



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIRECCION GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO

CENTRO MEDICO NACIONAL
“20 DE NOVIEMBRE”
ISSSTE

ANALISIS GENETICO DEL SINDROME VON HIPPEL-LINDAU
EN TRES FAMILIAS MEXICANAS

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
ESPECIALISTA EN GENETICA MEDICA

PRESENTA:

MEDICO CIRUJANO: JESUS BENITEZ GRANADOS

ISSSTE 315.2011

DIRECTOR DE TESIS
DRA. YURITZI SANTILLAN HERNANDEZ

REVISOR DE TESIS:
DR. OSCAR FRANCISCO CHACON CAMACHO
DRA. SILVIA VIDAL MILLAN
DR. JUAN CARLOS ZENTENO RUIZ



CIUDAD UNIVERSITARIA, 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A los pacientes que aceptaron participar en el estudio y a sus familiares que los acompañaron a las consultas.

A Miriam por la camaradería, amor, comprensión, apoyo y por escuchar mis sueños.

A Lourdes y Jesus por el maravilloso grupo de cromosomas que me regalaron y porque de forma incondicional entendieron mis ausencias y malos momentos. Soy afortunado por contar con su amor y ejemplo.

Al Dr. Chacón por la pasión con que hace las cosas, por compartir su conocimiento, por demostrarme que la clínica no esta separada del laboratorio.

A la Dra. Vidal por compartir la gran capacidad que tiene en la relación medico-paciente, por la forma en que los paciente la observan y porque después de cada crítica me dio un consejo.

Al Dr. Zenteno por confiar en mi persona, por la dirección de este trabajo y por ser un gran jefe de un gran equipo de trabajo.

A Bety, Erika, Maggie, Gaby, Lucy, por todo el apoyo y las buenas charlas, sin su ayuda este proyecto no se habría logrado.

A mis compañeros Leo, Ale y Marcela por convertir la brecha en camino, a Carlos porque no pude tener un mejor residente para compartir esta odisea, a Ivonne por todas las risas y consultas compartidas, a Maryangel por las buenas historias. Por el apoyo y porque me permitieron ser parte de su vida durante estos años.

A Chivis, Andrea, Checo, Eli, Don Agus, Dra. Canto, Nubia, Marina, James, Cesar y Paco por escucharme en los momentos difíciles y por el animo para terminar este proyecto.

A la Dra. Santillán por su disposición en este proceso, por haber accedido a modificar el calendario y dejarme rotar en Oftalmología, por aquel Abril de 2010.

A Conny, Ceci e Inés por toda la ayuda y el apoyo.

A la Dra. Chima y la Dra. García por el ejemplo brindado.

A todos aquellos que durante este proceso fueron mis maestros, mi mas sincero agradecimiento.

“La vida, a pesar de todo, es maravillosa”

V. v G

INTRODUCCION

La enfermedad de von Hippel-Lindau (VHL) (OMIM #193300) se describió por primera vez hace más de 100 años, Treacher Collins realizó la descripción clínica de dos hermanos (hombre y mujer), sin embargo en aquel momento no existía el término de enfermedad VHL (Collins 1984), posteriormente el oftalmólogo alemán Eugen von Hippel realizó descripciones similares de tumores vascularizados en retina (angiomas) (von Hippel 1904); el neuropatólogo sueco Arvid Lindau fue el primero en apreciar la naturaleza sistémica de la enfermedad y relacionar la presencia de lesiones en sistema nervioso central y en ojo (Lindau 1927). Fue en 1932 cuando Van der Hoeve usa por primera vez el término de enfermedad de von Hippel - Lindau en los casos en que se asocian hemangioblastomas retinianos y cerebelares. Es un síndrome caracterizado por la presencia de neoplasias altamente vascularizadas, como son los angiomas y hemangioblastomas los cuales histológicamente son indistinguibles y a menudo son referidos como hemangioblastomas en Sistema Nervioso Central (SNC) y retina (Richards et al., 1998) y otros tumores en diferentes órganos, dichos tumores puede ser benignos o malignos, incluyen quistes renales, carcinoma de células renales y feocromocitoma (Maher et al., 1997). Otros tumores que han sido descritos en la enfermedad VHL son tumores neuroendocrinos y/o quistes pancreáticos, tumores de saco endolinfático (Muzumdar et al., 2006), quistes de epidídimo y adenomas quísticos de ligamento ancho. Similar con otros síndromes de cáncer hereditario, existe una asociación genotipo – fenotipo en la enfermedad que forma la base de su clasificación clínica (Tabla 1) (Barry et al., 2004; Zbar et al., 1995). De esta manera, se clasifica en 2 tipos: VHL tipo I no incluye el feocromocitoma como una de sus manifestaciones, por otra parte VHL tipo 2 se caracteriza por presentar

feocromocitoma de forma aislada o asociado a otras manifestaciones, el tipo 2, a su vez, esta subdividido en tres categorías 2A, 2B y 2C. El tipo 2A se encuentra asociado con un riesgo bajo de carcinoma renal de células claras, el tipo 2B presenta riesgo aumentado de presentar carcinoma renal de células claras y el tipo 2C se caracteriza por presentar solamente feocromocitoma. Las características genéticas de estos subgrupos también son distintas, se ha mencionado que la enfermedad VHL tipo 1 esta asociada con grandes deleciones y mutaciones sin sentido mientras que VHL tipo 2 esta asociada principalmente a las mutaciones de sentido equivocado (Barontini et al. 2010).

Subtipo VHL	Feocromocitoma	Hemangioblastoma de sistema nervioso central	Carcinoma renal de células claras	Tipo de mutación
Tipo 1	-	+	+	Delección/ sin sentido
Tipo 2A	+	+	-	Perdida de sentido
Tipo 2B	+	+	+	Perdida de sentido
Tipo 2C	+	-	-	Perdida de sentido

Tabla 1. Subdivisión clínica y molecular de la enfermedad de von Hippel-Lindau (Modificado de Barry et al. 2004)

La enfermedad VHL es un cáncer familiar hereditario con una incidencia aproximada de 1 en 36000 a 1 en 45000 (Ong et al., 2007; Lonser et al., 2003) y una penetrancia cercana al 100% a los 60 años (Friedrich et al., 2001). Como se menciono previamente son muchos los órganos afectados por lo que a continuación se realizara una revisión detallada de las lesiones características.

Hemangioblastoma en sistema nervioso central: es la lesión mas frecuente asociada a la enfermedad VHL (Glasker et al., 1999), los sitios mas frecuentes de localización son el cerebelo y la medula espinal, afectando 60-84% de los pacientes con la enfermedad VHL. Los hemangioblastomas son tumores altamente vascularizados, histológicamente benignos, sin embargo pueden ocasionar sintomatología en sistema nervioso central con alta mortalidad (Wanebo et al., 2003). Las manifestaciones clínicas dependen de la localización del tumor y son debidas a las alteraciones en estructuras vecinas que afectan. Las principales manifestaciones clínicas son: cefalea, parestesias, mareo, debilidad o dolor en extremidades superiores y/o inferiores, alteraciones sensoriales, alteraciones en la marcha, ataxia espinal, dismetría, nistagmo, incontinencia e incluso hidrocefalia. Los pacientes frecuentemente presentan una larga historia de sintomatología neurológica leve seguida de exacerbación súbita. Debido a esto el diagnóstico esta retrasado 4-5 años aproximadamente desde el inicio de la sintomatología. (Maddock et al., 1996). Estos tumores se desarrollan frecuentemente en la segunda década de la vida, sin embargo se pueden desarrollar desde la etapa pediátrica alrededor de los 10 años (Singh et al., 2001). En población mexicana el reporte mas joven fue descrito en un paciente que presentó un hemangioma cerebelar a los 13 años. (Rasmussen et al., 2006). El hemangioblastoma de sistema nervioso central es junto con el hemangioblastoma de retina las lesiones mas frecuentes en la enfermedad de VHL (Singh et al., 2001). El método diagnóstico para estas lesiones es la resonancia magnética (IRM) de cerebro y medula espinal. El tratamiento de elección es la resección quirúrgica, sin embargo es tema de controversia el momento en el que se debe realizar dicho procedimiento quirúrgico y debe ser decidido de acuerdo a las características que presenta cada paciente (Wanebo et al., 2003). El déficit

neurológico frecuentemente es irreversible después de la cirugía por lo que el resultado depende del estado preoperatorio del paciente.

Hemangioblastoma de retina: Es la lesión oftalmológica típica de la enfermedad de VHL, hasta 60% de los pacientes la presentan. Esta manifestación esta frecuentemente asociada a la enfermedad VHL y es rara como una lesión esporádica, en el caso de los pacientes con enfermedad VHL la edad de presentación es mucho mas precoz que en los casos esporádicos y usualmente son multifocales y bilaterales (Singh et al., 2001). Frecuentemente son la primera manifestación clínica de la enfermedad y se pueden desarrollar tumores nuevos; generalmente aparecen en la tercera década de la vida, sin embargo, similar a los hemangioblastomas de SNC se pueden presentar en la edad pediátrica (Barontini et al., 2010). Clínicamente los pacientes presentan dolor y disminución de la agudeza visual, alteraciones en campo visual o ambos. En casos avanzados pueden presentar hemorragia, glaucoma y perdida de la visión. Debido al riesgo de perdida de la visión es indispensable que estas lesiones sean diagnosticadas y tratadas de manera oportuna, para cumplir este propósito se debe realizar valoración oftalmológica en los pacientes portadores de mutaciones en *VHL* iniciando en la infancia. (Singh et al., 2002). El hemangioblastoma es un diagnóstico sencillo por el típico aspecto que presenta durante la valoración de fondo de ojo. La angiografía con fluoresceína es una herramienta útil en caso de presentar lesiones poco diferenciadas o hemangioma yuxtapapilar. La fotocoagulación laser y la crioterapia son los métodos mas utilizados para el tratamiento de las lesiones periféricas. (McCabe et al., 2000).

Carcinoma renal de células claras: Estos pacientes presentan un riesgo elevado de quistes renales o carcinoma renal de células claras, lo cual ocurre hasta en 66%

(Maher et al., 1997), este último, se presenta a partir de los 20 años de edad y se ha reportado que para la edad de 60 años el 70% de los pacientes con enfermedad VHL tipo 1 y tipo 2B desarrollaran dicho carcinoma (Ong et al., 2007). Se debe realizar valoración clínica y seguimiento radiológico con ultrasonido, tomografía o incluso IRM en los pacientes con la enfermedad, la valoración oportuna permite reducir la edad de diagnóstico de 44 a 39 años (Patard et al., 2004). El carcinoma renal de células claras frecuentemente es multicentrico o bilateral y puede presentar parénquima renal con o sin quistes. El tratamiento es quirúrgico y tiene como objetivo conservar la mayor cantidad de parénquima renal que sea posible, solo serán candidatos de procedimiento quirúrgico las lesiones mayores a 3 centímetros (cm) de diámetro (Choueiri et al., 2006). La nefrectomía total no es un procedimiento recomendado en la enfermedad VHL. En etapas iniciales se ha observado que la nefrectomía parcial es muy efectiva (Bratslavsky et al., 2008). La ablación percutánea de radiofrecuencia es útil en el caso de tumores múltiples o bilaterales para preservar la función renal tanto como sea posible (Choueiri et al., 2006). En estadios avanzados se ha utilizado inhibidores de receptor del factor de crecimiento endotelial y vascular (VEGF) (Yang et al., 2003).

Los quistes renales son considerados como lesiones benignas, sin embargo se ha demostrado que en la enfermedad VHL puede tratarse de lesiones premalignas (Ong et al. 2007).

Tumores pancreáticos: Los tumores pancreáticos y/o quistes pancreáticos se desarrollan en 35 – 77% de los pacientes con enfermedad VHL, las lesiones quísticas son benignas. Los tumores pancreáticos asociados son de varios tipos: adenomas quísticos (12%), hemangioblastomas (<1%), adenocarcinomas (<1%) y tumores neuroendocrinos (9-17%) (Mukhopadhyay et al., 2002). Los tumores

neuroendocrinos son frecuentemente no funcionales y generalmente asintomáticos, aunque pueden desarrollar pancreatitis (Blansfield et al., 2007), la edad en la que se presentan estos síntomas es entre los 29 a 38 años de edad, es poco frecuente que los pacientes presenten sintomatología debido a la secreción de hormonas peptídicas, estos síntomas incluyen diarrea o hipoglucemia, sin embargo tinciones para glucagón, insulina, somatostatina, polipeptido pancreático han sido demostrados (Blansfield et al., 2007). La presencia de tumores malignos ocurre en 8-50% de los pacientes y es frecuente la metástasis a hígado. El tratamiento dependerá de las características del tumor (sintomático o maligno), la resección quirúrgica esta indicada en tumores mayores a 3 cm. Existen factores asociados con malignidad que ameritan un seguimiento oportuno del paciente en caso de presentar 2 las siguientes 3 características: 1 Tumor primario mayor a 3cm. 2 mutación en el exón 3 de *VHL*. 3 tumor primario que duplique su tamaño en menos de 500 días (Hammel et al., 2000).

Tumores de saco endolinfático: Este tipo de lesiones son frecuentemente adenomas quísticos papilares invasivos a región posterior del temporal, aunque este tipo de tumores se pueden presentar de manera aislada, con mucha frecuencia se asocian a enfermedad VHL (Lonser et al., 2004). Estos tumores se pueden detecta con tomografía o IRM en 11-16% de los pacientes siendo bilaterales el 15 a 30% de ellos (Butman et al., 2007). Las manifestaciones clínicas incluyen pérdida de la audición, tinitus, vértigo, alteraciones de equilibrio y con poca frecuencia parálisis facial. La pérdida de la audición es irreversible y ocurre de manera prematura con un promedio de edad de inicio a los 22 años (Lonser et al., 2004). La resección quirúrgica puede ser curativa, puede preservar la audición y mejorar la sintomatología vestibular por lo tanto el diagnóstico y tratamiento temprano son

importantes para prevenir alteraciones neurológicas permanentes (Butman et al., 2007).

