



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO **UNAM** POSGRADO 

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

DETERMINACIÓN DE MUTACIONES Y PATRONES
DE METILACIÓN EN EL GEN *VHL* EN PACIENTES
CON DIAGNÓSTICO CLÍNICO EN ENFERMEDAD
DE VON HIPPEL – LINDAU Y/O
HEMANGIOBLASTOMA CEREBELOSO.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)
P R E S E N T A :
SONIA NAVA SALAZAR

Tutor: Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes



MÉXICO, D. F.

Febrero 2006



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la tutoría del Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes en co-tutoría con la Dra. Astrid Rasmussen Almaraz del 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.

**DETERMINACIÓN DE MUTACIONES Y PATRONES DE METILACIÓN EN EL GEN VHL EN
PACIENTES CON DIAGNÓSTICO CLÍNICO EN ENFERMEDAD DE VON HIPPEL - LINDAU Y/O
HEMANGIOBLASTOMA CEREBELOSO.**

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de maestría se realizó bajo la dirección del Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes en el laboratorio de Biología Molecular, en el Departamento de Biología de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutoral que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes	Facultad de Química, UNAM
Dra. Marcela Lizano Soberón	Instituto Nacional de Cancerología
Dr. Ignacio Camacho Arroyo	Facultad de Química, UNAM

Se reconoce la colaboración de la Dra. Astrid Rasmussen Almaraz, del Departamento de Genética y Biología Molecular del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, en cuyo laboratorio se llevaron a cabo los experimentos de búsqueda de mutaciones germinales.

Se reconoce la colaboración de la Dra. Teresa Tusie Luna, de la Unidad de Biología Molecular y Medicina Genómica del Instituto Nacional de la Nutrición, en cuyo laboratorio se llevaron a cabo la secuenciación automatizada para la búsqueda de mutaciones germinales.

Se reconoce la asesoría del Dr. Samuel Canizales y la M. en C. Petra Yescas en los experimentos de búsqueda de mutaciones germinales.

Se reconoce la asesoría del Dr. Mauricio Rodríguez Dorantes en los experimentos de determinación de patrones de metilación.

Se reconoce a la Dra. Silvia Vidal, Dra. Alicia Cervantes Peredo y a la M. en C. Milena Saqui por sus aportaciones de muestras biológicas para la realización de éste trabajo.

El proyecto fue apoyado parcialmente por Facultad de Química. PAIP.

Durante los estudios de maestría goce de una beca otorgada por CONACYT para la realización de la presente tesis.

El Jurado del Examen de Maestría estuvo constituido por:

Presidente	Dr. José Pedraza Chaverri	Facultad de Química, UNAM
Vocal	Dra. Leticia Rocha Zavaleta	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Secretario	Dr. Julio Morán Andrade	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Suplente	Dra. Marcela Lizano Soberón	Instituto Nacional de Cancerología
Suplente	Dra. Marta Menjivar Iraheta	Facultad de Química, UNAM

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 Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes por darme la oportunidad de continuar éste proyecto en su laboratorio, por su apoyo, enseñanzas, comprensión y por devolverme la confianza en mi misma.

A la Dra. Astrid Rasmussen Almaraz por permitirme seguir con el proyecto.

A la M. en C. Petra Yescas Gómez por sus consejos, apoyo y su amistad.

Al Dr. Samuel Canizales, Dra. Adriana Mendoza, Dra. Ma. Elisa Alonso Vilatela y la Dra. Marisol López López por sus aportaciones, enseñanzas y apoyo en la realización de éste trabajo.

A mis amigos del laboratorio Miriel, Raquel, Noemí y en especial a América, gracias por tu amistad en esos momentos difíciles, consejos y aportaciones durante la maestría.

A mis amigos de la carrera: Blanca, Diana, Tere, Samia, Jonathan; del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía: Lety, Chayito, Adriana, Jorge, Aurelio, Miguel, Daniel por su amistad a pesar de la distancia y por todos los momentos que hemos pasado.

A Mary Flores y Victor Illescas por su amistad, comprensión y apoyo.

Dedicatorias

A mi Padre

Gracias por todo, eres un gran hombre y mi ejemplo a seguir

A mi mami Micha y a mi hermana Bota

Gracias por estar siempre conmigo, por su cariño, paciencia, fortaleza y no dejarme caer, sin su apoyo esto no hubiera sido posible

A mis hermanitos: Juan y Sofía

Por traer la alegría nuevamente a mi vida

A mi abuelita

Gracias por estar siempre conmigo y cuidarme desde arriba

La noche ha llegado para tomarnos
con su oscuridad imponente,
su brillo lunar parece amarme
y la melancolía, en mi ser, permanente.

Determinación de mutaciones y patrones de metilación en el gen *VHL* en pacientes con diagnóstico clínico en enfermedad de von hippel - lindau y/o hemangioblastoma cerebeloso.

Índice General

Tema	Página
Índice de Figuras	I
Índice de tablas	II
Índice de gráficas	III
Abreviaturas	IV
Resumen	VII
1. Antecedentes	
1.1. Enfermedad de von Hippel – Lindau	
1.1.1. Definición	1
1.1.2. Cuadro clínico	2
1.1.3. Clasificación de la enfermedad de von Hippel – Lindau	5
1.1.4. Criterios de diagnóstico clínico	6
1.1.5. Tratamiento	7
1.2. Genética de la enfermedad de von Hippel - Lindau	
1.2.1. Anatomía del gen <i>VHL</i>	9
1.2.2. Proteína VHL (pVHL)	9
1.2.3. Inactivación del gen <i>VHL</i>	12
1.2.3.1. Mutaciones germinales en el gen <i>VHL</i>	12
1.2.3.2. Mutaciones somáticas en tumores de pacientes con VHL	14
1.2.3.3. Metilación del gen <i>VHL</i>	14
1.2.4. Correlación genotipo - fenotipo	16
1.2.5. Proteínas asociadas a la pVHL	18
1.2.5.1. Complejo VCB	19
1.2.5.2. Complejo ligasa de ubiquitina VEC	21

1.2.6. pVHL y carcinogénesis	22
2. Justificación	27
3. Hipótesis	28
4. Objetivos	
4.1. Objetivo general	29
4.2. Objetivos particulares	29
5. Metodología	
5.1. Determinación de mutaciones germinales	
5.1.1. Población de estudio: criterios de inclusión y exclusión de los pacientes	30
5.1.2. Extracción del DNA y cuantificación	31
5.1.3. Amplificación específica de los exones del gen <i>VHL</i> por medio de PCR	33
5.1.4. Secuenciación	35
5.2. Determinación de mutaciones somáticas	
5.2.1. Población de estudio	37
5.2.2. Extracción del DNA y cuantificación	37
5.2.4. Amplificación por PCR, purificación y secuenciación	38
5.3. Estudio de la inactivación del gen <i>VHL</i> por metilación	
5.3.1. Inclusión del tejido en parafina	39
5.3.2. MSRF	39
5.3.3. Estudio de la expresión de la pVHL	40

6. Resultados	
6.1. Mutaciones germinales	42
6.2. Mutaciones somáticas	46
6.3. Estudio de la inactivación del gen <i>VHL</i> por metilación	47
6.4. Estudio de la expresión de la pVHL	48
7. Análisis de resultados	51
8. Conclusiones	59
9. Bibliografía	60

Índice de figuras

Figura		Página
1	Enfermedad de von Hippel - Lindau	1
2	Hemangioblastoma de cerebelo	3
3	Angioma de retina	3
4	Quistes pancreáticos en enfermedad VHL	4
5	Esquema del oído	5
6	Esquema del brazo corto del cromosoma 3 con localización del gen <i>VHL</i> en la región 3p25-26	9
7	Función y estructura de la proteína VHL	11
8	Distribución de mutaciones en el gen <i>VHL</i> en carcinoma renal esporádico	14
9	Metilación del DNA por la DNA metiltransferasa (DNMT)	15
10	Complejo VCB	19
11	Complejo VEC con actividad de ligasa E3 de ubiquitina	22
12	Modelo del papel de la pVHL en la degradación de HIF-1 α en el proteosoma mediada por ubiquitinación	24
13	Estructura del HIF unido a la pVHL	25
14	Ubicación de los oligonucleótidos utilizados para amplificar el gen <i>VHL</i>	34
15	Exón 1. Deleción del triplete TCT a partir del nucleótido 440	42
16	Exón 1. Inserción de una adenina en el nucleótido 512	43
17	Exón 1. Sustitución de C \rightarrow T en el nucleótido 469: P86S	44
18	Exón 2. Sustitución de A \rightarrow G en el nucleótido 575: D121G	44
19	Exón 3. Sustitución de C \rightarrow T en el nucleótido 694: R161X	45
20	Exón 2. Sustitución de G \rightarrow A en el nucleótido 676+1	47
21	Análisis de las muestras de los pacientes con VHL por medio de MSRF	47
22	Expresión de la pVHL en cerebelo normal	48
23	Expresión de la pVHL en hemangioblastomas de cerebelo	49
24	Expresión de la pVHL en riñón y en Carcinoma de células renales	50

Índice de tablas

Tabla		Página
1	Frecuencia reportadas de neoplasias asociadas a VHL	2
2	Clasificación de la enfermedad VHL	5
3	Métodos de detección para los distintos tumores que conforman la enfermedad	7
4	Características clínicas de los pacientes estudiados	31
5	Concentración óptima de los oligonucleótidos y tamaño del producto de PCR	34
6	Condiciones de PCR	35
7	Programa de PCR	35
8	Condiciones de secuenciación	36
9	Programa de secuenciación	36
10	Pacientes con muestras de tumor embebidos en parafina	37
11	Condiciones de PCR	38
12	Familiares de pacientes índices con mutación	46
13	Resumen de resultados	51

Índice de gráficas

Gráfica		Página
1	Distribución de los tipos de mutaciones en familias VHL	17
2	Distribución de los tipos de mutaciones en familias VHL con feocromocitoma	18
3	Distribución de los tipos de mutaciones en familias VHL sin feocromocitoma	18

Abreviaturas

λ	Longitud de onda
μL	Microlitro
μM	Micromolar
ACD	Ácido cítrico - dextrosa
ARB	Angiomas de retina bilateral
ARNT	Transportador nuclear del receptor aril hidrocarbano
C	Celsius
c.b.p.	Cuanto baste para
CCND1	Ciclina D1
CCR	Carcinoma de células renales
CCCR	Carcinoma de células claras de riñón
cDNA	DNA complementario
DAB	Diamino-benzidina
Del.	Delección
D.O.	Densidad óptica
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNMT	DNA metiltransferasa
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTP's	Desoxirribonucleótidos trifosfatados
EPO	Hormona eritropoyetina
F	Femenino
Fc	Feocromocitoma
FISH	Del inglés Fluorescent <i>In Situ</i> Hybridization
H1	Helice 1
HB	Hemangioblastomas
HBM	Hemangioblastoma de médula
HIF	Factor inducible por hipoxia
Ins.	Inserción
kD	Kilodaltones

LOH	Pérdida de heterocigosidad (siglas del inglés)
M	Masculino
M	Molar (mol/l)
ml	Mililitro
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
MSRF	Del inglés Methylation-Sensitive Restriction Fingerprint
N.D.	No determinada
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros
ODD	Degradación dependiente de oxígeno
pb	Pares de base
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PM	Peso molecular
pVHL	Proteína VHL
QP	Quistes pancreáticos
QR	Quistes en el riñón
QO	Quistes en el ovario
r.p.m.	Revoluciones por minuto
RCLB	Amortiguador para lisis de células rojas
RE	Retículo endoplásmico
RMN	Resonancia magnética nuclear
SCF	Complejo Skp1/Cdc53/F-box
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
TU	Tumoración uterina

U	Unidad
UTR	Región sin traducir
U.V.	Luz ultravioleta
VCB	Complejo pVHL-elongina C-elongina B
VEC	Complejo VCB unido con la proteína Cul2
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
Trptófono	Trp
Valina	Val
Ácido Aspártico	Asp
Ácido glutámico	Glu

Resumen

Resumen

La enfermedad von Hippel – Lindau (VHL) es un cáncer familiar autosómico dominante que se caracteriza clínicamente por la presencia de tumores vasculares. Esta enfermedad ha sido asociada a mutaciones en el gen *VHL* cuyo producto (pVHL) regula la concentración de la subunidad α del Factor de hipoxia inducible (HIF).

Diversos estudios en poblaciones caucásicas y asiáticas reportan una incidencia de 1:36,000 nacidos vivos de ésta enfermedad y señalan como principal alteración del gen, mutaciones de tipo germinal en la región codificante, y con menor frecuencia mutaciones somáticas en la misma o silenciamiento de la expresión del gen por hipermetilación de la región promotora. En población mexicana, la incidencia y causas de esta enfermedad no han sido estudiadas, por lo que en este trabajo se estudiaron la presencia de mutaciones y el patrón de metilación en el gen *VHL* en pacientes mexicanos con diagnóstico clínico de enfermedad de von Hippel – Lindau y/o hemangioblastoma cerebeloso.

Se incluyeron 10 pacientes de 9 familias que cubrían los criterios clínicos de diagnóstico, 5 pacientes con hemangioblastoma esporádico y 5 pacientes con diagnóstico de probable VHL. Por medio de secuenciación directa se determinó que el 89% de las familias que cubren criterios de diagnóstico clínico para VHL presenta mutaciones germinales, mas no pérdida de heterocigosidad en los tumores. Se identifico una mutación nueva: 1012_1013insA asociada a VHL tipo 1 y el estudio se extendió a familiares en riesgo de los pacientes portadores de una de las mutaciones, encontrando que el 39% habían heredado dicha mutación. Los resultados mostraron que el 33% de los pacientes con hemangioblastoma esporádicos presentan una mutación somática y en los pacientes con probable VHL no se detectaron mutaciones. En 17 muestras de tumores de los pacientes y en 2 muestras de cerebelo normal se estudió la inactivación del gen *VHL* por hipermetilación de la región del promotor y la expresión de la pVHL por medio de MSRF e inmunohistoquímica, respectivamente; no se encontraron casos de von Hippel – Lindau con metilación en el promotor del gen *VHL* en nuestra población de estudio. El estudio realizado permitió la identificación de una mutación no reportada en otras poblaciones y que la principal causa de von Hippel –Lindau en los pacientes analizados son mutaciones germinales del gen *VHL*.

1. Antecedentes

1.1. Enfermedad de von Hippel – Lindau

1.1.1. Definición.

La enfermedad von Hippel – Lindau o VHL es un síndrome de cáncer familiar autosómico dominante y multisistémico. Diversos estudios han estimado una incidencia de la enfermedad VHL de 1:36 000 a 1:45 000 nacidos vivos (Friedrich, 1999; Linehan y cols, 1995; Kondo y Kaelin Jr., 2002), pero en población latinoamericana no se han realizado estudios similares.

Las neoplasias que presentan los individuos con esta enfermedad son de tipo histológico específico: hemangioblastomas de retina, cerebelo y médula espinal, carcinoma de células renales, feocromocitomas, tumores en los islotes pancreáticos y en el saco endolinfático en el oído interno. Adicionalmente presentan múltiples quistes renales, pancreáticos, en el epidídimo y en el ligamento ancho uterino (Figura 1).

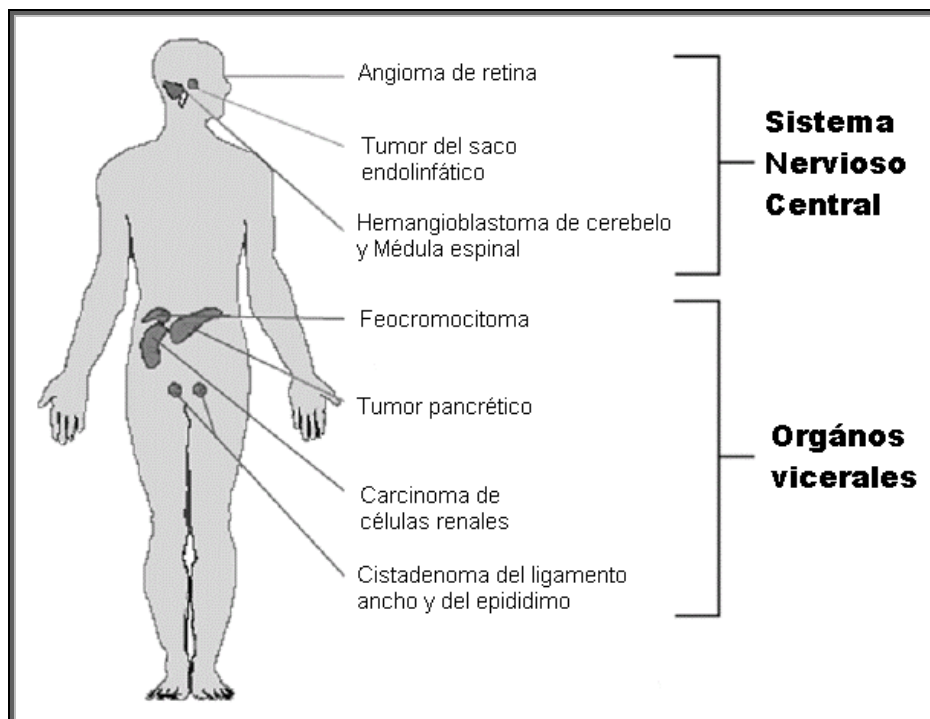


Figura 1. Enfermedad von Hippel – Lindau
Lesiones mas frecuentes de la enfermedad (Tomada y modificada de Kaelin, Jr.; 2002)

1.1.2. Cuadro Clínico

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, 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 familias, la mitad de los afectados presentaba alteración en un solo órgano (Neuman y cols, 1991). La manifestación inicial mas frecuente son los angiomas de retina y los hemangioblastomas de cerebelo. (Tabla 1)

Tabla 1. Frecuencias reportadas de neoplasia asociadas a VHL.

