

T
1193

 XOCHIMILCO SERVICIOS DE INFORMACION
ARCHIVO HISTORICO

124234

1234

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



“CARACTERIZACIÓN CLÍNICA Y MOLECULAR DE ENFERMEDAD DE VON
HIPPEL LINDAU EN POBLACIÓN MEXICANA”

TESIS

Que para obtener el grado de
Doctora en Ciencias Biológicas

PRESENTA

ASTRID OLIVIA RASMUSSEN ALMARAZ

Comité Tutorial:

Directora: Dra. Marisol López López

Asesor: Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes

Asesor: Dr. Ramón Coral Vázquez

JUNIO /2006

"El Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACYT y además cuenta con apoyo del mismo Consejo, con el convenio PFP-20-93"

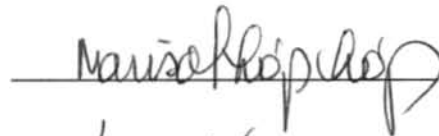
El jurado designado por las Divisiones de Ciencias Biológicas y de la Salud
de las Unidades Iztapalapa y Xochimilco
aprobó la tesis que presentó

ASTRID OLIVIA RASMUSSEN ALMARAZ

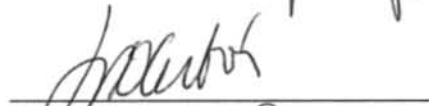
El día 6 de Junio del año de 2006

Jurado:


Directora: Dra. Marisol López López



Asesor: Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes



Asesor: Dr. Ramón Coral Vázquez



Sinodal: Dra María Elisa Alonso Vilatela



Sinodal: Dr. Héctor Fernando Serrano



DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS:

ÍNDICE

<u>NOMBRE DE LA SECCIÓN</u>	<u>NÚMERO DE PÁGINA</u>
RESUMEN	6
ABSTRACT	8
INTRODUCCIÓN	10
ANTECEDENTES	11
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	24
OBJETIVOS	25
HIPÓTESIS	25
MATERIAL Y MÉTODOS	26
RESULTADOS	33
DISCUSIÓN	45
CONCLUSIONES	50
BIBLIOGRAFIA	51
ANEXOS	
ANEXO 1	61
ANEXO 2	67
ANEXO 3	68
ANEXO 4	69
ANEXO 5	74

RESUMEN

Antecedentes: Los hemangioblastomas del sistema nervioso central (SNC) son tumores vasculares benignos que se presentan ya sea de manera esporádica o como una manifestación de la Enfermedad de von Hippel-Lindau (VHL), un síndrome de cáncer familiar. Nosotros estudiamos una serie de pacientes con hemangioblastomas del SNC y sus familiares, con el objetivo de identificar mutaciones germinales en el gen supresor tumoral *VHL*, y establecer un programa de diagnóstico predictivo y escrutinio para estas familias.

Métodos: Captamos de manera prospectiva, previo consentimiento informado, a los pacientes admitidos en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez en el periodo 2002-2004 con diagnóstico histopatológico confirmatorio de hemangioblastoma de cerebelo y/o médula espinal. Asimismo, se invitó a todos los familiares en riesgo a participar. El análisis de mutaciones en el gen *VHL* se realizó mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y secuenciación directa de DNA. Todos los portadores asintomáticos de mutaciones recibieron consejo genético y un programa de vigilancia de tumores.

Resultados: Se realizó diagnóstico molecular de noventa y ocho individuos: 23 sintomáticos y 75 asintomáticos, que pertenecían a 16 familias. Siete de las familias tenían criterios clínicos definitivos de enfermedad de VHL, cinco tenían hemangioblastomas esporádicos y cuatro tenían un hemangioblastoma del SNC además de signos viscerales menores. El diagnóstico molecular nos permitió identificar cinco mutaciones germinales en seis de las familias con diagnóstico definitivo de VHL (sensibilidad 85%), pero en ninguno de los casos posibles o esporádicos; cuatro de estas mutaciones han sido reportadas previamente en la

literatura, y una es una mutación novedosa que se identificó en dos familias no relacionadas entre sí. Después de que identificamos a todos los portadores de mutaciones en el gen *VHL*, se les realizó escrutinio clínico y de gabinete e identificamos lesiones asintomáticas asociadas a VHL en 43% de ellos.

Conclusiones: El diagnóstico molecular de mutaciones en el gen *VHL* es crucial para los pacientes con hemangioblastoma del SNC. La identificación oportuna de los portadores asintomáticos de la mutación permite la implementación de un protocolo de escrutinio multi-disciplinario, para disminuir la morbi-mortalidad de estos pacientes, a la vez que evita el uso de procedimientos costosos e invasivos en los no portadores.

ABSTRACT

Object: CNS hemangioblastomas are benign vascular tumors arising either sporadically or as a manifestation of von Hippel-Lindau disease (VHL), a hereditary cancer syndrome. We studied a series of patients with CNS hemangioblastomas and their families, in order to identify germline mutations in the *VHL* tumor suppressor gene, and to establish a predictive testing and scrutiny protocol.

Methods: Patients admitted during 2002-2004 at the INNN for hemangioblastoma were prospectively enrolled, together with their at risk family members. We performed the molecular analysis of the *VHL* gene by PCR and direct sequencing. All asymptomatic mutation-carriers underwent genetic counseling and tumor surveillance.

Results: Ninety-eight individuals were tested for VHL mutations: 23 symptomatic and 75 asymptomatic individuals, belonging to 16 families. Seven of the families had definite clinical criteria of VHL disease, five had sporadic hemangioblastoma and 4 had CNS hemangioblastoma plus minor visceral signs. Molecular genetic testing allowed us to identify five germline mutations in 6 of the definite VHL families (sensitivity 85%) but none in the possible VHL and sporadic hemangioblastoma cases; four of these mutations had been previously described and one is a novel mutation present in two unrelated families. After mutation-carriers were identified, they underwent clinical screening and asymptomatic VHL-related lesions were identified in 43% of them.

Conclusions: Genetic testing for mutations in the *VHL* gene is crucial in patients with CNS hemangioblastoma. The prompt identification of mutation carriers allows

a multi-disciplinary screening protocol to decrease morbidity and mortality in these patients, while avoiding costly and invasive procedures for non-carriers.

AMA
XORRRIICO SERVICIOS DE PROMOCION
ARCHIVO HISTORICO

INTRODUCCIÓN

El hemangioblastoma es el tumor primario intraxial de fosa posterior más común en adultos. De acuerdo a la literatura mundial, hasta 20% de los casos se presentan en relación con la enfermedad de Von Hippel-Lindau (VHL). Este padecimiento se caracteriza por la presentación de quistes, tumores vasculares y carcinomas multiorgánicos y constituye un síndrome clásico de susceptibilidad familiar al cáncer. El cáncer familiar constituye sólo 5-10% de las neoplasias, sin embargo, su relevancia radica en el elevado riesgo de múltiples tumores primarios en los afectados, y en la posibilidad que ofrece de identificar genes involucrados también en los procesos neoplásicos esporádicos (Garber y cols, 2005). La enfermedad de VHL se asocia a más de 305 diferentes mutaciones puntuales, deleciones o microdeleciones/inserciones germinales del gen *VHL* (Beroud y cols, 2006). Este es un gen supresor tumoral, localizado en el brazo corto del cromosoma 3 (3p25-26). El producto del gen es una proteína (pVHL) de 284 aminoácidos con un peso molecular de 18-23 kD que regula la angiogénesis y el ciclo celular. Las mutaciones en el gen *VHL* dan como resultado la estabilización de la transcripción de factores inducibles por hipoxia, tales como el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF). El aumento de estos factores angiogénicos bajo condiciones de normoxemia condiciona la aparición de las lesiones características de la enfermedad.

En nuestro país no existen reportes previos que indiquen la prevalencia, las características clínicas distintivas de la enfermedad, el protocolo de escrutinio, el seguimiento y el tratamiento, así como la estrategia experimental que permita confirmar el diagnóstico molecular de la enfermedad de VHL.

ANTECEDENTES

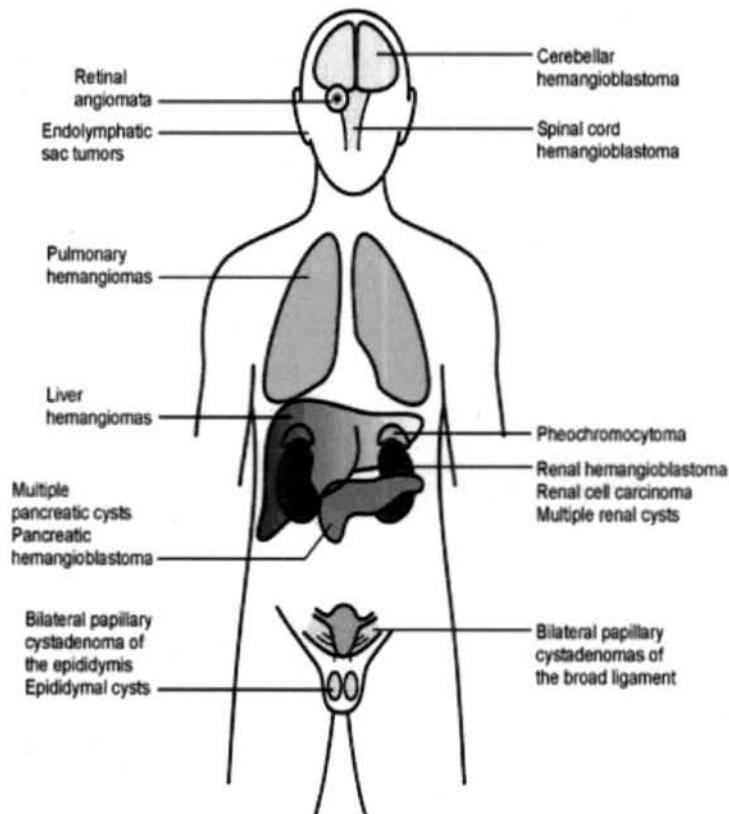
La Enfermedad o Síndrome de Von Hippel Lindau (SxVHL) (OMIM 193300) es un síndrome de cáncer familiar autosómico dominante, que confiere predisposición a una variedad de neoplasias tanto benignas como malignas, entre ellas: hemangioblastomas de cerebelo, retina y médula espinal, carcinoma de células renales, feocromocitomas y tumores pancreáticos. La base familiar del padecimiento se debe a la transmisión de mutaciones germinales en el gen supresor tumoral *VHL* localizado en la región 3p25.

En 1927 Lindau describió la conexión entre angiomas retinianos y lesiones del sistema nervioso central, y Cushing y Bailey (1928) reportaron el seguimiento a largo plazo de un paciente con todas las manifestaciones de la enfermedad. Por su parte, von Hippel había descrito dos pacientes en 1904, que cubrían los criterios diagnósticos de VHL (von Hippel, 1904). Los criterios diagnósticos vigentes se basan en la extensa revisión de casos realizada por Melmon y Rosen en 1964 y actualizada por Neumann en 1987.

Los síntomas cardinales de VHL son los angiomas retinianos y los hemangioblastomas del cerebelo (Neumann y cols, 1989). Los hemangioblastomas de la médula espinal, y los hemangiomas de glándula suprarrenal, pulmón e hígado son menos frecuentes. Otras manifestaciones clínicas incluyen quistes múltiples de páncreas y riñón, cistadenoma papilar de epidídimo, tumores renales tipo hipernefomas y feocromocitomas (Jennings y cols, 1988), y ocasionalmente tumores de islotes pancreáticos (Griffiths y cols, 1987). El cáncer renal metastático es la principal causa de mortalidad en estos pacientes. Otras complicaciones incluyen a la policitemia, que puede ser

secundaria ya sea a hemangioblastomas del cerebelo o a los hipernefromas; por otra parte la combinación de hipertensión más angiomas puede causar hemorragias subaracnoideas, y los tumores de saco endolinfático causan *tinnitus*, vértigo y pérdida auditiva (Manski y cols, 1997). [Figura 1].

Figura 1. Tumores asociados al Síndrome de von Hippel-Lindau.



Friedrich. Hum Mol Genet 2001;10(7):763-767.

De manera reciente, se identificó un nuevo síndrome asociado a mutaciones en el gen *VHL*. Pastore y cols, (2003) mostraron evidencia de que la causa más frecuente de policitemia congénita son las mutaciones puntuales del gen *VHL* en estado homocigoto o heterocigoto compuesto. Previamente, Ang y cols, (2000,

2002) habían mostrado ligamiento de la policitemia congénita tipo Chuvash (cuyo nombre se debe a su elevada frecuencia en Chuvashia-Federación Rusa) con 3p y posteriormente identificaron una mutación fundadora 598 C-T como la causa del padecimiento. La serie de Pastore incluyó pacientes de diversos orígenes étnicos, de los cuales más del 50% de los casos con policitemia congénita mas niveles elevados de eritropoyetina, tuvieron mutaciones puntuales en *VHL*. Cabe subrayar que, contrario a lo que ocurre con el síndrome VHL, el patrón de herencia de esta policitemia congénita (OMIM 263400) es autosómico recesivo y los pacientes no desarrollan los tumores asociados al síndrome de cáncer familiar (Pastore y cols, 2003). En la actualidad, se ha abandonado el término *Chuvash* del nombre de la policitemia, en virtud de que se han identificado una variedad de mutaciones en pacientes de diversos orígenes étnicos (Perrota y cols, 2006).

Por su parte, el síndrome de von Hippel-Lindau se transmite con un mecanismo de herencia autosómico dominante, encontrándose expresividad variable y ocasionalmente falta de penetrancia. Se estima que la incidencia, (por ejemplo en el noroeste de Inglaterra) es de 1 en 45 mil nacidos vivos. La aparición de los primeros síntomas se situó alrededor de los 26 años, en contraste con la edad promedio de diagnóstico que se situó en 31 años. La manifestación inicial es el hemangioblastoma cerebeloso hasta en un 35% de los pacientes. El seguimiento de los pacientes en un estudio reveló que el 60% desarrolló hemangioblastoma cerebeloso, 41% angioma retiniano, 25% carcinoma renal, 15% hemangioblastoma medular y 15% feocromocitoma; reportándose una edad promedio de mortalidad de 41 años, atribuible en el 48% de los casos a hemangioblastoma cerebeloso (Maddock y cols, 1996).

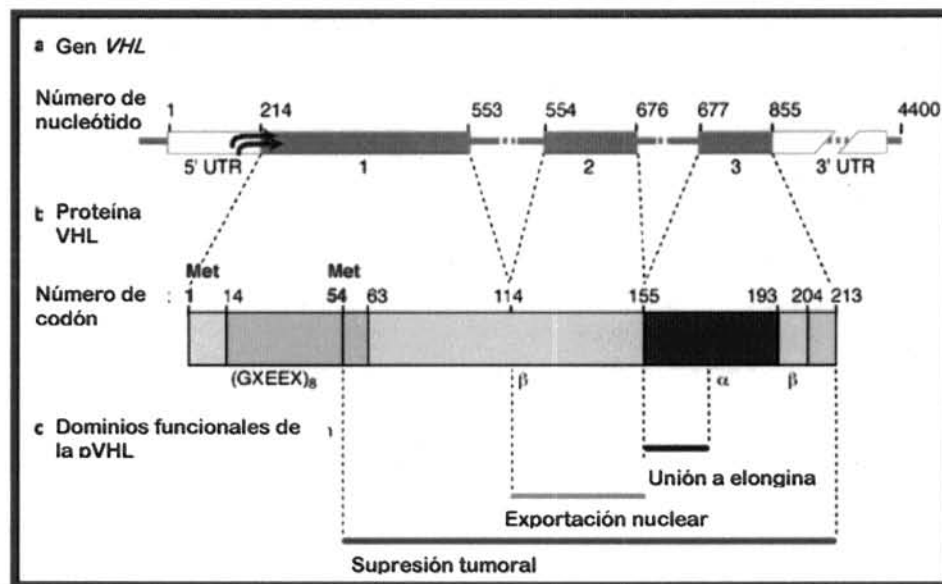
Asimismo, se ha descrito agregación familiar de algunas características de VHL, por ejemplo, la angiomatosis retiniana y el hemangioblastoma de sistema nervioso central que se presentan en la mayoría de las familias; mientras que las lesiones renales, pancreáticas o feocromocitoma generalmente no ocurren de manera simultánea (Neumann y Wiestler, 1991).