Feocromocitoma: Es un tumor neuroendocrino productor de catecolaminas derivado de células cromafines que se forma a partir de la medula suprarrenal o a partir de tejido cromafin ectópico como en el caso de paragangliomas. Existen otros genes asociados a feocromocitoma hereditario como son: *P53*, *RET*, *SDHB*, *SDHC*, *SDHD*, *NF1* y pueden ser detectados en mas del 25% de los casos (Maher et al., 2002). Como se menciono previamente el feocromocitoma es la lesión característica de la enfermedad VHL tipo 2, mas de 300 diferentes mutaciones de *VHL* han sido descritas y de estas las de perdida de sentido se encuentran asociadas a la enfermedad VHL (Bausch et al., 2006). Generalmente aparecen en pacientes jóvenes, antes de los 40 años y son bilaterales, múltiples o extra suprarrenales. Los casos pediátricos son muy frecuentes (Reddy et al., 2000., Barontini et al., 2006). La enfermedad maligna es rara, generalmente menor a 5% (Barontini et al., 2006). Los tumores en cabeza y cuello son poco frecuentes de acuerdo a su origen parasimpático, sin embargo puede ocurrir. En los pacientes afectados la hipertensión arterial es el signo mas frecuente, seguido por cefalea y diaforesis, aunque existen reportes que hasta 30% de los pacientes puede ser normotensos y asintomáticos (Eisenhofer et al., 2001). Los feocromocitomas en la enfermedad VHL muestran una característica distintiva, son tumores productores de norepinefrina con concentraciones de hasta en 98% mientras que la epinefrina constituye menos del 1.5% del total del contenido de catecolaminas. El diagnóstico se basa en la cuantificación de las catecolaminas y sus metabolitos en plasma o en orina de 24 hrs. Muchas técnicas de imagen están disponibles para la localización del tumor como son IRM, tomografía o I-metil.bencil guanidina (MIBG), gamagrafía con

octreótido y tomografía con emisión de positrones. El uso de dos técnicas de imagen es indispensable para vigilar la evolución del tumor. El tratamiento es quirúrgico y se lleva a cabo una vez que el paciente presente cifras normales de tensión arterial preferentemente con α adrenérgicos y β bloqueadores. La remoción quirúrgica mediante laparoscopia es la técnica quirúrgica preferida por la ausencia de complicaciones. (Al Sobhi et al., 2002). El paciente requiere seguimiento de por vida debido al riesgo de recurrencias.

Gen *VHL*

La enfermedad es causada por mutaciones germinales en *VHL* (ENSG 00000134086). Estudios de ligamiento realizados en la década de los 80's indicaron que *VHL* se ubicaba en el brazo corto del cromosoma 3 (3p), la cual es una región genómica frecuentemente deletada en cáncer renal esporádico (no familiar) (Seizinger et al., 1988). Usando esta información posicional el consorcio liderado por Eamon Maher, Michael Lerman, Marston Linehan y Bert Zbar aislaron el gen *VHL* en 1993 (Latif et al., 1993). Es un gen relativamente pequeño formado por tres exones. La enfermedad VHL de manera similar a otros síndromes de cáncer hereditario, es causada por mutaciones germinales de un gen supresor de tumores de acuerdo al modelo de "doble golpe" descrito por Knudson. (Knudson et al., 1971). Los pacientes heredan un alelo afectado de alguno de sus progenitores y de acuerdo con la hipótesis de Knudson, la inactivación de *VHL* es una característica común del carcinoma de células claras esporádico y hemangioblastomas esporádicos (Lubensky et al., 1996).

Como se menciona previamente *VHL* esta formado por 3 exones (Kuzmin et al., 1995), el exón 1 esta formado por los nucleótidos 1 a 340 (codón 1-113), el exón 2 del 341 a 463 (codón 114-154) y el exón 3 del 464 a 642 (codón 155-213). El promotor de *VHL* ha sido poco estudiado, presenta múltiples sitios de unión a factores de transcripción. La hipermetilación del promotor se ha descrito como un mecanismo que inactiva *VHL* en ausencia de mutaciones. El gen tiene una expresión ubicua, por lo tanto, el patrón espacial de expresión *VHL* no explica el conjunto restringido de tejidos que desarrollan los tumores y lesiones característicos de la enfermedad VHL (Kim & Kaelin 2004).

Proteína VHL (pVHL)

VHL codifica para dos proteínas: una proteína de 30kD (p30) formada por 213 aminoácidos, NM_000551.2 (variante de mRNA 1) y una proteína de 19kD (p19) formada por 160 aminoácidos NM_198156.1 (variante de mRNA 2) la cual es generada por inicio alternativo de la traducción en la metionina interna 54. Ambas isoformas pueden regular el factor α inducible de hipoxia (HIF- α) (Blankeship et al., 1999; Schoenfeld et al., 1998) (Figura 1).

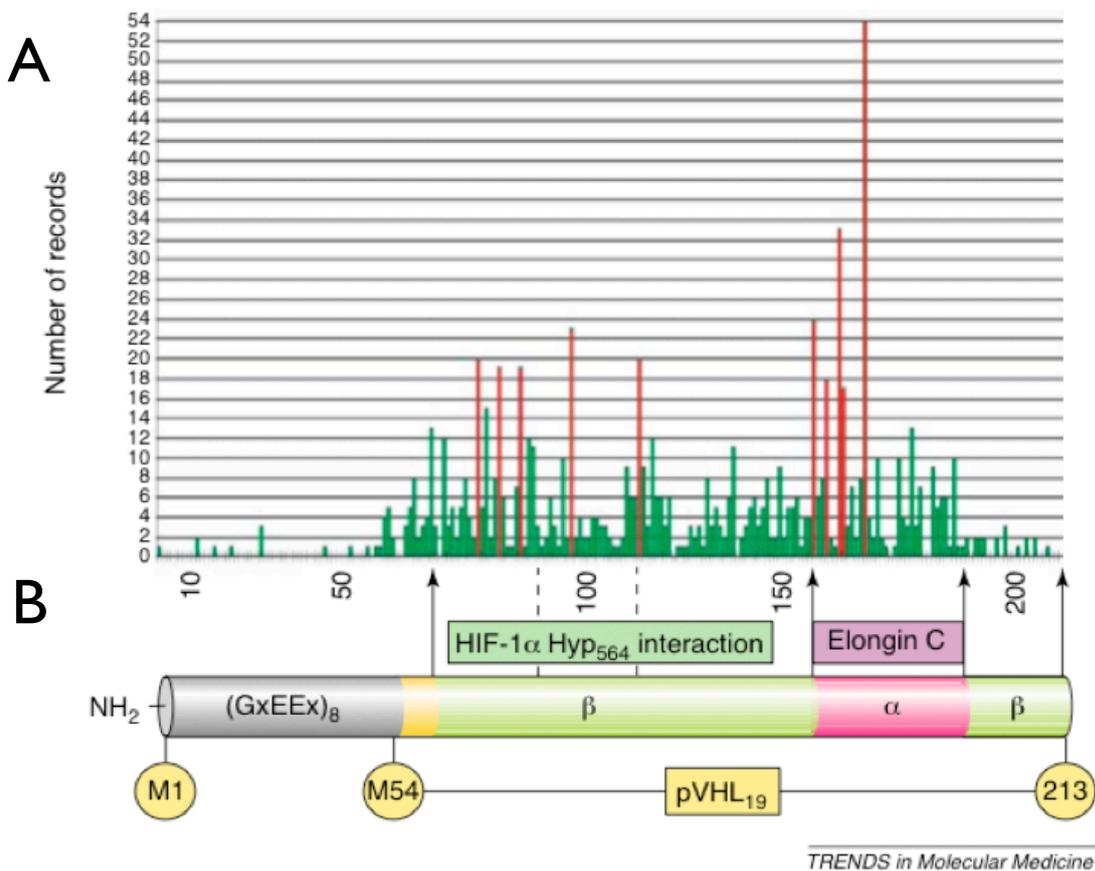


Figura 1: A Esquema en el que se muestra las mutaciones que se han reportado en cada codón de pVHL. En color rojo se muestran los 10 codones con las mutaciones más frecuentes. B Representación esquemática de la proteína, en color gris se presenta el dominio presente solo en la isoforma p30, en color verde el dominio β que permite la unión con HIF1 α y en color rosa el dominio α que permite la unión con elongina C. En color amarillo M1 representa la Metionina que inicia la traducción en la isoforma, p30, M54 representa el inicio de la traducción para la isoforma p19. Modificado Barry & Krek 2004.

pVHL es un componente del complejo proteico que incluye a la elongina B, elongina C, Culina-2 y Rbx 1, este complejo participa en la ubiquitinación y degradación del factor inducible de hipoxia (HIF), el cual es un factor de transcripción heterodímero

que desempeña un papel central en la expresión de genes regulados por oxígeno (Barry & Wilhem 2004). Desde el punto de vista estructural pVHL presenta dos subdominios: el α y el β . El primero de ellos es usado en el complejo proteico y funciona en la degradación mediante proteosoma, mientras que el dominio β funciona como un sitio de acoplamiento a sustrato. El sustrato mejor conocido de pVHL es HIF y sus tres subunidades α : HIF1 α , HIF2 α y HIF3 α (Kaelin et al., 2003), solamente cuando HIF se encuentra hidroxilado puede ser reconocido por pVHL para su degradación, dicha hidroxilación se lleva a cabo por modificaciones postraduccionales en residuos de prolina por la familia de enzimas dependientes de oxígeno conocidas como prolilhidroxilasas PHD1, PHD2 y PHD3 (también conocidas como EglN2, EglN1 y EglN3) (Epstein et al., 2001)(Figura 2).

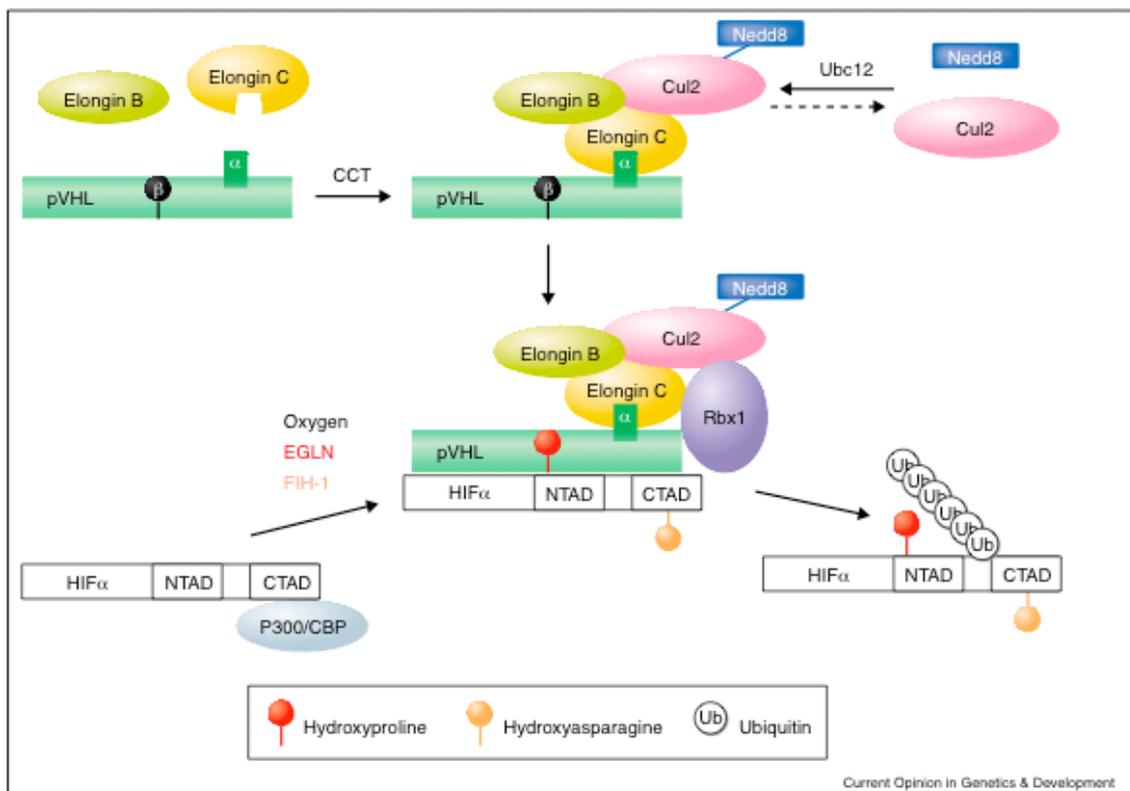


Figura 2: Representación esquemática de la regulación de HIF dependiente de oxígeno. CCT facilita la formación del complejo pVHL-ElonginaB-ElonginaC el cual se une con Cul2 y Rbx1. HIF α contiene dos dominios de transactivación llamados NTAD y CTAD. En presencia de oxígeno, NTAD y CTAD son hidroxilados en un residuo de prolina altamente conservado por una enzima de la familia EGLN. Solamente un sitio de hidroxilación de prolina se ha mostrado en la imagen. La hidroxilación de CTAD desplaza coactivadores de p30 y CBP mientras que la hidroxilación de NTAD crea un sitio de unión para pVHL, el cual dirige la poliubiquitinación de HIF. Modificado de Barry y Wilhem 2004

En condiciones de hipoxia HIF1 α no hidroxilado se dimeriza con HIF1 β y se unen a sitios consenso en promotores específicos de genes blanco en núcleo. En casos de que *VHL* presente mutaciones, la actividad de HIF está aumentada debido a la disminución en la degradación de dicho factor en ausencia de pVHL, lo cual dirige la activación transcripcional de varios genes blanco de HIF, los cuales incluyen: factores angiogénicos como el factor de crecimiento endotelial vascular (*VEGF*), enzimas involucradas en metabolismo de glucosa como son *GLUT 1* y hexoquinasa 1 (Maxwell & Ratcliffe 2002). Esto ha sido demostrado por análisis transcripcional en carcinomas renales (Gordan et al., 2008) y feocromocitomas (Dahia et al., 2005).