Autor	Lamiell y cols. 1989	Maher y cols. 1990	Richard et al. 1995	Maddock et al 1996
Pacientes (n)	554	152	215	83
Hemangioblastoma del SNC				
Frecuencia	55 %	72 %	72 %	64 %
Múltiples tumores	ND	38 %	43 %	ND
Edad de diagnóstico años (rango)	29±ND (13-61)	29±10 (11-61)	30±11 (13-70)	30±12 (4-76)
Otras manifestaciones de VHL				
Hemangioblastoma de retina	57 %	59 %	44 %	41 %
Carcinoma de células renales	24 %	28 %	36.7 %	14.5 %
Feocromocitoma	19 %	7 %	17.2 %	14.5 %
Lesiones pancreáticas	ND	ND	53 %	22 %

Los hemangioblastomas (HB) del sistema nervioso central (SNC) son tumores altamente vascularizados, de tipo benigno pero, debido a su crecimiento en un espacio cerrado, poseen el potencial de causar hemorragias, hidrocefalia obstructiva, hipertensión intracraneal, déficits neurológicos y muerte (Figura 2) (Huson y cols, 1986; Maddock y cols, 1996).



Figura 2. Hemangioblastoma de cerebelo
(Tomada de los archivos del Instituto Nacional de Neurología
y Neurocirugía, Manuel Velasco Suárez, 2003)

Los angiomas de retina también son tumores vascularizados y 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 3) (Huson y cols, 1986).

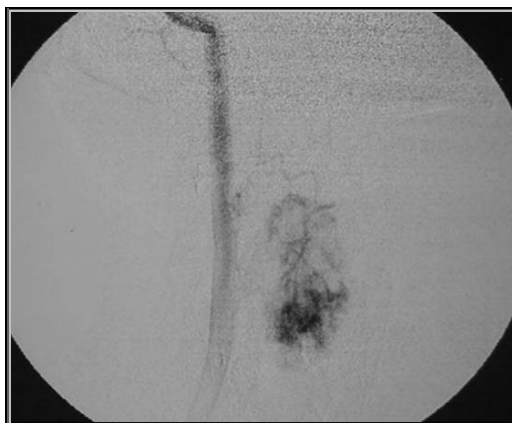


Figura 3. Angioma de retina
(Tomada de los archivos del Instituto Nacional de Neurología
y Neurocirugía, Manuel Velasco Suárez, 2003)

El 50 - 70 % de los pacientes eventualmente desarrollan quistes 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 y cols, 1987; Poston y cols, 1995; Maddock 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 (Chen y cols, 1995).

En el páncreas también pueden aparecer tumores. Los más frecuentes se denominan adenomas microquísticos y son de tipo benignos (Figura 4) (Girelli y cols, 1977; Neumann y cols, 1991).

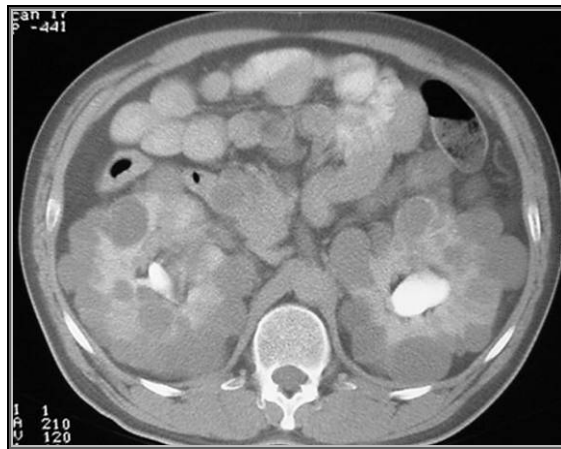


Figura 4. Quistes pancreáticos en enfermedad VHL.
(Tomada de los archivos del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, Manuel Velasco Suárez, 2003)

Los tumores de saco endolinfático, localizado en la región del oído interno, recientemente se han identificado como parte del síndrome que conforma la enfermedad (Figura 5). En un estudio de la función auditiva de una serie de 121 pacientes con enfermedad VHL, la prevalencia de trastornos auditivos fue muy elevada (> 65% del total de los casos y de estos en > 50% bilateral), con una incidencia de tumores del saco endolinfático del 11% (Manski y cols, 1997).

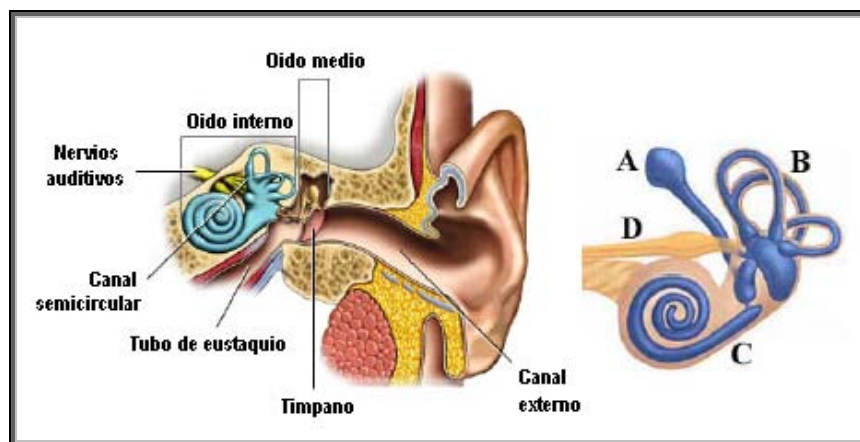


Figura 5. Esquema del oído. El oído interno consiste de A) Saco endolinfático, B) Canales semicirculares, C) Caracol y D) Tronco del nervio auditivo

Aunado a lo anterior, se ha descrito que los cistadenomas del epidídimo aparecen en la mitad de los varones afectados con VHL y se localiza principalmente en la cabeza del conducto (Choyke 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 y cols, 1997).

1.1.3. 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 en el gen <i>VHL</i> 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 y cols., 1995; Linehan y cols., 1995)

1.1.4. 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 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 se realiza 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 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 y cols, 1986).

1.1.5. 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, renales benignos y del epidídimo habitualmente son asintomáticos y sólo ameritan vigilancia (Persad y cols, 1997; Schiff 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.

1.2. Genética de la enfermedad de von Hippel – Lindau

1.2.1. 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 6); 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).

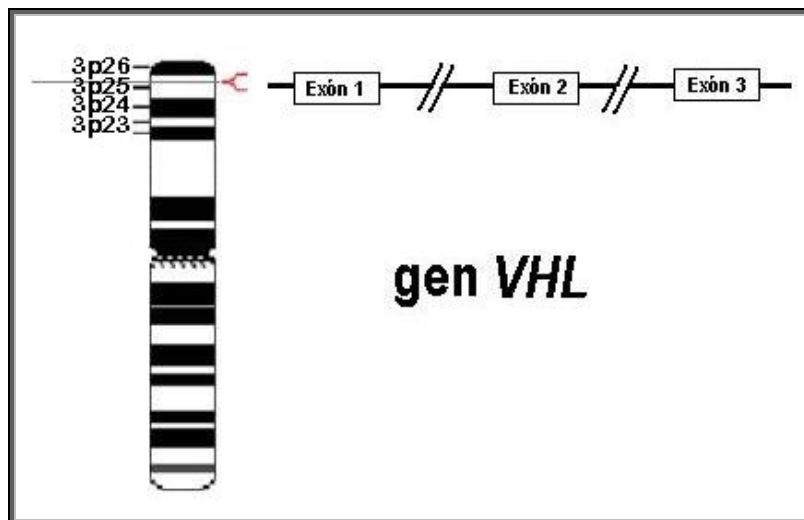


Figura 6. Esquema del brazo corto del cromosoma 3 con localización del gen *VHL* en la región 3p25-26. (Tomada y modificada de VHL Family Alliance, 2001)

1.2.2. Proteína VHL (pVHL)

El mRNA de 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, esta isoforma tiene un peso molecular de aproximadamente 18 – 20 kD (pVHL₁₉) (Schoenfeld y cols, 1998).

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

La pVHL tiene dos dominios: un dominio formado por una α -hélice (dominio α) que comprende de los aminoácidos 156 a 189 y es codificado por el exón III. Los aminoácidos 63 al 155, 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 7).

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.

Ye y colaboradores (1998) demostraron que la localización subcelular de la pVHL es regulada de forma dependiente del ciclo celular. Este grupo de investigadores encontró que la pVHL se acumula en el núcleo en células que se encuentran en fase G₁/G₀ del ciclo celular, mientras que la mayoría de las células en fase S expresaban la proteína en el citoplasma.

También se ha descrito que la pVHL₁₉ se distribuye de igual forma entre el citosol y el núcleo, mientras que la pVHL₃₀ es menos nuclear y se localiza principalmente en el citosol, asociada a la red de microtubulos (Iliopoulos y cols, 1995 y 1998; Coless y cols, 1997; Los y cols, 1996; Ohh y cols, 1998; Pause y cols, 1997).

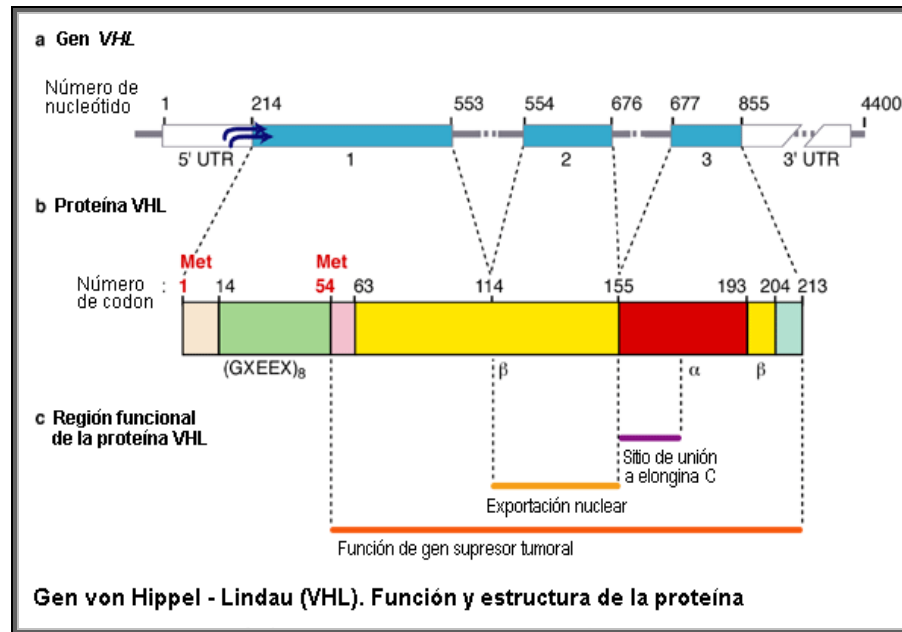


Figura 7. Función y estructura de la proteína VHL
 (Tomada y modificada de Expert Reviews in Molecular Medicine 2001
 Cambridge University Press: <http://www-ermm.cbcu.cam.ac.uk/01002654h.htm>)

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 proteína RAN, una proteína de unión a GTP, la cual es requerida para la transcripción por la RNA polimerasa II; por lo cual la inhibición de ésta enzima 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 descrito que una fracción de la pVHL esta asociada a membranas celulares, incluyendo aparato de Golgi y retículo endoplásmico (Fabbro y Henderson, 2003).

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

Los y colaboradores (1996) establecieron el patrón de expresión de la pVHL encontrando: expresión de la pVHL en el citoplasma de todas las neuronas del sistema nervioso central y periférico, siendo mayor en las células de Purkinje, Golgi tipo II y en el núcleo dentado del

cerebelo. En el cerebelo, la capa molecular presentó una menor expresión en comparación con la capa granular. También observaron que la pVHL se expresa en el sistema de túbulos renales (distal y proximal), bronquios, glándula tiroidea, vejiga, próstata, ductos biliares, útero, linfocitos, intestino y páncreas, siendo menor en los islotes de Langerhans.

El promotor del gen *VHL* contiene tres regiones reguladoras. Contiene un sitio de unión a Sp1 localizado en los nucleótidos +1 a +11, el cual contribuye significativamente a la activación de la transcripción del gen *VHL*, Sp1 es un factor de transcripción que se une a regiones ricas en secuencias CG, conocidas como islas CpG. Se han descrito otras dos regiones de regulación positiva en los nucleótidos -49 a -19 y -114 a -91, pero los factores que interaccionan con ellas aún no han sido identificados (Zatyka y cols, 2002).

1.2.3. Inactivación del gen *VHL*.

El gen *VHL* es un gen supresor tumoral, el cual se comporta de acuerdo a la hipótesis de Knudson, la cual postula que en el caso de cánceres hereditarios o síndromes de cáncer familiar, 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 y cols, 1971).

La enfermedad de von Hippel-Lindau es causada principalmente por mutaciones germinales en el gen *VHL*, seguido por la inactivación del alelo normal restante por mutaciones somáticas. Un mecanismo adicional descrito para la inactivación del gen *VHL* es la metilación de la región del promotor del gen.

1.2.3.1. Mutaciones germinales en el gen *VHL*.

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 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 y cols., 1996).

Las mutaciones C712T, G713A (Richards y cols, 1995), Arg238Trp, Arg238Gln, Arg167Trp (Crossey 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).

Las mutaciones Tyr98His y Tyr112His se han asociado a un alto riesgo a desarrollar hemangioblastoma de cerebelo, y un bajo riesgo de desarrollar feocromocitoma y carcinoma de células renales.

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 algunos pacientes con VHL, no se han encontrado mutaciones germinales en la región codificante del gen *VHL*. Un análisis mas cuidadoso con técnicas como FISH (del inglés “Fluorescent *In Situ* Hybridization”) o Southern blot han mostrado pacientes con deleciones completas de uno de los alelos del gen *VHL* o una parte considerable del mismo.

Actualmente en la base de datos The Human Gene Mutation Database se encuentran registradas 350 mutaciones.

1.2.3.2. Mutaciones somáticas en tumores de pacientes con 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 (LOH) (Figura 8).

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%.

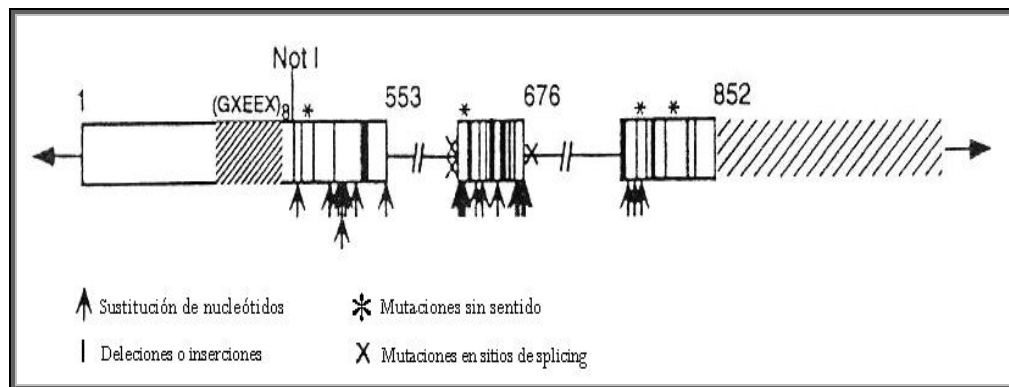


Figura 8. Distribución de mutaciones en el gen *VHL* en carcinoma renal esporádico. Los tres exones son indicados por cuadros, y en el exón 1 se muestra el repetido de aminoácidos pentamérico y la región 3' UTR en el tercer exón están indicados con líneas inclinadas. El número se refiere al nucleótido del marco de lectura abierta. (Tomada y modificada de: Gnarra y cols, 1994)

1.2.3.3. Metilación del gen *VHL*

Las modificaciones epigenéticas son definidas como cambios heredables en la expresión génica que ocurren sin una alteración en la secuencia de nucleótidos del DNA. Estos cambios implican cambios en los patrones de metilación en el DNA y/o cambios en la estructura de la cromatina que regulan la expresión génica (Ushijima, 2005).

