participará o no en el estudio. Los participantes en el proyecto son la Dra. Ma. Elisa Alonso, Dra. Astrid Rasmussen y Lic. En T.S. Adriana Ochoa del Departamento de Genética del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. Tel. 56 06 38 22, ext. 2018 y 2019.

AUTORIZACIÓN

He leído el contenido de este escrito y he decidido por voluntad propia participar en este estudio. Sus objetivos generales y particulares y los riesgos posibles e inconveniencias me han sido explicados y aclarados a satisfacción. Mi firma indica también que he recibido una copia de la presente autorización para participar.

Nombre_____
Firma

Fecha: _____

Teléfono: _____

Firma de quien obtiene el consentimiento_____
Testigo_____
Testigo

B. Preparación de Reactivos**RCLB: Amortiguador de Lisis de Glóbulos rojos.**

Reactivo	Concentración	Volumen
MgCl ₂	1 M	5 ml
NaCl	5 M	2 ml
TRIS pH =7.6	1 M	10 ml
H ₂ O	c.b.p. 1000 ml	

Cloruro de magnesio (MgCl₂) 1 M

- 203.3 g de MgCl₂.6H₂O
- Agregar 800 ml de H₂O desionizada estéril
- Agitar hasta disolución total
- Ajustar volumen a 1000 ml
- Esterilizar en autoclave

Cloruro de sodio 5 M (NaCl)

- Pesar 292.2 g NaCl
- Agregar 800 ml de H₂O desionizada estéril
- Agitar hasta disolución total
- Ajustar volumen a 1000 ml
- Esterilizar en autoclave

Cloruro de sodio saturado (NaCl)

- Pesar 409.08 g NaCl
- Agregar 800 ml de H₂O desionizada estéril
- Agitar hasta disolución total
- Ajustar volumen a 1000 ml
- Esterilizar en autoclave

TRIS (pH = 7.6) 1M

- 121.1 g TRIS base
- Agregar 800 ml de H₂O desionizada estéril
- Ajustar el pH con HCl concentrado (aproximadamente 60 ml)
- Agitar hasta disolución total
- Ajustar volumen a 1000 ml
- Esterilizar en autoclave

SDS 10% (Dodecil Sulfato de Sodio)

- 100 g de SDS
- 900 ml de H₂O desionizada estéril
- Calentar a 68° C para asegurar la disolución
- Esterilizar en autoclave

TBE 10X

Reactivo	Cantidad
TRIS base	108 gr.
Ac. Bórico	55 gr.
EDTA	7.3 gr.
H ₂ O	c.b.p. 1000 ml

- Pesar la cantidad indicada de TRIS base y disolver en 600 ml de H₂O desionizada estéril con agitación constante
- Una vez disuelto el TRIS base se pesa el ácido bórico y se agrega a la solución anterior
- Esperar a que se disuelva el componente anterior para agregar el EDTA
- Agitar hasta total disolución.
- Aforar a 1000 ml de H₂O desionizada estéril
- Filtrar la solución con papel filtro Whatman del No. 1
- Esterilizar.

TBE 1X

- 100 ml de TBE 10X
- 900 ml de H₂O desionizada estéril

Fenol saturado

- Se funde el fenol a 68° C.
- A 300 ml de fenol saturado se le adicionan 200 ml de H₂O desionizada estéril
- 2 ml de β-mercaptoetanol
- 2 ml de TRIS 2 M a pH= 8.0
- 292.5 μL de NaOH 10 N
- Se mezcla durante toda la noche protegido de la luz
- Ajustar el pH a 7.6
- Se almacena en un frasco ámbar a 4° C
- Usar la fase inferior para la extracción del DNA

Cloroformo/ Alcohol isoamilico

- Se mezclan 24 partes de cloroformo con 1 parte de alcohol isoamilico
- Se almacena a 4° C

Fenol/ Cloroformo/Alcohol isoamilico

- Se toma un volumen de fenol saturado y se mezcla con una cantidad igual de la mezcla de Cloroformo/ alcohol isoamilico
- Almacenar protegido de la luz a 4° C
- Utilizar la fase inferior.