La regulación de HIF por pVHL es un evento importante en la transición epitelio-mesénquima en el desarrollo renal, fibrosis y también ha sido asociado con cáncer. La pérdida de la función de pVHL tiene como resultado alteraciones a varios niveles como son: inhibición por contacto célula-célula, diferenciación celular y sobrevivencia de la célula (Esteban et al., 2006). En células renales, alteraciones en pVHL han sido asociadas con pérdida de E-cadherina, mediante desregulación de HIF; las E-cadherinas son un grupo de moléculas de adhesión que forman las uniones celulares en células epiteliales polarizadas en las uniones adherentes, un aumento en la expresión de E-cadherinas está asociado con diferenciación de células del mesénquima en células de epitelio tubular (Cho et al., 1998). La pérdida de E-cadherina ha sido asociada con la progresión de varios carcinomas, así, es posible que la pérdida de E-cadherina por activación de HIF puede explicar, al menos en parte, el desarrollo de carcinoma renal en la enfermedad VHL (Russel & Ohl 2007). Otro evento importante en el crecimiento de neoplasias, es aquel, debido a señalización de sustancias reductoras, el NAD(P)H oxidasa es la principal fuente de elementos reactivos de oxígeno, las cuales regulan la activación de HIF (Kaelin

et al.,2005). En modelos murinos nulos para pVHL, metabolitos resultantes de la vía de superóxido dependiente de NADPH están aumentados, sin embargo, si se reintroduce pVHL los niveles de estos metabolitos disminuyen por degradación de proteosoma (Guzy et al., 2005). Además, la identificación del aumento de actividad de oxidasas NAD(P)H en deficiencia de pVHL apoya la idea relacionada con la inhibición farmacológica de estas oxidasas como una alternativa para disminuir la expresión de HIF en tumores relacionados con la enfermedad VHL. (Figura 3).

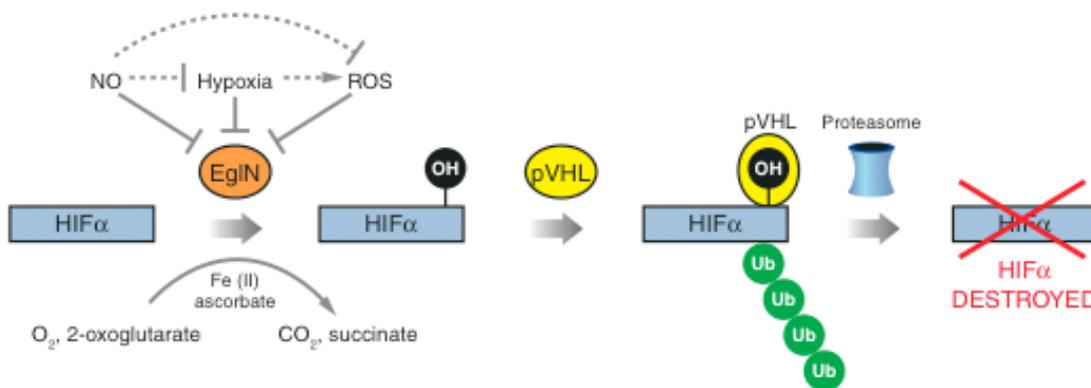


Figura 3: Control de la estabilidad de HIF α por oxígeno. En presencia de oxígeno las subunidades de HIF α son hidroxiladas en alguno de los dos residuos de prolina por miembros de la familia EglN. La actividad de EglN es sensible para reaccionar con especies reactivas de oxígeno (ROS) y óxido nítrico (NO). La hidroxilación en los residuos de prolina de HIF α generan un sitio de unión para pVHL, el cual una vez unido dirige la poliubiquitinación de HIF α , que se degrada por proteosomas. Modificado de Kaelin Jr 2007.

A pesar de las evidencias mencionadas, las cuales comprueban la participación y la relación entre pVHL-HIF en el desarrollo de las lesiones de la enfermedad VHL, existen estudios que vinculan mutaciones de *VHL* con genes no relacionados con HIF, entre estos genes se encuentran algunos involucrados en ensamble de matriz, regulación de protein cinasa C atípica (aPKC) y señalización de *FGFR1*. Los estudios que apoyan estas funciones de pVHL independientes a HIF están dadas por la presencia de tumores en pacientes con la enfermedad VHL tipo 2C (presentan solo feocromocitoma), en quienes no hay aumento en la actividad de HIF (Hoffman et al., 2001). Esta evidencia sugiere que otro gen regulado por VHL puede estar

relacionado con predisposición al feocromocitoma.

Una de las manifestaciones de la enfermedad es la presencia de quistes en riñones y páncreas, se ha propuesto la participación de pVHL en la estabilidad de los microtubulos y regulación de cilios, cuya alteración ha sido relacionada con el desarrollo de quistes (Thoma et al., 2007). En lo referente ha funciones en matriz extracelular, pVHL se puede unir directamente a fibronectina y colágena IV hidroxilada (Kaelin et al.,2008), las mutaciones en *VHL* tipo 2B no permiten la unión con fibronectina y colágena IV lo que impide una adecuada organización y función de la matriz extracelular, lo que puede contribuir con el desarrollo tumoral. La introducción de pVHL silvestre en modelos celulares de cáncer renal de células claras *VHL*^{-/-} restaura la organización de las uniones celulares y de esta manera permiten el desarrollo a tipo epitelial (Ohh et al., 1998).

En contraste con los hemangioblastomas y cáncer renal de células claras, las mutaciones de *VHL* relacionadas con feocromocitoma son de manera casi exclusiva mutaciones germinales (Dahia et al., 2006), esto sugiere que la función de pVHL a nivel embriológico esta relacionada con feocromocitoma, además la mayoría de las mutaciones relacionadas con feocromocitoma son mutaciones de perdida de sentido, las cuales no afectan la regulación de HIF, esto implica una función de pVHL independiente a HIF. En el desarrollo embriológico de precursores neuronales simpáticos, las células se someten a apoptosis en caso de que el factor de crecimiento neuronal (NGF) se encuentre limitado (Ong et al., 2007), esta apoptosis fisiológica es dependiente de c-Jun pero puede ser limitada por JunB (Lee et al., 2005), además EglN3/PHD3 que es un miembro de la familia de prolihidroxilasas, actúa rio abajo de c-Jun. Células *VHL*^{-/-} fueron modificadas para impedir su respuesta a JunB lo que provoco reducción en c-Jun y disminución de apoptosis

incluso en presencia de NGF (Lee et al., 2005), alteraciones en la señalización han sido reportadas como resultado de mutaciones en otros genes vinculados al desarrollo de feocromocitoma como son *P53*, *SDHD*, *NF1* y *RET* (Qin et al., 2009).

Recientemente se ha implicado a pVHL en la regulación de la senescencia celular, un estado irreversible de arresto en el crecimiento, lo cual es importante para la supresión de tumores in vivo (Young et al., 2008). Modelos celulares *VHL*^{-/-} presentaron arresto en el crecimiento y aumento de marcadores relacionados con senescencia, en contraparte células sin inactivación de pVHL no presentaron arresto de crecimiento. Este fenómeno está relacionado con p27KIP y pRb, pero no a p16 y p53, los dos mediadores principales en senescencia (Young et al., 2008). Basado en estos hallazgos se ha propuesto que existe una sensibilidad específica de cada tejido a senescencia lo que explicaría por que las manifestaciones de la enfermedad de pVHL está restringida a algunos sistemas y no son lesiones generalizadas en todo el cuerpo, es decir solo los tejidos donde los efectos oncogénicos por la pérdida de *VHL* reemplazaría el fenotipo senescente con el desarrollo de neoplasia, para comprobar esta suposición es necesario realizar estudios in vivo para determinar si este es el caso de la enfermedad *VHL* en humanos.

Otra de las funciones de pVHL reportadas hasta el momento es la localización en el huso mitótico y su inactivación funcional provoca desorientación molecular en el huso, alteraciones en control de huso e inestabilidad cromosómica (Thoma et al., 2009), estas características son reversibles en presencia de pVHL silvestre, lo que implica a pVHL en la orientación adecuada del huso y estabilidad cromosómica lo que probablemente contribuye con su función de supresión tumoral. También pVHL funciona como adaptador para promover la fosforilación de CARD9 (agonista de

NFκB), otra función de pVHL es la unión con p53, promoviendo la actividad y estabilidad en respuesta a estrés genotóxico, estas funciones pueden relacionarse con la resistencia al tratamiento con agentes citotóxicos convencionales (Barontini et al., 2010)

De acuerdo con esta serie de antecedentes se puede mencionar que existen efectos de pVHL dependientes de HIF y efectos de pVHL independientes de HIF (Figura 4).

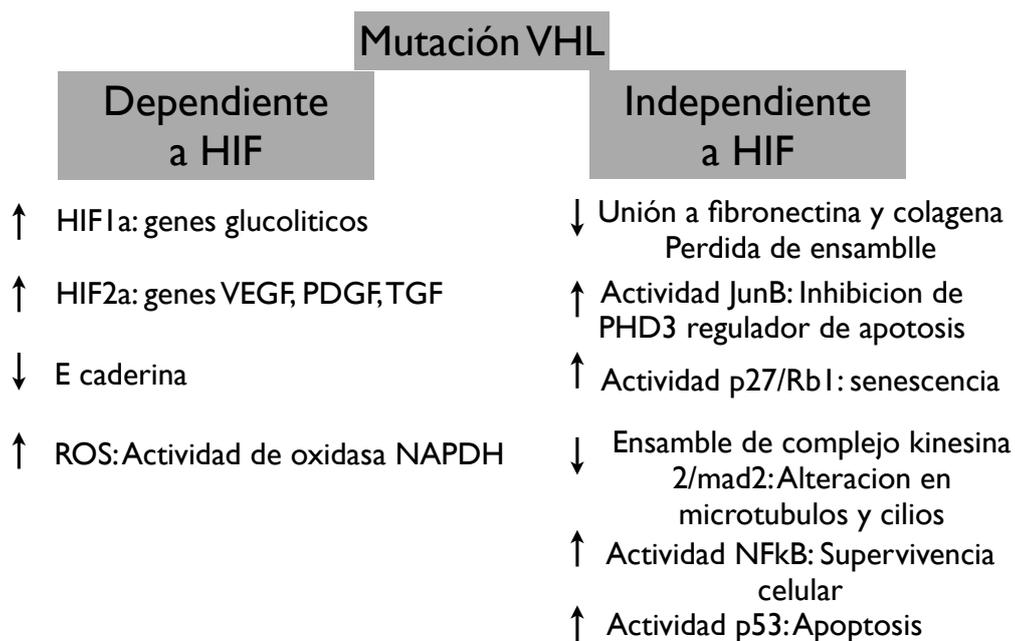


Figura 4: Mecanismo de acción de pVHL, dependientes de HIF e independientes de HIF. Ambos componentes pueden estar involucrados para interaccionar entre algunos de estos efectos. La dirección de las flechas indica efecto en incremento o efecto que disminuye. VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular. PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas. TGFb: Factor de crecimiento transformante b. Modificada de Barontini & Dahia 2010.

Diagnóstico

Los pacientes que presentan una o mas lesiones características o historia familiar positiva de la enfermedad VHL debe ser analizados a nivel molecular para identificar mutaciones germinales en *VHL*. Sin embargo existen reportes en los que no se detectó mutación hasta en 20% de los pacientes con diagnóstico clínico de la enfermedad VHL. (Ong et al. 2007). El diagnóstico molecular ha mejorado debido a

las herramientas diagnósticas con las que se cuenta, como son la secuenciación directa del DNA, análisis con Southern blot, las cuales han sido complementadas con hibridación fluorescente *in situ* (FISH) y de manera reciente PCR cuantitativa la cual permite el análisis del número de copias o amplificación múltiple dependiente de ligasa (MLPA) (Hes et al., 2007). Las mutaciones germinales en *VHL* también pueden presentarse *de novo* (20%) y rara vez los pacientes presentan mosaicismo somático lo cual haría el diagnóstico aun mas difícil (Santarpia et al., 2007).

Los criterios diagnósticos de la enfermedad VHL incluye uno de los siguientes tres grupos: 1 mas de un hemangioblastoma en sistema nervioso central o retina, 2 un hemangioblastoma en sistema nervioso central o retina mas complicación visceral (quistes hepáticos, renales o pancreáticos) o 3 un hemangioblastoma e historia familiar (Lamiel et al., 1989; Lonser et al., 2003; Morgan et al., 2009). Así mismo existen situaciones de especial cuidado en pacientes con enfermedad de VHL, como es el seguimiento en población pediátrica debido a que las primeras manifestaciones pueden ocurrir en la infancia o adolescencia, en este periodo de la vida, el feocromocitoma puede ser la primer manifestación. Shin et al., (2006) y describieron que la expresión clínica de feocromocitoma en pacientes con enfermedad VHL era mínima o ausente, sin embargo, en otros casos descritos por Asadi y Brackbil (2003), Reichardt et al., (2002) y Barontini y Dahia (2010) la hipertensión severa y las crisis hipertensivas han sido una manifestación frecuente en los pacientes. Otra forma de presentación descrita es feocromocitoma y cáncer renal de células claras (Ferragut et al., 1999) así como tumores neuroendocrinos de páncreas (Langrehr et al., 2007). Un paciente presento tumor de saco endolinfático sin feocromocitoma (Barontini & Dahia 2010). En la población mexicana existen pocos reportes de esta enfermedad, los mas recientes son de Rasmussen et al., (2006) y Chacon Camacho et al., (2010).