La metilación del DNA es catalizada por la DNA metiltransferasa (DNMT), la cual involucra la adición de un grupo metilo en el carbono 5 de la citosina del dinucleótido CpG, dando como resultado una 5-metil-citosina, por lo cual, las regiones con mayor susceptibilidad a metilación son regiones ricas en secuencias CG, llamadas islas CpG, las cuales frecuentemente se encuentran en la región del promotor de algunos genes (Doerfler y cols, 1983; Bestor, 2000) (Figura 9).

Este fenómeno es un mecanismo que se ha asociado al desarrollo de diferentes patologías (Jones y cols, 2002). En el caso de el cáncer, se ha encontrado que el DNA se hipermetila en la región del promotor de los genes supresores de tumores y en el caso de los oncogenes se encuentra hipometilado. Estos cambios en la metilación del DNA dan como resultado la pérdida o la ganancia de la función normal de dicho gen (Esteller y cols, 2000; Herman y cols, 1994).

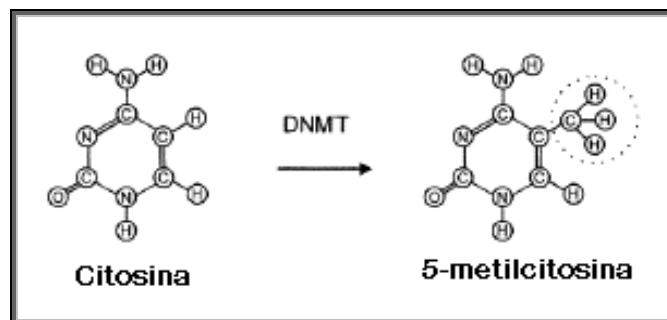


Figura 9. Metilación del DNA por la DNA metiltransferasa (DNMT), la cual transfiere un grupo metilo al carbono 5 de la citosina,

En términos generales se sabe que hay una relación inversa entre la densidad de la metilación del promotor y la actividad transcripcional del gen, sin embargo el mecanismo exacto por el cual la metilación del DNA regula la expresión de un gen, aun no se ha dilucidado por completo.

Herman y colaboradores en 1994 demostraron que el gen *VHL* se encontraba inactivo en carcinomas renales, debido a la hipermetilación de una isla CpG no metilada normalmente en la región 5' del gen *VHL*, en 5 de 26 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 era la causa del silenciamiento del gen.

A partir del reporte de Herman y colaboradores se ha estudiado la hipermetilación del gen *VHL* como mecanismo probable de inactivación. Se ha reportado hipermetilación del 8% al 33 % en carcinomas de células claras de riñón (Dulaimi y cols, 2004; Battagli y cols, 2003; Kuroki y cols, 2003; Cairos y cols, 2004), 36% en líneas celulares de carcinoma de riñón (Kuroki y cols, 2003) y en hemangioblastomas del sistema nervioso central no ha sido detectada (Gläsker y cols, 2001).

1.2.4. Correlación genotipo – fenotipo

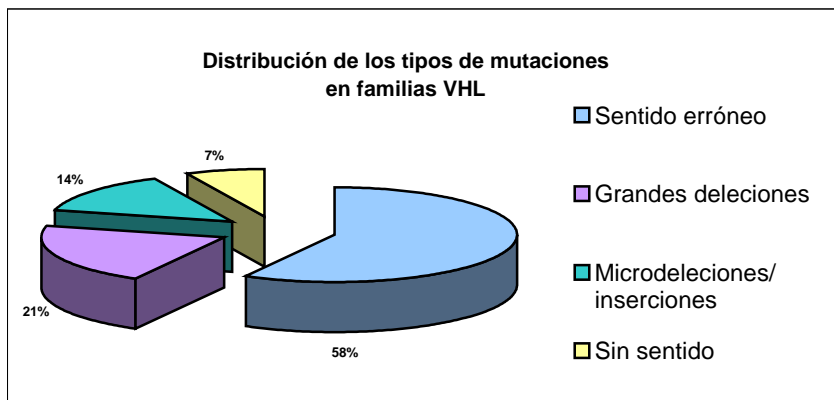
Chen y colaboradores (1995) identificaron mutaciones en células germinales en 85 de 114 familias con VHL (75%), encontrando que los tipos de mutaciones responsables del VHL sin feocromocitoma (tipo 1) difieren de las responsables del VHL con feocromocitoma (tipo 2). Las mutaciones encontradas fueron sin sentido, microdelecciones/ 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).

El análisis de mutaciones en células germinales en 469 familias con VHL de Norteamérica, Europa y Japón realizado por Zbar y colaboradores (1996) permitió la identificación de mutaciones en un 63% de las familias analizadas. En este estudio, 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, y que estas mutaciones en las familias estudiadas favorecen el desarrollo de tres tipos diferentes de cáncer: carcinoma renal sin feocromocitoma, carcinoma renal con feocromocitoma y sólo feocromocitoma.

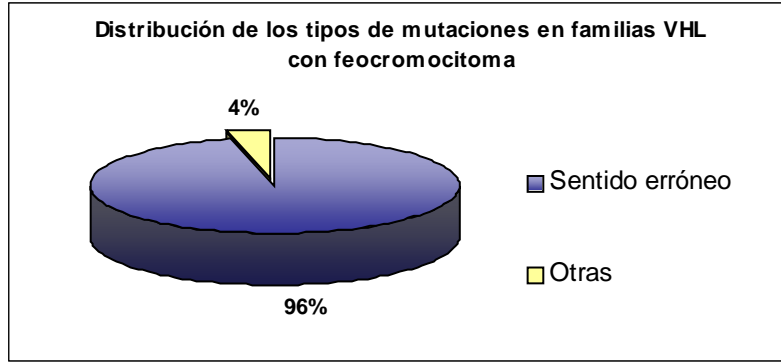
En un estudio de riesgo acumulativo de feocromocitoma en pacientes con una edad promedio de 50 años, el 59 % de los pacientes presentó mutaciones de sentido erróneo y 9% de éstos, delecciones o mutaciones sin sentido. No todas las mutaciones de sentido erróneo deben asociarse a un alto riesgo de feocromocitoma, 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 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 (CCR) y hemangioblastomas (VHL tipo 2B), aunque las mutaciones (Tyr98His y Tyr111His) se asocian con un bajo riesgo de RCC (fenotipo tipo 2A).

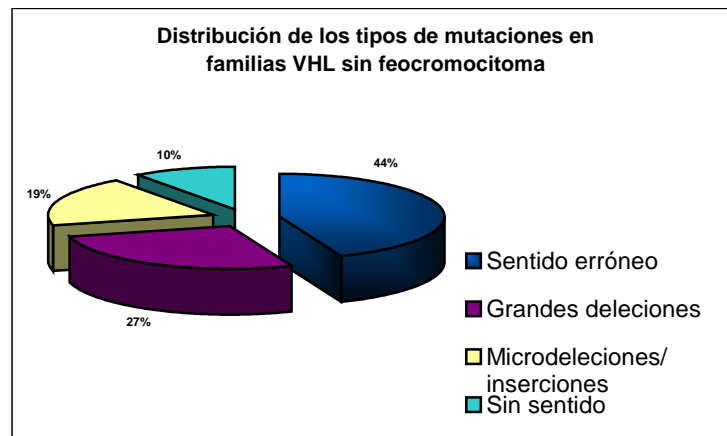
Brauch (1997) y Bar (1997), estudiaron sujetos con feocromocitoma esporádico, sin antecedentes familiares, y sólo encontraron mutaciones del gen *VHL* en un 3-3.7% de los casos. En familias *VHL* con feocromocitoma se han encontrado mutaciones germinales en aproximadamente 50%. Ciertas mutaciones, sin embargo, parecen ser exclusivamente asociadas con el fenotipo de feocromocitoma (tipo 2C) (Crossey y cols, 1995; Gross y cols, 1996).



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



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



Grafica 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).

1.2.5. 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).

1.2.5.1. 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 10).

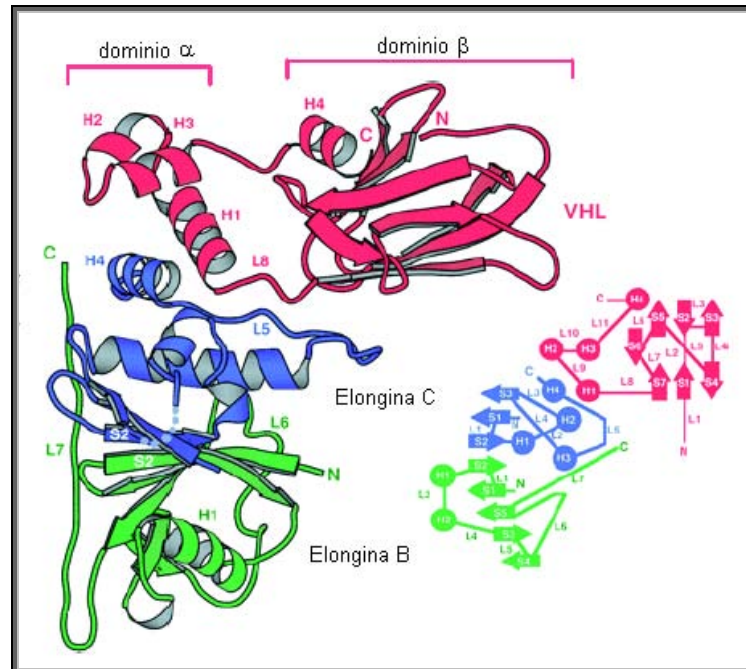


Figura 10. Complejo VCB.

Consiste de dos interfases, 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)

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 y cols, 1995; Kibel y cols, 1995; Kishida y cols, 1995).

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 , interactúan 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 están 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 sandwich 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 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, interactuando 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 $\alpha - \beta$, 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 $\alpha - \beta$ (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).

1.2.5.2. Complejo ligasa de ubiquitina VEC.

Una vez formado el complejo VCB, éste interacciona con una cuarta proteína llamada Cul2, dando lugar al complejo VEC. La Cul2, es miembro de la familia de las culinas, la cual está involucrada en el control del ciclo celular en las 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 VEC cuando se une con la enzima E2 conjugada con ubiquitina y Rbx1 tiene la actividad de ligasa E3 de ubiquitina, el cual se encarga de poliubiquitinar sus proteínas blanco para su posterior degradación vía proteosoma 26S. 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 (Lisztwan y cols, 1999; Iwai y cols, 1999) (Figura 11).

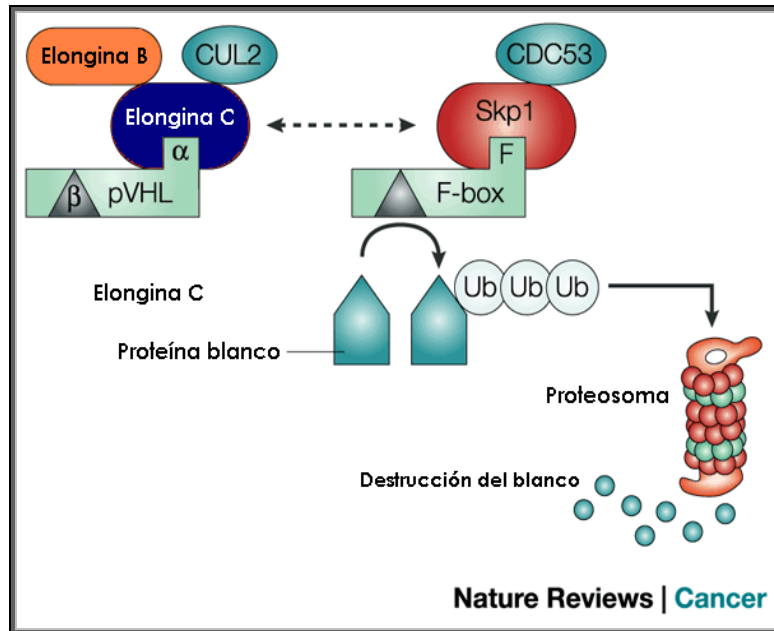


Figura 11. Complejo VEC con actividad de ligasa E3 de ubiquitina. Similitud entre el complejo VEC y el complejo SCF en levaduras, a partir del cual se elucidó la función de la pVHL (Tomada y modificada de Kaelin, Jr., 2002)

1.2.6. 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 el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF). 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. Los genes inducidos por hipoxia, tales como VEGF y EPO contienen sitios de unión para secuencias específicas, llamados activadores transcripcionales HIF (Illiopoulos y cols, 1996; Sato y cols, 1994; Siemeister y cols, 1996; Wizigmann-Voos y cols, 1995).

Otro de los genes blanco del HIF involucrados en el cuadro del enfermedad VHL es 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.

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 VEC se une directamente y poliubiquitina a la subunidad HIF α (Figura 12).

Hay tres genes HIF α en humanos: *hHIF-1 α* , *hHIF-2 α* y *hHIF-3 α* . La expresión de *hHIF-1 α* en tejidos es ubicua y débil, *hHIF-2 α* a pesar de que su expresión también se encuentra ampliamente distribuida, existen notables diferencias entre tejidos. La subunidad *hHIF-3 α* ha sido la menos caracterizada (Hansen y cols, 2002; Wiener y cols, 1996; Hogenesch y cols, 1997; Ema y cols, 1999). De la familia β existen tres miembros: HIF1 β /ARNT1, HIF2 β /ARNT2 y HIF3 β /ARNT3.

La actividad transcripcional del HIF1 α y HIF2 α es regulado a través de dos dominios de transactivación localizados hacia el COOH-terminal, llamados N-TAD y C-TAD. La regulación de HIF3 α es menos clara.

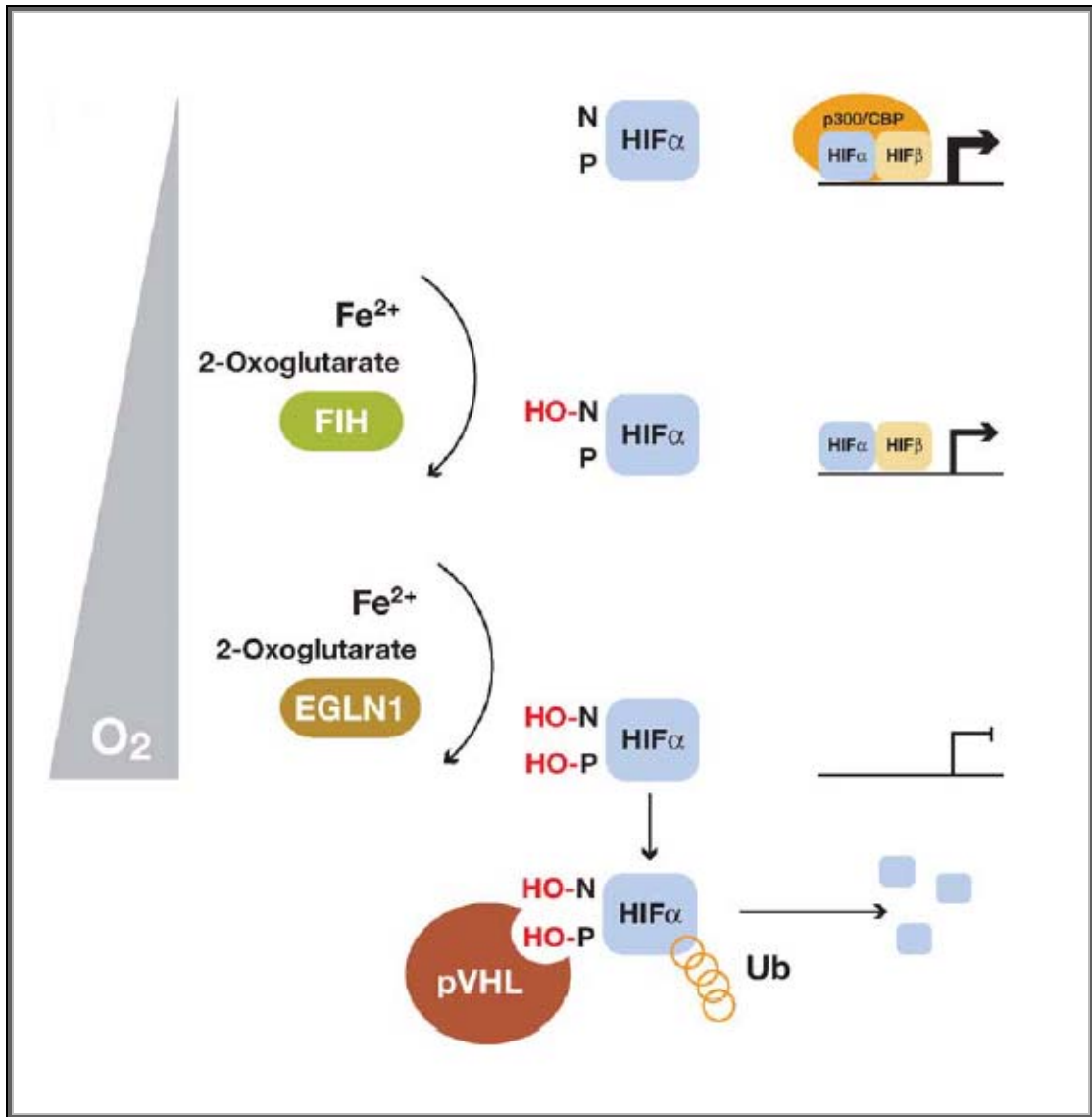


Figura 12. Modelo del papel de la pVHL en la degradación de HIF -1 α dependiente de oxígeno y mediada por ubiquitinación. (Tomada y modificada de Kaelin Jr., 2005)

La unión de la pVHL con el HIF α está regulada por la hidroxilación en un residuo de prolina. En presencia de oxígeno, HIF α es hidroxilada enzimáticamente por miembros de la familia EGLN en uno de dos posibles residuos de prolina dentro del dominio N-TAD (Ivan y cols, 2001; Jaakkola y cols, 2001; Yu y cols, 2000; Masson y cols, 2001). La hidroxilación de cualquiera de los residuos de HIF α corresponde a la prolina (Pro) 402 y Pro564, generando un sitio de unión para la pVHL. Por lo tanto, en ausencia de oxígeno (hipoxia) las prolin hidroxilasas no son activas, como consecuencia los residuos de prolina del HIF α al no

encontrarse hidroxilados no interaccionan con la pVHL, por esta razón este dominio del HIF α también se le conoce como dominio de degradación único dependiente de oxígeno (ODD) (Huang y cols, 1998; Salceda y Caro, 1997) (Figura 13).