El diagnóstico clínico se basa en los criterios propuestos por Melmon y Rosen (1964) y modificados por Neumann (1987): son criterios mayores la presencia de hemangioblastomas múltiples o un hemangioblastoma más una lesión visceral mayor. En presencia de una historia familiar demostrativa (80% de los casos), una lesión mayor es suficiente para establecer el diagnóstico. Los pacientes con lesiones típicas pero historia familiar negativa se presumen portadores de una mutación *de novo*. Por otra parte, los quistes en páncreas, riñón y epidídimo son frecuentes en la población abierta, por lo cual representan un problema diagnóstico sobre todo cuando no existen otras lesiones clásicas, como los hemangioblastomas oculares y del sistema nervioso central (Seizinger y cols, 1991).

Inicialmente, el análisis de ligamiento utilizando marcadores polimórficos fue muy útil para la identificación de portadores en sujetos en riesgo debido a parentesco con un afectado (Glenn y cols, 1992). Actualmente, las técnicas moleculares permiten la identificación de la mutación causal en la gran mayoría de los casos, y por lo tanto, el diagnóstico clínico deberá ser confirmado mediante pruebas moleculares para mutaciones germinales del gen de VHL (Clinical Research Group for VHL in Japan, 1995; Choyke y cols, 1995; Beroud y cols, 2006).

El *locus* VHL se localiza en 3p26-p25 (Richards y cols, 1993); el gen, que consta de 852 nucleótidos distribuidos en 3 exones (Latif y cols, 1993) codifica para una proteína de aproximadamente 30kD y 213 aminoácidos (Iliopoulos y cols, 1995). El exón 2 presenta procesamiento alternativo, dando lugar a dos RNA mensajeros de 6 y 6.5 kb, respectivamente (Latif y cols, 1993). Ambos transcritos se expresan en tejidos adultos, sin embargo, parece ser que el transcrito pequeño no es totalmente funcional (Gnarra y cols, 1994). [Figura 2].

Figura 2. Esquema del gen *VHL*



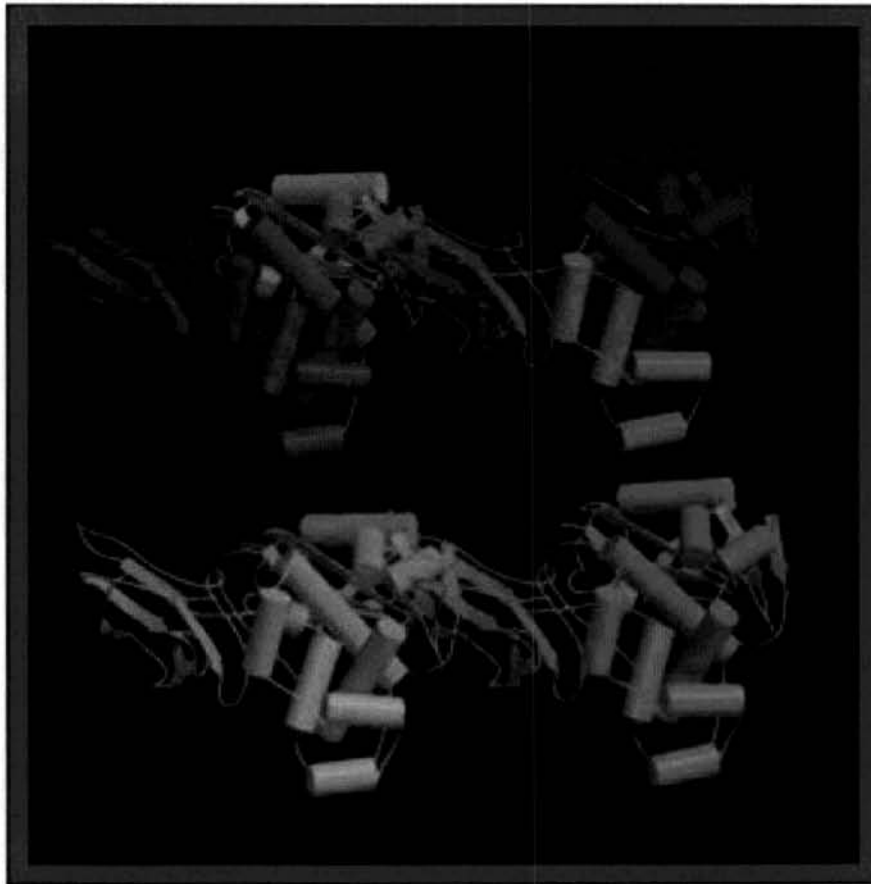
Modificado de Richards, *Exp Rev Mol Med* 2001.

El gen *VHL* funciona como un supresor tumoral recesivo; es decir, la inactivación de ambos alelos es un evento crítico en la formación de las neoplasias características del padecimiento (Crossey y cols, 1994). Esto ocurre cuando el individuo hereda una mutación germinal, y presenta pérdida de heterocigosidad (LOH) somática debido a delección o mutación puntual del alelo silvestre. Un estudio de pacientes con SxVHL ha mostrado LOH en 51% de los tumores informativos, provenientes de todas las estirpes celulares asociadas con las manifestaciones clínicas de la enfermedad, y en todos los casos se presentó delección del alelo silvestre. En 33% de los tumores sin LOH, se detectó silenciamiento del gen por hipermetilación (Prowse y cols, 1997; Versteeg y cols, 1997).

El papel de *VHL* en otros tumores ha sido poco explorado, sin embargo otros autores reportan pérdida alélica del gen *VHL* en 7 de 11 casos esporádicos de carcinoma de colon, pero ninguno en 8 pacientes con adenoma de colon; por lo que sugieren que la pérdida alélica del gen *VHL* es un evento tardío en la evolución de las neoplasias colónicas (Zhuang y col. 1996).

Mucho se ha discutido sobre cómo el gen *VHL* interviene en la supresión tumoral. Existe evidencia de que el producto del gen *VHL* es una proteína nuclear denominada pVHL [Figura 3].

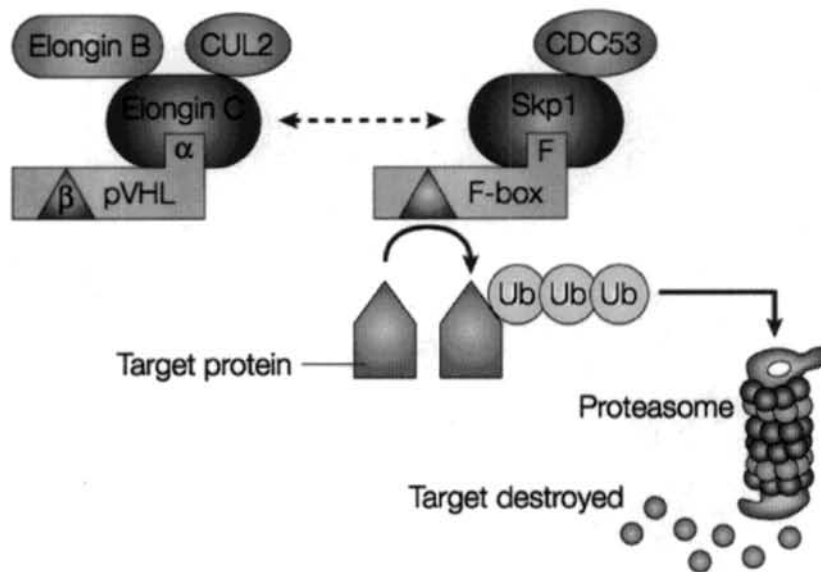
Figura 3. Estructura tridimensional de la proteína VHL (pVHL).



Swissprot database, 2006.

pVHL aparentemente tiene la capacidad de translocarse entre el núcleo y el citoplasma, y ejecutar sus funciones por medio de la formación de complejos multiproteicos específicos (Duan y cols, 1995). La proteína *VHL* parece tener una intervención importante en la transducción de señales generadas por cambios en la tensión de oxígeno (Iliopoulos y cols, 1996). El mecanismo bioquímico involucra la inhibición de la fase de elongación de la transcripción de genes blanco mediado por unión de pVHL con la elongina B (MIM 600787) y la elongina C (MIM 600788) (Kibel y cols, 1995). [Figura 4].

Figura 4. Interacciones de pVHL.



Kaelin. Nat Rev Cancer 2:673-682, 2002.

El RNAm del factor de crecimiento endotelial (VEGF) se encuentra sobre regulado en tumores asociados a VHL y la proteína pVHL silvestre inhibe la actividad promotora del VEGF. Una región del promotor VEGF de 144 pb es necesaria para la represión mediada por pVHL; este elemento de respuesta a VHL se une específicamente al factor de transcripción Sp1 (MIM 189906), lo que sugiere que la pérdida de inhibición por Sp1 puede ser un evento importante en la patogénesis de la enfermedad (Mukhopadhyay y cols, 1997).

Una característica esencial de las células normales y de células inmortalizadas en cultivo es el arresto de la progresión del ciclo celular al sufrir deprivación de plasma o pérdida de inhibición por contacto. La mayoría de las células neoplásicas carecen de esta característica y prosiguen su proliferación en ausencia de suero o en medios con alta densidad celular. Lo anterior se ha interpretado como un requisito para el proceso de transformación maligna.

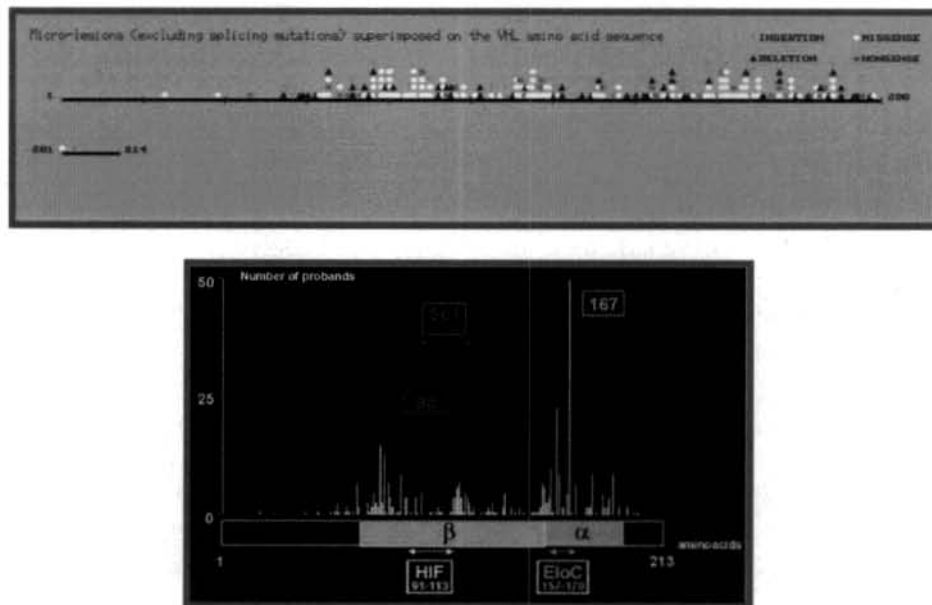
Algunos autores sugieren que la pérdida del alelo *VHL* silvestre resulta en un defecto celular del control de crecimiento dependiente de suero, mediado por el inhibidor de la cinasa dependiente de ciclina p27 (CDKN1B; MIM600778), evento que parece iniciar la transformación tumoral (Pause y cols, 1998). Entonces, *VHL* parece ser el primer supresor tumoral involucrado en la regulación del escape del ciclo celular, lo cual es consistente con su función de *gatekeeper* en el riñón.

La pVHL se expresa con niveles elevados en múltiples tejidos embrionarios del sistema urogenital, cerebro, médula espinal, ganglios sensitivos, ojos, y epitelio bronquial. Este patrón de expresión correlaciona con el patrón de manifestaciones clínicas (Richard y cols, 1996).

Desde el punto de vista de correlación genotipo-fenotipo, un estudio realizado por Zbar y cols, en 1996 encontró mutaciones germinales en 63% de 469 familias afectadas. En el resto de los casos no fue posible demostrar mutaciones en *VHL*, esto puede deberse a dos causas: a que no se analizaron regiones no codificadoras del gen, o a que el padecimiento presente heterogeneidad génica.

Las mutaciones son extremadamente heterogéneas y ocurren en toda la región codificadora del gen, excepto los primeros 50 codones, en que son raras. [Figura 5].

Figura 5. Distribución de las mutaciones en el gen *VHL*.



Hes y cols. *Hum Genet* 106:425-431, 2000.

De 15 al 20% de los pacientes tienen deleciones germinales grandes, que pueden ser detectadas mediante *Southern Blot*; 27% tienen mutaciones de sentido erróneo y 27% tienen mutaciones con corrimiento del marco de lectura o mutaciones sin sentido. Esto permite identificar mutaciones en 80% o más de las familias con SxVHL mediante el uso de análisis por *Southern Blot* y secuenciación directa de la región codificadora (Couch y cols, 2000). [Tabla 1].

Tabla 1. Tipos de mutaciones en el gen VHL

TIPO DE MUTACIÓN	NÚMERO TOTAL DE MUTACIONES
Mutaciones puntuales (sentido erróneo / sin sentido)	164
Mutaciones puntuales (splicing)	15
Mutaciones puntuales (regiones reguladoras)	1
Deleciones pequeñas	60
Inserciones pequeñas	35
Inserción-delección pequeña	5
Deleciones grandes	23
Inserciones y duplicaciones grandes	1
Rearreglos complejos (incluyendo inversiones)	1
Inestabilidad de repetidos	0
TOTAL	305

Tomado de: The Human Gene Mutation Database Cardiff (Stenson y cols, 2003; actualizado en 2006)

Diferentes tipos de mutaciones germinales en VHL dan lugar a tres síndromes clínicos: (1) las deleciones y mutaciones que originan proteínas truncadas y generan Sx VHL con cáncer renal sin feocromocitoma (VHL tipo I), (2) las familias con Sx VHL con cáncer renal y feocromocitoma (VHL tipo II) tienen en el 96% de los casos, mutaciones de sentido erróneo, y (3) se ha encontrado también una fuerte asociación entre mutaciones de sentido erróneo y el riesgo de

feocromocitoma (Couch y cols, 2000; Friedrich y cols, 2001). Las mutaciones en *VHL* son tan variadas como los tumores a los que dan lugar: feocromocitomas esporádicos (Eng y cols, 1995), hemangioblastomas capilares del sistema nervioso central (Oberstrass y cols, 1996), carcinoma renal (Kenck y cols, 1996), y paragangliomas torácicos (Bender y cols, 1997). [Tabla 2].