El embarazo es otro factor importante a considerar, que presenta una supervivencia para el feto de 96.4% y una morbilidad para la madre del 5.4% (Hayden et al., 2009).

JUSTIFICACION

La enfermedad von Hippel–Lindau es un padecimiento autosómico dominante con 50% de probabilidades de heredar la enfermedad, es ocasionado por mutaciones en el gen *VHL* localizado en la región cromosómica 3p25 el cual realiza funciones de supresión tumoral. En la mayoría de los pacientes las manifestaciones clínicas se presentan entre los 18 y los 30 años, es un síndrome caracterizado por la presencia de neoplasias altamente vascularizadas (hemangioblastomas) en diferentes órganos, principalmente en la retina, medula espinal y el cerebelo, así como carcinoma renal de células claras, feocromocitoma, tumores pancreáticos y carcinoma de saco endolinfático. Resulta de suma importancia el estudio a nivel molecular en este grupo de pacientes para poder ofrecer diagnóstico preciso, pronóstico y asesoramiento genético que permita al paciente conocer el riesgo de recurrencia, así como la vigilancia oportuna de los órganos afectados en esta enfermedad e incluso la posibilidad de realizar diagnóstico prenatal, así mismo permitirá ofrecer asesoramiento genético y valoración para toda la familia.

La confirmación por medio de diagnóstico molecular permitirá realizar un seguimiento solo en los pacientes, con la consecuente optimización de los recursos tanto humanos como físicos del Instituto. Además este estudio permitirá ampliar los conocimientos del espectro mutacional del gen *VHL* en población mexicana.

OBJETIVOS

Objetivo general:

Identificar y describir el espectro mutacional en pacientes mexicanos con enfermedad von Hippel-Lindau.

Objetivos específicos:

- Identificar los alelos del gen *VHL* que causan la enfermedad de von Hippel Lindau en pacientes del Centro Medico Nacional 20 de Noviembre ISSSTE.
- Predecir el cambio en la secuencia proteica de acuerdo al cambio en la secuencia de acido desoxiribonucleico.
- Ofrecer diagnóstico molecular en el resto de la familia

DISEÑO DEL ESTUDIO

Se propone un estudio, transversal, descriptivo en el cual se determinara el tamaño de la muestra no aleatorizado de casos consecutivos que acudan a la consulta externa del servicio de Genética Médica del Centro Medico Nacional 20 de Noviembre ISSSTE con criterios clínicos de enfermedad VHL.

Unidades de observación: Los pacientes con la enfermedad von Hippel-Lindau, son pacientes de cualquier sexo, con un predominio de edad entre los 18 y los 30 años (sin embargo se puede estudiar a los familiares en edades diferentes a este rango de edad), van a presentar tumoraciones por hemangioblastomas en retina, cerebelo, medula espinal, así como carcinoma de células claras renales, feocromocitoma, tumores pancreáticos y/o carcinoma de saco endolinfático.

Debido a las características del estudio, se evaluará la presencia o ausencia de modificaciones en la secuencia de ADN, por lo que no se contempla incluir un grupo control.

Criterios de inclusión: Derechohabientes del ISSSTE, de cualquier sexo y edad, con diagnóstico de hemangioblastoma en sistema nervioso central (cerebelo y medula espinal, retina, saco endolinfático), quistes o tumores en riñones, glándulas suprarrenales, páncreas y/o epidídimo, con o sin diagnóstico histopatológico. Por otra parte al realizar el árbol genealógico se verificara que 2 generaciones previas al caso índice hayan nacido en México.

Criterios de exclusión: Derechohabientes del ISSSTE, de cualquier sexo y edad, que hayan estado expuestos a radiaciones, quimioterapia u otros eventos que puedan modificar las secuencias de DNA.

Criterios de eliminación: Derechohabientes del ISSSTE, de cualquier sexo y edad cuyas muestras de DNA no se puedan procesar.

Definición de variables y unidades de medida: Mutación (Definición conceptual) : Las mutaciones son cambios en la estructura del ácido desoxiribonucleico (DNA), la molécula en la cual se encuentran codificadas las moléculas restantes que conforman las células y que, por tanto dan las características que bajo la influencia del ambiente, constituyen las propiedades y rasgos finales de un organismo, es decir el fenotipo. Por otra parte el genotipo establece toda la información almacenada en el DNA, es decir, los millones de pares de bases que forman los genes en el genoma humano, con sus regiones que se traducen en secuencias de aminoácidos (exones) y las regiones que no se traducen (intrones). Cada gen está compuesto por varios miles de nucleótidos, por lo que cada gen tiene múltiples oportunidades para cambiar por mutación. Las mutaciones pueden clasificarse desde varios puntos de vista, uno de ellos es el modo como se originan, de esta manera existen mutación por sustitución, mutaciones por delección y mutaciones por inserción. Las mutaciones por sustitución son aquellas en las que se cambia un nucleótido por otro, sin afectar el número total de nucleótidos en la secuencia. Las mutaciones por delección son aquellas en las que se pierde 1 o más nucleótidos. Las mutaciones por inserción son aquellas en las que se adiciona 1 o más nucleótidos. Sin embargo resulta importante mencionar que no todas las mutaciones en el DNA se traducen en cambios de aminoácidos. Esto se debe principalmente a dos hechos: Para algunos aminoácidos existen varios tripletes; si la mutación de uno de estos cambia a otro que codifique el mismo aminoácido, el efecto no se apreciará en la estructura final de la proteína. Por ejemplo, el aminoácido Leucina tiene seis tripletes: UUA, UUG, CUU, CUC, CUA y CUG. Si el triplete UUA cambia por una mutación por sustitución en la primera base U por C, resultará el triplete CUA, pero como los dos codifican para el mismo aminoácido, la mutación no se hace evidente o permanece "silenciosa", ya que la

secuencia de aminoácidos en la proteína no se altera. El otro hecho es que la mutación se presente en regiones conocidas como intrones, o bien en la secuencia río arriba (en dirección 5') o río abajo (en dirección 3') a la región donde se encuentra codificada la proteína. Recientemente se ha descubierto que estas últimas mutaciones pueden afectar el procesamiento del RNA mensajero (mRNA).

Mutación (Definición operacional): Las mutaciones se determinaran mediante secuenciación nucleotídica directa del gen *VHL* por medio de secuenciación automatizada de los productos de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) por el método de Big Dye terminator ® inicialmente en los pacientes afectados con enfermedad de von Hippel-Lindau y posteriormente a sus familiares en riesgo que quieran conocer su estado del gen VHL.

Escala de variable nominal

1 Por alteración de nucleótidos

1.1 Sustitución

1.2 Delección

1.3 Inserción

2 Por efecto de la mutación en la proteína

2.1 Mutación de sentido equivocado

2.2 Mutación por cambio en marco de lectura

2.3 Mutación que no cambia el marco de lectura

2.4 Mutación con terminación prematura de la proteína

2.5 Mutación con terminación retrasada de la proteína

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Procedimiento	Personal responsable	Duración
Captación de pacientes	Dra. Santillán Dr. Benítez	1 mes
Explicación del protocolo, Firma de consentimiento informado		
Muestra de sangre periférica	Dr. Chacón Dr. Benítez	1 semana
Obtención de ADN		
Amplificación por PCR		
Purificación del producto de interés		
Secuenciación	Dr. Chacón Dr. Benítez	1 semana
Análisis del informe de secuencia		
Informe de los resultados al paciente	Dr. Zenteno Dr. Benítez	1 mes
Elaboración del manuscrito final	Dr. Benítez	1 mes
Revisión del manuscrito final	Dra. Santillán Dr. Zenteno Dr. Chacón Dra. Vidal	1 mes

MATERIAL Y METODOS

Se realizó historia clínica y árbol genealógico a los pacientes que acudieron al servicio de Genética Médica del Centro Médico Nacional 20 de Noviembre ISSSTE enviados principalmente por los servicios de Oftalmología, Neurología, Oncología, Patología, Otorinolaringología y/o Nefrología de la institución; una vez confirmado el diagnóstico por los datos clínicos se invitó a los pacientes (al padre o tutor en los casos de menores de 18 años) para su participación en el estudio de manera libre y voluntaria, previa firma de consentimiento informado para la realización del diagnóstico molecular del gen *VHL*. Cuando el paciente aceptó participar se procedió de la siguiente manera:

EXTRACCION DE DNA GENOMICO A PARTIR DE SANGRE PERIFERICA

Previo consentimiento informado, se extrajeron 2 ml de sangre por punción venosa en cada sujeto a partir de la cual se aisló el DNA genómico mediante el kit *QUICKGENE DNA WHOLE BLOOD (DB-S, FujiFilm Co.)* Se colocaron 30µl de solución EDB (proteasa) en un microtubo eppendorf de 1.5 ml. Posteriormente se agregaron 250 µl de sangre total (se recomienda el uso de sangre total colectada en EDTA-2Na o EDTA-2K) y 250 µl de solución LDB (buffer de lisis). Inmediatamente se mezcló el tubo 5 veces invirtiéndolo de arriba hacia abajo, se agitó con vórtex a máxima velocidad durante 15 segundos y se centrifugó durante unos segundos. La muestra se incubó a 56°C durante 2 minutos y posteriormente se agregaron 250µl de etanol al 99%. Se repitió la agitación con vórtex durante 15 segundos y la muestra se centrifugó unos segundos.

Dentro de los siguientes 30 minutos se realizó el aislamiento de DNA. Se transfirió el lisado dentro del “cartucho” del sistema automático de aislamiento de ácidos nucleicos QuickGene-810 (se transfiere todo el contenido del microtubo en el

cartucho) y se procede a la extracción automatizada. El DNA genómico obtenido se resuspenderá en un volumen aproximado de 200µl. Se almacenará la muestra a una temperatura de -20°C hasta su utilización.

DETERMINACION DE LA CONCENTRACION Y PUREZA DEL DNA OBTENIDO

Se determinó la concentración y pureza del DNA extraído por medio de un análisis de absorbancia de la muestra a 260/280nm de longitud de onda en un espectrofotómetro. La relación 260/280 permitió evaluar la pureza de la muestra, considerando que la lectura a 280 nm corresponde a la fracción proteica. Se consideraron adecuadas para análisis las relaciones entre 1.6 y 2. Además, se realizó electroforesis en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio de cada muestra de DNA obtenida para verificar que no existiera degradación. La concentración de DNA obtenida se determinó por la lectura a 260 nm considerando obtener concentraciones promedio de 50 ng/ml.

AMPLIFICACION POR PCR DEL GEN *VHL*

Se realizó análisis molecular mediante amplificación por PCR y secuenciación nucleotídica automatizada del gen *VHL*. Se efectuó la amplificación por PCR de cada uno de los tres exones y de las uniones exón/intrón de este gen a partir del DNA de los sujetos afectados y de sus familiares con datos de la enfermedad, utilizando pares de oligonucleótidos derivados de la secuencia normal de cada exón que se incluyen a continuación.

No de EXON	SECUENCIA	Pb	T.Al (°C)
1F	AAGACTACGGAGGTCGACT	496	53.9
1R	CTTCAGACCGTGCTATCGT		53.9
2F	AGCCACCGGTGTGGCTCTT	215	58.2
2R	GTACTIONACACAACAACCTT		50.5
3F	GGTAGTTGTTGGCAAAGCCT	348	54.6
3R	GGAAGGAACCGATCCTGTAT		54.6

TABLA 2.- Oligonucleótidos para la amplificación por PCR de los 3 exones del gen *VHL*. Pb (pares de bases del amplicón resultante); T.Al (temperatura de alineamiento de los oligonucleótidos).

Cada reacción de amplificación de PCR tuvo un volumen final de 15 ml que contenía 7.5 ml de HotStarTaq DNA polimerasa (compuesta por 10xPCR buffer que contiene 25mM MgCl₂, 10mM de cada dNTP y 2.5 unidades de HotStarTaq DNA polimerasa), 50-100 ngs de DNA genómico (volumen variable), 1mM del oligonucleótido correspondiente (sentido y antisentido) y agua bidestilada c.b.p. (volumen variable). Se utilizó un programa de temperaturas que incluye 1 ciclo de 15 min a 95°C para la desnaturalización inicial, 35 ciclos con 1 min de desnaturalización a 95°C, 1 min de alineamiento a temperaturas específicas para cada par de oligonucleótidos y 1 min a 72°C para la extensión. Por último, se realizó 1 ciclo a 72°C por 10 min para la extensión final.

Los productos obtenidos de la amplificación se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5% con tinción de bromuro de etidio para identificar las bandas específicas con el producto amplificado, utilizando como referencia un marcador estándar de peso molecular de 100 pb. Se reconocieron las bandas de interés y se escindieron del gel para la purificación del producto de DNA amplificado utilizando el método de purificación por columna (Promega) o el método de unión a sílica (Qiagen).

La concentración del DNA amplificado obtenido de la purificación se determinó por medio de la comparación de la intensidad de las bandas obtenidas con respecto a un marcador de masa estándar (Low DNA Mass Ladder, Invitrogen) en un gel de agarosa al 1.2% teñido con bromuro de etidio.

SECUENCIACIÓN AUTOMATIZADA DE LOS PRODUCTOS DE PCR

Se realizaron nuevas reacciones de PCR para la secuenciación nucleotídica de cada uno de los exones de *VHL* incluyendo las uniones exón/intrón. Cada reacción de 10 µl contenía 2 µl de BigDye Terminator Cycle Sequencing kit (Applied

Biosystems) que contiene los cuatro dideoxinucleótidos trifosfatados (ddNTPs) marcados por fluorescencia, deoxinucleótidos trifosfatados (dNTPs) no marcados, Tris-HCl (Ph 9.0), MgCl₂ y la enzima ampliTaQ polimerasa; se agregó además 1 µl del oligonucleótido correspondiente a una concentración de 10 mM, 10-20ngs del DNA de cada producto de PCR como templado y agua bidestilada para un volumen final de 10 ml. Para esta reacción de PCR se utilizó un programa de 25 ciclos que incluyen 30 segundos a 97°C para la desnaturalización, 15 segundos a 50°C para el alineamiento y 4 minutos a 60°C para la extensión.