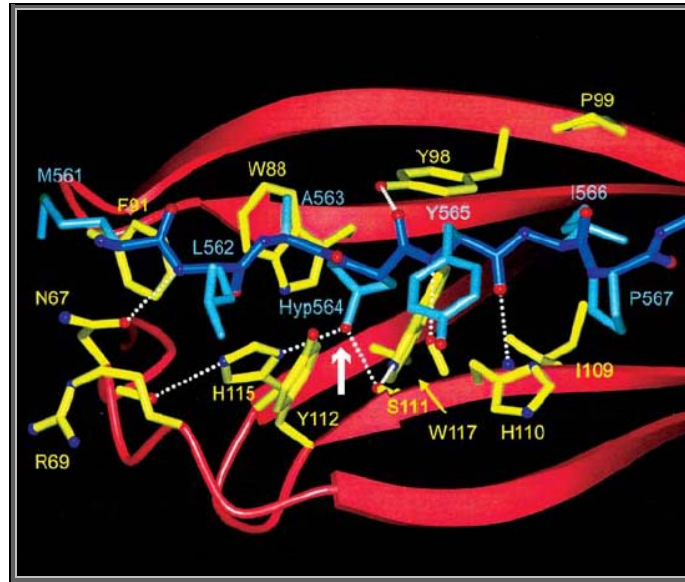


Figura 13. Estructura del HIF unido a la pVHL. Se muestra el dominio β de la pVHL (rojo), las cadenas más importantes (amarillo) con los residuos de His 115 y Ser 111. El núcleo del HIF α (azul oscuro) con las cadenas laterales (azul claro). Los residuos de His 115 y Ser 111 de la pVHL que pueden formar los puentes de hidrógeno con el residuo de prolina 564 hidroxilado del HIF α (flechas blancas). Tomado y adaptado de Min y cols, 2002

La región de unión del HIF a la pVHL es en el dominio β , este dominio a pesar de que es hidrofóbico contiene dos residuos hidrofílicos críticos, His y Ser, que normalmente interaccionan con agua y cuando la pVHL se une al HIF, desplaza estas moléculas de agua (Min y cols, 2002; Hon y cols, 2002).

El dominio C-TAD abarca los residuos 786-826 e interacciona con los coactivadores transcripcionales CREB, CBP, p300, SRC-1 y TIF-2. Este dominio también es regulado por la concentración de oxígeno a través de la hidroxilación de un residuo de asparagina por FIH-1 (del inglés asparagyl-hydroxylase-factor-inhibiting HIF-1, en condiciones de normoxia, la hidroxilación de la asparagina del residuo 803 inhibe la unión de los coactivadores por impedimento estérico (Lando y cols, 2002).

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 VHL se debe a una ganancia o pérdida de función de la pVHL (Kondo y Kaeling, Jr., 2001).

2. Justificación

3. Hipótesis

4. Objetivos

2. Justificación

El diagnóstico molecular de la enfermedad de von Hippel-Lindau, se realiza en forma sistemática en diversos países debido a la gravedad de la enfermedad, aunque su incidencia sea muy baja.

En nuestro país no existen estudios hasta la fecha, ni reportes 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 individuos que la presentan mueren sin un diagnóstico certero, dejando a sus descendientes sin conocimiento del alto riesgo de desarrollar la enfermedad (50%). Por lo tanto es importante la caracterización molecular de pacientes con diagnóstico clínico de enfermedad de von Hippel – Lindau y/o hemangioblastomas cerebeloso, con el fin de identificar las mutaciones y cambios epigenéticos responsables de esta enfermedad en población mexicana.

Esto es esencial con la finalidad en un futuro, de poder predecir con mayor certeza el riesgo de desarrollar los tumores que presentan los pacientes con la enfermedad de von Hippel – Lindau, así como su relación con mutaciones específicas en el gen *VHL*.

3. Hipótesis

La enfermedad de von Hippel-Lindau es un síndrome de cáncer familiar autosómico dominante, la cual se debe principalmente a mutaciones en el gen *VHL*, por lo que en aquellos pacientes con diagnóstico clínico en esta enfermedad e historia familiar positiva, la enfermedad se deberá principalmente a mutaciones germinales en dicho gen, y los pacientes con hemangioblastoma esporádico o probable VHL con historia familiar no comprobable, la enfermedad se deberá a mutaciones somática y cambios epigenéticos en el gen *VHL*.

4. Objetivos

4.1. Objetivo general

- ♣ Identificar nuevas mutaciones y patrones de metilación en el gen *VHL* en pacientes mexicanos con diagnóstico clínico de enfermedad de von Hippel – Lindau y/o hemangioblastoma cerebeloso.

4.2. Objetivos particulares:

- ♣ Identificar mutaciones germinales y somáticas en la región codificante del gen *VHL* en pacientes índices con diagnóstico clínico de enfermedad de von Hippel – Lindau y/o hemangioblastoma cerebeloso 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.
- ♣ Estudiar los patrones de metilación en el promotor del gen *VHL* por medio de MSRF (del inglés Methylation – Sensitive Restriction Fingerprint)

5. Metodología
6. Resultados
7. Análisis de resultados

5. Metodología

5.1. Determinación de mutaciones germinales

5.1.1. Población de estudio: criterios de inclusión y exclusión de los pacientes.

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 período del 2002 al 2004, 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 extendió a los familiares afectados o en riesgo los cuales aceptaron participar. Como primera fase del estudio se seleccionaron 8 pacientes de 7 familias que cubrían los criterios de Melmon y Rosen (1964), 5 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 4). De los pacientes seleccionados, solo un paciente presenta feocromocitoma, lo cual corresponde a un VHL tipo 2 y el resto de los pacientes a VHL tipo 1.

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.

Se excluyeron aquellos 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.

Tabla 4. Características clínicas de los pacientes estudiados

Diagnóstico	Paciente	Edad	Sexo	Tipo de tumor
VHL	3	35	F	HB (3)
	10	43	F	HB (2), QP
	65	28	F	HB (1)
	17	43	F	ARB, HB, QP, QR
	21	45	M	CCCR, HB, QP, QR
	70	29	F	HB(6), ARB, CCR, QP, QR, QO, TU, Fc
	71	32	M	HB
	92	34	M	HB (1), QR
Probable VHL	14	71	F	HB (1), QR (1)
	15	47	M	HB (1)
	58	38	M	HB (1)
	63	31	M	HB múltiple, HBM
Esporádico	13	42	M	HB (1)
	24	47	M	HB (1)
	66	29	M	HB (1)
	72	-	F	HB (1)
	91	-	F	HB (1)
----	67	36	F	Sana

(): número de tumores
 ARB: angiomas de retina bilateral
 CCCR: carcinomas de células claras de riñón
 F: femenino
 Fc: feocromocitoma
 HB: hemangioblastoma de cerebelo

HBM: hemangioblastoma de médula
 M: masculino
 QP: quistes pancreáticos
 QR: quistes en el riñón
 QO: quistes en el ovario
 TU: Tumoración uterina

5.1.2. Extracción del DNA y cuantificación.

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

La extracción del 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), esto es con la finalidad de crear un banco con DNA con muestras extraídas por diferentes métodos y para estudios posteriores.

En la extracción por medio de sales 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 lisarlos 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 se precipita con isopropanol y se lava con etanol al 70% (Sambrook y cols., 1989). El DNA se secó por medio de calor y vacío, se resuspendió en agua estéril y se disolvió a 50°C.

La extracción con el paquete comercial marca Qiagen se realizó con base al procedimiento establecido por el fabricante, el cual consistió en emplear una proteasa, la cual degrada las proteínas contenidas generalmente en las muestras biológicas. El DNA se precipita con etanol y se traspa a una columna, la cual contiene una membrana de afinidad con el DNA, por lo cual, el DNA queda fijo a esta membrana para ser lavado y posteriormente diluido con agua para liberarlo de la membrana (Manual Qiagen).

El análisis cuantitativo del DNA se hizo por espectrofotometría, la lectura se realizó 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 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 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 y cols., 1989).

Para el análisis cualitativo se realizó por medio de electroforesis, el DNA se resolvió en geles de agarosa al 1%, el cual se saturó con el amortiguador TBE (Tris-Borato-EDTA) y se corrió a 100 volts. Posteriormente el gel de agarosa se tiñó con bromuro de etidio y se observó en un transiluminador de luz ultravioleta.

5.1.3. Amplificación específica de los exones del gen *VHL* por medio de PCR

Para obtener las condiciones necesarias de PCR para amplificar las diferentes regiones del gen *VHL* se utilizaron como base los oligonucleótidos descritos por Gnarra y cols (1994). El exón 1 se amplificó en dos partes, en lugar de cuatro como lo había descrito Gnarra y cols (1994), para el exón 2 no se hicieron cambios y para el exón 3 fue necesario diseñar un par oligonucleótidos diferentes, los cuales facilitaron la secuenciación de esta región.

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 # 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

E3F 5' _ AGG TAG TTG TTG GCA AAG CCT C _ 3'
E3R 5' _ CAC TTT GAA ACT AAG GAA GGA ACC _ 3'

Los oligonucleótidos para amplificar el fragmento 1-A abarcan 92 pb hacia el extremo 5' del promotor hasta el nucleótido 240 del exón 1, el oligonucleótido antisentido para la región 1-B abarca 27 pb hacia el extremo 3' del exón 1. Los oligonucleótidos para amplificar el exón 2 abarcan 28 pb hacia el extremo 5' y 57 pb hacia el extremo 3' de la región codificante, los oligonucleótidos para el exón 3 abarcan 84 pb hacia el extremo 5' y 99 pb hacia el extremo 3' de la región codificante (Figura 14).

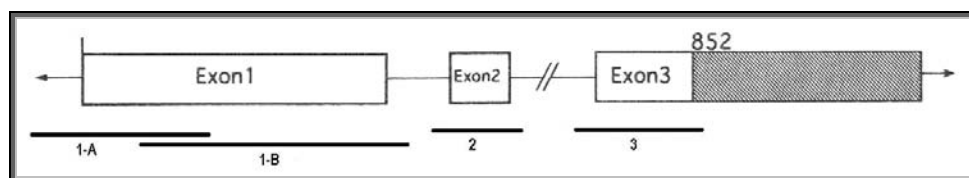


Figura 14. Ubicación de los oligonucleótidos utilizados para amplificar el gen *VHL*.

Para estandarizar el PCR de cada una de las regiones se partió de las condiciones descritas por Gnarra y cols (1994). Los productos de PCR fueron resueltos por electroforesis en geles de agarosa al 3% en TBE 1X a 120 volts, los productos amplificados se flanquearon por un marcador de peso molecular (Marcador V y/o VIII de Roche) para verificar su tamaño. Posteriormente los geles de agarosa fueron teñidos con bromuro de etidio y observados en un transiluminador de luz U.V. Una vez establecidas las condiciones óptimas de PCR para cada exón se procedió a amplificar las muestras de los pacientes.

En la tabla 5 se muestran el tamaño de los productos de PCR obtenidos para cada región del gen *VHL* y la concentración óptima encontrada.

Tabla 5. 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	25	146
	VHL # 101		
2	VHL # 102	100	208
	VHL # 103		
3	E3F	25	363
	E3R		

En la tabla 6 se indican las condiciones de PCR y en la tabla 7 se muestran los programas utilizados para la amplificación de cada una de las regiones del gen *VHL*.

Tabla 6. Condiciones de PCR

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

Tabla 7. Programa de PCR

Desnaturalización Inicial	95 ° C	10 minutos
30 Ciclos	95 ° C	30 segundos
	T.O.*	30 segundos
	70 ° C	30 segundos
Extensión final	72 ° C	10 minutos
	4 ° C	enfriar

*: Temperatura óptima de alineamiento de cada uno de los oligonucleótidos, exon 1-A y 1-B: 68° C, exon 2: 65° C; exon 3: 60° C

5.1.4. Secuenciación.

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. 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 y 2.

Los productos de PCR del exon 3 se purificaron empleando un paquete comercial de la marca Qiagen de purificación del producto de PCR desde el gel de azarosa, debido a que se observaba DNA degradado. 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%.

Para la reacción de secuenciación se utilizó el paquete BigDye Terminator V3.3 de Applied BioSystems. Las condiciones de secuenciación que se utilizaron para los tres exones fueron similares, en las cuales, la cantidad de DNA del producto amplificado varió de acuerdo a la concentración estimada por electroforesis en geles de agarosa. Las condiciones de secuenciación fueron:

Tabla 8. 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 9. 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 se secaron 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 (ABI prism 3100) 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).

5.2. Determinación de mutaciones somáticas

5.2.1. Población de estudio

Para esta parte del estudio, de los pacientes anteriormente estudiados, se seleccionaron aquellos pacientes con que se contara con una muestra de tumor embebido en parafina de cirugías anteriores almacenados en el departamento de patología del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. Esto se realizó con previo consentimiento de dicho departamento. En la tabla 10 se muestra los pacientes seleccionados y el tipo de tumor.

Tabla 10. Pacientes con muestras de tumor embebidos en parafina

Diagnóstico	Paciente	Tumor
VHL	3	HB (1)
	4	HB (2)
	10	HB (1)
	17	HB (1)
	21	CCR (1)
	26	CCR (1)
	65	HB (1)
	70	HB (1)
	70	CCR (1)
Probable VHL	63	HB (1)
	14	HB (1)
	60	HB (2)
Esporádico	13	
	24	HB (1)
	66	

(): número de tumores
HB: hemangioblastoma de cerebelo
CCR: Carcinoma de células renales
CN: muestra de cerebelo normal

5.2.2. Extracción del DNA y cuantificación.

De cada uno de los bloques de los tumores embebidos en parafina, se hicieron tres cortes de 15 μm y se colocaron en un tubo eppendorf, para eliminar la parafina del tejido, se les agregó n-octano y se incubó a 50°C por 30 minutos, se centrifugó y se eliminó el sobrenadante, este procedimiento se repitió dos veces.

Una vez eliminada la parafina del tejido, se lavó con etanol absoluto y etanol al 75%, se secó la pastilla y se agregó el amortiguador de lisis, el cual contiene Tris 50 mM, EDTA 1 mM, Tween 0.5% y Proteinasa K (PK) a una concentración de 200 µg/ml. Se incubó toda la noche a 50°C, esto es con el fin de lisar las células para liberar el DNA.