Tabla 2. Tipo de mutaciones en relación al fenotipo

A. Tipo de mutación en relación al tumor

Fenotipo	Mutaciones puntuales	Micro-lesiones	Lesiones grandes
<u>Feocromocitoma</u>	17	2	1
<u>Sx Von Hippel-Lindau</u>	154	95	21
<u>Hemangioblastoma</u>	4	3	3
<u>Cáncer pancreático</u>	1	0	0
Policitemia con ↑ EPO	3	0	0
Feocromocitoma + Paraganglioma	1	0	0

Tomado de: *The Human Gene Mutation Database Cardiff* (Stenson y cols, 2003; actualizado en 2006)

B. Tipo de mutación en relación al subtipo de síndrome de von Hippel-Lindau

Fenotipo	Tumores	Mutaciones	
VHL tipo 1	Feocromocitoma (-)	Delección, corrimiento de marco de lectura, sin sentido	
VHL tipo 2A	Feocromocitoma (+) RCC (-)	Mutaciones puntuales que no truncan la proteína	Tyr98His
VHL tipo 2B	Feocromocitoma (+) RCC (+)		Arg167Gln, Arg167Trp
VHL tipo 2C	Solo Feocromocitoma		Leu188Val

RCC: Carcinoma de células renales

Tomado de (Chen y cols, 1995)

El diagnóstico predictivo genético es aquel que se realiza a un individuo asintomático en riesgo de desarrollar un padecimiento hereditario. Aquellos padecimientos en que el diagnóstico predictivo ha tenido un mayor impacto, son las enfermedades neurodegenerativas (p. Ej. Enfermedad de Huntington), los síndromes de cáncer familiar, y el diagnóstico prenatal. Sin embargo, este tipo de estudios plantea dilemas éticos, sociales y médicos hasta ahora insospechados. Sus ventajas son terminar con la incertidumbre y ofrecer la oportunidad de tomar decisiones con respecto al futuro; las desventajas son los eventos psicológicos adversos, incluyendo el riesgo de suicidio, la discriminación laboral, familiar o social y en muchos casos, la falta de estrategias preventivas o curativas (Rasmussen y Alonso, 2002).

Las estrategias a seguir en individuos en quienes se detectó de manera presintomática una mutación incluyen exámenes clínicos, de laboratorio y gabinete de manera rutinaria, modificaciones de estilo de vida (disminuir carcinógenos exógenos), quimioprevención e incluso cirugía profiláctica. Por el contrario, el excluir la presencia de mutación en una persona en riesgo, le evitará someterse a procesos agresivos (Murphy y Bray, 1997).

El diagnóstico predictivo, en términos generales, no se ofrece a menores de edad, excepto en el caso de padecimientos con inicio en etapas tempranas de la vida y en los cuales existen estrategias preventivas, como es el caso del SxVHL y otros síndromes de cáncer familiar (The American Society of Clinical Oncology, 1996; Rasmussen y Alonso, 2002).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En nuestro país no existen estadísticas confiables con respecto al SxVHL. De manera reciente, realizamos un estudio piloto de revisión de expedientes de pacientes con diagnóstico de hemangioblastoma cerebeloso o medular del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez. Encontramos que el 60% (versus 20% tradicionalmente reportado en la literatura) de los pacientes con hemangioblastoma cerebeloso cubren criterios diagnósticos de VHL. No existe información similar con respecto a pacientes con feocromocitoma, cáncer renal, o angiomas retinianos.

El SxVHL es un síndrome de cáncer familiar, en el cual los individuos afectados tienen una elevada morbi-mortalidad secundaria al desarrollo de neoplasias múltiples y la sobrevida promedio es de 40 años debido al desarrollo de cáncer de riñón. Se hereda con un patrón autosómico dominante, lo cual implica un riesgo de recurrencia del 50% para la descendencia. En la actualidad el manejo de estas familias implica vigilancia estrecha desde la infancia, consistente en estudios de laboratorio y gabinete (incluyendo tomografías y resonancia magnética) cada 6 a 12 meses, por el resto de la vida. El diagnóstico molecular de mutaciones en el gen *VHL* permite corroborar el diagnóstico, reduce la angustia de no saber quién es portador, y permite evitar estudios costosos e invasivos en los individuos sin mutaciones. Asimismo, identifica a los individuos que sí tienen riesgo elevado, favoreciendo una adecuada vigilancia y tratamiento oportuno de las neoplasias (Glasker y cols, 1999).

HIPÓTESIS

Las mutaciones en el gen *VHL* son la causa de enfermedad de Von Hippel Lindau en pacientes mexicanos.

El programa de escrutinio de pacientes con mutaciones en el gen *VHL* permitirá disminuir las complicaciones de los individuos afectados.

El diagnóstico predictivo de la enfermedad de Von Hippel Lindau permitirá identificar oportunamente a los individuos en riesgo para el padecimiento.

OBJETIVOS

1. Objetivos generales:

a) Analizar el gen *VHL* en pacientes con diagnóstico clínico de enfermedad de Von Hippel Lindau, o diagnóstico histopatológico de hemangioblastoma de cerebelo o médula espinal.

b) Establecer la correlación genotipo-fenotipo en los pacientes con mutaciones en el gen *VHL*.

c) Implementar un programa de escrutinio para individuos portadores de mutaciones en el gen *VHL*.

d) Implementar un programa de diagnóstico predictivo para familias con Enfermedad de Von Hippel Lindau.

2. Objetivos específicos:

a) Crear un banco de DNA con muestras de pacientes con diagnóstico de hemangioblastoma de cerebelo y/o médula.

b) Obtener historia familiar (árbol genealógico) de los pacientes captados.

c) Implementar las técnicas de biología molecular necesarias para el análisis del gen *VHL*.

d) Brindar asesoramiento genético a los pacientes y familiares con base en el diagnóstico molecular.

MATERIAL Y METODOS

1. Población de estudio: Se captaron de manera prospectiva todos los pacientes que fueron admitidos al Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (periodo 2002-2004) en quienes se confirmó el diagnóstico de hemangioblastoma del sistema nervioso central. Se impartieron sesiones de consejo genético para cada familia, a las cuales se invitó a todos los familiares en riesgo. Se incluyeron los individuos que aceptaron participar en el estudio y que firmaron carta de consentimiento informado, de acuerdo con los requisitos del Comité de Investigación y Comité de Bioética del INNN. En el caso de menores de edad entre 11 y 17 años, el consentimiento fue otorgado por uno de los padres o el tutor, pero se solicitó la aceptación escrita del menor.

[Anexo 1]

2. Banco de DNA: Se creó un banco de DNA de los pacientes, para lo cual se extrajeron 20 ml. de sangre periférica usando EDTA como anticoagulante. El DNA se obtuvo de leucocitos utilizando la técnica convencional de fenol-cloroformo y precipitación con etanol. (Blin y Stafford, 1976). Se cuantificó el DNA mediante espectrofotometría y se verificó su integridad mediante visualización en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio.

3. Análisis de mutaciones en el gen *VHL*: Se amplificaron los 3 exones del gen mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), modificando la técnica propuesta por Gnarra y cols (1994), mediante la siguiente estrategia:

PROMOTOR Y EXÓN 1

1. Fragmento 1A: Consiste en 269 pb que abarcan 92pb río arriba del promotor, la totalidad del promotor y 24pb río abajo del codón de inicio.

#104 (5'- AGT GGA AAT ACA GTA ACG AGT TGG CCT -3') 50 µM

#105 (5'- GTC CCA GTT CTC CGC CCT CCG GGG CAT -3') 50 µM

DMSO 5%

Mezcla de reacción (Qiagen Hotstart Taq Master Mix) 1 µl

DNA genómico 300-800 ng

Agua bidestilada c.b.p. 25 µL

Con el perfil térmico:

(95°C) 10' – [(95°C) 30" – (68°C) 30" – (70°C) 30"]_{30 ciclos} – (72°C) 10'

2. Fragmento 1B: Cuyo tamaño es de 146 pb.

#3 (5'- GCG GCG TCC GGC CCG GGT GGT CTG GAT -3') 5 µM

#8 (5'- CCT CGG CGC CCG ACT CCT CCC CGC CGT -3') 5 µM

DMSO 5%

Mezcla de reacción (Qiagen Hotstart Taq Master Mix) 1 µl

DNA genómico 300-800 ng

Agua bidestilada c.b.p. 25 µL

Con el perfil térmico:

(95°C) 10' – [(95°C) 30" – (68°C) 30" – (70°C) 30"]_{30 ciclos} – (72°C) 10'

3. Fragmento 1C: Tamaño 193 pb

#1 (5'- GAG GCA GGC GTC GAA GAG TAC GGC CCT -3') 50 µM

#10 (5'- GAC TGC GAT TGC AGA AGA TGA CCT GGG -3') 50 µM

DMSO 5%

(Qiagen Hotstart Taq Master Mix) 1 µl

DNA genómico 300-800 ng

Agua bidestilada c.b.p. 25 µL

Con el perfil térmico:

(95°C) 10' – [(95°C) 30" – (68°C) 30" – (70°C) 30"]_{30 ciclos} – (72°C) 10'

4. Fragmento 1D: Incluye 27 pb del intrón 1, y su tamaño total es de 148pb.

#9 (5'- CAT CTT CTG CAA TCG CAG TCC GCG CGT -3') 25 µM

#101 (5'- TGG GTC GGG CCT AAG CGC CGG GCC CGT -3') 25 µM

DMSO 5%

(Qiagen Hotstart Taq Master Mix) 1 µl

DNA genómico 300-800 ng

Agua bidestilada c.b.p. 25 µL

Con el perfil térmico:

(95°C) 10' – [(95°C) 30" – (68°C) 30" – (70°C) 30"]_{30 ciclos} – (72°C) 10'

EXÓN 2

Se genera un fragmento de 208 pb; los cebadores corresponden a las regiones intrónicas adyacentes (28pb del extremo 3' del intrón 1 y 57pb del extremo 5' del intrón 2):

#102 (5'- CTT TAA CAA CCT TTG CTT GTC CCG ATA -3') 100 µM

#103 (5'- GTC TAT CCT GTA CTT ACC ACA ACA CCT -3') 100 µM

DMSO 5%

Mezcla de reacción (Qiagen Hotstart Taq Master Mix) 1 µl

DNA genómico 400-1000 ng

Agua bidestilada c.b.p. 35 µL

Con el perfil térmico:

(95°C) 5' – [(95°C) 30" – (61.8°C) 30" – (70°C) 30"] 30 ciclos – (72°C) 10 '

EXÓN 3

El fragmento obtenido contiene 266 pb; los cebadores abarcan un fragmento del intrón 2 y un fragmento de la región 3'UTR (45pb del extremo 3' del intrón 2 y 41pb río abajo del sitio de terminación):

#107 (5'- CTG AGA CCC TAG TCT GCC ACT GAG GAT -3') 50 µM

#6 (5'- CAA AAG CTG AGA TGA AAC AGT GTA AGT -3') 50 µM

DMSO 5%

Mezcla de reacción (Qiagen Hotstart Taq Master Mix) 1 µl

DNA genómico 400-1000 ng

Agua bidestilada c.b.p. 25 µL

Con el perfil térmico:

(95°C) 10' – [(95°C) 30" – (64°C) 30" – (70°C) 30"] 30 ciclos – (72°C) 10 '.

Posteriormente modificamos las condiciones de amplificación del exón 1, en virtud de que encontramos dificultades para amplificar el fragmento 1C. Utilizamos el cebador sentido del fragmento 1B (VHL #3) y el cebador reversa del fragmento 1D (VHL#101), generando un fragmento denominado 1B-D de 406pb.

Los productos obtenidos de la PCR se resolvieron en geles de agarosa al 2.5% teñidos con bromuro de etidio, flanqueados por dos marcadores de peso molecular (Marcador V y VIII de Roche). Posteriormente se purificaron mediante un paquete comercial (Qiagen). En el caso de los fragmentos 1A, 1B, 1D y 2 la purificación se hizo de las muestras amplificadas, mientras que

los fragmentos 1C y 3 se purificaron a partir del gel de agarosa. Los productos purificados se volvieron a analizar por electroforesis en gel de agarosa para verificar la ausencia de productos inespecíficos e impurezas.

El siguiente paso fue la secuenciación directa de los productos amplificados. Esto se realizó de acuerdo al paquete *BigDye Terminador* de Applied Biosystems, de acuerdo con las siguientes condiciones:

DNA 3-6 μ L

Oligonucleótido (diluído 1:50) 1 μ L

Amortiguador 3.5 μ L

BigDye 2 μ L

Agua bidestilada c.b.p. 20 μ L

Con el perfil térmico:

(96°C) 1' – [(94°C) 30" – (52°C) 10" – (60°C) 4']_{25 ciclos} – (60°C) 3'

Los productos obtenidos se purificaron mediante columnas Centri Sep (Princeton Separations) y fueron secados en un concentrador de vacío. Se resuspendió el producto de la reacción de secuenciación con formamida, se traspasó a una gradilla para el termociclador y se desnaturalizó para transferirla al secuenciador automatizado (AbiPrism 310, Applied Biosystems). Los electroferogramas obtenidos se analizaron comparando la secuencia de las muestras de DNA con la secuencia de referencia de genbank de DNA genómico AF010238 [Anexo 4].

4. Evaluación clínica: A todos los participantes se les realizó historia clínica completa y árbol genealógico. Los estudios de laboratorio y gabinete que se realizaron a los individuos sintomáticos fueron: imagen por resonancia

magnética nuclear (IRM) de encéfalo, medula espinal y conducto auditivo interno, examen oftalmológico, tomografía axial computada (TAC) de abdomen y determinación de catecolaminas en orina de 24 horas. De acuerdo con los datos obtenidos, los pacientes se clasificaron en tres grupos clínicos:

a) Diagnóstico definitivo de enfermedad de von Hippel-Lindau: aquellos pacientes que cubrieron los criterios clínicos propuestos por Melmon y Rosen (1969) y modificados por Neumann (1987).

b) Posible enfermedad de von Hippel-Lindau: cuando la historia familiar fue sugestiva de enfermedad de von Hippel-Lindau, pero no fue posible confirmar la información, o cuando el paciente tenía hemangioblastoma del SNC más una lesión visceral menor.

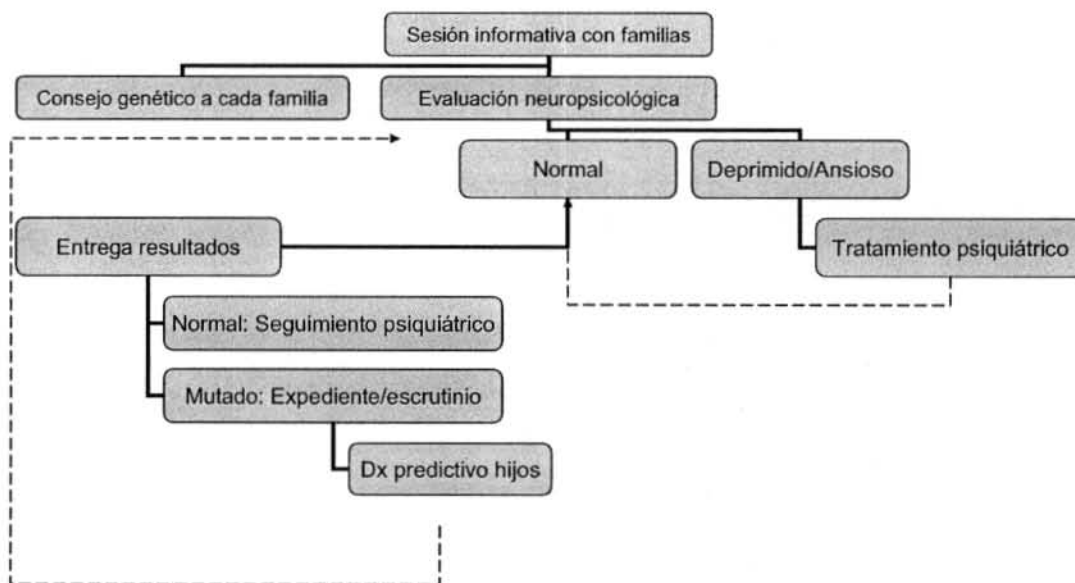
c) Hemangioblastoma esporádico: aquellos pacientes cuya única lesión fuera un hemangioblastoma del SNC e historia familiar negativa.