Los productos de esta segunda amplificación de PCR se purificaron por medio de columnas Centri-Sep (Applied Biosystems) para eliminar el exceso de oligonucleótido y de ddNTPs fluorescentes. Cada muestra se resuspendió en 20 µl de formamida y posteriormente se desnaturalizó a 95°C durante 5 minutos. Los productos se analizaron por electroforesis capilar en un secuenciador automático ABI Prism 310 y las secuencias de DNA obtenidas en sujetos enfermos se compararon con las secuencias silvestres del gen *VHL* para identificar posibles mutaciones.

PRESENTACION DE RESULTADOS

Los resultados fueron entregados a los pacientes mediante un informe detallado y firmado por los médicos responsables.

LABORATORIO DE GENÉTICA

Fecha de reporte:

Nombre de la paciente:

No. Expediente:

Prueba realizada: Detección de mutaciones en el gen *VHL*

Resultado de la búsqueda de mutaciones en el gen *VHL*

El estudio esta basado en la técnica de secuenciación de los productos de PCR de las regiones codificantes de los 3 exones de *VHL* y las uniones exón-intrón de estas secuencias, así como de una porción de la región no-codificante 3' del promotor.

El resultado es _____ **PARA UNA MUTACIÓN DELETÉREA EN EL GEN *VHL*** referida como _____ **en el exón _ que genera _____**, la cual _____ ha sido reportada en pacientes con Síndrome de von Hippel Lindau.

Cada familiar de primer grado de este paciente tiene un riesgo del 50% de tener la mutación.

Dra. Juan Carlos Zenteno R.
Genética Medica

Dr. Oscar F. Chacón C
Genética Medica

Dr. Jesus Benitez G.
Genética Medica

Cabe aclarar que el anterior es un esquema general y que cada resultado que se entregó al paciente fué individual y de acuerdo a los hallazgos.

RESULTADOS

Se analizaron 3 casos índice con características clínicas de la enfermedad VHL y los familiares que aceptaron participar en el estudio, a todos ellos se les explicó las características del estudio, se realizó historia clínica completa, se realizó la extracción de sangre periférica (previo consentimiento informado) para su procesamiento como se detalló anteriormente.

Se amplificaron por medio de reacción de PCR y se colocaron las muestras en gel de agarosa para llevar a cabo la electroforesis como se describió en la metodología.

Figura 5.

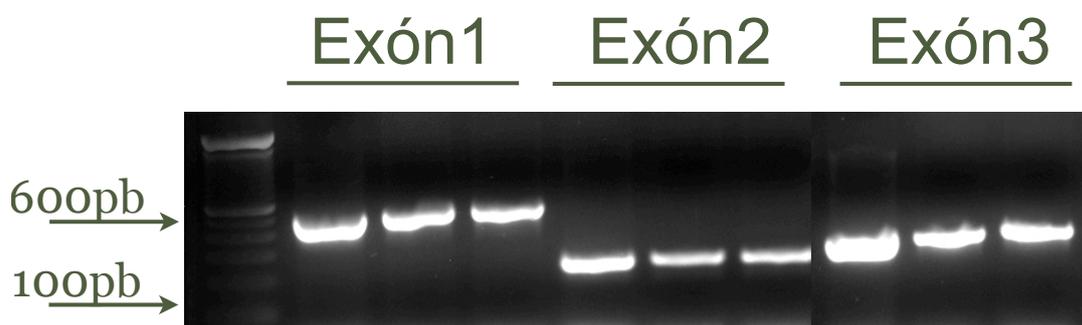
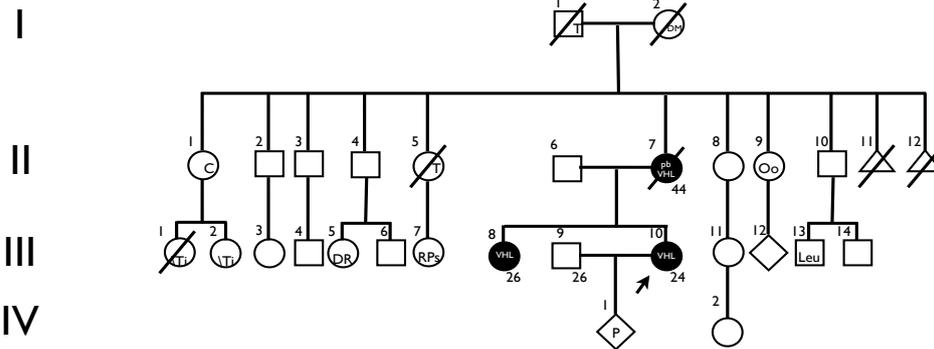


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en el cual se colocaron los productos de PCR de tres pacientes correspondientes a los 3 exones del gen VHL. Los tamaños esperados corresponden con los tamaños observados. Exón 1: 496pb, exón 2: 215pb y exón 3: 348pb. En el carril 1 se colocó 1 μ l de marcador de peso molecular NEB®.

FAMILIA 1

Caso índice (Paciente III-10) femenino de 24 años de edad al momento de la primer consulta, originaria y residente del Distrito Federal, inicia manifestaciones clínicas a los 13 años con dorsalgia y cervicalgia, a los 16 años presenta disminución de fuerza muscular en extremidades inferiores, IRM con reporte de tumor en T4-T5 y T8-T9, a los 20 años hemangioblastomas retinianos en ojo derecho, a los 21 años hemangioblastoma cerebelar. Al momento de la primer consulta refiere embarazo de 6.5 semanas de gestación (SDG). La paciente solicitó diagnóstico molecular en ella de acuerdo a los antecedentes clínicos y familiares, una vez confirmada la mutación en *VHL* la paciente y su pareja solicitaron diagnóstico prenatal el cuál se realizó mediante amniocentesis a las 14.5 SDG para la posterior extracción de DNA a partir de células amnióticas. No se encontraron modificaciones en la secuencia genética del producto en la valoración prenatal (Paciente IV-1), también se realizó cariotipo bandas GTG con resultado 46,XX. La paciente III-8 presentó hemangioblastomas retinianos bilaterales desde los 20 años, actualmente agudeza visual disminuida. En el caso de la madre de nuestro caso índice (Paciente II-7) murió por complicaciones posquirúrgicas en el servicio de neurocirugía a los 44 años de edad, antecedente de tumor en bulbo raquídeo y hemangioblastoma. No fue posible realizar análisis en el resto de los familiares debido a que no existen adecuadas relaciones intrafamiliares. (Figura 6).

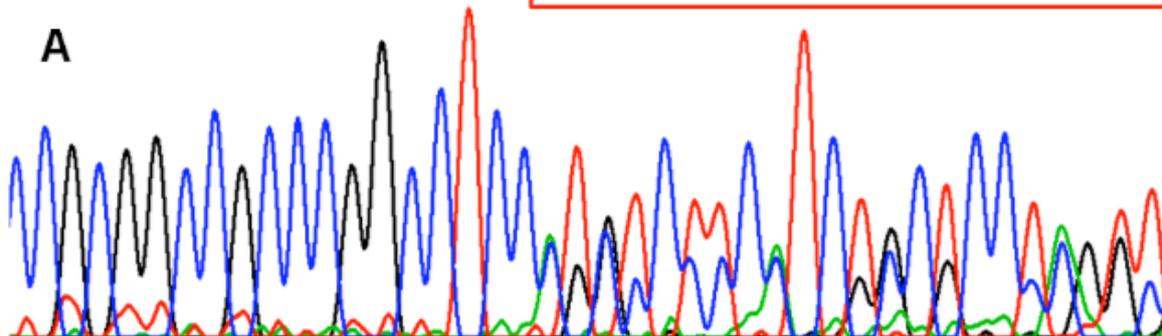
Familia 1



- ☒ I-1 Probable tumor ocular/Cardiopatía/EVC
- ☒ I-2 Diabetes mellitus
- ⊖ II- 1 Cardiopatía
- ☒ II- 5 Tumor craneal/muerte por complicaciones a preeclampsia
- ☒ II- 7 Tumor en bulbo raquídeo/hemangioblastoma/ DM/ Muerte por complicaciones posquirúrgicas neurocirugía
- ⊖ II- 9 Migraña y estrabismo
- ☒ II- 11 y II-12 Abortos de primer trimestre
- ☒ III-1 y III-2 Hipotiroidismo/arritmias
- ⊖ III-5 Desprendimiento de retina
- ⊖ III-7 Retraso psicomotor
- ☒ III-8 Hemangioblastomas ambos ojos Tumor en ovario y páncreas
- ☒ III -10 Hemangioblastoma cerebeloso, tumores medula espinal
- ⊖ III-7 Leucemia
- ⊖ IV-1 Embarazo de 14.5 SDG

c.161_168 dup GGAGGCCG

C C G C G G C C G C C C G G C C T C C N T N T C T T T C N T C T N C T C C T N G N T



C C G C G G C C G C C C G G C C T C C A T C T C T C T C T C G G C G C C C A G T T C

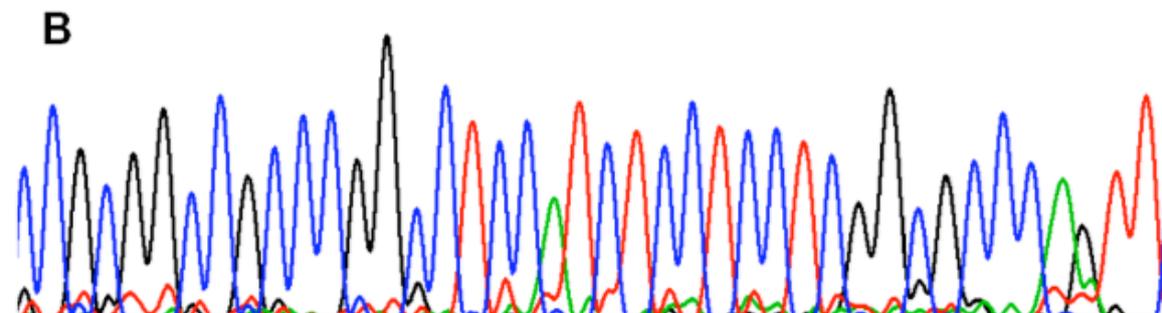


Figura 6 :En la parte superior se presenta el árbol genealógico de la familia 1. En el panel A se presenta el electroferograma de la paciente III-10, donde se muestra el cambio en el marco de lectura a partir de una inserción de 8pb. En el panel B se muestra el electroferograma del paciente IV-1 en la cual se muestra la secuencia silvestre.

FAMILIA 2

Caso índice (Paciente III-1) masculino de 17 años de edad al momento de la primer consulta en Genética, inició de sintomatología por hemangioblastomas a los 13 años con disminución de agudeza visual en ojo derecho en región temporal, a los 15 años diagnóstico de hemangioma en ojo izquierdo, actualmente presenta agudeza visual 20/25 en ojo izquierdo, en ojo derecho no percibe luz. Ambos ojos han sido tratados con crioblación. Se realizó diagnóstico molecular en el Instituto Nacional de Cancerología. En el CMN 20 de Noviembre ISSSTE se realizó USG para valoración hepática, pancreática, renal, testicular; audiometría; TAC de cráneo; valoración por nefrología y endocrinología normales. Se ofreció estudio molecular en el resto de la familia. El paciente II-1 de 42 años de edad no ha recibido las valoraciones correspondientes, reporte verbal de hemangioblastoma en ojo izquierdo, niega otra sintomatología. La paciente II-5 inicio manifestaciones clínicas a los 31 años de edad con quistes renales, a los 37 años quistes pancreáticos, presenta HAS irregular y cefaleas ocasionales. Las pacientes III-2, III-3, III-7 y III-8 no han presentado manifestaciones clínicas.