Etanol 70%

- 700 ml de etanol puro
- 300 ml de H₂O desionizada estéril
- Almacenar a 4° C

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Colorante de carga

Reactivo	Concentración
Azul de bromofenol	0.25 %
Xilén cianol FF	0.25 %
Ficoll (400) en H ₂ O	25.0 %
H ₂ O	c.b.p. 100%

C. Secuencia del cDNA del gen *VHL*

NCBI
Nucleotide

Entrez	PubMed	Nucleotide	Protein	Genome	Structure	PMC	Taxonomy	Books
Search	Nucleotide	for		Go	Clear			
Display	default	Show	20	Send to	File	Get Subsequence	Features	Details

1: L15409. Homo sapiens (clo...[gi:306847])

LOCUS HUMHIPLIND 1810 bp mRNA linear PRI 26-JUL-1993
 DEFINITION Homo sapiens (clone g7) von Hippel-Lindau disease tumor supresor mRNA sequence.

ACCESSION L15409
 VERSION L15409.1 GI:306847
 KEYWORDS tumor suppressor.
 SOURCE Homo sapiens (human)
 ORGANISM Homo sapiens
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1810)
 AUTHORS Latif,F., Tory,K., Gnarra,J., Yao,M., Duh,F.-M., Orcutt,M.L., Stackhouse,T., Kuzmin,I., Modi,W., Geil,L., Schmidt,L., Zhou,F., Li,H., Wei,M.-H., Chen,F., Glenn,G., Choyke,P., Walther,M.M., Weng,Y., Duan,D.-S.R., Dean,M., Glavac,D., Richards,F.M., Crossey,P.A., Ferguson-Smith,M.A., Le Paslier,D., Chumakov,I., Cohen,D., Chinault,A.C.R., Maher,E.R., Linehan,W.M., Zbar,B. And Lerman,M.I.

TITLE Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene
 JOURNAL Science 260 (5112), 1317-1320 (1993)
 MEDLINE 93262488
 PUBMED 8493574
 COMMENT Original source text: Homo sapiens fetal kidney cDNA to mRNA.
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..1810
 /organism="Homo sapiens"
 /mol_type="mRNA"
 /db_xref="taxon:9606"
 /cell_type="teratoma"
 /tissue_type="kidney"
 /dev_stage="fetal"

ORIGIN

```

1 cctcgcctcc gttacaacag cctacggtgc tggaggatcc ttctgcgcac ggcacagacc
61 tccggccggc tatttccgcg agcgcgttcc atcctctacc gagcgcgcgc gaagactacg
121 gaggtcgact cgggagcgcg cacgcagctc cgccccgcgt ccgaccgcgc gatcccgcgg
181 cgtccggccc ggggtgtctg gatcgcggag ggaatgcccc ggagggcggg gaactgggac
241 gaggccgagg taggcgcgga ggaggcaggc gtcgaagagt acggccctga agaagacggc
301 ggggaggagt cgggcccga ggagtccggc ccggaagagt cggccccgga ggaactgggc
361 gccgaggagg agatggaggc cgggcggccg cggcccgtgc tgcgctcgtt gaactcgcgc
421 gagccctccc aggtcatctt ctgcaatcgc agtccgcgcg tcgtgctgcc cgtatggctc
481 aacttcgacg gcgagccgca gccctacca acgctgcgcg ctggcacggg ccgccgcac
541 cacagctacc gaggtcacct ttggtctctc agagatgcag ggacacacga tgggttctg
601 gttaaccaa ctgaattatt tgtgccatct ctcaatggtg acggacagcc tatttttgcc
661 aatatcacac tgccagtgta tactctgaaa gagcgatgcc tccaggttgt cggagccta
721 gtcaagcctg agaattacag gagactggac atcgtcaggt cgctctacga agatctggaa
781 gaccaccaa atgtgcagaa agacctggag cggtgcacac aggagcgcac tgcacatcaa
841 cggatgggag atggaagatt tctggtgaaa cttacactgt ttcactcag cttttgatgg
901 tactgatgag tcttgatcta gatacaggac tggttccttc cttagtttca aagtgtctca
961 ttctcagagt aaaataggca ccattgctta aaagaaagt aactgacttc actaggcatt
1021 gtgatgttta ggggcaaaca tcacaaaatg taatttaatg cctgccatt agagaagtat
1081 ttatcaggag aagtggttg catttttgct tcctagtaag tcaggacagc ttgtatgtaa
1141 ggaggtttat ataagtaatt cagtgggaat tgcagcatat cgtttaatt taagaaggca
1201 ttggcatctg cttttaatgg atgtataata catccattct acatccgtag cgttggtga
1261 cttgtctgcc tctgctttg ggaagactga ggcatccgtg aggcaggac aagtctttct
1321 cctctttgag accccagtgc ctgcacatca tgagccttca gtcagggttt gtccagaggaa
1381 caaacagggg gacactttgt tagaaaagtc ttagaggttc tgcctctatt tttgtgggg
1441 ggtgggagag gggaccttaa aatgtgtaca gtgaacaaat gtcctaaaag gaatcatttt
1501 tgtaggaagc atttttata attttctaag tcgtgcactt tctcggcca ctctgttga
1561 agtgctgttt tattactgtt tctaaaactag gattgacatt ctacagttgt gataatagca
1621 tttttgtaac ttgccatccg cacagaaaat acgagaaaat ctgcatgttt gattatagta
1681 ttaattgaca aataagtttt tgctaaatgt gagtatttct gttccttttt gtaaatatgt
1741 gacattcctg attgatttgg gtttttttgt tgttgttgtt ttgttttgtt ttgttttttt
1801 gggatggagg