5. Asesoramiento genético y protocolo de escrutinio: Se brindó asesoramiento genético a los participantes en el estudio y se les ofreció participar en un protocolo de escrutinio basado en nuestras modificaciones a los protocolos de Cambridge (Maher et al., 1990), y Choyke (Choyke y cols, 1995; Lonser y cols, 2003). Nuestras modificaciones consistieron en iniciar a edad más temprana el escrutinio de lesiones del sistema nervioso central, decisión que se tomó después de haber identificado a una niña portadora de mutación con hemangioblastoma de cerebelo sintomático a los 9 años de edad. [Anexos 2 y 3]

6. Protocolo de diagnóstico predictivo: Se ofreció diagnóstico predictivo a los familiares en riesgo de individuos con mutación corroborada en el gen *VHL*.

Dicho protocolo se hizo extensivo a menores de edad en los casos en que estos tuvieran un riesgo *a priori* de 50% de riesgo de padecer la enfermedad. El protocolo de diagnóstico predictivo fue aprobado por el Comité de Ética del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía y se basó en el modelo desarrollado para la enfermedad de Huntington (International Huntington Association and the World Federation of Neurology Research Group on Huntington's Chorea, 1989 y actualizados en 1994) y en los lineamientos de The American Society of Clinical Oncology (1996). El diseño del protocolo de diagnóstico predictivo puede observarse en la Figura 6.

Figura 6. Flujoograma del programa de diagnóstico predictivo.



RESULTADOS

En la primera etapa del estudio se identificaron 16 casos índice con hemangioblastoma de cerebelo. A cada uno de ellos se le realizó historia clínica y árbol genealógico en el cual se identificaron los familiares en riesgo. Se les brindó asesoramiento genético, explicando que el patrón de herencia de la enfermedad de von Hippel-Lindau es autosómico dominante, lo cual implica un riesgo de 50% para cada hijo de un afectado. Una segunda sesión de asesoramiento genético incluyó a todos los familiares interesados, de tal manera que en total asistieron 98 personas a las sesiones informativas. La totalidad de los asistentes solicitó participar en el programa de diagnóstico genético, de tal manera que la población de estudio consistió en 98 individuos. De éstos, 75 estaban asintomáticos al inicio del estudio, y 23 tenían historia de hemangioblastoma del SNC y/u otras manifestaciones de la enfermedad de von Hippel-Lindau. El 60.2% (n=59) fueron mujeres y 39.8% (n=39) varones, 34 pacientes eran menores de 18 años de edad. De los 23 pacientes sintomáticos, 14 fueron clasificados como enfermedad de von Hippel-Lindau definitiva (7 familias), 4 como posible enfermedad de von Hippel-Lindau (4 familias) y 5 como hemangioblastomas esporádicos (Tabla 3). Dos de los niños ya habían mostrado síntomas del padecimiento: una niña de 16 años de edad tenía angiomas retinianos bilaterales con amaurosis unilateral, quistes pancreáticos y renales y un hemangioblastoma sintomático de cerebelo que fue parcialmente resecado cuando tenía 15 años. La otra menor sintomática fue una niña de 12 años a quien se le resecó un hemangioblastoma de cerebelo a los 9 años de edad.

Tabla 3. Clasificación clínica de las familias estudiadas antes del diagnóstico molecular.

Diagnóstico clínico	Número de familias	Número de individuos (sintomáticos/asintomáticos)
VHL	7	84 (14/70)
Posible VHL	4	8 (4/4)
Hemangioblastoma esporádico	5	6 (5/1)
Total	16	98 (23/75)

El análisis molecular nos permitió identificar mutaciones en 6 de las 7 familias con diagnóstico definitivo de la enfermedad (26 individuos portadores de mutación), pero en ninguno de los casos posibles o esporádicos. Encontramos cinco mutaciones diferentes: cuatro de ellas eran mutaciones previamente reportadas en la literatura -una deleción dentro del marco de lectura, una mutación sin sentido y dos mutaciones de sentido erróneo- (Clinical Research Group for VHL in Japan, 1995; Crossey y cols, 1994; Whaley y cols, 1994; Zbar y cols, 1996), y una mutación novedosa no descrita previamente -inserción de una base- y que se presentó en dos familias diferentes (Tablas 4 y 5).

Tabla 4. Mutaciones germinales en VHL en pacientes con hemangioblastoma del SNC.

Nombre de la mutación*	Tipo de mutación	Número de familias	No. de individuos mutados (sintomático/asintomático)	Fenotipo
DelPhe76	Delección en marco de lectura	1	4 (3/1)	VHL tipo 1
1012_1013insA**	Inserción fuera de marco de lectura	2	19 (7/12)	VHL tipo 1
D121G	Sentido erróneo	1	1(1/0)	VHL tipo 2B
R161X	Sin sentido	1	1 (1/0)	VHL tipo 1
P86S	Sentido erróneo	1	1(1/0)	VHL tipo 1

* Nomenclatura de acuerdo con Human Genome Mutation Database basada en la secuencia de DNA genómico AF010238 ** Mutación novedosa

Tabla 5. Tumores presentes en portadores de mutaciones en el gen *VHL*

Familia	Mutación	Estado*	Edad	Tumores
A	DelPhe76	Sintomático	34	2 HB cerebelo, 1 HB medular, poliquistosis renal
		Sintomático	35	3 HB cerebelo
		Sintomático	29	>3 HB cerebelo
		Asintomático	11	Ninguno
B	1012_1013insA	Sintomático	44	1 HB cerebelo, angiomas retinianos bilaterales
		Sintomático	16	4 HB cerebelo, 1 HB bulbar, 1 HB medular, angiomas retinianos bilaterales, poliquistosis renal y pancreática
		Sintomático	26	1 HB cerebelo, angiomas retinianos bilaterales, poliquistosis renal y pancreática, carcinoma de células renales unilateral
		Asintomático	28	1 HB cerebelo
		Asintomático	7	Ninguno
		Asintomático	2	Ninguno
		Asintomático	2	Ninguno
C	1012_1013insA	Sintomático	45	1 HB cerebelo, poliquistosis renal y pancreática, carcinoma de células renales unilateral
		Asintomático	21	Cistadenoma de epididimo
		Asintomático	17	Ninguno
		Asintomático	12	Ninguno
		Asintomático	36	2 HB cerebelo, poliquistosis renal, hepática, pancreática y suprarrenal, carcinoma de células renales bilateral
		Asintomático	54	Poliquistosis renal
		Asintomático	13	Ninguno
		Asintomático	20	1 HB medular, poliquistosis renal y pancreática
		Asintomático	30	2 HB medular
		Sintomático	13	1 HB cerebelo
		Asintomático	29	Ninguno
		Sintomático	30	1 HB cerebelo, poliquistosis renal y pancreática
		Asintomático	9	Ninguno
D	D121G	Sintomático	29	2 HB cerebelo, angiomas retinianos bilaterales, poliquistosis renal y pancreática, carcinoma de

				células renales unilateral, feocromocitoma, cystadenoma de ligamento ancho uterino
E	R161X	Sintomático	32	3 HB cerebelo, poliquistosis renal y pancreática
F	P86S	Sintomático	30	1 HB cerebelo recurrente, poliquistosis renal y pancreática, carcinoma de células renales bilateral metastásico

**Presencia o ausencia de manifestaciones clínicas de enfermedad VHL previo al escrutinio clínico y por imagen.*

Tal y como se ha descrito en la literatura (Hes y cols, 2000), las familias que presentaban mutaciones que dan lugar a una proteína truncada, tenían el fenotipo de VHL tipo 1, sin embargo, una familia con una mutación de sentido erróneo (P86S) no había mostrado historia de feocromocitoma. En una familia que cubría todos los criterios clínicos diagnósticos de la enfermedad, no logramos identificar mutaciones en el gen *VHL*, sin embargo, nuestra estrategia diagnóstica no permite descartar la presencia de deleciones grandes u otros rearrreglos del gen.

El programa de escrutinio clínico y de imagen de los portadores asintomáticos de mutaciones, mostró que 6/14 (43%) ya tenían lesiones asociadas a VHL, que no habían dado manifestaciones clínicas. En el caso de los pacientes sintomáticos con mutaciones, el estudio de escrutinio también permitió identificar nuevas lesiones aun asintomáticas. Las imágenes de algunas de las lesiones identificadas corresponden a las Figuras 8 – 13.

En nuestro grupo de pacientes, identificamos un total de 42 hemangioblastomas del SNC. Ocho fueron hemangioblastomas medulares que se presentaron en 6 pacientes: dos sin mutación identificada y cuatro con mutaciones en el gen *VHL*. Dos de los pacientes cursaron con 2 hemangioblastomas espinales cada uno, uno

de ellos era portador de la mutación 1012_1013insA, mientras que el otro paciente no tenía historia familiar y no se le había detectado ninguna mutación. Los 34 hemangioblastomas restantes eran cerebelosos, no encontramos hemangioblastomas en el tallo cerebral ni en estructuras supratentoriales. Sin embargo, al analizar la IRM de una paciente mutada (1012_1013insA) se identificó un meningioma paraselar además de dos hemangioblastomas medulares. Los hemangioblastomas del SNC fueron la primera manifestación de la enfermedad en todos los pacientes excepto en dos casos, en los cuales el dato inicial fueron los angiomas de retina. En el curso del estudio, uno de los pacientes falleció a consecuencia de complicaciones quirúrgicas durante la resección de la tercera recidiva de un hemangioblastoma cerebeloso.

Las manifestaciones clínicas asociadas en los portadores de mutaciones, fueron riñón poliquístico en 10 casos (38%), quistes pancreáticos en 8 (30%), angiomas retinianos en 4 (15%), carcinoma de células renales en 4 (15%) y cistadenoma de epidídimo, cistadenoma de ligamento ancho uterino y feocromocitoma en 1 individuo cada uno (4%). Una portadora de la mutación mutación 1012_1013insA desarrolló cirrosis biliar secundaria, debido a la obstrucción del colédoco originada por la poliquistosis pancreática.

Al analizar al subgrupo de pacientes con la mutación novedosa 1012_1013insA (edad: media 30.2, rango 13-54), 8/12 (66%) tenían uno o más hemangioblastomas cerebelosos, 2/12 (16%) tenían uno o más hemangioblastomas medulares, 3/12 (25%) tenían angiomas retinianos bilaterales, 7/12 (58%) mostraron quistes renales, 6/12 (50%) quistes

pancreáticos, 3/12 (25%) habían desarrollado carcinoma de células renales y 1/12 (8%) tuvo un cistadenoma de epidídimo [Figura 7].

La historia familiar reveló otros individuos afectados por tumores relacionados con la enfermedad de von Hippel-Lindau en 5/7 (71%) de los casos con diagnóstico definitivo de enfermedad de von Hippel-Lindau, pero en ninguno de los casos posibles o esporádicos, en contraste con lo previamente reportado (Hes y cols, 2000).

Figura 7. Arbol genealógico de la Familia C, portadora de la mutación 1012 1013insA. Cuadrante superior izquierdo negro: uno o más hemangioblastomas de cerebello. Cuadrante superior derecho negro: uno o más hemangioblastomas medulares. Cuadrante inferior izquierdo: lesiones viscerales que incluyen quistes pancreáticos y/o renales y/o carcinoma de células renales. Punto negro central: portador asintomático de mutación. Punto central gris: individuo que no es portador de la mutación. ▶ Caso índice.

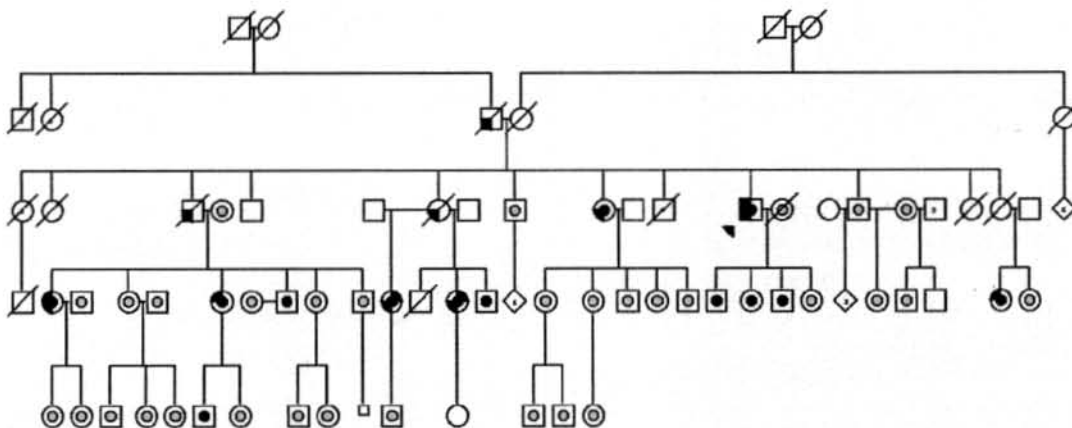


Figura 8. Hemangioblastomas de cerebello en pacientes con síndrome de von Hippel Lindau

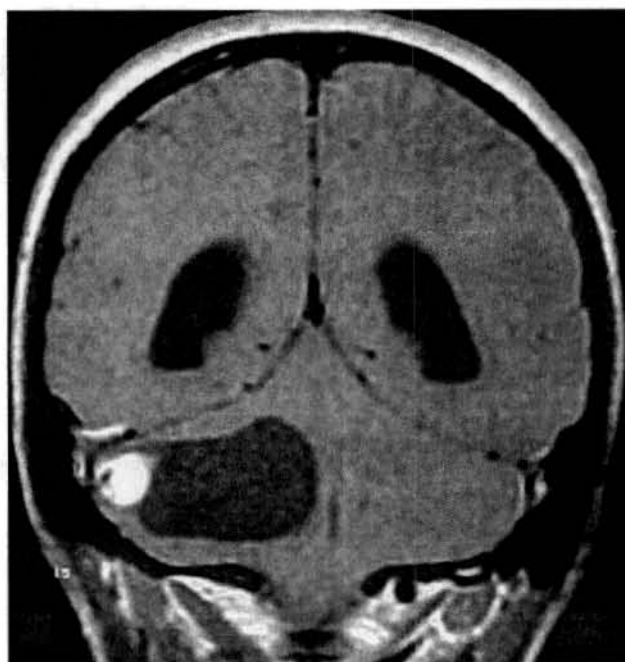
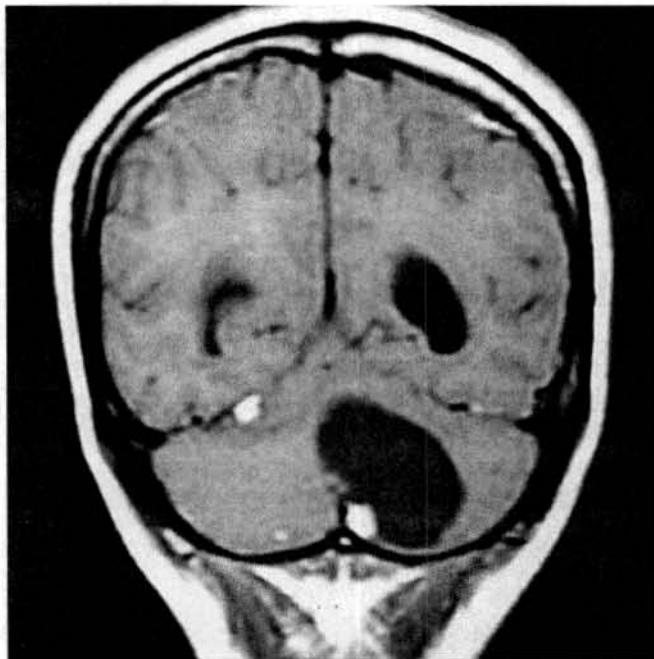


Figura 9. Hemanqioblastomas de tallo y médula espinal en pacientes con síndrome de von Hippel-Lindau.