Se eliminaron los restos celulares del DNA con fenol, fenol - cloroformo y cloroformo – alcohol isoamílico, finalmente el DNA obtenido se precipitó con isopropanol y se lavó con etanol al 70% (Sambrook y cols.; 1989). La cuantificación del DNA se realizó de la misma manera que para el DNA extraído de linfocitos.

5.2.4. Amplificación por PCR, purificación y secuenciación

En la tabla 11 se muestran las condiciones de PCR para amplificar los diferentes exones del gen *VHL*. Los programas y los oligonucleótidos son los mismos que los utilizados con el DNA extraído de linfocitos.

Tabla 11. Condiciones de PCR

Reactivo	Concentración inicial	Vol. [µL]	Concentración final
Amortiguador	10X	3.5	1 X
dNTP's	10 mM	1 c/u	0.29 mM
MgCl ₂	30 mM	1.75	1.5 mM
DMSO	100 %	1.75	5%
Olidonucleótido sentido	Concentración oligonucleótido óptima		
Oligonucleótido antisentido			
Taq Polimerasa	10 U/µL	0.5	5 U
H ₂ O	c.b.p. 35 µL		

Para la purificación y secuenciación de los productos de PCR se realizó el mismo procedimiento que con el DNA de linfocitos.

5.3. Estudio de la inactivación del gen *VHL* por metilación.

En las muestras de tumores embebidos en parafina disponibles se estudió si el gen *VHL* se encuentra inactivo por metilación, y en forma paralela por medio de inmunohistoquímica se analizó la expresión de la proteína en dichos tumores con el fin establecer una correlación entre el grado de metilación y la expresión de la pVHL. Para esta parte del estudio se incluyeron dos muestras de cerebelo normal que fueron donadas del departamento de patología del Hospital General.

5.3.1. Inclusión del tejido en parafina.

Las muestras de cerebelo normal fueron tejido fresco de dos pacientes que murieron de un padecimiento no relacionado con el cuadro clínico de pacientes con VHL, no presentaron alteraciones en las estructuras normales del cerebelo y ambos pacientes murieron en la cuarta década de vida.

Como primera parte del procedimiento se deshidrato el tejido, para lo cual se mantuvo sumergido con agitación constante y durante una hora en cada una de las siguientes sustancias: Et-OH al 96%, tres cambios de Et-OH absoluto, tres cambios de Xilol 100%, tres cambios en parafina, previamente disuelta entre 55 y 60° C. Finalmente se acomodó el tejido en los moldes para hacer los bloques y se rellenaron con parafina. Se dejaron enfriar los bloques y se etiquetaron.

Una vez obtenidos los cerebelos en bloques de parafina se realizó la extracción del DNA de acuerdo con el procedimiento mencionado para los tumores.

5.3.2. MSRF (del inglés Methylation – Sensitive Restriction Fingerprint)

La técnica de MSRF consiste en digerir el DNA con una enzima sensible a metilación, estos es, cuando la secuencia de nucleótidos se encuentra metilada la enzima no corta y posteriormente por medio de PCR se amplifica la región de interés. El análisis se realiza con

base a la ausencia o presencia del producto de PCR. Cuando en una muestra hay producto de PCR significa que el sitio de corte se encuentra metilado ya que la enzima sensible a metilación no cortó dicho producto de PCR.

En este experimento una misma muestra se sometió a dos tratamientos, como primer paso ambas muestras son digeridas con la enzima Mse I a 37°C durante 12 horas (secuencia de corte que reconoce: T ↓ TAA) ya que el DNA podría encontrarse en un estado alto de compactación, lo cual impediría la adecuada digestión de la segunda enzima sensible a metilación y obtener como resultado un falso positivo. Posteriormente sólo a una de ellas se sometió a una segunda digestión con la enzima sensible a metilación BstU I a 60°C durante 12 horas (secuencia de corte que reconoce: CG ↓ CG), después se realizó el PCR y la muestra de DNA digerido solo con la enzima Mse I se utilizó como control positivo de PCR.

El gen *VHL* tiene una isla CpG que abarca del nucleótido 441 al 1070, la cual comprende la región del promotor y el exón 1. En este estudio se analizó la región del promotor (nucleótido 566 al 670), por lo que se flanqueó con los oligonucleótidos VHL # 104 y VHL # 105 para el PCR.

Como control negativo para metilación se utilizó el DNA de las muestras de cerebelo normal y el de los linfocitos de cada uno de los pacientes. Se utiliza el DNA de los linfocitos como control, ya que de acuerdo a la literatura esta región normalmente no se encuentra metilada y la inactivación por este mecanismo es tejido específico.

5.3.3. Estudio de la expresión de la pVHL.

La expresión de la pVHL fue analizada mediante inmunohistoquímica revelada con peroxidasa y diamino-benzidina (DAB) en muestras de cerebelo normal y en los tumores de los pacientes.

De los bloques de los tumores embebidos en parafina se realizaron cortes de 10 μm en un microtomo, se montaron en laminillas previamente tratadas con Poli-L-lisina y se dejaron secar a temperatura ambiente durante 24 horas.

Para desparafinar las muestras se colocaron las laminillas en una estufa a 60° C por 30 min, se sacaron de la estufa e inmediatamente se colocaron en xilol al 100% durante 10 min, después nuevamente xilol, xilol-EtOH (1:1), Et-OH al 100%, Et-OH 90%, 75%, 55% y H₂O destilada, cada uno por 10 min. Posteriormente se colocaron las laminillas en un amortiguador de citratos a pH= 6 en ebullición por 15 minutos, 20 minutos en citratos fríos (pH= 6) y después se les dio tres lavados con un amortiguador de fosfatos (PBS) a pH= 7.4 de 10 minutos cada uno.

La peroxidasa endógena fue bloqueada con H₂O₂ al 1% en metanol durante 30 minutos a temperatura ambiente, se permeabilizó el tejido con Tritón al 3% en PBS, las laminillas fueron lavadas en PBS y preincubadas con BSA 5% en PBS durante 30 h. Se utilizó el anticuerpo de conejo anti-VHL (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) con una dilución 1:100, en PBS durante 48 hrs a 4°C. El tejido se lavó con PBS y se incubó con el anticuerpo secundario biotinilado correspondiente durante 1 hr. en PBS a temperatura ambiente. Posteriormente el tejido se volvió a lavar con PBS y se incubaron durante 1 hr. con el complejo avidina-biotina preparado en PBS 30 minutos antes. El revelado se realizó con DAB, los tejidos se deshidrataron en EtOH 50, 75, 96 y 100%; Xilol-EtOH y Xilol 100% y finalmente se montaron con Clarion. Las preparaciones se analizaron con microscopía de luz.

6. Resultados

6.1. Mutaciones germinales.

Para el exón 1 se secuenciaron 18 pacientes con el oligonucleótido sentido y se encontró un cambio en la secuencia codificante en los pacientes 3, 17, 21 y 92.

El paciente 3 presentó una delección de los nucleótidos TCT (nucleótidos 440, 441, 442) localizados en los codones 76 y 77 (Figura 15).

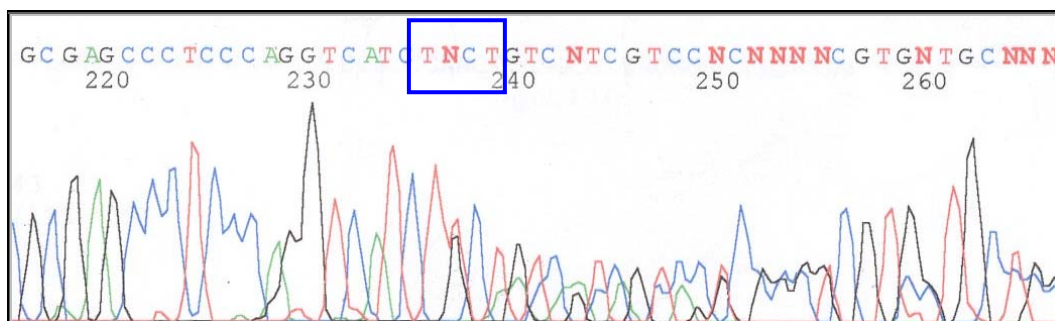


Figura 15. Exón 1. Delección del triplete TCT a partir del nucleótido 440

Secuencia normal	TCC	CAG	GTC	ATC	TTC	TGC	AAT	CGC
Secuencia de aminoácidos	Ser	Gln	Val	Ile	Phe	Cys	Asn	Arg
No. de codón	72	73	74	75	76	77	78	79
Secuencia mutada	TCC	CAG	GTC	ATC	TGC	AAT	CGC	
Secuencia de aminoácidos	Ser	Gln	Val	Ile	Cys	Asn	Arg	
No. de codón	72	73	74	75	77	78	79	

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 este 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 del codón 76: delPhe76.

Dos pacientes no relacionados: 17 y 21, presentaron una inserción de una adenina en el nucleótido 512 que se localiza en el codón 100 (Figura 16).

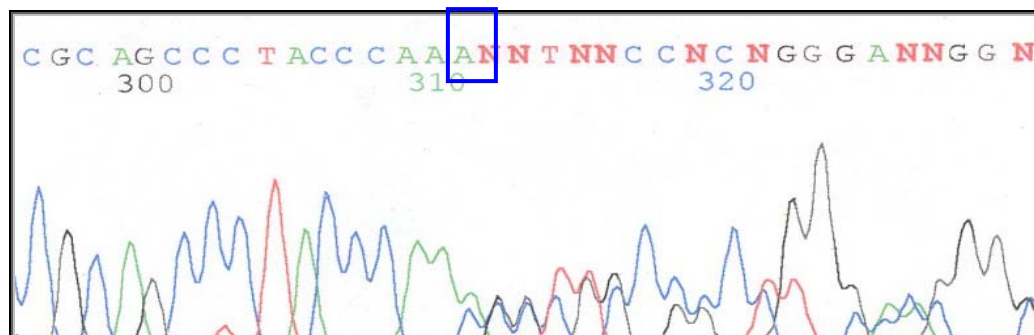


Figura 16. Exón 1. Inserción de una Adenina en el nucleótido 512

Secuencia normal	CCC	TAC	CCA	ACG	CTG	CCG	CCT
Secuencia de aminoácidos	Pro	Tyr	Pro	Thr	Leu	Pro	Pro
No. De codón	97	98	99	100	101	102	103
Secuencia mutada	CCC	TAC	CCA	AAC	GCT	GCC	GCC
Secuencia de aminoácidos	Pro	Tyr	Pro	Asn	Ala	Ala	Ala
No. De codón	97	98	99	100	101	102	103

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 el codón de terminación TAA en el nucleótido 131: 1012_1013insA.

El paciente 92 presentó una sustitución en el nucleótido 469, C → T, en el codón 86, dando lugar al cambio del aminoácido Pro → Ser en el exón 1: P86S (Figura 17).

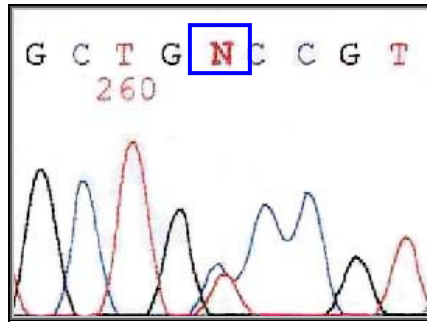


Figura 17. Exón 1. Sustitución de C → T en el nucleótido 469: P86S

Secuencia normal	GTC	GTG	CTG	C CC	GTA	TGG	CTC
Secuencia de aminoácidos	Val	Val	Leu	Pro	Val	Trp	Leu
No. de codón	83	84	85	86	87	88	89
Secuencia mutada	GTC	GTG	CTG	T CC	GTA	TGG	CTC
Secuencia de aminoácidos	Val	Val	Leu	Ser	Val	Trp	Leu
No. de codón	83	84	85	86	87	88	89

Para el exón 2 también se secuenciaron los 18 pacientes con el oligonucleótido sentido y se encontró un cambio en la secuencia codificante en el paciente 70.

El paciente 70 presentó una sustitución en el nucleótido 575, A → G, en el codón 121, dando lugar a un cambio en el aminoácido Asp → Gly en el exón 2: D121G (Figura 18).

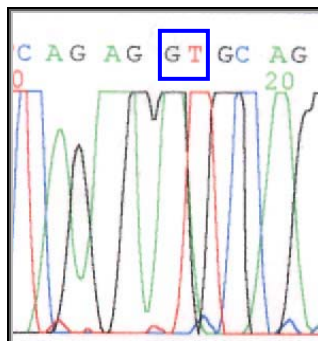


Figura 18. Exón 2. Sustitución de A → G en el nucleótido 575: D121G

Secuencia normal	CTC	TTC	AGA	GAT	GCA	GGG	ACA
Secuencia de aminoácidos	Leu	Phe	Arg	Asp	Ala	Gly	Thr
No. de codón	118	119	120	121	122	123	124
Secuencia mutada	CTC	TTC	AGA	GCT	GCA	GGG	ACA
Secuencia de aminoácidos	Leu	Phe	Arg	Gly	Ala	Gly	Thr
No. de codón	118	119	120	121	122	123	124

Para el exón 3 de los 18 pacientes secuenciados con el oligonucleótido sentido, se encontró un cambio en el paciente 71.

El paciente 71 presentó una sustitución en el nucleótido 694, C → T, en el codón 161, dando lugar al cambio del aminoácido Arg → Term en el exón 3: R161X (Figura 19).

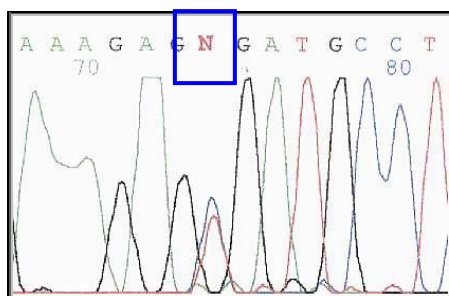


Figura 19. Exón 3. Sustitución de C → T en el nucleótido 694: R161X

Secuencia normal	CTG	AAA	GAG	CGA	TGC	CTC
Secuencia de aminoácidos	Leu	Lys	Glu	Arg	Cys	Leu
No. de codón	158	159	160	161	162	163
Secuencia mutada	CTG	AAA	GAG	TGA	TGC	CTC
Secuencia de aminoácidos	Leu	Lys	Glu	Stop	Cys	Leu
No. de codón	158	159	160	161	162	163

Los cambios en la secuencia codificante del gen *VHL* 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), D121G por Whaley y cols. (1994), R161X por Crossey y cols. (1994) y Maher y cols. (1996), P86S por CRGVHLJ (1995), el cambio 1012_1013insA no se encuentra reportado en la literatura y la nomenclatura de dio con base a Human Genome Mutation Database y en la secuencia del gen *VHL* AF010238.

De los pacientes en los cuales se encontró mutación se extendió el estudio a aquellos familiares de los cuales se contaba con muestra de DNA para analizar el gen *VHL* de la misma forma descrita. En la tabla 12 se muestra el número de familiares estudiados.

Tabla 12. Familiares de pacientes índices con mutación.

Mutación	Familiares estudiados	Mutados
1012_1013insA	7	4
	44	17
DelPhe76	13	4
Total	64	25

6.2. Mutaciones somáticas

Las muestras de tumores de pacientes *VHL* con mutación (6 pacientes) se realizó solo la secuenciación la región del exón donde se encontraba la mutación, ya que se ha reportado que la pérdida de heterocigocidad (LOH) se da generalmente por la homocigocidad de dicha mutación. En nuestro caso cada una de las mutaciones germinales descritas se observaron como heterocigotas en los tumores.

Además se incluyeron los dos pacientes con *VHL* sin mutación: 10 y 65, no se encontraron mutaciones somáticas en los exones 1 y 2, el exón 3 no fue posible amplificarlo; en los 3 pacientes con probable *VHL* tampoco se encontraron mutaciones somáticas.

De las tres muestras de tumores de pacientes con hemangioblastoma esporádico se encontró una mutación en el paciente 66. Éste paciente presentó una mutación en el sitio de splicing en el exón 2, la cual es una sustitución de G → A; y éste cambio ya ha sido descrita en la literatura en población japonesa por Yoshida y cols, (2000) (Figura 20).

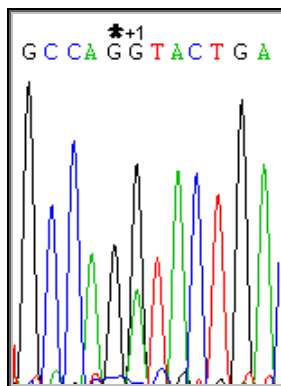


Figura 20. Exón 2. Sustitución de G → A en el nucleótido 676+1.
* indica el termino de la región codificante.