```

Secuencia de la proteína pVHL (Illiopoulos, O. y cols, 1995). La numeración de los nucleótidos es de acuerdo al la base de datos del NCBI con número de acceso L15409, en el cual los codones son numerados desde la primera metionina de la secuencia del cDNA (nucleótido 214).

8. Bibliografía

8. Bibliografía

- Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raft, R.; Roberts, K.; Watson, J.D. Molecular biology of the cell. 3era. Edición. Edit. Garland Publishiry, Inc. USA. 1999.
- Bai, C.; Sen, P.; Hofmann, K.; Ma, L.; Goebel, M.; Harper, J.W.; Elledge, S. SKP1 Connects Cell Cycle Regulators to the Ubiquitin Proteolysis Machinery through a Novel Motif, the F-Box. *Cell*. 86: 263-274, 1996.
- Bar, M.; Friedman, E.; Jakobovitz, O.; Leibowitz, G.; Lerer, I.; Albeliovich, D.; et al. Sporadic pheochromocytomas are rarely associated with germline mutations in the Von Hippel-Lindau and RET genes. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. 47: 707-712, 1997.
- Brauch, H.; Kishida, T.; Glavas, D.; Chen, F.; Pausch, F.; Hofler, H.; Lerman, M.I.; Zbar, B.; Neumann, H.P.H. von Hippel – Lindau disease with pheochromocytoma in the Black Forest region in Germany: Evidence for a founder effect. *Hum. Genet*. 95: 551-556. 1995.
- Brauch, H.; Hoepfner, W.; Jähmig, H.H.; Wöhl, T.; Engelhardt, D.; Spelsberg, F.; et al. Sporadic pheochromocytomas are rarely associated with germline mutations in the VHL tumor suppressor gene or the ret protooncogene. *J Clin. Endocrinol. Metab*. 82: 4101-4104, 1997.
- Chen, F.; Kishida, T.; Yao, M.; Hustad, T.; Glavac, D.; Dean, M. Germ-line mutations in the Von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene: correlations with phenotype. *Hum Mutat*. 5: 66-75, 1995.
- Choyke, P.L.; Glenn, G.M.; Lubensky, I.A.; Lubensky, I.A.; Thakore, K.; Zbar, B. Epididymal cystadenomas in Von Hippel-Lindau disease. *Urology*. 49: 926-931, 1997.
- Cohen, A.J.; Li F.P.; Berg, S.; et al. Hereditary renal cell carcinoma associated with a chromosomal translocation. *New Engl. J. Med*. 301: 592-595, 1979.
- Cohen, A.J.; Li F.P.; Berg, S.; et al. Hereditary renal cell carcinoma associated with a chromosomal translocation. *Am. J. Med*. 36:595, 1979.
- Collins, E.T. Intra – ocular growths (two cases, brother and sister with peculiar vascular new growth, probably retinal, affecting both eyes). *Trans Ophthalmol Soc*. 14: 141-49, 1894.
- Cotran, Kuman, Collins. Pathologic basis of disease. Saunders Company. USA. 1999.
- Crossey, P.A.; Richards, F.M.; Foster, K.; Green, J.S.; Prowse, A.; Latif, F.; Lerman, M. I., Zbar, B.; Affara, N. A.; Ferguson-Smith, M.A.; Maher, E.R. Identification of intragenic mutation in the von Hippel – Lindau disease tumour suppressor gene and correlation with disease phenotype. *Hum. Mol. Genet*. 3: 1303-1308, 1994.
- Crossey, P.A.; Eng, C.; Ginalska-Mallinowska, M.; Lennard, T.; Wheeler, D.; Ponder, B.; Maher, E. Molecular genetic diagnosis of von Hippel-Lindau disease in familial pheochromocytoma. *J Med Genet*. 32: 885-886, 1995.
- Cushing, H.; Bailey, P. Hemangiomas of cerebellum and retina (Lindau's disease), with a report of case. *Arch. Ophthalmol*. 57:440-63, 1928.