Familia 2

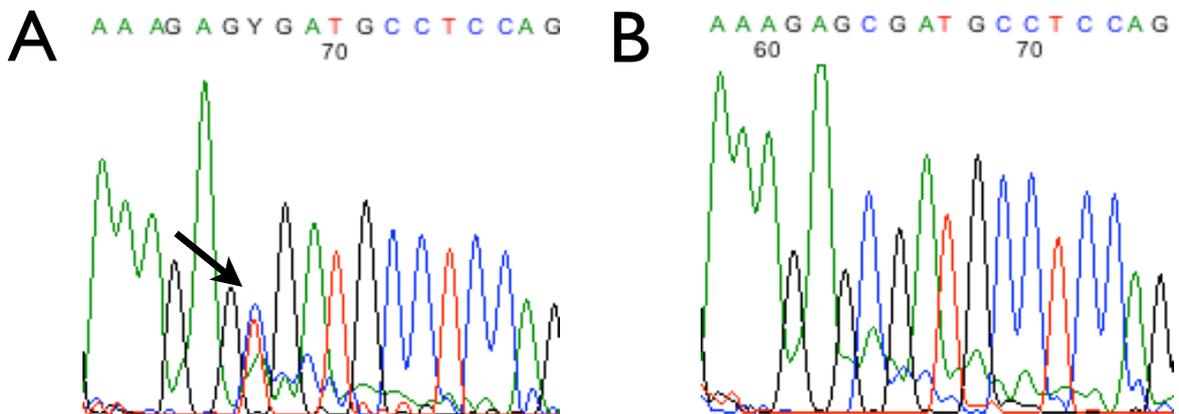
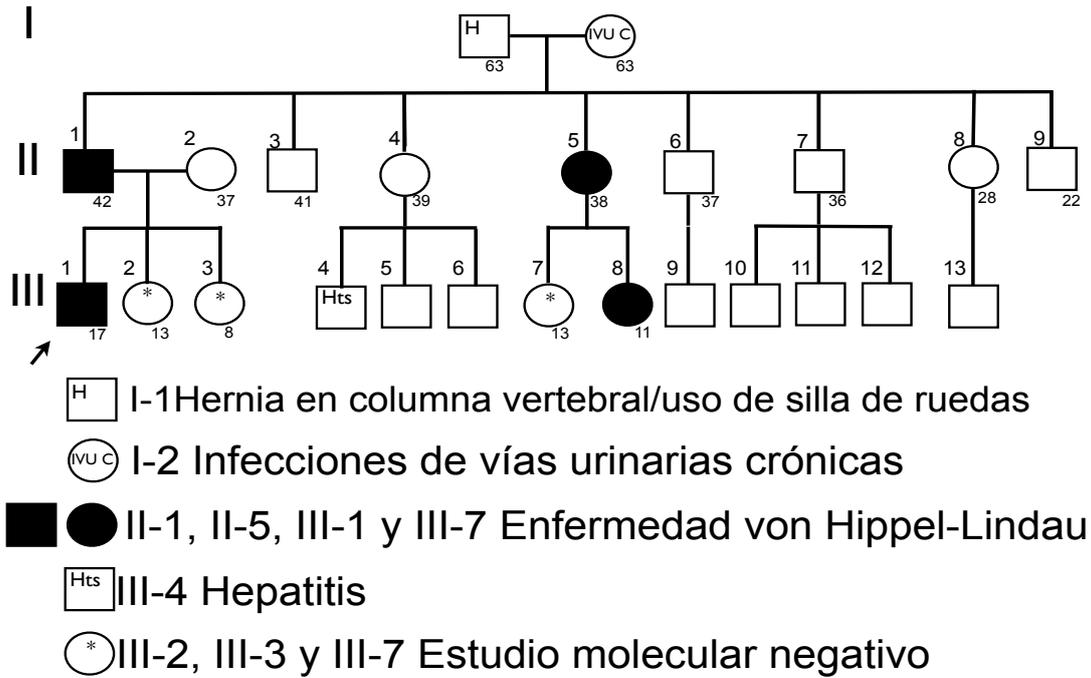
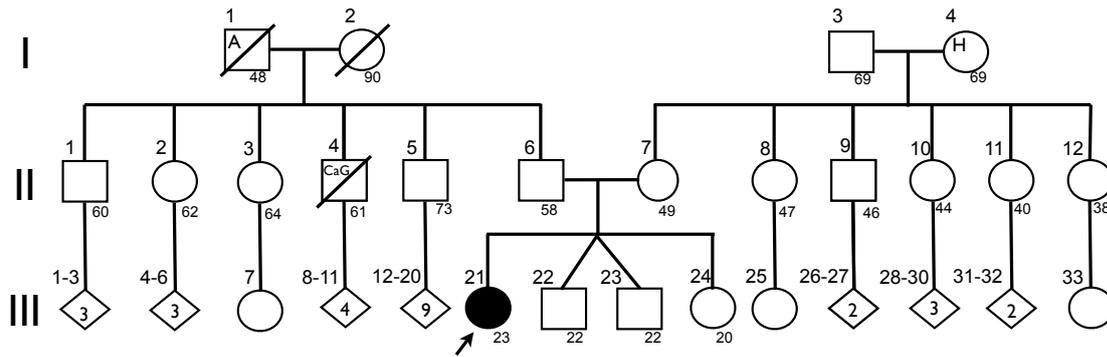


Figura 7 : Árbol genealógico de la familia 2. En el panel A se muestra el electroferograma de la paciente II-5 en el cual se muestra la heterocigosidad C>T (flecha), que provoca el cambio de codón; en el panel B se muestra el electroferograma de la paciente II-7 en el cual se muestra la secuencia silvestre. La mutación sin sentido encontrada en la paciente fue descrita por primera por Crossey et al., (1994).

FAMILIA 3

Caso índice (Paciente III-21) femenino de 23 años de edad al momento de la primer consulta originaria y residente de Tampico, Tamaulipas. Inicia padecimiento a los 16 años de edad con disminución de la agudeza visual en ojo derecho, tratada con laser. En enero de 2009 se realiza IRM con reporte de tumor cerebelar izquierdo de 18mm de diámetro, En febrero de 2009 disminución de agudeza visual ojo izquierdo, acompañada de náusea, vómito y somnolencia, se realiza IRM, se reportan datos de hidrocefalia, se coloca válvula de derivación ventriculoperitoneal. IRM en mayo de 2010, con lesión tumoral hipointensa en la región pineal que se extiende a mesencéfalo hasta la cisterna, resección quirúrgica en julio de 2010, con estudio histopatológico descrito como hemangioblastoma. No existen datos clínicos de la enfermedad en otros integrantes de la familia.

Familia 3



I-1 Anemia

I-4 Hemiparesia

II-4 Cáncer de garganta

III-21 Enfermedad von Hippiel-Lindau
Hemangioblastoma cerebelar

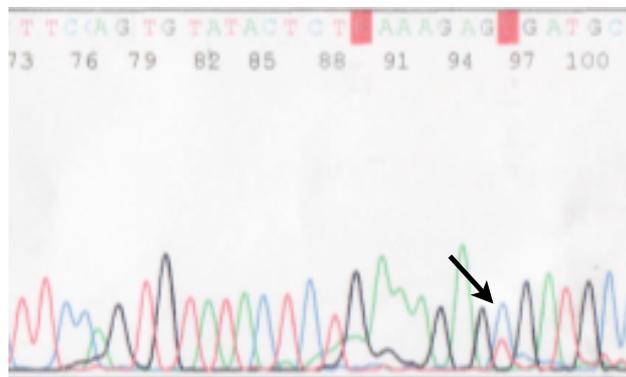


Figura 7. Árbol genealógico de la familia 3. En el panel inferior se muestra el electroferograma de la paciente III-21 en el cual se muestra la heterocigosidad C>T (flecha, que provoca el cambio de codón. La mutación encontrada en la paciente fue descrita por primera vez en 1994 por Crossey et al., (1994).

A continuación se presenta una tabla que resume las características clínicas y moleculares de los pacientes analizados en el presente estudio. Se analizaron 11 casos de los cuales, 2 son de sexo masculino y 11 de sexo femenino.

PACIENTE	SEXO	EDAD PRIMERA CONSULTA / EDAD PRIMERA MANIFESTACION	Mutación DNA	Cambio PROTEINA	MANIFESTACIONES CLINICAS
FAMILIA 1					
III-8	Fem	26/13	161_162 ins GGAGGCCG	p.69E>X	HR
III-10	Fem	24/13	161_162 ins GGAGGCCG	p.69E>X	HR, HC, HM
IV-1	Fem	Prenatal	Silvestre		Asintomática
FAMILIA 2					
II-1	Mas	42/40	c.481C>T	p.161R>X	HR
II-5	Fem	38/33	c.481C>T	p.161R>X	HR, QR, QP, HAS
III-1	Mas	17/13	c.481C>T	p.161R>X	HR
III-2	Fem	13/-	Silvestre		Asintomática
III-3	Fem	8/-	Silvestre		Asintomática
III-7	Fem	13/-	Silvestre		Asintomática
III-8	Fem	11/-	c.481C>T	p.161R>X	Asintomática
FAMILIA 3					
III-21	Fem	24/16	c.481C>T	p.161R>X	HR, HC

TABLA:3 Características clínicas y moleculares de los pacientes analizados. HR:Hemangioblastoma Retiniano. HC: Hemangioma cerebeloso. HM: Hemangioblastoma de medula espinal. QR: Quistes Renales. QP: Quistes Pancreáticos. HAS: Hipertension Arterial Sistémica.

Se ofreció diagnóstico molecular a todos los familiares de primer grado de los pacientes afectados, en todos los casos que no se cuenta con estudio molecular fue por que decidieron no participar en el estudio.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

El espectro mutacional de *VHL* es bastante amplio, hasta el momento se han descrito mas de 375 mutaciones (www.hgmd.org Human Genome Database) que involucran a la mayoría de los codones, solamente 26 codones no han reportado mutaciones, 25 de estos codones se encuentran en la región carboxilo terminal de pVHL. La región amino terminal esta presente solo en la isoforma p30 y la mayoría de las mutaciones presentes en esta región se pueden asociar con enfermedad. Los codones que nunca se han asociado a la enfermedad son 2,3,4,5,6,11,13,15,16,17,20,21,22,23,24,29,30,32 y 35 estos codones se presentan solamente en la isoforma p30. En la región carboxilo terminal de la proteína otros tres codones, el 201, 208 y 212 no han reportado mutaciones.

En el caso de la familia 1 se presenta la mutación en dos pacientes de sexo femenino, probablemente la madre (paciente II-7) presentaba la misma mutación en *VHL* por las manifestaciones clínicas que presentó, nuestro probando refiere que esta paciente falleció por complicaciones posquirurgicas por resección de un tumor cerebeloso, de la misma manera el paciente I-1 presenta características clínicas compatibles, además existen otros miembros de la familia cuyas manifestaciones clínicas sugieren el diagnóstico de la enfermedad *VHL* en los pacientes II-5, II-9, III-5 y III-7, lamentablemente nuestro caso índice no tiene los datos de contacto de estos pacientes por lo que no se ha podido realizar el diagnostico molecular.

En este caso familiar, se realizó diagnóstico prenatal, el cual es una técnica frecuente en países europeos así como en Estados Unidos, sin embargo en nuestro sistema de salud fue complicado realizar dicho procedimiento por cuestiones clínicas y burocráticas, resulta importante realizar una difusión de esta técnica como

herramienta diagnóstica en nuestra población para su uso futuro no solamente en la enfermedad VHL.

En la familia 2 se presentó una mutación sin sentido diagnosticada por primera vez en un paciente de 17 años, originario de Chiapas y derechohabiente del ISSSTE, se comunico al padre los resultados del estudio informándole que era necesario realizar el estudio en él y la madre del probando, así como en otros miembros de la familia de acuerdo a las características del árbol genealógico, lamentablemente en ese momento el padre no acepto el estudio para él y su esposa pero si envió al servicio a una hermana residente de Querétaro, la paciente II-5, se realizó el estudio en la paciente, el cual resultó con mutación en *VHL*, por tal motivo una vez que se le informo el resultado se pidió realizar el estudio en sus dos hijas, las pacientes III-7 y III-8, de las cuales una de ellas, la paciente III-8, también presento mutación en *VHL*, las pacientes son derechohabientes del IMSS por lo que su seguimiento se deberá realizar en dicha institución, sin embargo este no se ha llevado a cabo de manera óptima, lamentablemente en nuestro sistema de salud no existe la coordinación interinstitucional adecuada para el beneficio del paciente. Después de analizar este estudio molecular, nos comunicamos con el padre del caso índice para ofrecerle nuevamente el diagnóstico molecular, el paciente acepto y se presentó al servicio de Genética en compañía de su esposa y sus dos hijas, las pacientes III-2 y III-3, las cuales después de realizar el análisis genético no presentaron la mutación en *VHL*; llama la atención que en el padre, el paciente II-1 de 42 años de edad no se han presentado manifestaciones clínicas, pues se ha reportado una penetrancia elevada en nuestro gen de estudio. De acuerdo a las características clínicas, el paciente I-1 podría ser el portador de la mutación en este caso familiar, sin embargo este paciente no esta dispuesto a realizarse el diagnóstico molecular. Solamente la

familia del caso índice es derechohabiente del ISSSTE lo que ha complicado la valoración completa de este caso familiar. Los pacientes II-3 y II-4 se encuentran fuera del país, por lo que no es factible que se presenten en nuestro servicio para ofrecerles el estudio molecular. El paciente II-6 no cuenta con recursos para trasladarse a la ciudad de México, respecto al paciente II-7 no se tienen datos de contacto y los pacientes II-8 y II-9 no tienen interés en realizarse la prueba en este momento.

La familia 3 presenta un caso índice de 24 años, con inicio de las manifestaciones clínicas a los 16 años, sin embargo la paciente no ha sido informada que las manifestaciones clínicas que presenta compatibles con el diagnóstico de la enfermedad VHL, solo se ha presentado una vez al servicio de Genética y presentaba una depresión severa, nos comunicamos con los familiares de la paciente para solicitar la presencia de ambos padres junto con la paciente para realizar el asesoramiento genético y realizar el estudio molecular en ellos, los pacientes II-6 y II-7 de 58 y 47 años de edad respectivamente quienes se encuentran asintomáticos, lo que aunado a las características del árbol genealógico sugiere una mutación *de novo*, sin embargo consideramos oportuno realizar dichas valoraciones para descartar una penetrancia incompleta en alguno de los padres.

La Arginina en el codón 161 es un aminoácido conservado en múltiples especies de mamíferos y en otros organismo como el pollo, el pez zebra y la rana, forma parte del dominio de unión a elongina C. (Figura 8). Además de las mutaciones reportadas en la familia 2 y en la familia 3: p.161R>X, se han reportado mutaciones de sentido equivocado en este aminoácido, p.161R>Q (Chen et al., 1995), p.161R>P(Zbar et al., 1996) y p.161R>G(Glavac et al., 1996) (www.hgmd.org Human Genome Database). Resulta importante mencionar que la mutación encontrada en las familias

2 y 3 , fue reportada en población mexicana en un individuo de 32 años que presentó hemangioblastomas cerebelares y quistes pancreáticos y renales (Rasmussen et al., 2006). Las mutaciones en la Arginina 161, son la segunda localización mas frecuente de mutaciones reportada en casos de enfermedad, solamente detrás de Arginina 167(Barry & Krek 2004).