6.3. Estudio de la inactivación del gen *VHL* por metilación.

Se estudió en total el DNA de 17 tumores pertenecientes a 14 pacientes y 2 muestras de cerebelo normal, en las cuales todas resultaron negativas para metilación. En la figura 21 se muestra un gel de agarosa al 2.5% en donde puede observar tres de las muestras estudiadas, en las cuales el DNA de linfocitos de los pacientes y el de los cerebelos normales cuando son digeridos solo con Mse I son positivas para PCR y negativas cuando son digeridas con BstU I y las muestras de DNA de los tumores de los pacientes siguen el mismo patrón.

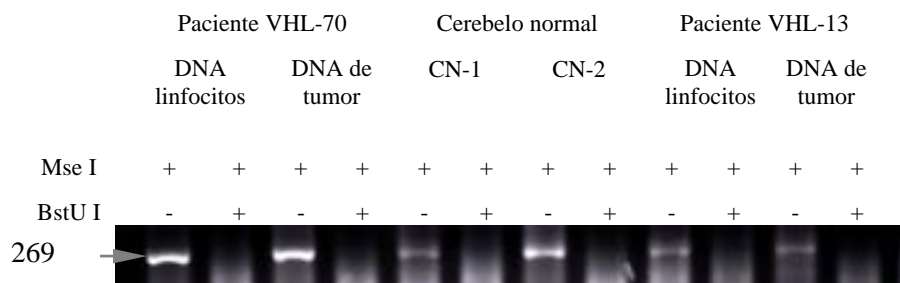


Figura 21. Análisis de las muestras de los pacientes con VHL por medio de MSRF.

6.4. Estudio de la expresión de la pVHL.

Por medio de inmunohistoquímica se estudió la expresión de la pVHL en muestras de cerebelo normal y en los tumores de los pacientes.

En las muestras de cerebelo normal la expresión de la proteína VHL fue detectada en el citoplasma, con una menor expresión en la capa molecular y granulosa en comparación con las células de purkinje (Figura 22) lo cual coincide con reportes previos.

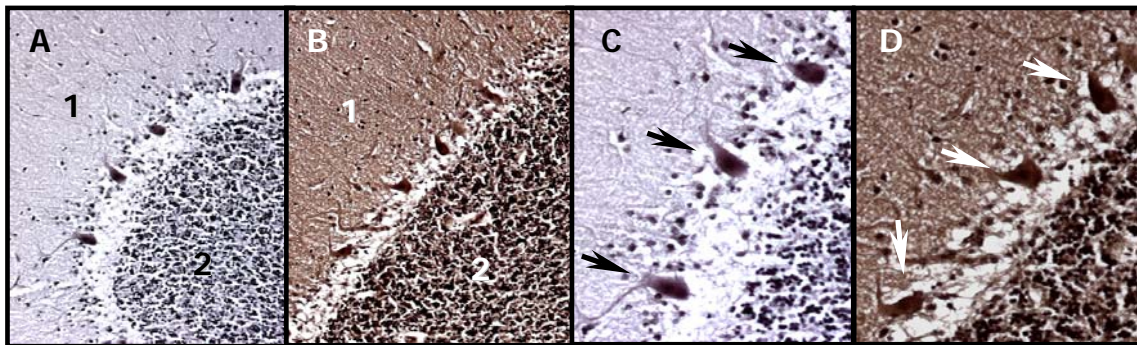


Figura 22. Expresión de la pVHL en cerebelo normal. A) Control negativo 10X, B) Expresión de la pVHL en la Capa Molecular (1) y en la Capa Granulosa (2), 10X; B) Control negativo 20X, C) Mayor expresión de la pVHL en las Células de Purkinje (flechas), 20X.

En la figura 23 se observa la expresión de la pVHL en hemangioblastomas de cerebelo de un paciente con diagnóstico molecular de VHL (A), paciente con diagnóstico clínico de VHL sin mutación (B), un probable VHL (C) y un caso esporádico (D). En los cuatro casos se observa una expresión muy similar de la pVHL. También se puede observar la histología clásica de un hemangioblastoma de cerebelo: red de capilares, vasos de mayor diámetro, trabéculas y principalmente células estromales. Las células estromales contienen un alto contenido lipídico, dando al citoplasma un aspecto claro, por lo que también se le conoce como citoplasma espumoso.

En la figura 24 se puede observar la expresión de la pVHL en el riñón: expresión positiva en el sistema de tubulos renales, corte longitudinal (A), corte transversal (B), en el glomérulo casi no se detectó expresión de la pVHL (C) y en la figura (D) se muestra la expresión de la pVHL

en un carcinoma de células renales (CCR), el cual se deriva del epitelio tubular renal. Las características histológicas del CCR son: células tumorales grandes y poligonales, y su citoplasma es claro debido a la acumulación de glucógeno y lípidos citoplasmáticos.

Las muestras de tumores de los pacientes estudiados presentaron inmunoreactividad positiva para la pVHL.

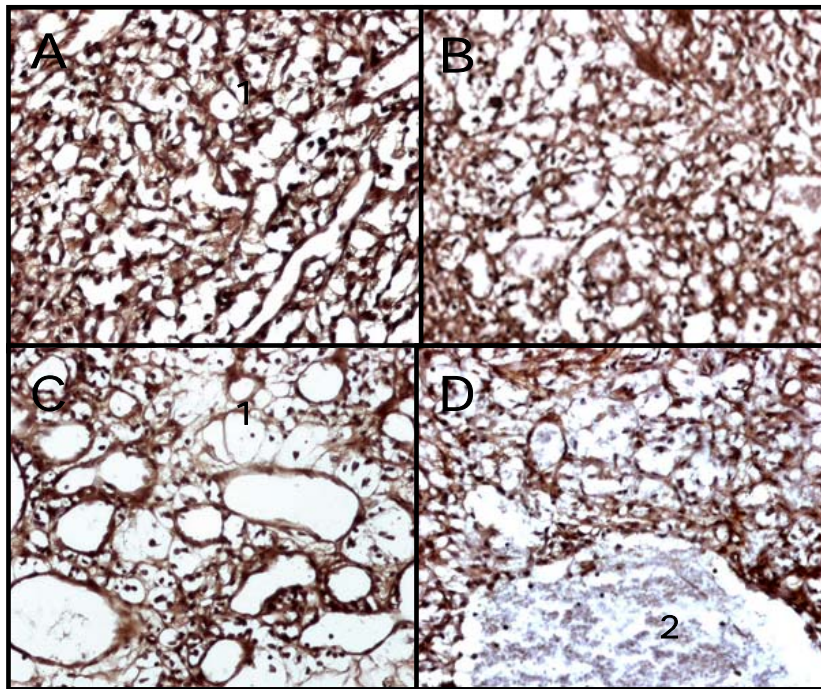


Figura 23. Expresión de la pVHL en hemangioblastomas de cerebelo: A) Paciente con diagnóstico molecular positivo para VHL, B) Paciente con diagnóstico clínico de VHL sin mutación, C) Paciente con probable VHL y D) Paciente con HB esporádico. 1) Células estromales, 2) Vasos sanguíneos. 20X

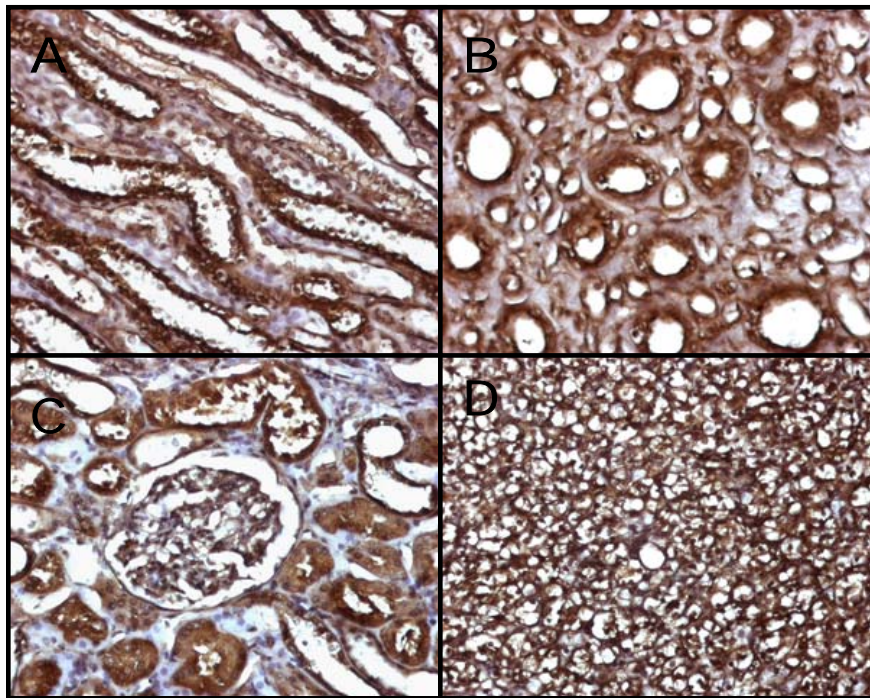


Figura 24. Expresión de pVHL: A) y B) Sistema de tubulos renales, C) Glomérulo y D) Carcinoma de células renales. 20X.

7. Análisis de resultados.

El objetivo del presente trabajo fue estudiar a nivel molecular el mecanismo por el cual el gen *VHL* se inactiva, lo cual da lugar a la enfermedad de von - Hippel Lindau en población mexicana. El estudio en pacientes mexicanos es de suma importancia, ya que en nuestro país no existían reportes previos sobre el diagnóstico molecular de la misma. Esto nos llevará a la implementación del diagnóstico molecular, identificación de portadores asintomáticos y por lo tanto el asesoramiento genético de las familias afectadas, ya que esta es una enfermedad que tiene un pronóstico muy malo y una calidad de vida precaria de los pacientes.

Para el presente estudio se analizaron 20 casos índice y tres personas sanas, con un rango de edad entre 29 y 71 años, de los cuales el 53 % son mujeres y el 47 % son hombres; en la tabla 13 se muestra un resumen de los resultados obtenidos en el presente estudio.

Tabla 13. Resumen de resultados

Diagnóstico	Paciente	Tipo de tumor	Mutación Germinal	Mutación Somática	Metilación*	Tipo VHL	
VHL	3	HB (3)	delPhe76	Het.	Neg.	1	
	4	HB (2)	delPhe76	Het.	Neg.		
	10 65	HB (2), QP HB (1)	s/m	s/m	Neg.		
	17	ARB, HB, QP, QR	1012_1013insA	Het.	Neg.		
	21	CCCR, HB, QP, QR		Het	Neg.		
	26	CCCR, HB		Het	Neg.		
	70	HB(6), ARB, CCR, QP, QR, QO, TU, Fc		D121X	Het.		Neg.
	71	HB	R161X	N.D.	N.D.		1
	92	HB (1), QR	P86S	N.D.	N.D.		
	Probable VHL	14	HB (1), QR (1)	s/m	s/m		Neg.
15		HB (1)	s/m	N.D.	N.D.		
58		HB (1)	s/m	N.D.	N.D.		
60		HB múltiple	N.D.	s/m	Neg.		
Esporádico	63	HB múltiple, HBM	s/m	N.D.	Neg.	---	
	13	HB (1)	s/m	s/m	Neg.		
	24	HB (1)	s/m	s/m	Neg.		

	66	HB (1)	s/m	676+1	Neg.	1
	72	HB (1)	s/m	N.D.	N.D.	---
	91	HB (1)	s/m	N.D.	N.D.	---
Sano	CN-1		N.D.	s/m	Neg.	
	CN-2	---	N.D.	s/m	Neg.	---
	67		s/m	N.D.	N.D.	

(): número de tumores
 ARB: angiomas de retina bilateral
 CCCR: carcinomas de células claras de riñón
 Fc: feocromocitoma
 HB: hemangioblastoma de cerebelo
 HBM: hemangioblastoma de médula
 QP: quistes pancreáticos
 QR: quistes en el riñón
 QO: quistes en el ovario
 TU: Tumoración uterina
 N.D.: No determinada
 Neg.: Negativa
 s/m: sin mutación
 *: Detectada por MSRF

El cambio encontrado en la región codificadora del Phe76 en el paciente 3, se encuentra reportado en la literatura en familias con VHL (Crossey y cols., 1994, Maher y cols., 1996; Chen 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 del Phe76 descritas en el estudio de Chen 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 ésta 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; esto apoya la teoría de que la enfermedad es de expresividad variable (Lamiell y cols, 1989; Glenn y cols, 1990, 1991), ya que cada familia, así como los miembros de la misma, pueden exhibir 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, por ejemplo se ha asociado que el polimorfismo A/G en el

nucleótido 870 de la ciclina D1 (CCND1), el alelo G puede incrementar el riesgo la susceptibilidad a desarrollar angiomas de retina bilaterales, pero no CCR

La inserción de una adenina en el nucleótido 512 localizado en el codón 100, encontrado en dos pacientes de 2 familias diferentes (pacientes 17 y 21), 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, sería 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), teniendo como consecuencia que el complejo VCB no se forme y que no haya interacción con las subsecuentes proteínas que participan en la función de la pVHL. Para confirmar esta aseveración se podría realizar un western blot para determinar el tamaño de la proteína mutada de estos pacientes o por medio de ensayos de inmunoprecipitación determinar si el complejo VCB se forma.

A pesar de que dos pacientes comparten el mismo cambio de 1012_1013insA, el cuadro clínico es diferente, mientras que un paciente padece angiomas de retina, el otro paciente no presenta éste tipo de lesión; y a diferencia del primero, tiene CCCR, lo anterior apoya la teoría de que la enfermedad VHL tiene expresividad variable (Lamiell y cols, 1989; Glenn y cols, 1990, 1991).

La mutación D121G presente en el paciente 70 se encuentra reportada en la literatura (Whaley y cols, 1994) y este aminoácido se encuentra dentro del dominio β . De acuerdo a las bases de datos “The Human Gene Mutation Database” y “von Hippel – Lindau germline mutation database of University of Birmingham”, es la única mutación que se ha descrito en este codón. El paciente con esta mutación ha presentado 6 hemangioblastomas de cerebelo, angiomas retinianos bilaterales, carcinoma de células renales, quistes pancreáticos, quistes renales, quistes en el ovario, tumoración uterina y feocromocitoma, por lo que corresponde a un VHL

tipo 2B. De acuerdo a este tipo de VHL las mutaciones que se han asociado son mutaciones de sentido erróneo, lo cual concuerda con la mutación encontrada, ya que la mutación D121G es de éste tipo. Cuando se reportó esta mutación no se describió el fenotipo encontrado en el paciente, por lo que no es posible compararlo.

La mutación R161X, encontrada en el paciente 71 también ya ha sido reportada en la literatura (Crossey y cols, 1994; Maher y cols, 1996) y se ha descrito que el aminoácido Arg¹⁶¹ junto con el aminoácido Gln¹⁶⁴ juegan un papel muy importante en la estabilidad de la interfase del interdominio α - β (Stebbins y cols, 1999), por lo que esta mutación comprometería la estabilidad de la pVHL. En las bases de datos “The Human Gene Mutation Database” y “von Hippel – Lindau germline mutation database of University of Birmingham”, en el codón 161 se han encontrado las sustituciones: CGA-CAA, gCGA-GGA, CGA-CCA. Éste paciente de acuerdo al fenotipo que presenta corresponde a un VHL tipo 1, lo cual concuerda con el tipo de mutación encontrada, ya que el cambio R161X es una mutación sin sentido que genera una proteína trunca.

La mutación P86S también se encuentra reportado en la literatura (CRGVHLJ, 1995) y se encuentra en el dominio β . En las bases de datos “The Human Gene Mutation Database” se han reportado en el codón 86 las sustituciones: gCCC-GCC, CCC-CGC, CCC-CTC. El paciente en el que se encontró anteriormente esta mutación (CRGVHLJ, 1995) presenta angiomas de retina, hemangioblastoma de cerebelo, carcinoma de células renales y no presenta feocromocitoma, lo cual al hacer la correlación genotipo – fenotipo no concuerda por tratarse de una mutación de sentido erróneo. En este reporte, en familias japonesas no encontraron una relación significativa entre las mutaciones de sentido erróneo y el VHL tipo 2 a diferencia de otros reportes (Crossey y cols, 1994; Chen y cols, 1995), sin embargo, éste tipo de mutaciones se les asoció a un alto riesgo de presentar carcinoma de células renales. En el caso del paciente 92 el cual presenta hemangioblastoma de cerebelo y quistes renales y al igual que al paciente reportado anteriormente no presenta feocromocitoma a pesar de portar una mutación de sentido erróneo, lo cual sugiere que no existe una estricta asociación entre las mutaciones en sentido erróneo y el tipo de tumores. Este punto requiere un mayor estudio para poder establecer las relaciones entre fenotipo y genotipo.