- Darnell, I.; Lodish, H.; Berk, A.; Matsudaria, P.; Baltimas, D. *Biología celular y molecular*. 4ta edición. Edit. Panamericana. España. 2002
- De Paulsen, N.; Brychzy, A.; Fournier, M.; Klausner, R.; Gnarra, J.; Pause, A.; Lee, A. Role of transforming growth factor – alpha in VHL *-/-* clear cell renal carcinoma cell proliferation: A possible mechanism coupling von Hippel – Lindau tumor suppressor inactivation and tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 4:1387-1392, 2001.
- DeVita, V.T.; Hellman, S.; Rosenberg, S. *Cancer. Principles and practice of oncology*. 2da. Edición. Lippincott Company. Filadelfia. 1999.
- Donis-Keller, H.; Dou, S.; Chi, D. Mutations in the RET proto-oncogene are associated with MEN2A and FMTC. *Hum. Mol. Genet.* 2: 851-856, 1993.
- Duan, DR.; Pause, A.; Birgress, W.; Aso, T.; Chen, DYT.; Garrett, KP; Conaway, RC.; Conaway, JW.; Linehan, WM; Klauster, RD. Inhibition of transcriptional elongation by the VHL tumor suppressor protein. *Science*. 269. 269: 1402-1406, 1995.
- Favor, M.; Henderson, B. Regulation of tumor suppressors by nuclear – cytoplasmic shuttling. *Experimental Cell Research*. 282: 59-69, 2003.
- Friedrich, C.A. von Hippel – Lindau syndrome. A pleomorphic condition. *Cancer Supp.* 86:1658-1662, 1999.
- Fung, Y.K.; Murphree, A.; Tang, A. Qian, J.; Hinrichs, S.H.; Benedict, W. Structural Evidence for the Authenticity of the Human Retinoblastoma Gene. *Science*. 236: 1657-1661, 1987.
- Gardner, E.J.; Simmons, M.J.; Snustad, D.P. *Principios de Genética*. Editorial Limusa Wiley. Cuarta edición. México. 1998.
- Girelli, R.; Bassi, C.; Falcono, M.; De Santis, L.; Bonora, A.; Caldiron, E. Pancreatic cystic manifestations in Von Hippel-Lindau disease. *Int J Pancreatol.* 22: 101-109, 1977.
- Glenn, G. M.; Choyke, P.; Zbar, B.; Linehan, W. M. Von Hippel – Lindau disease: Clinical review and molecular genetics. *Probl. Urol.* 4: 312-330, 1990.
- Glenn, G. M.; Daniel, L. N.; Choyke, P.; Linehan, W. M.; Oldfield, E.; Gorin, M. B.; Hosoe, S.; Latif, F.; Weiss, G.; Walther, M.; Lerman, M. I.; Zbar, B. von Hippel-Lindau (VHL) disease: distinct phenotypes suggest more than one mutant allele at the VHL locus. *Hum. Genet.* 87: 207-210, 1991.
- Gnarra, J.R.; Tory, K.; Schmidt, L.; Wei, M.H.; Li, H.; Latif, F. Mutation of the VHL tumour suppressor gene in renal carcinoma. *Nat. Genet.* 7: 85-90, 1994.
- Gross, D.; Avishai, N.; Meiner, V.; Filon, D.; Zbar, B.; Abeliovich, D. Familial pheochromocytoma associated with a novel mutation in the von Hippel – Lindau gene. *J. Clin. Endocrinol. Met.* 81: 147-149, 1996.
- Hansen, W.J.; ohh, M.; Moslehi, J.; Kondo, Ke.; Kaelin, E.G.; Welch, W.J. Diverse effects of mutation in Exon II of the von Hippel – Lindau (VHL) Tumor Suppressor Gene on the Interaction of pVHL with the Cytosolic Chaperonin and pVHL – Dependet Ubiquitin Ligase Activity. *Mol. Cell. Biol.* 22: 1947-1960, 2002.