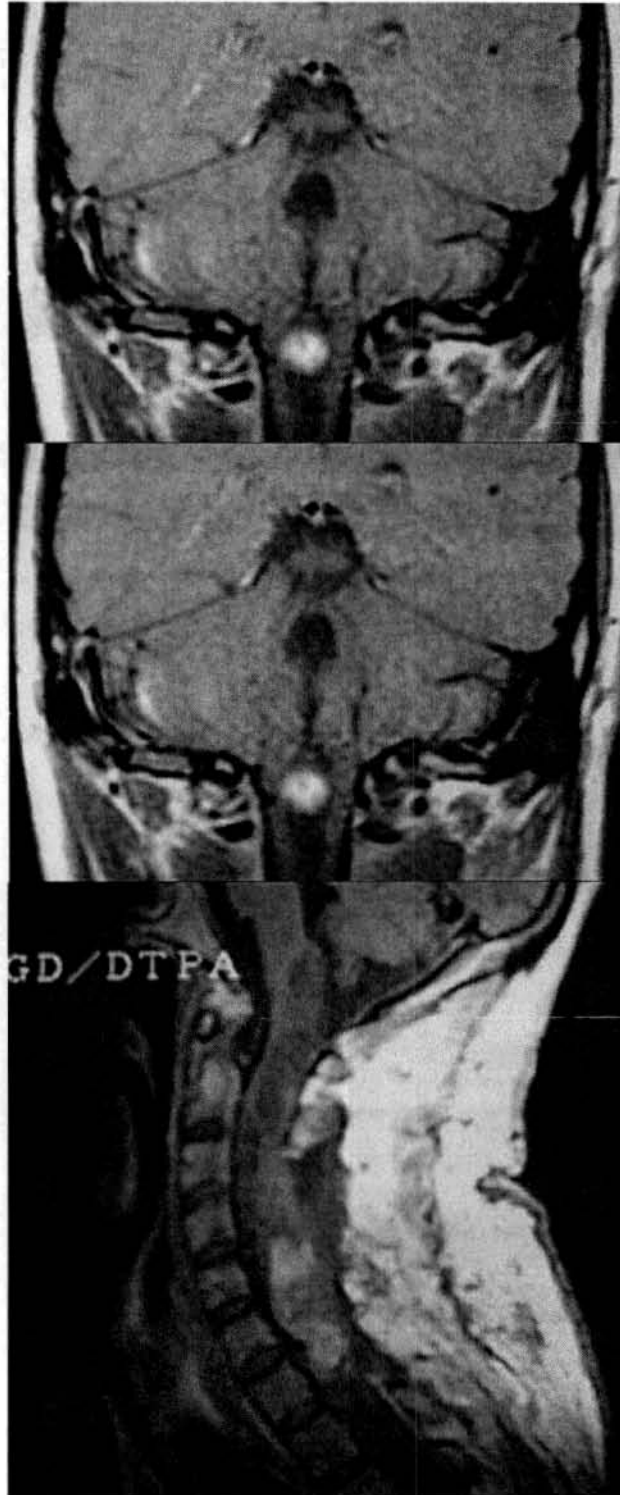


Figura 10. Angiomas retinianos en pacientes con síndrome de von Hippel-Lindau.

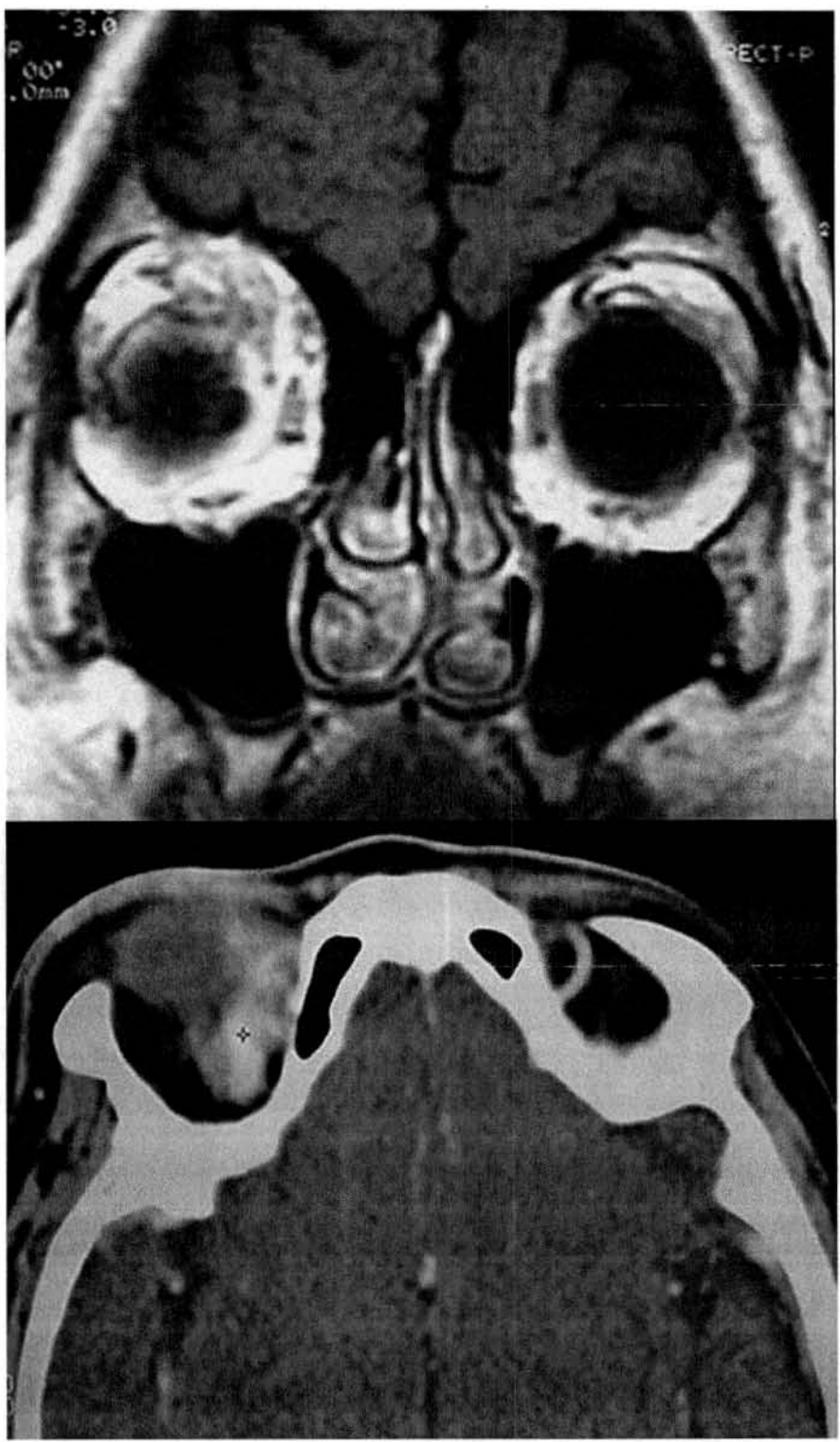


Figura 11. Quistes pancreáticos y renales en un paciente con síndrome de von Hippel-Lindau.

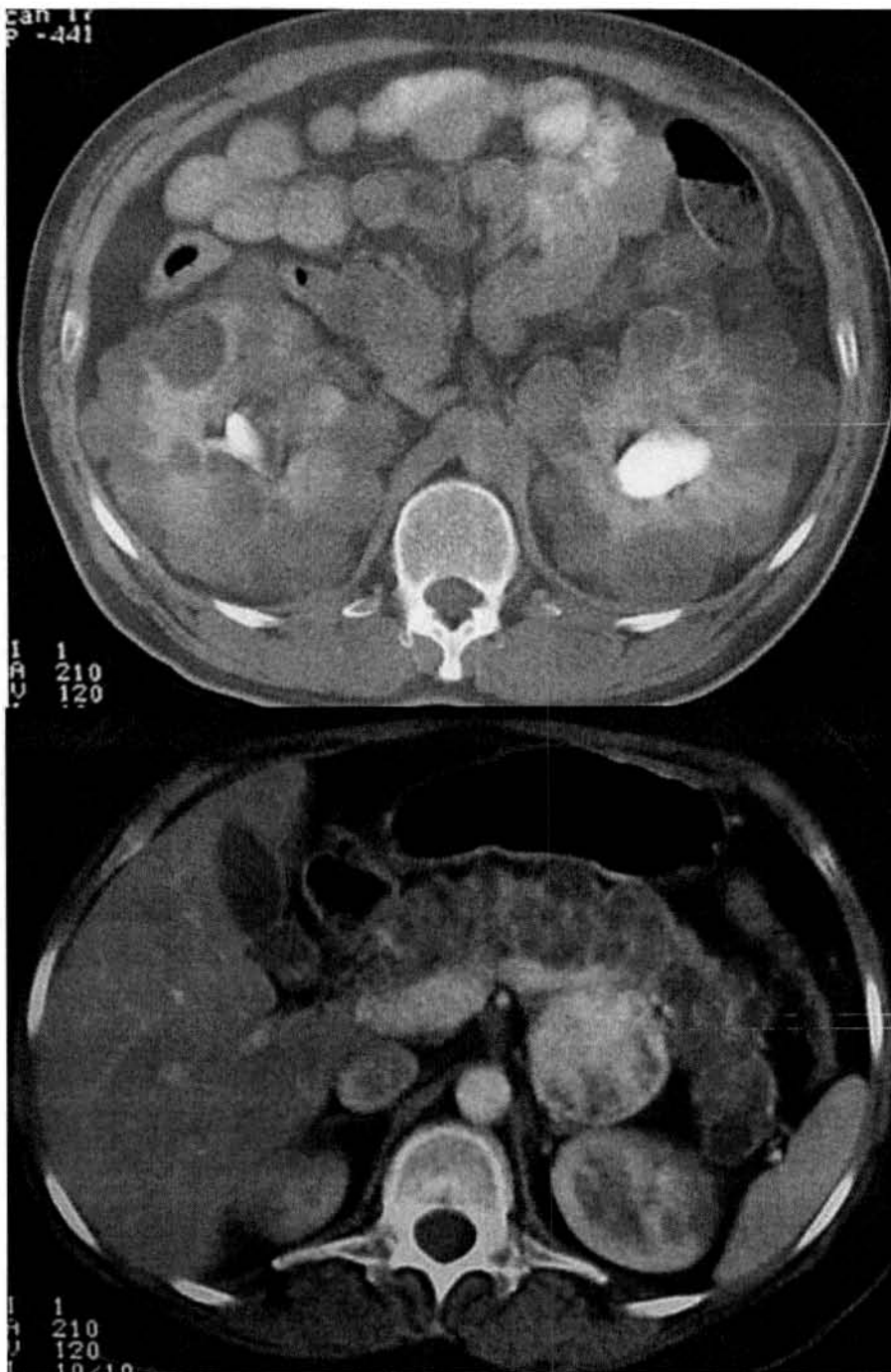


Figura 12. Carcinoma de células renales en un paciente con síndrome de von Hippel Lindau.

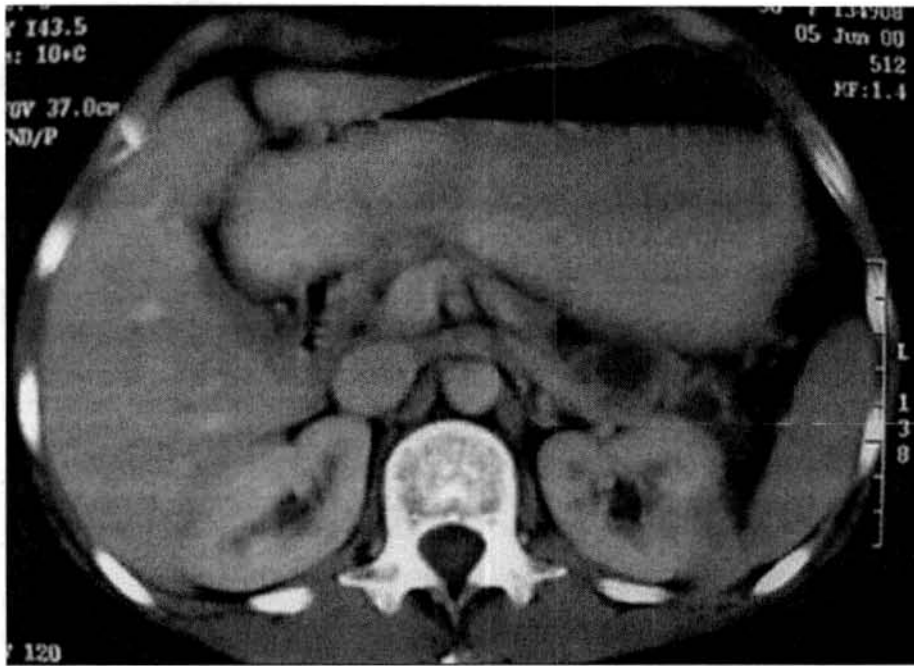
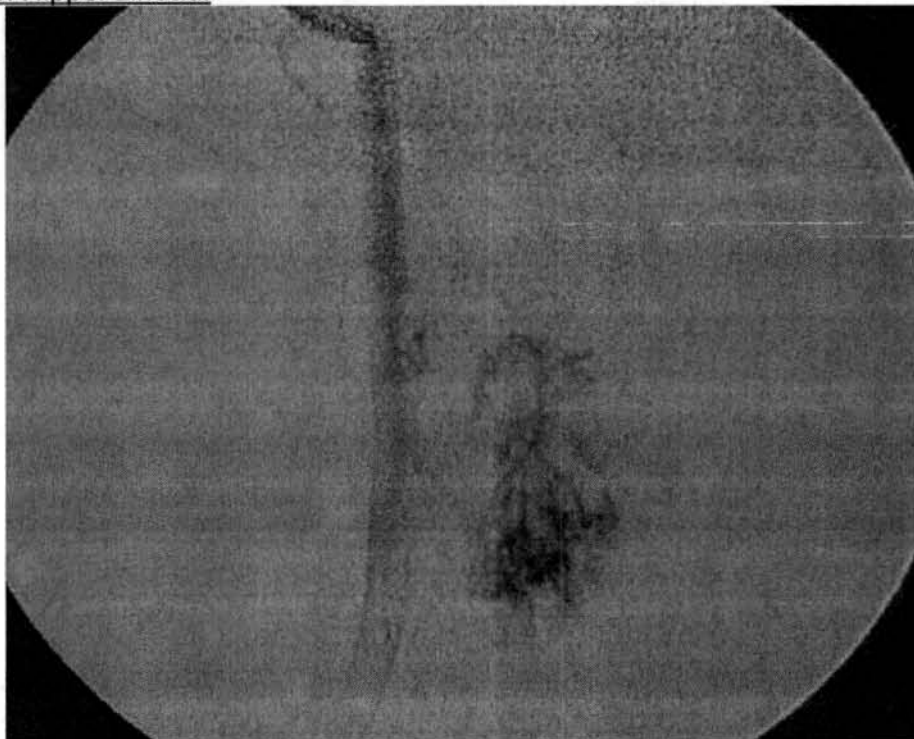


Figura 13. Angiografía digital de un feocromocitoma en un paciente con síndrome de von Hippel-Lindau.