Las mutaciones mencionados anteriormente, que se encontraron en los pacientes 3, 17, 21 y 71, las cuales se clasificaron como microdelección, inserción y mutación sin sentido; se han asociado a familias sin feocromocitoma, llamadas VHL Tipo 1 (Zbar y cols, 1996; Chen y cols, 1995), lo cual concuerda con el fenotipo observado, ya que ninguno de los pacientes ha presentado este tipo de lesión. A excepción del paciente 92 con la mutación P86S, en el cual se clasifica como VHL tipo 1, a pesar de tener una mutación de sentido erróneo, ya que no presentó feocromocitoma. En cambio el paciente 70 que es un VHL tipo 2B, con feocromocitoma y con carcinoma de células renales, presentó la mutación de sentido erróneo D121G, lo cual concuerda con lo reportado previamente para la correlación fenotipo-genotipo.

De las 5 distintas mutaciones encontradas, 3 fueron del exón 1, 1 en el exón 2, y 1 en el exón 3, lo cual coincide con la literatura donde se ha descrito que en el exón 1 presenta una mayor frecuencia de mutaciones (Ma y cols, 2001; Kondo y cols, 2002).

Las mutaciones en células germinales en el gen *VHL* se han detectado en un 39-90%, dependiendo de la estrategia utilizada para la identificación de dichas mutaciones en familias con VHL de Europa, Estados Unidos y Asia (Whaley y cols, 1994; Chen y cols, 1995; Crossey y cols., 1994, Maher y cols., 1996; Zbar y cols., 1996). De los 10 pacientes analizados, pertenecientes a las 9 familias que cubrían los criterios clínicos de diagnóstico para la enfermedad de von Hippel – Lindau de Melmon y Rosen (1964), 8 presentaron mutaciones, lo cual corresponde al 89% (8 familias de 9), por lo que el porcentaje de mutaciones en células germinales estimado en nuestros pacientes se encuentra dentro del rango de lo reportado para otras poblaciones (39-90%).

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 y cols., 1998) y en un 3-9% (Richard y cols, 1993; Yao y cols, 1993; Stolle 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 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 descartan posibles mutaciones en las uniones intrón - exón (Zbar y cols, 1996; Crossey y cols., 1994), ya que las secuencias obtenidas abarcan de 5 a 10 pb hacia el extremo 5' y 3' de la región codificante y no se observaron cambios.

Los pacientes con diagnóstico de hemangioblastoma esporádico de cerebelo y aquellos 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*.

De los familiares en riesgo se encontró que el 39% de los familiares estudiados son portadores de una de las mutaciones, y en los árboles genealógicos de estas familias se observa que ambas mutaciones segregan con un patrón autosómico dominante. Para los familiares en los que se encontró ser portadores de una de estas mutaciones sería necesario empezar protocolos de escrutinio y vigilancia para una detección oportuna de las lesiones y brindarles una mejor calidad de vida.

De los pacientes con VHL que presentaron mutación en el gen *VHL* y que se contaba con muestra de tumor, se secuencio solo la región donde se encontraba la mutación germinal, ya que se ha descrito que cuando se da la LOH en el tejido, se presenta la homocigosidad de la mutación y ésta se ha encontrado de un 52 a un 62% (Prowse y cols, 1997; Clifford y cols., 1998; Gläsker y cols, 2001). En las muestras de los tumores analizados en nuestro trabajo, las mutaciones se encontraron heterocigotas, pero para determinar si hubo una LOH sería necesario secuenciar el resto del gen *VHL* o hacer un análisis con marcadores genéticos.

La mutación somática que presentó el paciente 66 en el sitio de splicing en el exón 2: 676+1 ya se encuentra reportada en la literatura por Yoshida y cols. (2000), la proteína pVHL con ésta mutación carece del exón 2 y por lo tanto de los aminoácidos 114 a 155 del dominio β , comprometiendo la unión del complejo ligasa E3 de ubiquitina con el HIF α , llevándolo a su desregulación y por lo tanto su sobreexpresión. Este paciente se considera como un caso esporádico de VHL tipo 1, debido a la presencia de un solo hemangioblastoma; mientras que en la población japonesa ésta mutación se reportó en dos familias con un cuadro completo de VHL, ya que el 55.6 % presentaba hemangioblastoma del sistema nervioso central, el 11% angiomas de retina, 22.2% quistes pancreáticos o tumor y todos presentaban carcinoma de células renales. De acuerdo con las bases de datos de mutaciones, se encontró que en el nucleótido 676+1 se ha reportado otra sustitución: G \rightarrow C (Glavac y cols., 1996).

De lo anterior podemos decir que de los casos esporádicos estudiados, se encontraron mutaciones somáticas en un 33% (1/3). Este porcentaje es mayor con respecto al reportado (23%, Gläsker y cols, 2001). Esto puede ser debido al tamaño de la muestra, por lo que sería necesario aumentarla para dar un resultado más certero de la población. En el caso de los pacientes con probable VHL no se detectaron mutaciones en ninguno de los pacientes.

De los 17 tumores pertenecientes a 14 pacientes y las 2 muestras de cerebelo normal estudiadas por MSRF para determinar si el promotor del gen *VHL* se encontraba metilado, el resultado fue negativo en todos los casos. La inactivación del gen *VHL* por hipermetilación de su región promotora se ha encontrado de un 13 a 33%, la mayoría de estos estudios se han hecho en carcinoma de células renales (Dulaimi y cols, 2004; Battagli y cols, 2003; Kuroki y cols, 2003; Cairns, 2004). Los carcinomas de células renales de nuestros pacientes no se encontraron hipermetilados en la región estudiada del gen *VHL* por lo que su inactivación se debe principalmente a las mutaciones 1012_1013insA y D121G que presentan dichos pacientes. La hipermetilación del gen *VHL* en tumores del sistema nervioso ha sido muy poco explorada, con un solo estudio reportado en hemangioblastomas de cerebelo (Gläsker y cols., 2001), en el cual, al igual que en nuestros pacientes estudiados, el gen *VHL* no se encuentra inactivado por este mecanismo epigenético.

El patrón de expresión de la pVHL y las características histológicas de los hemangioblastomas de cerebelo y de los carcinomas de células renales reportados en la literatura (Los y cols., 1996; Vortmeyer y cols., 1997; Corless y cols, 1997), fueron confirmados por medio de inmunohistoquímica.

En reportes anteriores en los cuales no se observaba expresión de la pVHL en los tumores, se asoció con la hipermetilación de la región del promotor en el gen *VHL* (Herman y cols, 1994; Vortmeyer y cols., 1997; Herman y cols., 1996), y debido a que en las muestras estudiadas de tumores de nuestros pacientes, todos presentaron expresión positiva para la pVHL y con base a los resultados de MSRF, podemos concluir que la hipermetilación de la región del promotor no es un mecanismo de inactivación del gen *VHL* en nuestra población de estudio.

De lo anterior podemos decir que el mecanismo principal responsable de la enfermedad de von Hippel – Lindau en nuestra población de estudio son las mutaciones germinales.

La importancia de este trabajo, es que es el primero en el que se hace un análisis molecular del gen *VHL* en pacientes mexicanos, el cual tuvo como objetivo determinar las mutaciones que producen la enfermedad de VHL en estos, con el fin de establecer un método de diagnóstico molecular.

Con estos resultados se determinan con mayor precisión la distribución y frecuencia de las mutaciones características de nuestra población, sin embargo es necesario aumentar el tamaño de muestra y extender el estudio a los familiares de los casos índice estudiados para ofrecer un estudio predictivo de la enfermedad VHL y de esta manera minimizar en el paciente, como en el familiar el riesgo de complicaciones posteriores.

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.

8. Conclusiones

8. Conclusiones

En los pacientes índice con VHL incluidos en este estudio la enfermedad de von Hippel - Lindau se debe principalmente a mutaciones germinales en el gen *VHL* y la enfermedad segrega con un patrón autosómico dominante.

En la población de estudio el 33% de los casos esporádicos de hemangioblastoma, se debe a mutaciones somáticas en el gen *VHL* y las mutaciones encontradas no afectan la expresión de la pVHL lo que sugiere que el origen de la transformación celular tiene un origen complejo.

El análisis de metilación indica que el gen no se encuentra metilado en las regiones estudiadas. Por lo que probablemente el silenciamiento del gen *VHL* por este mecanismo no está involucrado en el desarrollo de la enfermedad en la población estudiada.

Las principales contribuciones del presente trabajo son: la detección de una mutación nueva asociada a la enfermedad von Hippel-Lindau tipo 1: 1012_1013insA, la disponibilidad de un diagnóstico molecular en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía y que este estudio puede servir de base para dar consejo genético a los familiares en riesgo

9. Bibliografía

9. Bibliografía

- Bai, C.; Sen, P.; Hofmann, K.; Ma, L.; Goebel, M.; Harper, J.W.; Elledge, S. (1996). SKP1 connects cell cycle regulators to the ubiquitin proteolysis machinery through a novel motif, the F-Box. *Cell*. 86: 263-274.
- Bar, M.; Friedman, E.; Jakobovitz, O.; Leibowitz, G.; Lerer, I.; Albeliovich, D.; Gross, D.J. (1997). Sporadic pheochromocytomas are rarely associated with germline mutations in the Von Hippel-Lindau and RET genes. *Clin. Endocrinol. (Oxf)* 47: 707-712.
- Battagli, C.; Uzzo, R.; Dulaimi, E.; Ibanez, I.; Krassenstein, R.; Al-Saleem, T.; Greenberg, R.; Cairns, P. (2003). Promotor hypermethylation of tumor suppressor genes in urine from kidney cancer patients. *Can. Res.* 63: 8695-8699.
- Bestor, TH.; Jaenisch, R. (2000). The DNA methyltransferases of mammals. *Hum. Mol. Genet.* 9: 2345-23402.
- Brauch, H.; Hoepfner, W.; Jähnig, H.H.; Wöhl, T.; Engelhardt, D.; Spelsberg, F.; Ritter, M.M. (1997). 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.
- Brauch, H.; Kishida, T.; Glavas, D.; Chen, F.; Pausch, F.; Hofler, H.; Lerman, MI.; Zbar, B.; Neumann, HPH. (1995). von Hippel – Lindau disease with pheochromocytoma in the Black Forest region in Germany: Evidence for a founder effect. *Hum. Genet.* 95: 551-556.
- Cairns, P. (2004). Detection of promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in urine from kidney cancer patients. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1022: 40-43.
- Chen, F.; Kishida, T.; Yao, M.; Hustad, T.; Glavac, D.; Dean, M. (1995). Germ-line mutations in the Von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene: correlations with phenotype. *Hum Mutat.* 5: 66-75.
- Choyke, PL.; Glenn, GM.; Lubensky, IA.; Lubensky, IA.; Thakore, K.; Zbar, B. (1997). Epididymal cystadenomas in Von Hippel-Lindau disease. *Urology.* 49: 926-931.
- Clifford, S.; Prowse, A.; Affara, N.; Buys, C.; Maher, E. (1998). Inactivation of the von Hippel-Lindau (VHL) Tumour Suppressor Gene and allelic losses at chromosome arm 3p in primary renal cell carcinoma: Evidence for a VHL-independent pathway in Clear Cell Renal Tumourigenesis. *Gene, Chromosomes cancer* 22: 200-209.
- CRGVHL (Clinical Research Group for VHL in Japan). (1995). Germline mutations in the von Hippel – Lindau disease (VHL) gene in Japanese VHL. *Hum. Mol. Genet.* 4: 2233 – 2237.
- Corless, C.; Kibel, A.; Iliopoulos, O.; Kaelin, W. Jr. (1997). Immunostaining of the von Hippel-Lindau gene product in normal and neoplastic human tissues. *Hum. Pathol.* 28: 459-464.
- Crossey, P.A.; Eng, C.; Ginalska-Mallinowska, M.; Lennard, T.; Wheeler, D.; Ponder, B.; Maher, E. (1995). Molecular genetic diagnosis of von Hippel-Lindau disease in familial pheochromocytoma. *J. Med. Genet.* 32: 885-886.

Crossey, P.A.; Richards, F.M.; Foster, K.; Green, J.; Prowse, A.; Latif, F.; Lerman, M.; Zbar, B.; Affara, N.; Fergusoj-Smith, M.A.; Maher, E. (1994). Identification of intragenic mutations in the von Hippel – Lindau disease tumour suppressor gene and correlation with disease phenotype. *Hum. Mol. Genet.* 3: 1303 – 1308.

De Paulsen, N.; Brychzy, A.; Fournier, M.; Klausner, R.; Gnarr, J.; Pause, A.; Lee, A. (2001). 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.

Doerfler, W. (1983). DNA methylation and gene activity. *Annu. Rev. Biochem.* 52: 93-124.

Duan, DR.; Pause, A.; Birgress, W.; Aso, T.; Chen, DYT.; Garrett, KP; Conaway, RC.; Conaway, JW.; Linehan, WM; Klauster, RD. (1995). Inhibition of transcriptional elongation by the VHL tumor suppressor protein. *Science.* 269. 269: 1402-1406.

Dulaimi, E.; Ibanez, I.; Uzzo, R.; Al-Saleem, T.; Greenberg, R.; Polascik, T.; Babb, J.; Grizzle, W.; Cairns, P. (2004). Promotor Hypermethylation profile of kidney cancer. *Clin. Can. Res.* 10: 3972-3979.

Ema, M.; Hirota, K.; Mimura, J.; Abe, H.; Yodoi, J.; Sogaza, K.; Poellinger, L.; Fujii-Kuriyama, Y. (1999). Molecular mechanisms of transcription activation by HLF and HIF1alpha in response to hypoxia: Their stabilization and redox signalinduced interaction with CBP/p300. *EMBO J.* 18:1905–1914.

Esteller, M. (2000). Promoter hypermethylation and *BRCA1* inactivation in sporadic breast and ovarian tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* 92: 564-569.

Fabbro, M.; Henderson, B. (2003). Regulation of tumor suppressors by nuclear – cytoplasmic shuttling. *Exp. Cell Res.* 282: 59-69.

Friedrich, C.A. (1999). von Hippel – Lindau syndrome. A pleomorphic condition. *Cancer Supp.* 86:1658-1662.

Girelli, R.; Bassi, C.; Falcono, M.; De Santis, L.; Bonora, A.; Caldiron, E. (1977). Pancreatic cystic manifestations in Von Hippel-Lindau disease. *Int J Pancreatol.* 22: 101-109.

Gläsker, S.; Bender, BU.; Apel, T.W. Velthoven, V.; mulligan, LM.; Zenther, Neumann, H.P. (2001). Reconsideration of biallelic inactivation of the VHL tumour suppressor gene in hemangioblastomas of the central nervous system. *J. Neurol. Psychiatry* 70: 644-648.

Glavac D.; Neumann HP.; Wittke C.; Jaenig H.; Masek O.; Streicher T.; Pausch F.; Engelhardt D.; Plate KH.; et. al. (1996). Mutations in the VHL tumor suppressor gene and associated lesions in families with von Hippel-Lindau disease from central Europe. *Hum. Genet.* 98(3): 271-280.

Glenn, G. M.; Choyke, P.; Zbar, B.; Linehan, W. M. (1990). Von Hippel – Lindau disease: Clinical review and molecular genetics. *Probl. Urol.* 4: 312-330.

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. (1991). von Hippel-Lindau (VHL) disease: distinct phenotypes suggest more than one mutant allele at the VHL locus. *Hum. Genet.* 87: 207-210.

Gnarra, J.R.; Tory, K.; Schmidt, L.; Wei, M.H.; Li, H.; Latif, F. (1994). Mutation of the VHL tumour suppressor gene in renal carcinoma. *Nat. Genet.* 7: 85-90.

Gross, D.; Avishai, N.; Meiner, V.; Filon, D.; Zbar, B.; Abeliovich, D. (1996). Familial pheochromocytoma associated with a novel mutation in the von Hippel – Lindau gene. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81: 147-149.

Hansen, W.J.; Ohh, M.; Moslehi, J.; Kondo, Ke.; Kaelin, E.G.; Welch, W.J. (2002). 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 – dependent ubiquitin ligase activity. *Mol. Cell. Biol.* 22: 1947-1960.

Herman, J.; Latif, F.; Weng, Y.; Lerman, M.; Zbar, B.; Liu, S.; Samid, D.; Duan, D.; Gnarra, J.; Linehan, Baylin, S. (1994). Silencing of the VHL tumor suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 9700-9704.