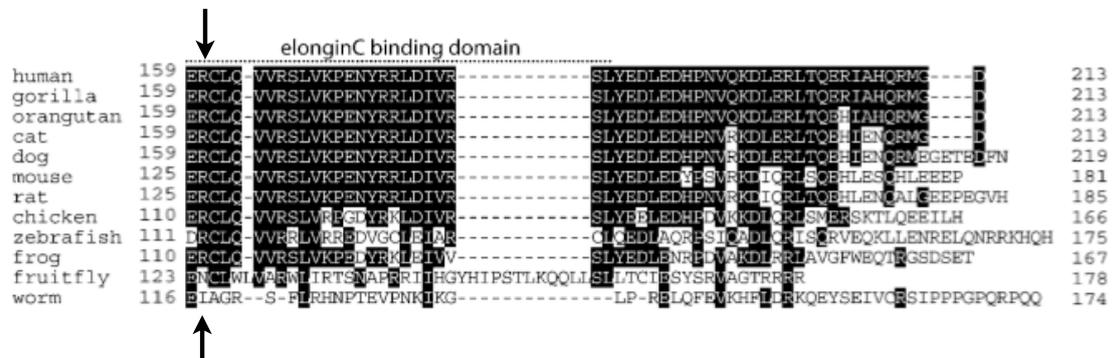


Figura 8. La secuencia codificante de VHL ha sido conservada a lo largo de la evolución, los residuos conservados se encuentran sombreados. Las flechas muestran a arginina en el codón 161. Los números de accesos que fueron usados para el alineamiento son los siguientes: H. sapiens (human) ENSP00000256474; G. gorilla (gorilla) ENSGGOP00000010193; P. pygmaeus (orangutan) ENSPPYP00000015275; M. musculus (mouse) ENSMUSP00000039418; R. norvegicus (rat) ENSRNOP00000013727; C. familiaris (dog) ENSCAFP00000007687; F. catus (cat) ENSFCAP00000010437; G. gallus (chicken) ENSGALP00000013663; D. rerio (zebrafish) ENSDARP000000094654; X. tropicalis (frog) ENSXETP00000003053; C. elegans (worm) F08G12.4; D. melanogaster (fruit fly) FBpp0087216. Modificado de HUMAN MUTATION, Vol. 31, No. 5, 521 – 537, 2010.

De esta manera después del análisis de las tres familias, constatamos la variedad en la expresión clínica de la enfermedad VHL así como la variedad en el abordaje clínico de cada familia, el diagnóstico prenatal y la dificultad para comunicarse con el resto de los familiares en el caso de la familia 1; la negativa por parte de algunos miembros de la familia 2 para participar en el estudio y las consecuencias de un mal asesoramiento en el caso de la familia 3. De tal manera los fenómenos clínicos, burocráticos, sociales y psicológicos son un elemento importante a considerar para el diagnóstico y seguimiento de los pacientes con enfermedad VHL.

En las familias analizadas encontramos dos mutaciones diferentes, una inserción que modifica el marco de lectura provocando un codón de paro prematuro que no ha sido reportada en la literatura y una mutación sin sentido en dos familias no relacionadas, esta mutación fue descrita por primera vez en 1994 en población

Europea. Aun queda por investigar si estas mutaciones son comunes en la población mexicana así como las características clínicas y edad de inicio que se presentan en nuestra población comparándolas con lo reportado en otras poblaciones (Tabla 4).

	Frecuencia (porcentaje)	Edad de inicio (rango)
Sistema Nervioso Central		
Hemangioblastoma craneoespinal	69%	29 (9-78)
Tumores de saco endolinfático	10%	22 (12-50)
Hemangioblastoma de retina	47%	25 (1-67)
Órganos		
Feocromocitoma	13%	30 (5-58)
Tumores de islotes pancreáticos	42%	36 (5-70)
Carcinoma renal de células claras	30%	39 (16-67)
Adenoma de epidídimo	42%	Desconocido
Adenoma de ligamento ancho	Desconocido	Desconocido

Tabla 4. Frecuencia de tumores y edad de inicio (Modificado de Barry et al. 2004)

La identificación de las mutaciones que causan la enfermedad VHL ya sea en casos familiares o de forma esporádica permite el diagnóstico temprano en el caso de familiares jóvenes que pueden presentar la mutación y desarrollar la enfermedad. Esta información es muy importante no solo para el adecuado asesoramiento genético sino también para el desarrollo de un plan para el paciente que permita la vigilancia oportuna de otras manifestaciones asociadas a la enfermedad con el objetivo de mejorar el tratamiento y pronóstico. Los pacientes jóvenes asintomáticos que presentan mutaciones en *VHL* detectados en este estudio deben ser valorados por ultrasonido abdominal u otras técnicas de imagen como TAC o IRM, una evaluación clínica que incluya valoración neurológica, valoración oftalmológica, medición de presión arterial, medición de metabolitos de catecolaminas (Meister et al., 2009) (Tabla 5). El diagnóstico molecular además permitirá el uso óptimo de los recursos, tanto humanos como físicos de los institutos de salud, una vez que se determina quienes son los pacientes jóvenes que presentan mutaciones, solo en ellos se llevara la vigilancia descrita.

Estudio	Primera valoración	Periodicidad
Catecolaminas urinarias	2 años	Anual o bianual
Oftalmoscopia	Infancia	Anual
IRM cerebro y medula	Desde los 11 años Después de los 60 años	Bianual Cada 3 – 5 años
USG abdominal	Desde los 11 años	Anual
TAC abdominal	Desde los 20 años	Anual o bianual

TABLA 5: Evaluación y seguimiento de los pacientes con enfermedad de von Hippel-Lindau. Modificado de Meister et al. 2009. Basado en la norma del Instituto Nacional de Salud USA

En los últimos 15 años han existido grandes cambios en el manejo de la enfermedad VHL, el seguimiento y los programas para detectar tumores renales, oftalmológicos y de sistema nervioso central presintomáticos ha sido un abordaje adoptado ampliamente por los servicios de salud, así mismo, han aumentado los procedimientos quirúrgicos conservadores (Ong et al., 2007). El presente estudio ilustra la relevancia del análisis genético en todos los pacientes con manifestaciones clínicas o historia familiar de la enfermedad que puedan ser portadores de mutaciones en *VHL*. La oportuna identificación de portadores asintomáticos permitirá una evaluación por un grupo médico multidisciplinario lo que evitara procedimientos invasivos y costosos en los pacientes no portadores, es importante para el Genetista tener una relación adecuada con los servicios de Oftalmología, Neurología, Neurocirugía, Otorrinolaringología, Endocrinología, Urología, Nefrología, Patología y/o Radiología principalmente con el objetivo de difundir las características de la enfermedad y realizar un diagnóstico oportuno que limite en lo posible la morbilidad y mortalidad en el paciente. La optimización de recursos es importante en sistemas de salud como el que presenta México, donde la limitación de dichos recursos es una consideración de suma importancia a tomar en cuenta.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Al-Sobhi S, Peschel R, Zihak C, Bartsch G, Neumann H & Janetschek G. 2002. Laparoscopic partial adrenalectomy for recurrent pheochromocytoma after open partial adrenalectomy in von Hippel-Lindau disease. *Journal of Endourology* 16(3): 171–174.
- Assadi F & Brackbill EL. 2003. Bilateral pheochromocytomas and congenital anomalies associated with a de novo germline mutation in the von Hippel-Lindau gene. *American Journal of Kidney Diseases* 41(1): E3.
- Barontini M, Levin G & Sanso G. 2006. Characteristics of pheochromocytoma in a 4- to 20-year-old population. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1073: 30–37.
- Barotini M & Dahia P. 2010. VHL Disease. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 24 : 401–413
- Barry, R. & K. Wilhelm. 2004. The von Hippel–Lindau tumour suppressor: a multi-faceted inhibitor of tumourigenesis. *TRENDS in Molecular Medicine*. 10(9): 467-472
- Bausch B, Boedeker CC, Berlis A, Brink I, Cybulla M, Walz MK et al. 2006. Genetic and clinical investigation of pheochromocytoma: a 22-year experience, from Freiburg, Germany to international effort. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1073: 122–137.
- Blansfield JA, Choyke L, Morita SY, Choyke PL, Pingpank JF, Alexander HR et al. 2007. Clinical, genetic and radiographic analysis of 108 patients with von Hippel-Lindau disease (VHL) manifested by pancreatic neuroendocrine neoplasms (PNETs). *Surgery* 142(6): 814–818. discussion 8 e1–2.
- Bratslavsky G, Liu JJ, Johnson AD, Sudarshan S, Choyke PL, Linehan WM et al. 2008. Salvage partial nephrectomy for hereditary renal cancer: feasibility and outcomes. *The Journal of Urology* 179(1): 67–70.
- Butman JA, Kim HJ, Baggenstos M, Ammerman JM, Dambrosia J, Patsalides A et al. 2007. Mechanisms of morbid hearing loss associated with tumors of the endolymphatic sac in von Hippel-Lindau disease. *Journal of the American Medical Association* 298(1): 41–48.
- Chacon-Camacho, O., Rodriguez-Dennen, F., Camacho-Molina, A., Rasmussen, A., Alonso-Vilatela, E & J. Zenteno. 2010 Clinical and molecular features of familial and sporadic cases of von Hippel – Lindau disease from Mexico *Clinical and Experimental Ophthalmology* 38: 277-283
- Cho EA, Patterson LT, Brookhiser WT, Mah S, Kintner C & Dressler GR. 1998. Differential expression and function of cadherin-6 during renal epithelium development. *Development* 125(5): 803–812.
- Choueiri TK, Bukowski RM & Rini BI. 2006. The current role of angiogenesis inhibitors in the treatment of renal cell carcinoma. *Seminars in Oncology* 33(5): 596–606.
- Crossey PA, Richards FM, Foster K, Green JS, Prowse A, Latif F, Lerman MI, Zbar B, Affara NA, Ferguson-Smith MA,. 1994. Identification of intragenic mutations in the von Hippel-Lindau disease tumour suppressor gene and correlation with disease phenotype. *Hum Mol Genet.*;3(8):1303-8.
- Dahia PL, Ross KN, Wright ME, Hayashida CY, Santagata S, Barontini M et al. 2005. A HIF1alpha regulatory loop links hypoxia and mitochondrial signals in pheochromocytomas. *PLoS Genetics*. 1(1): 72–80.
- Dahia PL. 2006. Evolving concepts in pheochromocytoma and paraganglioma. *Current Opinion in Oncology* 18(1): 1–8.
- Eisenhofer G, Walther MM, Huynh TT, Li ST, Bornstein SR, Vortmeyer A et al. 2001. Pheochromocytomas in von Hippel-Lindau syndrome and multiple endocrine neoplasia type 2 display distinct biochemical and clinical phenotypes. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 86(5): 1999–2008.

Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA, Hewitson KS, O'Rourke J, Mole DR et al. 2001. C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell*. 2001. 107(1): 43–54.

Esteban MA, Tran MG, Harten SK, Hill P, Castellanos MC, Chandra A et al. 2006. Regulation of E-cadherin expression by VHL and hypoxia-inducible factor. *Cancer Research* 66(7): 3567–3575.

Ferragut J, Caimari M, Rituerto B, Gomez-Rivas B, Herrera M & Alonso F. 1999. Pheochromocytoma and clear-cell renal carcinoma in a child with von Hippel-Lindau disease: a patient report. *Journal of Pediatric Endocrinology & Metabolism* 12(4): 579–582.

Glasker S, Bender BU, Apel TW, Natt E, van Velthoven V, Scheremet R et al. 1999. The impact of molecular genetic analysis of the VHL gene in patients with haemangioblastomas of the central nervous system. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*. 67(6): 758–762.

Gordan JD, Lal P, Dondeti VR, Letrero R, Parekh KN, Oquendo CE et al. 2008. HIF-alpha effects on c-Myc distinguish two subtypes of sporadic VHL-deficient clear cell renal carcinoma. *Cancer Cell*. 14(6): 435–446.

Guzy RD, Hoyos B, Robin E, Chen H, Liu L, Mansfield KD et al. 2005. Mitochondrial complex III is required for hypoxia-induced ROS production and cellular oxygen sensing. *Cell Metabolism* 1(6): 401–408.

Hammel PR, Vilgrain V, Terris B, Penforis A, Sauvanet A, Correas JM et al. 2000. Pancreatic involvement in von Hippel-Lindau disease. The Groupe Francophone d'Etude de la Maladie de von Hippel-Lindau. *Gastroenterology* 119(4): 1087–1095.

Hayden, M., Gephart, R., Kalanithi, P & Ch. Dean. 2009. Von Hippel-Lindau disease in pregnancy: A brief review. *Journal of Clinical Neuroscience*. 16 : 611–613.

Hes FJ, van der Luit RB, Janssen AL, Zewald RA, de Jong GJ, Lenders JW et al. 2007. Frequency of Von Hippel-Lindau germline mutations in classic and non-classic Von Hippel-Lindau disease identified by DNA sequencing, Southern blot analysis and multiplex ligation-dependent probe amplification. *Clinical Genetics* 72(2): 122–129.

Hoffman MA, Ohh M, Yang H, Klco JM, Ivan M & Kaelin Jr. WG. 2001. von Hippel-Lindau protein mutants linked to type 2C VHL disease preserve the ability to downregulate HIF. *Human Molecular Genetics*. 10(10): 1019–1027.

Human Genome Database www.hgmd.org

Kaelin Jr. WG. 2002. Molecular basis of the VHL hereditary cancer syndrome. *Nature Reviews. Cancer* Sep; 2(9): 673–682.

Kaelin Jr. WG. 2003. The von Hippel-Lindau gene, kidney cancer, and oxygen sensing. *Journal of the American Society of Nephrology* 14(11): 2703–2711.

Kaelin Jr. WG. 2004. The von Hippel-Lindau tumor suppressor gene and kidney cancer. *Clinical Cancer Research* Sep 15; 10(18 Pt 2): 6290S–6295S.

Kaelin Jr. WG. 2005. ROS: really involved in oxygen sensing. *Cell Metabolism* 1(6): 357–358.

Kaelin WG. 2007. Von Hippel-Lindau disease. *Annual Review of Pathology*. 2: 145–173.

Kaelin Jr. WG. 2008. The von Hippel-Lindau tumour suppressor protein: O₂ sensing and cancer. *Nature Reviews. Cancer* 8(11): 865–873.