- Herman, J.; Latif, F.; Weng, Y.; Lerman, M.; Zbar, B.; Liu, S.; Samid, D.; Duan, D.; Gnarr, J.; Linehan, W. H.; Baylín, S. Silencing of the VHL tumor suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 9700-9704, 1994.
- Huang, L.E.; Arany, Z.; Livingston, D.M.; Bunn, F. Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its alpha subunit. *J Biol Chem.* 271: 32253-32259, 1996.
- Huang, E.; Pete, E.; Schau, M.; Milligan, J.; Gu, J. Leu574 of HIF-1 α for the VHL-mediated Degradation Pathway. Papers in Press. Published on August 29, 2002.
- Huson, S.M.; Harper, P.S.; Hourihan, M.D.; Cole, G.; Weeks, R.D.; Compston, D.A.S. Cerebellar haemangioblastoma and Von Hippel-Lindau disease. *Brain.* 109: 1297-1310, 1986.
- Iliopoulos, O.; Kibel, A.; Gray, S.; Kaelin Jr., W. Tumour suppression by the human von Hippel – Lindau gene product. *Nat. Med.* 1: 822-826, 1995.
- Iliopoulos, O.; Levy, A. P.; Jiang, C.; Kaelin, W. G., Jr.; Goldberg, M. A. Negative regulation of hypoxia-inducible genes by the von Hippel-Lindau protein. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 93: 10595-10599, 1996.
- Iwai, K.; Yamanaka, K.; Kamura, T.; Minato, N.; Conaway, R.; Conaway, J.; Klausner, R.; Pause, A. Identification of the von Hippel – Lindau tumor – suppressor protein as part of an active E3 ubiquitin ligase complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 12436-12441, 1999.
- Kaelin, Jr. W.G. Many vessels, faulty gene. *Nature.* 399: 203-204, 1999.
- Kaelin, Jr. W.G. Molecular basis of the VHL hereditary cancer syndrome. *Nat. Rev. Cancer.* 2: 673-682, 2002.
- Karp, G. Biología celular y molecular. Edit. McGraw – Hill. México. 1999.
- Kibel, A.; Iliopoulos, O.; DeCaprio JD.; Kaelin, W.G. Binding of the von Hippel – Lindau tumor suppressor protein to elongin B and C. *Science.* 269: 1444-1446, 1995.
- Kishida, T.; Staekhouse, T.M.; Chen, F.; Lerman, M.I.; Zbar, B. Cellular protein that bind the von Hippel – Lindau disease gene product: Mapping of binding domains and the effect of missense mutations. *Cancer Res.* 55: 4544-4548, 1995.
- Klein, B.; Weirich, G.; Brauch, H. DHPLC – based germline mutation screening in the analysis of the VHL tumor suppressor gene: usefulness and limitations. *Hum. Genet.* 108: 376-384, 2001.
- Knudson, A.G. Antioncogenes and human cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 10914-10921, 1993.
- Knudson, A.G. mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 68: 820-823, 1971.
- Kondo, K.; Kaelin, W.G. Jr. The von Hippel – Lindau tumor suppressor gene. *Exp. Cell. Res.* 264: 117-125, 2001.
- Kondo, K.; Yao, M.; Yoshida, M.; Kishida, T.; Shuin, T.; Miura, T.; Moriyama, M.; Kobayashi, K. Comprehensive Mutational Analysis of the VHL Gene in Sporadic Renal Cell Carcinoma: Relationship to Clinicopathological Parameters. *Genes, chromosomes and cancer.* 34: 58-68, 2002.