Herman, J.G.; Graff, J.R.; Myohanen, S.; Nelkin, B.; Saylin, S. (1996). Methylation – specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 9821-9826.

Hogenesch, J.B.; Chan, W.K.; Jackiw, V.H.; Brown, R.C.; Gu, Y.Z.; Pray-Grant, M.; Perdew, G.H.; Bradfield, C.A. (1997). Characterization of a subset of the basic-helix-loop-helix-PAS superfamily that interacts with components of the dioxin signalling pathway. *J Biol Chem* 272:8581–8593.

Hon WC, Wilson MI, Harlos K, Claridge TD, Schofield CJ, Pugh CW, Maxwell PH, Ratcliffe PJ, Stuart DI, Jones EY. (2002). Structural basis for the recognition of hydroxyproline in HIF-1 alpha by pVHL. *Nature* 417: 975 - 978.

Huang, E.; Pete, E.; Schau, M.; Milligan, J.; Gu, J. (2002). Leu574 of HIF-1 α for the VHL-mediated Degradation Pathway. *J Biol Chem.* 277: 41750-41755.

Huang, L.E.; Gu J.; Schau M.; Bunn HF.(1998). Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:7987–7992.

Huson, S.M.; Harper, P.S.; Hourihan, M.D.; Cole, G.; Weeks, R.D.; Compston, D.A.S. (1986). Cerebellar haemangioblastoma and Von Hippel-Lindau disease. *Brain.* 109: 1297-1310.

Iliopoulos, O.; Kibel, A.; Gray, S.; kaelin Jr., W. (1995). Tumour suppression by the human von Hippel – Lindau gene product. *Nat. Med.* 1: 822-826.

Iliopoulos, O.; Levy, A. P.; Jiang, C.; Kaelin, W. G., Jr.; Goldberg, M. A. (1996). Negative regulation of hypoxia-inducible genes by the von Hippel-Lindau protein. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 93: 10595-10599.

Iliopoulos, O.; Ohh, M.; Kaelin, W. G., Jr. (1998). pVHL(19) is a biologically active product of the von Hippel-Lindau gene arising from internal translation initiation. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 95: 11661-11666.

Ivan, M.; Kondo, K.; Yang, H.; Kim, W.; Valiando, J.; Ohh, M.; Salic, A.; Asara, J. M.; Lane, W. S.; Kaelin, W. G., Jr. (2001). HIF-alpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science* 292: 464-468.

Iwai, K.; Yamanaka, K.; Kamura, T.; Minato, N.; Conaway, R.; Conaway, J.; Klausner, R.; Pause, A. (1999). 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.

Jaakkola P, Mole D, Tian Y, Wilson M, Gielbert J, Gaskell, S.J.: Kriegsheim, A.; Hebestreit, H.F.; Mukherji, M.; Schofield, C.J.; et al et al. (2001). Targeting of HIF-alpha to the von Hippel- Lindau ubiquitylation complex by O2-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 292:468–72.

Jones, P.A.; Baylin, S.B. (2002). The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nature Rev. Genet.* 3: 415-428.

Kaelin, Jr. W.G. (2002). Molecular basis of the VHL hereditary cancer syndrome. *Nat. Rev. Cancer.* 2: 673-682.

Kaelin, Jr. W.G. (2005). Proline Hydroxylation and Gene Expression. *Annu. Rev. Biochem.* 74: 115-128.

Kibel, A; Illiopoulos, O.; DeCaprio JD.; Kaelin, WG. (1995). Binding of the von Hippel – Lindau tumor suppressor protein to elongin B and C. *Science*. 269: 1444-1446.

Kishida, T.; Staekhouse, TM; Chen, F.; Lerman, MI; Zbar, B. (1995). 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.

Klein, B.; Weirich, G.; Brauch, H. (2001). DHPLC – based germline mutation screening in the analysis of the VHL tumor suppressor gene: usefulness and limitations. *Hum. Genet.* 108: 376-384.

Knudson, A.G. (1971). Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*. 68: 820-823.

Knudson, A.G. (1993). Antioncogenes and human cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 10914-10921.

Kondo, K.; Kaelin, W.G. Jr. (2001). The von Hippel – Lindau tumor suppressor gene. *Exp. Cell. Res.* 264: 117-125.

Kondo, K.; Yao, M.; Yoshida, M.; Kishida, T.; Shuin, T.; Miura, T.; Moriyama, M.; Kobayashi, K. (2002). Comprehensive Mutational Análisis of tne VHL Gene in Sporadic Renal Cell Carcinoa: Relationship to Clinicopathological Parameters. *Genes chromosomes cancer.* 34: 58-68.

Kuroki, T.; Trapasso, F.; Yendamuri, S.; Matsuyama, A.; Alder, H.; Mori, M.; Croce, C. (2003). Allele Loss and Promoter Hypermethylation of *VHL*, *RAR-β*, *RASSF1A*, and *FHIT* Tumor Supresor Genes on chromosome 3p in esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Res.* 63: 3724-3728.

Lamiell, J.M.; Salazar, F.G.; Hsia, Y.E. (1989). von Hippel-Lindau disease affecting 43 members of a single kindred. *Medicine* (Baltimore). 68: 1-29.

Lando D.; Peet DJ.; Whelan DA.; Gorman JJ.; Whitelaw ML. (2002). Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch. *Science* 295: 858–861.

-
- Latif, F.; Tory, K.; Gnarr, J.; Yao, M.; Duh, F.M.; Orcutt, M.L.; Stackhouse, T.; Kuzmin, I.; et al. (1993). Identification of the von Hippel – Lindau disease tumor suppressor gene. *Science*. 260:1317-1320.
- Linehan, W.M.; Lerman, M.I.; Zbar, B. (1995). Identification of the von Hippel – Lindau (VHL) gene. Its role in renal cancer. *JAMA*. 273: 564-570.
- Lisztwan, J. Imbert, G.; Wirbelauer, C.; Gstaiger, M.; Krek, W. (1999). The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein is a component of an E3 ubiquitin-protein ligase activity. *Genes Dev*. 13: 1822-1833.
- Lonergan, K.M.; Illiopoulos, O.; Ohh, M.; Kamura, T.; Conaway, R.; Conaway, J.W.; Kaelin, W. (1998). 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.
- Los, M.; Jansen, G.H.; Kaelin, W.G.; Lips, C.J.; Blijham, GH.; Voest, E.E. (1996). Expression pattern of the von Hippel-Lindau protein in human tissues. *Lab. Invest*. 75:231–238.
- Ma, X.; Yang, K.; Lindblad, P.; Egevad, L.; Hemminki, K. (2001). VHL gene alterations in renal cell carcinoma patients: novel hotspot or founder mutations and linkage disequilibrium. *Oncogene*. 20: 5393-5400.
- Maddock, I. R.; Moran, A.; Maher, E. R.; Teare, M. D.; Norman, A.; Payne, S. J.; Whitehouse, R.; Dodd, C.; Lavin, M.; Hartley, N.; Super, M.; Evans, D. G. R. (1996). A genetic register for von Hippel-Lindau disease. *J. Med. Genet*. 33: 120-127.
- Maher, E. R.; Iselius, L.; Yates, J. R. W.; Littler, M.; Benjamin, C.; Harris, R.; Sampson, J.; Williams, A.; Ferguson-Smith, M. A.; Morton, N. (1991). Von Hippel-Lindau disease: a genetic study. *J. Med. Genet*. 28: 443-447.
- Maher, E. R.; Yates, J. R. W.; Ferguson-Smith, M. A. (1990). Statistical analysis of the two stage mutation model in von Hippel-Lindau disease, and in sporadic cerebellar haemangioblastoma and renal cell carcinoma. *J. Med. Genet*. 27: 311-314.
- Maher, E.R.; Webster, A.R.; Richards, F.M.; Green, J.S.; Crossey, P.A.; Payne, S.J.; Moore, A.T. (1996). Phenotypic expression in von Hippel – Lindau disease: correlation with germline VHL gene mutations. *J. Med. Genet*. 33: 328-332.
- Maher, E.R.; Webster, AR.; Moore, A. (1990). Clinical features and natural history of von Hippel-Lindau disease. *Q. J. Med*. 77: 1151-1163.
- Manski, TJ; Heffner, DK; Glenn, GM; Patronas, NJ; Pikus, AT; Katz, D. Lebovics, R.; Sledjeski, K.; Choyke, PL.; Zbar, B.; Linehan, W.M.; Oldfield, E.H. (1997). Endolymphatic sac tumors. A source of morbid hearing loss in von Hippel-Lindau disease. *JAMA*. 277: 1461-1466.
- Masson, N.; Willam, C.; Maxwell, P.H.; Pugh, C.W.; Ratcliffe, PJ. (2001). Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor-alpha chains activated by prolyl hydroxylation. *EMBO J*. 20:5197–5206.

Maxwell, P.; Wiesener, M.; Chang, G.; Clifford, S.; Vaux, E.; Cockman, M.; Wykoff, C.; Pugh, C.; Maher, E.; Ratcliffe, P. (1999). The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia – inducible factors for oxygen – dependent proteolysis. *Nature*. 399: 271-275.

Melmon, K. L.; Rosen, S. W. (1964). Lindau's disease: review of the literature and study of a large kindred. *Am. J. Med.* 36: 595-617.

Min JH.; Yang H.; Ivan M.; Gertler F.; Kaelin WG Jr.; Pavletich NP. (2002). Structure of an HIF-1 α -pVHL complex: hydroxyproline recognition in signaling. *Science* 296: 1886–1889.

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

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

Neumann, H. P. H.; Wiestler, O. D. (1991). Clustering of features of von Hippel-Lindau syndrome: evidence for a complex genetic locus. *Lancet* 337: 1052-1054.

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

Pause, A. Peterson, B.; Schaffar, G.; Stearman, R.; Klausner, R. (1999). 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.

Pause, A.; Lee, S.; Lonergan, K. M.; Klausner, R. D. (1998). The von Hippel-Lindau tumor suppressor gene is required for cell cycle exit upon serum withdrawal. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 95: 993-998.

Persad, RA.; Probert, JL.; Sharma, SD.; Haq, A.; Doyle, PT. (1997). 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.

Poston, CD.; Jaffe, GS.; Solomon, D.; Zbar, B.; Linehan, WM.; Walther, MM. (1995). 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.

Prowse, A. H.; Webster, A. R.; Richards, F. M.; Richard, S.; Olschwang, S.; Resche, F.; Affara, N. A.; Maher, E. R. (1997). Somatic inactivation of the VHL gene in Von Hippel-Lindau disease tumors. *Am. J. Hum. Genet.* 60: 765-771.

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

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. (1993). Mapping the von Hippel – Lindau disease tumour suppressor gene: Identification of germline deletions by pulsed field gel electrophoresis. *Hum. Mol. Genet.* 2: 879-882.

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

Salceda S.; Caro J. (1997). 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.

Sambrook, J.; Maniatis, T.; Fritsch, E.F. (1989). *Molecular Cloning a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2da. Edición. Volumen 1, 2 y 3.

Sato, K.; Terada, K.; Sugiyama, T.; Takahashi, S.; Saito, M.; Moriyama, M.; Kakinun, H.; Sukuki, Y.; Kato, M.; Kato, T. (1994). Frequent overexpression of vascular endothelial growth factor gene in human renal cell carcinoma. *J. Exp. Med.* 173: 355-360.

Schiff, D.; Wen, P.Y. (1995). Tumores cerebrales raros. *Clínicas Neurológicas de Norteamérica.* 4: 975-998.

Schoenfeld, A.; Davidowitz, E.; Burk, R. (1998). 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.

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. (1991). Genetic flanking markers refine diagnostic criteria and provide insights into the genetics of Von Hippel Lindau disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 2864-2868.

Seizinger, B.R.; Rouleau, G.A.; Ozelius, L.J.; Lane, A.H.; Farmer, G.E.; Lamiell, J.M., Haines, J.; Yuen, J.W.; Collins, D.; Majoor-Krakauer, D. et al. (1988). von Hippel – Lindau disease maps to the region of chromosome 3 associated with renal cell carcinoma. *Nature.* 332: 268-269.

Siemeister, G.; Weindel, K.; Mohrs, K.; Barleon, B.; Martiny-Baron, G.; Marme, D. (1996). 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.

Spetzger, U.; Bertalanffy, H.; Huffmann, B.; Mayfrank, L.; Reul, J.; Gilsbach, JM. (1996). Hemangioblastomas of the spinal cord and the brainstem: diagnostic and therapeutic features. *Neurosurg Rev.* 19: 147-151.

Stebbins, C.; Kaelin Jr., W.; Pavletich, N. (1999). Structure of the VHL – elongin C – elongin B complex: Implications for VHL Tumor Suppressor function. *Science.* 284: 455-461.

Stolle, C.; Glenn, G.; Zbar, B.; Humphrey, J. S.; Choyke, P.; Walther, M.; Pack, S.; Hurley, K.; Audrey, C.; Klausner, R.; Linehan, W. M. (1998). Improved detection of germline mutations in the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. *Hum. Mutat.* 12: 417-423.

Takagi, Y.; Pause, A.; Conaway, R.C.; Conaway, J.W. (1997). Identification of elongin C sequences required for interaction with the von Hippel-Lindau Tumor suppressor protein. *J. Biol. Chem.* 272: 27444-27449.

Ushijima, T. (2005). Detection and interpretation of altered methylation patterns in cancer cell. *Nature Rev.* 5: 223-231

VHL Family Alliance. (2001). La enfermedad de von Hippel – Lindau. Una grave enfermedad presente en las distintas especialidades médicas. Colegio médico de Chile. Santiago de Chile. Editorial IKU.

Vortmeyer, A.O.; Gnarr, J.R.; Emmert-Buck, M.R.; Katz, D.; Linehan, W.M.; Oldfield, E.H.; Zhuang, Z. (1997). Von Hippel – Lindau Gene Deletion Detected in the Stromal Cell component of a Cerebellar hemangioblastoma Associated with von Hippel – Lindau Disease. *Hum. Pathol.* 28: 540-543.

Werness, B.A.; Guccion, J.G. (1997). Tumor of broad ligament in Von Hippel-Lindau disease of probable müllerian origin. *Int. J. Gynecol. Pathol.* 16: 282-285.

Whaley, J.M.; Naglich, J.; Gelbert, L.; Hsia, Y.E.; Lamiell, J.M.; Green, J.S.; Collins, J.S. (1994). 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.

Wiener, C.M.; Booth, G.; Semenza, G.L. (1996). In vivo expression of mRNAs encoding hypoxia-inducible factor 1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 225:485–488.

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

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

Ye, Y.; Vasavada, S.; Kuzmin, I.; Stackhouse, T.; Zbar, B.; Williams, B. (1998). Subcellular localization of the von Hippel-Lindau disease gene product is cell cycle-dependent. *Int. J. Cancer* 78: 62-69.

Yoshida, M.; Ashida, S.; Kondo, K.; Kobayashi, K.; Kanno, H.; Shinohara, N.; Shitara, N.; Kishida, T.; Kawakami, S.; Baba, M.; Yamamoto, I.; Hosaka, M.; et al. (2000). Germ-line Mutation Analysis in Patients with von Hippel-Lindau Disease in Japan: An Extended Study of 77 Families. *Jpn. J. Cancer Res.* 91: 204–212.

Yu F.; White S.; Zhao Q.; Lee F. (2001). HIF-1 α binding to VHL is regulated by stimulus-sensitive proline hydroxylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 9630–9635.

Zatyka, M.; Morrissey, C.; Kuzmin, I.; Lerman, M. I.; Latif, F.; Richards, F. M.; Maher, E. R.. (2002). Genetic and functional analysis of the von Hippel-Lindau (VHL) tumour suppressor gene promoter. *J. Med. Genet.* 39: 463-472.

Zbar, B.; Kishida, T. Chen, F.; Schmidt, L.; Maher, E.R.; Richards, F.M.; Crossey, P.A.; Webster, A.R.; Affara, N.A.; Ferguson-Smith, M.A.; Brauch, H.; Glavac, D.; Neumann, H.P.; Tisherman, S.; Mulvihill, J.J.; Gross, D.J.; Shuin, T.; Whaley, J.; Seizinger, B.; Kley, N.; Olschwang, S.; Boisson, C.; Richard, S.; Lips, C.H.; Lerman, M.; et al. (1996). Germline mutations in the von Hippel - Lindau (VHL) gene in families from North America, Europe, and Japan. *Hum. Mutat.* 8: 348-357.

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://pressz.nci.nih.gov/sciencebehind/cancersp/cancersp36.htm>

<http://www-ermm.cbcu.cam.ac.uk/01002654h.htm>

<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp?VHL>