Langrehr JM, Bahra M, Kristiansen G, Neumann HP, Neumann LM, Plockinger U et al. 2007. Neuroendocrine tumor of the pancreas and bilateral adrenal pheochromocytomas. A rare manifestation of von Hippel-Lindau disease in childhood. *Journal of Pediatric Surgery* 42(7): 1291–94.

- Lee S, Nakamura E, Yang H, Wei W, Linggi MS, Sajan MP et al. 2005. Neuronal apoptosis linked to EglN3 prolyl hydroxylase and familial pheochromocytoma genes: developmental culling and cancer. *Cancer Cell*. 8(2): 155–167.
- Lonser RR, Glenn GM, Walther M, Chew EY, Libutti SK, Linehan WM et al. 2003 .von Hippel-Lindau disease. *Lancet Jun 14*; 361(9374): 2059–2067.
- Lonser RR, Kim HJ, Butman JA, Vortmeyer AO, Choo DI & Oldfield EH. 2004. Tumors of the endolymphatic sac in von Hippel- Lindau disease. *The New England Journal of Medicine* 350(24): 2481–2486.
- Maddock IR, Moran A, Maher ER, Teare MD, Norman A, Payne SJ et al. 1996. A genetic register for von Hippel-Lindau disease. *Journal of Medical Genetics* 33(2): 120–127.
- Maher ER & Kaelin Jr. WG. 1997. von Hippel-Lindau disease. *Medicine (Baltimore)*; 76(6): 381–391.
- Maher ER & Eng C. 2002.The pressure rises: update on the genetics of phaeochromocytoma. *Human Molecular Genetics*. 11(20): 2347–2354.
- Maxwell PH & Ratcliffe PJ. 2002. Oxygen sensors and angiogenesis. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 13(1): 29–37.
- McCabe CM, Flynn Jr. HW, Shields CL, Shields JA, Regillo CD, McDonald HR et al. 2000. Juxtapapillary capillary hemangiomas. Clinical features and visual acuity outcomes. *Ophthalmology* 107(12): 2240–2248.
- Meister M, Choyke P, Anderson C, Patel U. 2009. Radiological evaluation, management, and surveillance of renal masses in Von Hippel-Lindau disease. *Clinical Radiology* .64:589-600
- Mukhopadhyay B, Sahdev A, Monson JP, Besser GM, Reznick RH & Chew SL. 2002. Pancreatic lesions in von Hippel-Lindau disease. *Clinical Endocrinology* 57(5): 603–608. 26.
- Muzumdar, D., Goel, A., Fatterpurkar, N. & N. Goel. 2006. Endolymphatic sac carcinoma of the right petrous bone in Von Hippel-Lindau disease. *Journal of Clinical Neuroscience*. 13 : 471–474
- Neumann HP, Eggert HR, Weigel K, Friedburg H, Wiestler OD & Schollmeyer P. 1989. Hemangioblastomas of the central nervous system. A 10-year study with special reference to von Hippel-Lindau syndrome. *Journal of Neurosurgery*. 70(1): 24–30.
- Neumann HP, Bausch B, McWhinney SR, Bender BU, Gimm O, Franke G et al. 2002. Germ-line mutations in nonsyndromic pheochromocytoma. *The New England Journal of Medicine* 346(19): 1459–1466.
- Nordstrom-O'Brien M, van der Luijt R, van Rooijen E, Ans M. van den Ouweland, Danielle F. Majoor-Krakauer, Martijn P. Lolkema, van Brussel A, Voest E Rachel H. Giles. 2010. Genetic Analysis of von Hippel-Lindau Disease *HUMAN MUTATION*, Vol. 31, No. 5, 521 – 537.
- Ohh M, Yauch RL, Lonergan KM, Whaley JM, Stemmer-Rachamimov AO, Louis DN et al. 1998. The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein is required for proper assembly of an extracellular fibronectin matrix. *Molecular Cell*. 1(7): 959– 968.
- Ong KR, Woodward ER, Killick P, Lim C, Macdonald F & Maher ER. 2007. Genotype-phenotype correlations in von Hippel-Lindau disease. *Human Mutation* 28(2): 143–149.
- Qin Y, Buddavarapu K & Dahia PL. 2009. Pheochromocytomas: from Genetic Diversity to New Paradigms. *Hormone and Metabolic Research* 41(9): 664–671.
- Rasmussen, A., Nava-Salazar, S., Yescas, P., Alonso, E., Revuelta, R., Ortiz, I., Canizales-Quinteros, S., Tusie-Luna, M & M. Lopez-Lopez. 2006 *Von Hippel – Lindau disease* germline mutations in Mexican patients with cerebellar hemangioblastoma. *J Neurosurg* 104:389-394

- Reddy VS, O'Neill Jr. JA, Holcomb 3rd GW, Neblett 3rd WW, Pietsch JB, Morgan 3rd WM et al. 2000. Twenty-five-year surgical experience with pheochromocytoma in children. *The American Surgeon* 66(12): 1085–1091. discussion 92.
- Reichardt P, Apel TW, Domula M, Trobs RB, Krause I, Bierbach U et al. 2002. Recurrent polytopic chromaffin paragangliomas in a 9-year-old boy resulting from a novel germline mutation in the von Hippel-Lindau gene. *Journal of Pediatric Hematology/ Oncology* 24(2): 145–148.
- Russell RC & Ohh M. 2007. The role of VHL in the regulation of E-cadherin: a new connection in an old pathway. *Cell Cycle* 6(1): 56–59.
- Santarpia L, Sarlis NJ, Santarpia M, Sherman SI, Trimarchi F & Benvenga S. 2007. Mosaicism in von Hippel-Lindau disease: an event important to recognize. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 11(6): 1408–1415.
- Shuin T, Yamasaki I, Tamura K, Okuda H, Furihata M & Ashida S. 2006. Von Hippel-Lindau disease: molecular pathological basis, clinical criteria, genetic testing, clinical features of tumors and treatment. *Japanese Journal of Clinical Oncology* 36(6): 337–343.
- Singh AD, Nouri M, Shields CL, Shields JA & Smith AF. 2001. Retinal capillary hemangioma: a comparison of sporadic cases and cases associated with von Hippel-Lindau disease. *Ophthalmology* 108(10): 1907–1911.
- Singh AD, Nouri M, Shields CL, Shields JA & Perez N. 2002. Treatment of retinal capillary hemangioma. *Ophthalmology* 109(10): 1799–1806.
- Stéphane, R. Graff, J., Lindau, J. & F. Resche. 2004. Von Hippel-Lindau disease. *Lancet*. 363: 1231-1234
- Thoma CR, Frew IJ, Hoerner CR, Montani M, Moch H & Krek W. 2007. pVHL and GSK3beta are components of a primary cilium- maintenance signalling network. *Nature Cell Biology*. 9(5): 588–595.
- Thoma CR, Toso A, Gutbrodt KL, Reggi SP, Frew IJ, Schraml P et al. 2009. VHL loss causes spindle misorientation and chromosome instability. *Nature Cell Biology*. 2009 Aug; 11(8): 994–1001.
- Wanebo JE, Lonser RR, Glenn GM & Oldfield EH. 2003. The natural history of hemangioblastomas of the central nervous system in patients with von Hippel-Lindau disease. *Journal of Neurosurgery*. 98(1): 82–94.
- William, G. & Jr. Kaelin 2003. The von Hippel±Lindau tumor suppressor protein: new insights into oxygen sensing and cancer. *Current Opinion in Genetics & Development*. 13:55-60.
- William, G. & Jr. Kaelin. 2005. The von Hippel–Lindau protein, HIF hydroxylation, and oxygen sensing. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 338 : 627–638.
- Yang JC, Haworth L, Sherry RM, Hwu P, Schwartzentruber DJ, Topalian SL et al. 2003. A randomized trial of bevacizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antibody, for metastatic renal cancer. *The New England Journal of Medicine* 349(5): 427–434.
- Young AP, Schlisio S, Minamishima YA, Zhang Q, Li L, Grisanzio C et al. 2008. VHL loss actuates a HIF-independent senescence programme mediated by Rb and p400. *Nature Cell Biology* 10(3): 361–369.
- Zbar B. Von Hippel-Lindau disease and sporadic renal cell carcinoma. *Cancer Surveys* 1995; 25: 219–23

APENDICE A
FORMATOS DE CONSENTIMIENTO INFORMADO



**CENTRO MEDICO NACIONAL “20 DE NOVIEMBRE ISSSTE”
GENÉTICA MÉDICA**

**“ANALISIS GENETICO DEL SINDROME VON HIPPEL – LINDAU EN TRES
FAMILIAS MEXICANAS”**

**CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO
(MAYOR DE EDAD)**

México, D. F., a ____ de _____ de 20_____.

Por medio de la presente hago constar que yo: _____ de manera libre y voluntaria estoy de acuerdo en participar en el proyecto **“ANALISIS GENETICO DEL SINDROME VON HIPPEL – LINDAU EN TRES FAMILIAS MEXICANAS”** que se lleva a cabo en el Centro Médico Nacional 20 de Noviembre ISSSTE en el periodo comprendido del 1 de enero de 2011 al 30 de agosto de 2011. Se me ha explicado que para la realización del estudio, se requiere una muestra de sangre periférica de 2 ml tomada por personal calificado y bajo todas las medidas de seguridad, como son el uso de equipo estéril y desechable, así como el uso de guantes. También se me ha informado de las complicaciones de la punción vascular como puede ser el cambio de coloración en la piel “moreton” (hematoma).

De igual forma, me han informado que de esta muestra se obtendrá el material genético (DNA) y de éste se analizarán regiones(genes) que pueden ser las responsables del síndrome Von Hippel - Lindau. Se me ha explicado, que la justificación del presente estudio es para conocer las causas genéticas de la enfermedad y la probabilidad de que esta se repita en otros miembros de mi familia, lo que permitiría una valoración oportuna de acuerdo a la evolución de la enfermedad.

Entiendo que los datos personales en el estudio serán mantenidos en estricta confidencialidad y no será compartida con terceros como empleadores, aseguradoras, escuelas, otros familiares, etc., si no es con mi autorización expresa y por escrito. Sin embargo, autorizo que la información necesaria para el análisis de los resultados, pueda ser evaluada y revisada por los médicos e investigadores del presente proyecto. De igual forma, se me ha asegurado que toda la información clínica recabada para el presente proyecto, quedará resguardada bajo llave al igual que los datos clínicos y genéticos en archivos electrónicos. Sólo los investigadores responsables del proyecto tendrán la llave y la clave de acceso a esta información para preservar la confidencialidad.

Se me ha informado que la muestra de DNA quedará codificada bajo una clave que no incluya mi nombre y datos clínicos en el contenedor de dicha muestra, y ésta quedará bajo el resguardo por el Dr. Juan Carlos Zenteno Ruíz, una vez terminado el análisis genético, la muestra será desechada de acuerdo a los protocolos descritos en la norma oficial mexicana vigente. Así mismo se me ha explicado que los resultados pueden ser presentados en publicaciones o en foros académicos preservando siempre la confidencialidad de la información derivada.



**CENTRO MEDICO NACIONAL "20 DE NOVIEMBRE ISSSTE"
GENÉTICA MÉDICA**

**"ANALISIS GENETICO DEL SINDROME VON HIPPEL – LINDAU EN TRES
FAMILIAS MEXICANAS"**

**CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO
(MENOR DE EDAD)**

México, D. F., a ____ de _____ de 20 ____.

Por medio de la presente hago constar que yo:

madre/padre de _____ de manera libre y voluntaria estoy de acuerdo en que mi hijo(a) participe en el proyecto **"ANALISIS GENETICO DEL SINDROME VON HIPPEL – LINDAU EN TRES FAMILIAS MEXICANAS"** que se lleva a cabo en el Centro Médico Nacional 20 de Noviembre ISSSTE en el periodo comprendido del 1 de enero de 2011 al 30 de agosto de 2011. Se me ha explicado que para la realización del estudio, se requiere una muestra de sangre periférica de 2 ml. tomada por personal calificado y bajo todas las medidas de seguridad, como son el uso de equipo estéril y desechable, así como el uso de guantes. También se me ha informado de las complicaciones de la punción vascular como puede ser el cambio de coloración en la piel "moreton" (hematoma).

De igual forma, me han informado que de esta muestra se obtendrá el material genético (DNA) y de éste se analizarán regiones (genes) que pueden ser las responsables del síndrome Von Hippel - Lindau. Se me ha explicado, que la justificación del presente estudio es para conocer las causas genéticas de la enfermedad y la probabilidad de que esta se repita en otros miembros de mi familia, lo que permitiría una valoración oportuna de acuerdo a la evolución de la enfermedad.

Entiendo que los datos personales de mi hijo(a) en el estudio serán mantenidos en estricta confidencialidad y no será compartida con terceros como empleadores, aseguradoras, escuelas, otros familiares, etc., si no es con mi autorización expresa y por escrito. Sin embargo, autorizo que la información necesaria para el análisis de los resultados, pueda ser evaluada y revisada por los médicos e investigadores del presente proyecto. De igual forma, se me ha asegurado que toda la información clínica e impresa de mi hijo recabada para el presente proyecto, quedará resguardada bajo llave al igual que los datos clínicos y genéticos en archivos electrónicos. Sólo los investigadores responsables del proyecto tendrán la llave y la clave de acceso a esta información para preservar la confidencialidad.

Se me ha informado que la muestra de DNA quedará codificada bajo una clave que no incluya el nombre de mi hijo(a) y ésta quedará bajo resguardo por el Dr. Juan Carlos Zenteno Ruíz, una vez terminado el análisis genético, la muestra será desechada de acuerdo a los protocolos descritos en la norma oficial mexicana vigente. Así mismo se me ha explicado que los resultados pueden ser presentados en publicaciones o en foros académicos preservando siempre la confidencialidad de la información derivada.