- Lamiell, J.M.; Salazar, F.G.; Hsia, Y.E. von Hippel-Lindau disease affecting 43 members of a single kindred. *Medicine* (Baltimore). 68: 1-29, 1989.
- Latif, F.; Tory, K.; Gnarr, J.; Yao, M.; Duh, F.M.; Orcutt, M.L.; Stackhouse, T.; Kuzmin, I.; et al. Identification of the von Hippel – Lindau disease tumor suppressor gene. *Science*. 260:1317-1320, 1993.
- Lehninger, A.L. Principles of Biochemistry with an Extended Discussion of Oxigen. Worth Publishers, 2da. Edición. 1993.
- Linehan, W.M.; Lerman, M.I.; Zbar, B. Identification of the von Hippel – Lindau (VHL) gene. *JAMA*. 273: 564-570, 1995.
- Lisztwan, J. Imbert, G.; Wirbelauer, C.; Gstaiger, M.; Krek, W. The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein is a component of an E3 ubiquitin-protein ligase activity. *Genes Dev*. 13: 1822-1833, 1999.
- Lonergan, K.M.; Illiopoulos, O.; Ohh, M.; Kamura, T.; Conaway, R.; Conaway, J.W.; Kaelin, W. Regulation of hypoxia-inducible mRNAs by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein requires binding to complexes containing elongins B/C and Cul2. *Mol Cell Biol*. 18: 732-741, 1998.
- López-Veiga, A.. Molecular genetics and ocular neoplasms. *Arch. Soc. Canar. Oftal*. No. 11.2000.
- Maher, E.R.; Webster, AR.; Moore, A. Clinical features and natural history of von Hippel-Lindau disease. *Q. J. Med*. 77: 1151-1163, 1990.
- Maher, E.R.; Webster, A.R.; Richards, F.M.; Green, J.S.; Crossey, P.A.; Payne, S.J.; Moore, A.T. Phenotypic expression in von Hippel – Lindau disease: correlation with germline VHL gene mutations. *J. Med. Genet*. 33: 328-332, 1996.
- Maher, E.R.; Kaelin, W.G. von Hippel – Lindau disease. *Medicine*. 76:381-391, 1997.
- Manski, TJ; Heffner, DK; Glenn, GM; Patronas, NJ; Pikus, AT; Katz, D. Endolymphatic sac tumors. A source of morbid hearing loss in von Hippel-Lindau disease. *JAMA*. 277: 1461-1466, 1997
- Ma, X.; Yang, K.; Lindblad, P.; Egevad, L.; Hemminki, K. VHL gene alterations in renal cell carcinoma patients: novel hotspot or founder mutations and linkage disequilibrium. *Oncogene*. 20: 5393-5400, 2001.
- Maxwell, P.; Wiesener, M.; Chang, G.; Clifford, S.; Vaux, E.; Cockman, M.; Wykoff, C.; Pugh, C.; Maher, E.; Ratcliffe, P. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia – inducible factors for oxygen – dependet proteolysis. *Nature*. 399: 271-275, 1999.
- Maddock, IR.; Moran, A.; Maher, ER.; Teare, H.; Norman, A.; Payne, S. A genetic register for von Hippel-Lindau disease. *J Med Genet*. 33: 120-127, 1996.
- Melmon, K. L.; Rosen, S. W. Lindau's disease: review of the literature and study of a large kindred. *Am. J. Med*. 36: 595-617, 1964.
- Mukhopadhyay, D.; Knebelmann, B.; Cohen, H.; Ananth, S.; Sukhatme, V. The von Hippel – Lindau tumor suppressor gene product interacts with Sp1 to repress vascular endothelial growth factor promoter activity. *Mol. Cell. Biol*. 17: 5629-5639, 1997.
- Mulligan, LM.; Kwok, JBJ.; Healey, CS. Germ-line mutations of the RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2A. *Nature*. 363: 458-460, 1993.

Murgia, A.; Martella, M.; Vinanzi, C.; Polli, R.; Perlongo, G.; Opocher, G. Somatic mosaicism in von Hippel Lindau disease. *Hum. Mutat.* 15: 114-118, 1999.

Neuman, H.P. Basic criteria for clinical diagnosis and genetic counseling in von Hippel – Lindau syndrome. *J. Vasc. Dis.* 16: 309-311, 1987.

Neumann, H.P.; Wiestler, OD. Clustering of features of Von Hippel-Lindau syndrome: evidence for a complex genetic locus. *Lancet.* 337: 1052-1054, 1991.

Neumann, H.P.; Berger, D.P.; Sigmund, G.; Blum, U.; Schmidt, D.; Parmer, R.J.; et al Pheochromocytomas, multiple endocrine neoplasia type 2 and Von Hippel-Lindau disease. *New Engl. J. Med.* 329: 1531-1538, 1993.