DISCUSIÓN

Analizamos una serie prospectiva de pacientes mexicanos admitidos al INNN con diagnóstico de hemangioblastoma del SNC, con el objeto de identificar mutaciones puntuales en el gen supresor tumoral *VHL*. Identificamos 5 mutaciones en 6 familias, 4 de las cuales ya habían sido descritas previamente en la literatura, pero la inserción 1012_1013insA es una mutación novedosa.

Esta inserción fuera del marco de lectura en el exón 1, estuvo presente en dos familias no relacionadas entre sí, y cosegrega con la enfermedad. En la familia B, estudiamos a 10 individuos (4 sintomáticos y 6 asintomáticos, de los cuales 3 eran menores de 10 años de edad), y todos los individuos clínicamente afectados presentaban la mutación. Los 3 adultos asintomáticos fueron no-portadores, mientras que 2 de los 3 niños asintomáticos si presentaron la mutación. La segunda familia con la inserción 1012_1013ins A, la familia C, contó con 46 individuos que fueron estudiados molecularmente, 3 estaban clínicamente afectados mientras que los 43 restantes se describían a si mismos como asintomáticos. El análisis molecular identificó a 13 portadores de la mutación, que incluían a los 3 pacientes afectados, 5 que mostraron lesiones asociadas a *VHL* aún presintomáticas y 5 individuos sin evidencia de enfermedad (edad 9-29 años) [Figura 7].

La mutación 1012_1013insA cambia el marco de lectura dando lugar a la modificación de treinta y un aminoácidos río debajo de la mutación, y un codón de terminación prematuro en los nucleótidos 5441-5443 (aminoácido 131). Los aminoácidos modificados se encuentran en un dominio común a todas las

isoformas de la pVHL, el altamente conservado dominio de unión a cct de la proteína, que participa en la formación del complejo pVHL-elongina que es indispensable para la actividad de supresor tumoral. Además, la proteína mutante está truncada prematuramente y carece de la mitad C-terminal del exon 2 y la totalidad del exón 3, que incluyen la señal de exportación nuclear y el sitio de unión de la elongina C a pVHL. Por lo tanto, esta proteína truncada afectaría a las dos isoformas funcionales de pVHL: la isoforma mayor pVHL30 y pVHL19, pero no a la isoforma 2, que carece del exón 2, pero que no es funcional (Genbank AF010238; Swissprot database entry for pVHL).

Analizamos la correlación fenotipo-genotipo para todas las mutaciones identificadas en este estudio, en virtud de que se ha descrito que el patrón de mutaciones presentes en las familias con VHL correlaciona con la subclasificación clínica en relación con los tipos de tumores para los cuales el riesgo está incrementado (Richards 2001; Lonser y cols, 2003) y que hay variaciones geográficas en la frecuencia de las mutaciones (Rocha y cols, 2003; Sansó y cols, 2004). Veintitrés individuos eran portadores de una mutación que da lugar a una proteína truncada (R161X and 1012_1013insA) o a una delección pequeña (DelPhe76). Diecisiete de ellos tenían un fenotipo VHL tipo 1; los ocho restantes son jóvenes y aun no han desarrollado tumores asociados a VHL. Estos resultados son congruentes con los reportes previos, que proponen que las delecciones, mutaciones que dan lugar a proteínas truncadas (de corrimiento de marco de lectura y sin sentido), y algunas mutaciones de sentido erróneo, se asocian con un riesgo disminuido de desarrollar feocromocitoma – el denominado fenotipo VHL tipo 1- (Olschwang y cols, 1998; Lonser y cols, 2003).

Identificamos dos mutaciones de sentido erróneo (D121G y P86S), en una familia cada una. El paciente portador de la mutación D121G tiene el cuadro clínico completo de VHL, el llamado tipo 2B, incluyendo hemangioblastomas cerebelosos múltiples, angiomas retinianos bilaterales que han causado amaurosis bilateral, poliquistosis pancreática y renal, carcinoma de células claras renales unilateral, un feocromocitoma y cistadenoma de ligamento ancho uterino. La historia familiar de esta paciente es negativa, existiendo la posibilidad de que ella presente una mutación *de novo*, que se ha descrito en hasta 20% de los pacientes con VHL (Sgambati y cols, 2000), sin embargo no nos fue posible descartar la posibilidad de no-paternidad. La mutación D121G fue descrita inicialmente en 1994 por Whaley y cols (1994), y se ha asoció con un riesgo incrementado de feocromocitoma. Sin embargo, el sitio caliente mutacional clásicamente asociado con el fenotipo 2B corresponde al codón 167 (Olschwang y cols, 1998).

Un individuo con VHL tipo 1 y sin historia personal o familiar de feocromocitoma, es portador de otra mutación de sentido erróneo: P86S. Las mutaciones de sentido erróneo, tradicionalmente se han asociado con un riesgo incrementado de feocromocitoma; esta mutación se ha reportado previamente en un paciente japonés con hemangioblastoma cerebeloso esporádico (Clinical Research Group for VHL in Japan, 1995), dos individuos que solamente se describieron como "pacientes con enfermedad VHL" (Zbar y cols, 1996; Beroud y cols, 2006) y un individuo con cáncer renal y un feocromocitoma (Olschwang y cols, 1998; Beroud y cols, 2006). Nuestro paciente es un individuo joven que ha desarrollado hemangioblastomas cerebelosos múltiples recidivantes, poliquistosis renal y actualmente presenta carcinoma renal bilateral metastásico. Los demás individuos

afectados de la familia D han muerto a edades tempranas, el seguimiento prospectivo del caso índice nos ayudará a determinar si existe un riesgo incrementado de feocromocitoma en esta familia.

También analizamos el fenotipo de las dos familias que presentaron la mutación nueva 1012_1013insA, ambas se clasificaron como VHL tipo 1 con base en la ausencia de feocromocitoma. Encontramos una muy elevada frecuencia de hemangioblastomas en ambas familias, de tal manera que el 83% de los afectados presentó uno o más hemangioblastomas de SNC. Un individuo asintomático presentó dos hemangioblastomas espinales y adicionalmente un meningioma supraselar; este tipo de tumores se ha reportado previamente como una manifestación inusual de la enfermedad de VHL (Kanno y cols, 2003). La edad más temprana en que se manifestó clínicamente un hemangioblastoma de SNC fue en una niña de 9 años, esto nos llevó a promover el diagnóstico presintomático y el inicio del programa de escrutinio lo más temprano posible en el resto de los familiares.

Las manifestaciones de la enfermedad fueron muy semejantes entre ambas familias portadoras de la mutación 1012_1013insA, excepto con una diferencia notoria en el riesgo de angiomas retinianos. La familia B mostró angiomas retinianos bilaterales en 3 de 4 individuos sintomáticos, mientras que ningún individuo de la familia C desarrolló tumores en retina. De manera dirigida e intencional, reinterrogamos a los miembros de la familia C para investigar si otros familiares no estudiados por nosotros, habían desarrollado problemas visuales, pero lo negaron. Además, la frecuencia total de angiomas de retina en nuestra serie de pacientes es inferior (4 de 26 portadores de mutación, 15%) que la cifras

mencionadas en otras series, que van del 40 al 60% (Richard y cols, 1998; Webster y cols, 1999; Dollfus y cols, 2002). Webster y cols (1998, 1999) analizaron una cohorte grande de portadores de mutaciones asociadas a VHL y no encontraron correlación entre el tipo de mutación y el riesgo de angiomas retinianos. De manera más reciente, Zatyka y cols (2002) describieron la asociación de un polimorfismo de nucleótido sencillo (SNP, *single nucleotide polymorphism*) en el gen de la ciclina D1 (*CCND1*) con una modificación en el riesgo de angiomas retinianos. En un futuro, sería interesante analizar el genotipo *CCND1* en esta cohorte.

Nuestro protocolo de diagnóstico predictivo y escrutinio nos ayudó a identificar tumores presintomáticos en el 43% de los individuos en riesgo, así como tumores asintomáticos en individuos ya afectados. Esta estrategia ha permitido una planeación apropiada para elegir los métodos terapéuticos, que se ejemplifica en el caso de una mujer asintomática de 36 años de edad, en quien identificamos carcinoma de células renales bilateral en una etapa temprana, lo cual permitió una cirugía conservadora de la función renal con un bajo riesgo de metástasis.

CONCLUSIONES

El presente estudio ilustra la relevancia del diagnóstico genético en todos los pacientes con hemangioblastomas del SNC, con el objeto de identificar a los portadores de mutaciones en el gen *VHL*. La identificación temprana de los portadores asintomáticos, permite la implementación de un programa de escrutinio multidisciplinario con la finalidad de disminuir la morbilidad y mortalidad de estos pacientes, a la vez que se evitan procedimientos costosos e invasivos en los no portadores. Esta es una consideración relevante en países como México,

en los cuales los recursos médicos son limitados. En nuestra población, identificamos una mutación novedosa en dos familias no relacionadas. Queda por determinar si ésta es una mutación frecuente en los pacientes mexicanos con enfermedad de von Hippel Lindau.

REFERENCIAS

1. Allen RC, Webster AR, Sui R, Brown J, Taylor CM, Stone EM. Molecular characterization and ophthalmic investigation of a large family with type 2A von Hippel-Lindau disease. *Arch Ophthalmol* 119: 1659-1665, 2001.
2. Ang SO, Chen H, Gordeuk VR, Sergueeva AI, Polyakova LA, Miasnikova GY, et al. Endemic polycythemia in Russia: mutation in the *VHL* gene. *Blood Cell Molec Dis* 28: 57-62, 2002.
3. Ang SO, Chen H, Hirota K, Gordeuk VR, Jelinek J, Guan Y et al. Disruption of oxygen homeostasis underlies congenital Chuvash polycythemia. *Nature Genet* 32: 614-621, 2002.
4. Bender BU, Altehofer C, Januszewicz A, Gartner R, Schmidt H, Hoffmann MM, et al. Functioning thoracic paraganglioma: association with Von Hippel-Lindau syndrome. *J Clin Endocr Metab* 82: 3356-3360, 1997.
5. Bérout C, Joly D, Gallou C. Universal VHL-Mutation Database disponible en la URL: <http://www.umd.be:2020/>
6. Couch V, Lindorm NM, Karnes PS, Michels V. von Hippel-Lindau Disease. *Mayo Clin Proc* 75:265-272, 2000.
7. Chen F, Kishida T, Yao M, Hustad T, Glavac D, Dean M, et al. Germline mutations in the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene: correlations with phenotype. *Hum Mutat* 5:66-75, 1995.
8. Choyke PL, Glenn GM, Walther MM, Patronas NJ, Linehan WM, Zbar B. von Hippel-Lindau disease: genetic, clinical and imaging features. *Radiology* 194:629-642, 1995.

9. Clinical Research Group for VHL in Japan. Germline mutations in the von Hippel-Lindau disease (*VHL*) gene in Japanese VHL. *Hum Mol Genet* 4:2233-2237, 1995.
10. Crossey PA, Richards FM, Foster K, Green JS, Prowse A, Latif F, Lerman MI, Zbar B, Affara NA, Ferguson-Smith MA, Maher ER. Identification of intragenic mutations in the von Hippel-Lindau disease tumour suppressor gene and correlation with disease phenotype. *Hum Molec Genet* 3: 1303-1308, 1994.
11. Dollfus H, Massin P, Taupin P, Nemeth C, Amara S, Giraud S, et al. Retinal hemangioblastoma in von Hippel-Lindau disease: a clinical and molecular study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43:3067-3074, 2002.
12. Duan DR, Pause A, Burgess WH, Aso T, Chen DYT, Garrett KP, et al. Inhibition of transcription elongation by the VHL tumor suppressor protein. *Science* 269: 1402-1406, 1995.
13. Eng C, Crossey PA, Mulligan LM, Healey CS, Houghton C, Prowse A, et al. Mutations in the RET proto-oncogene and the von Hippel-Lindau disease tumour suppressor gene in sporadic and syndromic pheochromocytomas. *J Clin Genet* 32: 934-937, 1995.
14. Friedrich CA. Genotype-phenotype correlation in von Hippel-Lindau syndrome. *Hum Mol Genet* 10:763-767, 2001.
15. Garber JE, Offit K. Hereditary cancer predisposition syndromes. *J Clin Oncol* 23:276-292, 2005.
16. Genbank accession number AF010238, disponible en la URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=2282063>

17. Gläsker S, Bender BU, Apel TW, Natt E, van Velthoven V, Scheremet R, et al. The impact of molecular genetic analysis of the *VHL* gene in patients with haemangioblastomas of the central nervous system. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 67:758-762, 1999.
18. Glenn GM, Linehan WM, Hosoe S, Latif F, Yao M, Choyke P et al. Screening for von Hippel-Lindau disease by DNA polymorphism analysis. *JAMA* 267: 1226-1231, 1992.
19. Gnarra JR, Tory K, Weng Y, Schmidt L, Wei MH, Li H et al. Mutations of the *VHL* tumor suppressor gene in renal carcinoma. *Nat Genet* 7:85-90, 1994.
- Griffiths DFR, Williams GT, Williams ED. Duodenal carcinoid tumours, pheochromocytoma and neurofibromatosis: islet cell tumour, Pheochromocytoma and the von Hippel-Lindau complex: two distinctive neuroendocrine syndromes. *QJM* 245: 769-782, 1987.
20. Hes F, Zewald R, Peeters T, Sijmons R, Links T, Verheij J, et al. Genotype-phenotype correlations in families with deletions in the von Hippel-Lindau (*VHL*) gene. *Hum Genet* 106:425-431, 2000.
21. Hes FJ, McKee S, Taphoorn MJBP, van der Luijt RRB, McMahon R, van der Smagt JJ, et al. Cryptic von Hippel-Lindau disease: germline mutations in patients with haemangioblastoma only. *J Med Genet* 37:939-943, 2000.
22. Human Genome Mutation Database, disponible en la URL: http://archive.uwcm.ac.uk/uwcm/mg/docs//mut_nom.html
23. Iliopoulos O, Kibel A, Gray S, Kaelin WG. Tumour suppression by the human von Hippel-Lindau gene product. *Nature Med* 1: 822-826, 1995.