Ohh, M.; Yauch, R.L.; Lonergan, K.; Whaley, J.; stemmer, A.; louis, D.; Gavin, B.; Kley, N.; Kaelin, W.; Iliopoulos, O.; Kaelin, W. The von Hippel – Lindau tumor suppressor protein is required for proper assembly of an extracellular fibronectin matrix. *Mol. Cell.* 1: 959-968, 1998.

Okuda, H.; Hirai, S.; Takaki, Y.; Kamada, M.; Baba, M.; Sakai, N.; Kishida, T.; Kaneto, S.; Yao, M.; Ohno, S.; Shuin, T. Direct Interaction of the β -Domain of VHL Tumor suppressor protein with the regulatory domain of atypical PCK Isozymes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 263: 491-497, 1999.

Pal, S.; Claffey, K.; Dvorak, H.; Mukhopadhyay, D. The von Hippel – Lindau gene product inhibits vascular permeability factor/ vascular endothelial growth factor expression in renal cell carcinoma by blocking protein Kinase C pathways. *J. Biol. Chem.* 272: 27509-27512, 1997.

Pause, A. Peterson, B.; Schaffar, G.; Stearman, R.; Klausner, R. Studying interactions of four proteins in the yeast two-hybrid system: structural resemblance of the pVHL/elongin BC/hCUL-2 complex with the ubiquitin ligase complex SKP1/cullin/F-box protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96: 9533-9538, 1999.

Persad, RA.; Probert, JL.; Sharma, SD.; Haq, A.; Doyle, PT. Surgical management of the renal manifestations of Von Hippel-Lindau disease: a review of a United Kingdom case series. *Br J Urol.* 80: 392-396, 1997.

Poston, CD.; Jaffe, GS.; Solomon, D.; Zbar, B.; Linehan, WM.; Walther, MM. Characterization of the renal pathology of a familial form of renal cell carcinoma associated with von Hippel-Lindau disease: clinical and molecular genetic implications. *J Urol.* 153: 22-26, 1995.

Richards, F.; Phipps, M.; Latif, F.; Yao, M.; Crossey, P.; Foster, K.; Linehan, W.; Affara, N.; Lerman, M.; Zbar, B.; Ferguson-Smith, M.; Maher, E. Mapping the von Hippel – Lindau disease tumour suppressor gene: Identification of germline deletions by pulsed field gel electrophoresis. *Hum. Mol. Genet.* 2: 879-882, 1993.

Richards, F.; Payne, S.; Zbar, B.; Affara, N.; Ferguson-Smith, M.; Maher, E. Molecular analysis of the novo germline mutations in the von Hippel Lindau disease gene. *Hum. Mol. Genet.* 4: 2139-2143, 1995.

Richards, F.M.; Schofield, P.N.; Fleming, S.; Maher, E.R. Expression of the von Hippel – Lindau disease tumour suppressor gene during human embryogenesis. *Hum. Molec. Genet.* 5: 639-644, 1996.

Salceda, S.; Caro, J. Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J Biol Chem.* 272: 22642-22647, 1997.