24. Iliopoulos O, Levy AP, Jiang C, Kaelin WG, Goldberg MA. Negative regulation of hypoxia-inducible genes by the von Hippel-Lindau protein. *Proc Nat Acad Sci* 93: 10595-10599, 1996.
25. Jennings AM, Smith C, Cole DR, Jennings C, Shortland JR, Williams J et al. Von Hippel-Lindau disease in a large British family: clinico-pathological features and recommendations for screening and follow-up. *QJM* 66: 233-249, 1988.
26. International Huntington Association and the World Federation of Neurology Research Group on Huntington's Chorea: Guidelines for the molecular genetics predictive test in Huntington's disease. *Neurology* 44:1533-1536, 1994.
27. Kaelin WG. Molecular basis of the VHL hereditary cancer syndrome. *Nat Rev Cancer* 2:673-682, 2002.
28. Kanno H, Yamamoto I, Yoshida M, Kitamura H. Meningioma showing *VHL* gene inactivation in a patient with von Hippel-Lindau disease. *Neurology* 60:1197-1199, 2003.
29. Kenck C, Wilhelm M, Bugert P, Staehler G, Kovacs G. Mutation of the *VHL* gene is associated exclusively with the development of non-papillary renal cell carcinomas. *J Path* 179: 157-161, 1996.
30. Kibel A, Iliopoulos O, DeCaprio JA, Kaelin WG. Binding of the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein to elongin B and C. *Science* 269: 1444-1446, 1995.
31. Kim WY, Kaelin WG. Role of *VHL* gene mutation in human cancer. *J Clin Oncol* 22:4991-5004, 2004.

32. Latif F, Tory K, Gnarr J, Yao M, Duh FM, Orcutt ML, et al. Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. *Science* 260: 1317-1320, 1993.
33. Lindau A. Zur Frage der Angiomatosis retinae und ihrer Hirncomplication. *Acta Ophthalmol (Scand)* 4:193-226, 1927.
34. Lonser RR, Glenn GM, Walther MC, Chew EY, Libutti SK, Linehan WM, et al. Von Hippel-Lindau disease. *Lancet* 361:2059-2067, 2003.
35. Maddock IR, Moran A, Maher ER, Teare MD, Norman A, Payne SJ, et al. Mapping of the von Hippel-Lindau disease locus to a small region of chromosome 3p by genetic linkage analysis. *Genomics* 10: 957-960, 1991.
36. Maher ER, Yates JRW, Harries R, Benjamin C, Harries R, Moore AT, et al. Clinical features and natural history of von Hippel-Lindau disease. *QJM* 77:1151-1163, 1990.
37. Manski TJ, Heffner DK, Glenn GM, Patronas NJ, Pikus AT, Katz D, et al. Endolymphatic sac tumors: a source of morbid hearing loss in von Hippel-Lindau disease. *JAMA* 277: 1461-1466, 1997.
38. Melmon KL, Rosen SW. Lindau's disease: review of the literature and study of a large kindred. *Am J Med* 36:595-617, 1964.
39. Mukhopadhyay D, Knebelmann B, Cohen HT, Ananth S, Sukhatme VP. The von Hippel-Lindau tumor suppressor gene product interacts with Sp1 to repress vascular endothelial growth factor promoter activity. *Molec Cell Biol* 17: 5629-5639, 1997.
40. Murphy P, Bray W. How cancer gene testing can benefit patients. *Mol Med Today* 3:147-152, 1997.

41. Neumann HP. Basic criteria for clinical diagnosis and genetic counselling in von Hippel-Lindau syndrome. *J Vasc Dis* 16:309-311, 1987.
42. Neumann HPH, Eggert HR, Weigel K, Friedburg H, Wiestler OD, Schollmeyer P. Hemangioblastomas of the central nervous system. A 10-year study with special reference to von Hippel-Lindau syndrome. *J Neurosurg* 70:24-30, 1989.
43. Neumann HPH, Wiestler OD. Clustering of features of von Hippel-Lindau syndrome: evidence for a complex genetic locus. *Lancet* 337: 1052-1054, 1991.
44. Oberstrass J, Reifenberger G, Reifenberger J, Wechsler W, Collins VP. Mutation of the von Hippel-Lindau tumour suppressor gene in capillary haemangioblastomas of the central nervous system. *J Path* 179: 151-156, 1996.
45. Olschwang S, Richard S, Boisson C, Giraud S, Puig PL, Resche F, et al. Germline mutation profile of the *VHL* gene in von Hippel-Lindau disease and in sporadic hemangioblastoma. *Hum Mutat* 12:424-430, 1998.
46. Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM (TM). Johns Hopkins University, Baltimore, MD. Von Hippel-Lindau syndrome. MIM Number:193300: Fecha de acceso: 20/04/2006. Disponible en la URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/193300>.
47. Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM (TM). Johns Hopkins University, Baltimore, MD. *VHL* gene. MIM Number:608537. Date last edited: 20/04/2006. Disponible en la URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/608537>
48. Pause A, Lee S, Lonergan KM, Klausner RD. The von Hippel-Lindau tumor suppressor gene is required for cell cycle exit upon serum withdrawal. *Proc Nat Acad Sci* 95: 993-998, 1998.

49. Pastore Y, Jedlickova K, Guan Y, Liu E, Fahner J, Hasle H, et al. Mutations of von Hippel-Lindau tumor-suppressor gene and congenital polycythemia. *Am J Hum Genet* 73: 412-419, 2003. Erratum: *Am J Hum Genet* 74: 598 only, 2004
50. Perrotta S, Nobili B, Ferraro M, Migliaccio C, Borriello A, Cucciolla V et al. Von Hippel-Lindau-dependent polycythemia is endemic on the island of Ischia: identification of a novel cluster. *Blood* 107: 514-519, 2006.
51. Prowse AH, Webster AR, Richards FM, Richard S, Olschwang S, et al. Somatic inactivation of the *VHL* gene in Von Hippel-Lindau disease tumors. *Am J Hum Genet* 60: 765-771, 1997.
52. Rasmussen A, Alonso E. El diagnóstico predictivo genético y sus implicaciones. *Salud Mental* 25: 9-13, 2002.
53. Richard S, Campello C, Taillandier L, Parker F, Resche F. Haemangioblastoma of the central nervous system in von Hippel-Lindau disease. *J Internal Med* 243:547-553, 1998.
54. Richards FM, Phipps ME, Latif F, Yao M, Crossey PA, Foster K, et al. Mapping the von Hippel-Lindau disease tumour suppressor gene: identification of germline deletions by pulsed field gel electrophoresis. *Hum Mol Genet* 2: 879-882, 1993.
55. Richards FM, Schofield PN, Fleming S, Maher ER. Expression of the von Hippel-Lindau disease tumour suppressor gene during human embryogenesis. *Hum Molec Genet* 5: 639-644, 1996.
56. Richards F. Molecular pathology of von Hippel-Lindau disease and the *VHL* tumour suppressor gene. *Exp Rev Mol Med* 2001. ([http://www-ermm.cbcu.cam.ac.uk/\(01\)00265-4a.pdf](http://www-ermm.cbcu.cam.ac.uk/(01)00265-4a.pdf))

57. Rocha JCC, Silva RLA, Mendonça BB, Marui S, Simpson AJG, Camargo AA. High frequency of novel germline mutations in the *VHL* gene in the heterogeneous population of Brazil. *J Med Genet* 40:e31, 2003 (<http://www.jmedgenet.com/cgi/content/full/40/3/e31>)
58. Sansó G, García-Rudaz MC, Levin G, Barontini M. Familial isolated pheochromocytoma presenting a new mutation in the von Hippel-Lindau gene. *Am J Hypertens* 17:1107-1111, 2004.
59. Seizinger BR, Smith DI, Filling-Katz MR, Neumann H, Green JS, Choyke PL, et al. Genetic flanking markers refine diagnostic criteria and provide insights into the genetics of Von Hippel Lindau disease. *Proc Nat Acad Sci* 88: 2864-2868, 1991.
60. Sgambati MT, Stolle C, Choyke PL, Walther MM, Zbar B, Linehan WM, et al. Mosaicism in von Hippel-Lindau disease: lesson from kindreds with germline mutations identified in offspring with mosaic parents. *Am J Hum Genet* 66:84-91, 2000.
61. Sims KB. Von Hippel-Lindau disease: gene to bedside. *Curr Opin Neurol* 14:695-703, 2001.
62. Stenson PD, Ball EV, Mort M, Phillips AD, Shiel JA, Thomas NS et al. Human Gene Mutation Database (HGMD): actualización 2003. *Hum Mutat* 21:577-81, 2003. Disponible en la URL: <http://archive.uwcm.ac.uk/uwcm/mg/search/120488.html> (fecha de acceso: 20/04/2006).
63. Swissprot database entry for pVHL, accessible at: [http://www.infobiogen.fr/srs7bin/cgi-bin/wgetz?-newId+-e+\[SWALL-Acc:P40337](http://www.infobiogen.fr/srs7bin/cgi-bin/wgetz?-newId+-e+[SWALL-Acc:P40337)

64. The American Society of Clinical Oncology. Genetic testing for cancer susceptibility. *J Clin Oncol* 14:1730-1736, 1996.
65. Versteeg R. Aberrant methylation in cancer (Editorial). *Am J Hum Genet* 60: 751-754, 1997.
66. von Hippel E. Uber eine sehr seltene Erkrankung der Netzhaut. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 59:83-106, 1904.
67. Webster AR, Maher ER, Moore AT. Clinical characteristics of ocular angiomatosis in von Hippel-Lindau disease and correlation with germline mutation. *Arch Ophthalmol* 117:371-378, 1999.
68. Webster AR, Richards FM, MacRonal FE, Moore AT, Maher ER. An analysis of phenotypic variation in the familial cancer syndrome von Hippel-Lindau disease: evidence of modifier effects. *Am J Hum Genet* 63:1025-1035, 1998.
69. Whaley JM, Naglich J, Gelbert L, Hsia YE, Lamiell JM, Green JS, et al. Germ-line mutations in the von Hippel-Lindau tumor-suppressor gene are similar to somatic von Hippel-Lindau aberrations in sporadic renal cell carcinoma. *Am J Hum Genet* 55:1092-1102, 1994.
70. World Federation of Neurology Research Committee, Research Group on Huntington's chorea: Ethical issues policy statement on Huntington's disease molecular genetics predictive test. *J Neurol Sci* 94:327-332, 1989.
71. Zatyka M, Fernandes da Silva N, Clifford SC, Morris MR, Wiesener MS, Eckardt KU, et al. Identification of Cyclin D1 and other novel targets for the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene by expression array analysis and investigation of Cyclin D1 genotype as modifier in von Hippel-Lindau disease. *Cancer Res* 62:3803-3811, 2002.

72. Zbar B, Kishida T, Chen F, Schmidt L, Maher ER, Richards FM, et al: Germline mutations in the Von Hippel-Lindau disease (*VHL*) gene in families from North America, Europe, and Japan. *Hum Mutat* 8: 348-357, 1996.

73. Zhuang Z, Emmert-Buck MR, Roth MJ, Gnarr J, Linehan WM, Liotta LA et al. Von Hippel-Lindau disease gene deletion detected in microdissected sporadic human colon carcinoma specimens. *Hum Path* 27: 152-156, 1996.

ATA
ARCHIVO HISTORICO
SERVICIO DE INFORMACION

MATERIAL PARA PACIENTES Y FAMILIARES

HOJA DE CONSENTIMIENTO PARA PARTICIPAR EN EL ESTUDIO:

“CARACTERIZACION CLINICA Y MOLECULAR DE ENFERMEDAD DE VON HIPPEL LINDAU EN POBLACION MEXICANA”

INVITACION A PARTICIPAR

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

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

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

PROCEDIMIENTOS A REALIZARSE

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

EFFECTOS INDESEABLES Y RIESGOS

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

BENEFICIOS PARA LAS PERSONAS PARTICIPANTES EN EL ESTUDIO

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

CONSIDERACIONES ECONOMICAS

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

CONFIDENCIALIDAD

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

DERECHO A ABANDONAR EL ESTUDIO

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

Si usted considera que cualquiera de los puntos antes mencionados no está claro, o le surgen dudas nuevas, le suplicamos aclararlas con los investigadores responsables antes de determinar si participará o no en el estudio. Los participantes en el proyecto son la Dra. Ma. Elisa Alonso, Dra. Astrid Rasmussen y Lic. en T.S. Adriana Ochoa del Departamento de Genética del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. Tel. 5606 3822 ext. 2002, 2018 y 2019.

AUTORIZACION

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

Nombre

Firma

Fecha: _____

Teléfono: _____

Firma de quien obtiene el consentimiento

PREPARACIÓN PARA ESTUDIO DE CATECOLAMINAS

La indicación más importante para hacer una prueba para descartar feocromocitoma es antes de una cirugía o parto. El exponerse a estas experiencias estresantes con un feocromocitoma no detectado puede ser extremadamente peligroso, pero si los médicos saben que usted tiene este tumor, pueden tomar medidas preventivas que aseguren el bienestar del paciente y en dado caso del bebé.

La mejor prueba para detectar feocromocitoma es un procedimiento de Medicina Nuclear llamado MIBG, sin embargo es un estudio difícil de obtener y no todos los individuos son buenos candidatos. Las pruebas de orina y sangre son muy confiables si se toman en cuenta dos aspectos: dieta previa al estudio y una adecuada conservación de la muestra de orina.

Para que la información obtenida de la prueba de orina de 24 horas sea adecuada, es indispensable que el paciente – USTED – siga cuidadosamente las instrucciones necesarias, aunque en el laboratorio no le hayan hecho hincapié al respecto. Estas instrucciones son:

Es muy importante que la muestra de orina sea cuidadosamente refrigerada y mantenida así durante todo el proceso de recolección que dura 24 horas, y que se entregue lo mas pronto posible al laboratorio para que se procese.

No tome ningún medicamento sin que se lo autorice el médico que solicita la prueba. En particular, asegúrese de comentarle al médico si es que toma teofilina, medicamentos para la presión, metildopa (Aldomet), reserpina, guanetidina, L-Dopa o algún diurético.

Debe mantenerse en ayuno desde la noche anterior a la entrega de la muestra (a partir de las 10:00 PM lo único que podrá ingerir será agua simple); no tome los medicamentos que acostumbra tomar en la mañana a menos que el médico se lo haya ordenado expresamente. Lleve consigo los medicamentos al laboratorio, para que pueda tomarlos tan pronto haya terminado su estudio.

La dieta consiste en evitar absolutamente el consumir nicotina o cafeína desde por lo menos tres días antes del estudio (incluye cigarros, puros, café, té, refrescos de cola, etc.). Asimismo, es necesario que desde dos días antes de la prueba evite comer chocolate, frutas (especialmente plátanos) y cualquier alimento que contenga sabor vainilla. Si tiene dudas con la dieta, contacte al médico.

El procedimiento toma aproximadamente 45 minutos, sin embargo es importante que usted esté tranquilo y relajado desde unos 30 minutos antes de la toma de sangre para que los resultados sean confiables. Le sugerimos que llegue temprano y traiga un libro o su música favorita para sentarse y relajarse un rato antes.

Instrucciones para recolectar la muestra de orina: No inicie su recolección en viernes o sábado porque tendrá que esperar hasta el lunes para entregarla al laboratorio, y la muestra debe de ser fresca.