- Sambrook, J.; Maniatis, T.; Fritsch, E.F. *Molecular Cloning a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2da. Edición. Volumen 1, 2 y 3. 1989.
- Sato, K.; terada, K.; Sugiyama, T.; Takahashi, S.; Saito, M.; Moriyama, M.; Kakinun, H.; Sukuki, Y.; Kato, M.; Kato, T. Frequent overexpression of vascular endothelial growth factor gene in human renal cell carcinoma. *J. Exp. Med.* 173: 355-360, 1994.
- Seizinger, B.R.; Rouleau, G.A.; Ozelius, L.J.; Lane, A.H.; Farmer, G.E.; Lamiell, J.M., et al. von Hippel – Lindau disease maps to the region of chromosome 3 associated with renal cell carcinoma. *Nature*. 332: 268-269, 1988.
- Seizinger, B. R.; Smith, D. I.; Filling-Katz, M. R.; Neumann, H.; Green, J. S.; Choyke, P. L.; Anderson, K. M.; Freiman, R. N.; Klauck, S. M.; Whaley, J.; Decker, H.-J. H.; Hsia, Y. E.; y cols. Genetic flanking markers refine diagnostic criteria and provide insights into the genetics of Von Hippel Lindau disease. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 88: 2864-2868, 1991.
- Schiff, D.; Wen, P.Y. Tumores cerebrales raros. *Clínicas Neurológicas de Norteamérica*. 4: 975-998, 1995.
- Siemeister, G.; Weindel, K.; Mohrs, K.; Barleon, B.; Martiny-Baron, G.; Marme, D. Reversion of deregulation expression of vascular endothelial growth factor in human renal carcinoma cells by von Hippel – Lindau tumor suppressor protein. *Cancer Res.* 56: 2299-2301, 1996.
- Schoenfeld, A.; Davidowitz, E.; Burk, R. A second major native von Hippel – Lindau gene product, initiated from an internal translation start site, functions as a tumor suppressor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 95: 8817-8822, 1998.
- Spetzger, U.; Bertalanffy, H.; Huffmann, B.; Mayfrank, L.; Reul, J.; Gilsbach, JM. Hemangioblastomas of the spinal cord and the brainstem: diagnostic and therapeutic features. *Neurosurg Rev.* 19: 147-151, 1996.
- Stolle, C.; Glenn, G.; Zbar, B.; Humphrey, J. S.; Choyke, P.; Walther, M.; Pack, S.; Hurley, K.; Audrey, C.; Klausner, R.; Linehan, W. M. Improved detection of germline mutations in the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. *Hum. Mutat.* 12: 417-423, 1998.
- Strachan, T.; Read, A.. *Human Molecular Genetics*. 2da. Edición. Wiley-Liss. Oxford. 1999.
- Strachan, T.; Read, A.. *Human Molecular Genetics*. 3era. Edición. GS Garland Science. India. 2004.
- Stebbins, C.; Kaelin Jr., W.; Pavletich, N. Structure of the VHL – elongin C – elongin B complex: Implications for VHL Tumor Suppressor Function. *Science*. 284: 455-461. 1999.
- Takagi, Y.; Pause, A.; Conaway, R.C.; Conaway, J.W. Identification of elongin C sequences required for interaction with the von Hippel-Lindau Tumor suppressor protein. *J. Biol. Chem.* 272: 27444-27449, 1997.
- VHL Family Alliance. La enfermedad de von Hippel – Lindau. Una grave enfermedad presente en las distintas especialidades médicas. Colegio médico de Chile. Santiago de Chile. Editorial IKU. 2001
- Voet, D.; Voet, J. *Bioquímica*. Ediciones Omega. Barcelona. 1992.

Whaley, JM.; Naglich, J.; Gelbert, L.; hsia, YE.; Lamiell, JM.; Green, JS.; Collins, JS. Germ-line mutations in the von Hippel – Lindau tumor suppressor gene are similar to somatic von Hippel - Lindau aberrations in sporadic renal cell carcinoma. *Am. J. Hum. Genet.* 55:1092-1102, 1994

Werness, BA.; Guccion, JG. Tumor of broad ligament in Von Hippel-Lindau disease of probable mullerian origin. *Int. J. Gynecol. Pathol.* 16: 282-285, 1997.

Wizigmann-Voos, S.; Breier, G.; Risau, W.; Plate, K. Up-regulation of vascular endothelial growth factor and its receptors in von Hippel-Lindau disease-associated and sporadic hemangioblastomas. *Cancer Res.* 55: 1358-1364, 1995.

Yao, M.; Latif, F.; Orcutt, ML.; Kuzmin, I.; Stackhouse, T.; Zhou, FW.; Tory, K.; Duh, FM.; Richards, F. von Hippel – Lindau disease: identification of deletion mutations by pulsed field gel electrophoresis. *Hum. Genet.* 92: 605-614, 1993.

Zbar, B.; Kishida, T. Chen, F.; Schmidt, L.; Maher, E.R.; Richards, F.M. Germline mutations in the von Hippel - Lindau (VHL) gene in families from North America, Europe, and Japan. *Hum. Mutat.* 8: 348-57, 1996.

Bases de datos:

- Instituto Nacional de Cancerología
- Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. M. V. S.
- The Human Gene Mutation Database
- von Hippel – Lindau germline mutation database of Universit Of Birmingham, División of Medical and Molecular Genetics.

Sitios de internet:

- <http://www.opolanco.es/apat/boletin9/oncogene.html>
- <http://www.cnio.es/es/cancer/cap201.htm>
- <http://www.opolanco.es/apat/boletin15/genycan.htm>
- <http://www.cnio.es/es/programas/prog504p1.htm>
- <http://pressz.nci.nih.gov/sciencebehind/cancersp/cancersp36.htm>
- <http://www-ermm.cbcu.cam.ac.uk/01002654h.htm>