1. Inicie la recolección en la mañana. Al despertar, *orine en el baño*, no guarde esa orina.
2. Anote en el frasco de recolección la fecha y hora en que tiró la 1a. orina*.
3. Cada vez que vaya a orinar, durante las siguientes 24 horas, guarde en el frasco la orina. La última orina que guardará en el frasco es la de la mañana siguiente, a la misma hora que anotó en el frasco.
4. Mantenga el frasco con la orina en refrigeración TODO el tiempo (parece desagradable, si lo desea puede meter el frasco en una bolsa de papel para que no se vea).
5. Cuando recolecte la última muestra, anote en el frasco el día y hora en que terminó la recolección.
6. Lleve la orina al laboratorio tan pronto como le sea posible después de haberla recolectado.

** Si usted nota que el frasco ya contiene un líquido cuando se lo entrega el laboratorio, tenga cuidado de que este no toque su piel, es un conservador que es irritante. Si esto ocurriera, lave el área con abundante agua de inmediato.*

Adaptado de "VHL family alliance handbook, part 4".



¿Qué es el Von Hippel-Lindau?

El Von Hippel-Lindau (VHL) es un síndrome genético que, entre otras cosas, se caracteriza por el crecimiento anormal de los vasos sanguíneos en ciertas partes del cuerpo densamente vascularizadas.

Los vasos sanguíneos crecen normalmente formando una estructura "arborescente". Sin embargo, en las personas con VHL los capilares forman pequeños "nudos". Estos nudos se llaman angiomas o hemangioblastomas.

El VHL no distingue sexo, edad o raza, y se puede manifestar de manera distinta en cada paciente. Incluso en una misma familia las personas pueden mostrar uno, ninguno o varios síntomas asociados con VHL (incluyendo quistes y tumores en retina, glándula adrenal, páncreas, riñón, médula espinal y cerebro).



Como el VHL es un cáncer genético, frecuentemente es mal diagnosticado o no se diagnostica. Se cree que miles de individuos pueden tener VHL sin diagnosticar. Además, la disfunción de la proteína del VHL puede estar asociada a cáncer de riñón en el 70% de los casos.

Así que el VHL parece no ser tan raro como se creía antes

¿Cómo se adquiere el VHL?

El VHL es causado por una mutación o cambio en uno de los miles de genes del cuerpo. Una vez que aparece en la familia este cambio se vuelve hereditario. Un hijo de una persona con VHL tiene 50% de probabilidad de heredar el gen mutado.

Si el diagnóstico y tratamiento se realizan en forma tardía puede provocar daños serios y permanentes e incluso la muerte.



¿Cómo se ma

La primera ma
ser diferente en
síntomas pued
muy temprana e
dónde apar
impredecible. L
los quistes o tu
cerebro, riñón,
adrenal, páncre

¿Cuál es el tra

Debido a que n
detección ten
constante son
tratamiento. L
tratados más fá
en estadios tem

Para conservar
VHL se deben
procedimientos

Sugerencias de

- Examen oftalmológico
- Ultrasonido computarizado sin contraste adrenal, páncreas
- Análisis de sangre
- Resonancia magnética de cerebro
- Resonancia magnética auditiva
- Evaluación de riñón

El diagnóstico predictivo en el Von Hippel-Lindau

El *diagnóstico predictivo* o *presintomático* es la capacidad de detectar a los individuos portadores de la enfermedad antes de que presenten manifestaciones clínicas.

En el VHL es posible realizar el diagnóstico predictivo, pero conlleva problemas éticos importantes, además es necesario realizarse junto con un programa de consejo genético y apoyo psicoterapéutico.

El "Consejo Genético" es un proceso educativo mediante el cual se asesora a personas en riesgo potencial de heredar VHL, acerca del pronóstico y tratamiento del padecimiento.



Adaptado del Folleto original de
VHL Family Alliance
www.vhl.org

INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGÍA MVS



INFORMES

Instituto Nacional de Neurología y
Neurocirugía MVS
Insurgentes Sur 3877 Col- La Fama,
Tlalpan
Departamento de Genética
Tel. 56 06 38 22 ext. 2002
Departamento de Grupos de Apoyo
Tel. 56 06 38 22 ext. 2016

RESPONSABLE:
Dra. Astrid Rasmussen

MUCH
PRE

TENDE

NOSC

PREO

C

ANEXO 2

PROTOCOLO DE ESCRUTINIO DE CAMBRIDGE (Maher y cols, 1990)

Paciente afectado:

- (1) Examen médico anual con examen general de orina
- (2) Oftalmoscopia directa e indirecta anual con angioscopia o angiografia con fluoresceina.
- (3) Resonancia magnetica cerebral cada 3 años hasta los 50 años, posteriormente cada 5 años.
- (4) Ultrasonido renal anual con TAC abdominal cada 3 años (aumentar frecuencia si se presenta poliquistosis renal)
- (5) Determinación anual de catecolaminas en orina de 24 horas.

Familiar en riesgo:

- (1) Examen médico anual con examen general de orina
- (2) Oftalmoscopia directa e indirecta anual con angioscopia o angiografia con fluoresceina entre los 10 y 60 años de edad.
- (3) Resonancia magnetica cerebral cada 3 años entre los 5 y 40 años, posteriormente cada 5 años.
- (4) Ultrasonido renal anual con TAC abdominal cada 3 años entre los 20 y 65 años de edad (aumentar frecuencia si se presenta poliquistosis renal)
- (5) Determinación anual de catecolaminas en orina de 24 horas.

PROTOCOLO DE ESCRUTINIO DE CHOYKE (Choyke y cols, 1995), modificado por Lonser (Lonser y cols, 2003).

EXAMEN	EDAD DE INICIO	FRECUENCIA
Oftalmoscopia	Infancia temprana	Anual
Catecolaminas en orina de 24 horas	2 años	Anual (mas frecuente en hipertensos)
IRM contrastada de eje craneoespinal*	11 años	Anual
IRM o TAC de conducto auditivo interno	Inicio de sintomatología (tinnitus, vértigo, hipoacusia o pérdida de equilibrio)	De acuerdo a sintomatología
Ultrasonido abdominal	8 años de edad, puede sustituirse por IRM	Anual
TAC abdominal	18 años de edad o antes en caso necesario	Anual
Audiometría	Inicio de sintomatología (misma que para imagen de conducto auditivo interno)	De acuerdo a sintomatología

* Se refiere a imagen de encéfalo y médula espinal

ANEXO 3

COSTO DEL PROGRAMA DE ESCRUTINIO

El programa de escrutinio basado en el protocolo de Cambridge, es costoso e implica procedimientos invasivos. Como ejemplo, la siguiente tabla muestra el costo anual por persona si el protocolo se realiza en una institución pública. Utilizamos el tabulador de cuotas del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez (INNN) actualizado a Abril de 2006. La primera columna “clave” se refiere a la clasificación socio-económica del paciente, que se basa en el estudio realizado por el departamento de trabajo social en cada caso. Los estudios que incluimos en el cálculo del total son: imagen por resonancia magnética contrastada con gadolinio de encéfalo y medula espinal (sin incluir medula lumbar), tomografía axial computada de abdomen en el caso de adultos y ultrasonido abdominal en el caso de niños, una evaluación oftalmológica anual y la determinación de catecolaminas en orina de 24 horas.

CLAVE	IRM contrastada*	Núm regiones	Total IRM	TAC abdomen	US abdomen	Evaluación Oftalmológica	Catecolaminas urinarias**	Total niño	Total adulto
1	\$138.00	2	\$276.00	\$151.00	\$88.00	\$10.00	\$491.00	\$865.00	\$928.00
2	\$347.00	2	\$694.00	\$379.00	\$227.00	\$25.00	\$491.00	\$1,437.00	\$1,589.00
3	\$1,040.00	2	\$2,080.00	\$1,134.00	\$668.00	\$76.00	\$491.00	\$3,315.00	\$3,781.00
4	\$2,634.00	2	\$5,268.00	\$2,837.00	\$1,676.00	\$192.00	\$491.00	\$7,627.00	\$8,788.00
5	\$4,713.00	2	\$9,426.00	\$3,513.00	\$2,999.00	\$343.00	\$491.00	\$13,259.00	\$13,773.00
6	\$6,930.00	2	\$13,860.00	\$5,168.00	\$4,410.00	\$504.00	\$491.00	\$19,265.00	\$20,023.00

* Costo por región estudiada

** No se realiza en el INNN; se solicita en laboratorio privado de referencia.

IRM: Imagen de resonancia magnética

TAC: Tomografía axial computada

US: Ultrasonido

ANEXO 4

SECUENCIA DE REFERENCIA DEL GEN VHL (AF010238)

1: AF010238. Reports Homo sapiens von ...[gi:2282063]

LOCUS AF010238 14543 bp DNA linear PRI 24-NOV-2000
 DEFINITION Homo sapiens von Hippel-Lindau tumor suppressor (VHL) gene, complete cds.
 ACCESSION AF010238 U19763 U49746 U68055 U68176
 VERSION AF010238.1 GI:2282063
 KEYWORDS .
 SOURCE Homo sapiens (human)
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..14543
 /organism="Homo sapiens"
 /mol_type="genomic DNA"
 /db_xref="taxon:9606"
 /chromosome="3"
 /map="3p25-26"
 repeat_region 141..438
 /rpt_family="Alu"
 gene 565..12993
 /gene="VHL"
 promoter 565..670
 /gene="VHL"
 mRNA join(643..1054,5392..5514,8667..12993)
 /gene="VHL"
 exon 643..1054
 /gene="VHL"
 /number=1
 5'UTR 643..714
 /gene="VHL"
 /note="5'UTR"
 CDS join(715..1054,5392..5514,8667..8845)
 /gene="VHL"
 /note="eloin binding protein; VHL protein; pVHL"
 /codon_start=1
 /product="von Hippel-Lindau tumor suppressor"
 /protein_id="AAB64200.1"
 /db_xref="GI:2282064"
 /translation="MPRRAENWDEAEVGAEEAGVEEYGPEDGGEESGAEEESGPEESG
 PEELGAEEMEAGRPRPVLRSVNSREPSQVIFCNRSRVLVPLVWLNFDGEPQPYPTLP
 PGTGRRIHSYRGHLWLFRDAGTHDGLLVNQTELFVPSLNVGQPIFANITLFPVYTLKE
 RCLQVVRSLVKPENYRRLDIVRSLYEDLEDHPNVQKDLERLTQERIAHQRMGD"
 intron 1055..5391
 /gene="VHL"
 /number=1
 repeat_region 1227..1440
 /rpt_family="Alu"
 repeat_region 2038..2185
 /rpt_family="Alu"
 repeat_region 3851..4074
 /rpt_family="Alu"
 repeat_region 4299..4588
 /rpt_family="Alu"
 repeat_region 5062..5351
 /rpt_family="Alu"
 exon 5392..5514

```

/ gene="VHL"
/ number=2
intron 5515..8666
/ gene="VHL"
/ number=1
repeat region 5901..6187
/ rpt_family="Alu"
repeat region 6254..6558
/ rpt_family="Alu"
repeat region 6824..6981
/ rpt_family="Alu"
repeat region 7205..7493
/ rpt_family="Alu"
repeat region 7569..7620
/ rpt_family="Alu"
repeat region 7678..7867
/ rpt_family="Alu"
repeat region 8003..8292
/ rpt_family="Alu"
exon 8667..12993
/ gene="VHL"
/ number=3
3'UTR 8846..12993
/ gene="VHL"
/ note="3'UTR"
polyA signal 12354..12359
/ gene="VHL"
polyA signal 12408..12413
/ gene="VHL"
repeat region 12864..13154
/ rpt_family="Alu"
polyA signal 12988..12993
/ gene="VHL"

```

ORIGIN

```

1 gaattcagtt agttgacttt ttgtacttta taagcgtgat gattgggtgt tcccgtgtga
61 gatgcgccac cctcgaacct tgttacgacg tggcacatt gcgcgtctga catgaagaaa
121 aaaaaaattc agttagtoca ccaggcacag tggctaaggc ctgtaatccc tgcactttga
181 gaggccaagg caggaggatc acttgaacct aggagtctga gaccagccta ggcaacatag
241 cgagactccg tttcaaaaaa caaataaaaa taattagtcg ggcatgggtg tgccgcgcta
301 cagtaccaac tactcgggag gctgaggcga gacgatcgtc tgagccaggg aggtcaaggc
361 tgcagtgagc caagctcgcg ccaactgact ccagcccggg cgacagagtg agaccctgtc
421 tccaaaaaaa aaaaaaaca ccaaacctta gaggggtgaa aaaaaatttt atagtggaaa
481 tacagtaacg agttggccta gcctcgctc cgttacaaca gcctacggtg ctggaggatc
541 cttctgcgca cgcgcacagc ctccggccgg ctatttccgc gagcgcgctc catcctctac
601 cgagcgcgcg cgaagactac ggaggtcgac tccggagcgc gcacgcagct ccgccccgcg
661 tccgaccgcg ggatcccgcg gcgtccggcc cgggtggtct ggatcgcgga gggaatgccc
721 cggaggggcg agaactggga cgaggccgag gtaggcgagg agggagcagg cgtcgaagag
781 tacggccctg aagaagacgg cggggaggag tccggcgccg aggagtcagg cccggaagag
841 tccggcccgg aggaactggg cgccgaggag gagatggagg ccggggcgcc gcggcccgtg
901 ctgcgctcgg tgaactcgcg cgagccctcc caggtcatct tctgcaatcg cagtcgcgcg
961 gtcgtgctgc ccgtatggct caacttcgac ggcgagccgc agccctacc aacgctgccc
1021 cctggcacgg gccgcccgat ccacagctac cgaggtacgg gccggcgctc taggcccgac
1081 ccagcagggg cगतगacag gtctgaagcc cctctaccgc cccggggctc attttgaga
1141 cggggaactg aggcccttg aggcaggaca catccagggt gacgctgctc gtaagcgtca
1201 gagcattctt ttttttttt ttttttttt tctgagacgg agtctcgctc tgtcggcccag
1261 gctggagtgc agtggcgcga tctcgactca ctgcagcctc cgcctcccgg gtccaagcga
1321 ttctcctgcc tcagcctcct gagttagctgg gattacaggc gtgcgccacc gcgccggct
1381 gatttttata tttttagtag agacggggtt tcaccatgtt ggtcaggctg gtctcgaact
1441 aactgaacct gtgatccgcc cgcctcggcc tccccaaagt gctgggctta tgggcatgag

```

1501 cctccgcgcc cgcccagag cattctttat aaggccgaat agtttgcatt tgaaggtggc
1561 tccccccag tccccacc cactgttatt tccccctca agaaaagctg cacccttaac
1621 accccatctg tccagtcctc atgactccag tgggccagtt ctgctgagtc cctgccctcg
1681 tggagaacac attcctcctg gggagactga cagatgcaaa gacaggaaca agccagggtc
1741 atgttggcgc cggaagagcc gaccgtgtgt ggcgtgggaa attgacttac ctgctgctg
1801 ggagatggag gggttgcggt tgtgtggttt cagttaagga gcacttcccg gagaaggaag
1861 agagcaggat ggagtaggaa ctagccaacc ctagtaaga ggttctagac atgctgctg
1921 tgagacctgg agtcttggga gaggatgctt aaaaggtgat tttacccta ggaatatggg
1981 ggcaactgaa ttttttttt tttttgagac gggagtcttg ctctgcaagc tggagtgcag
2041 tggcccacgc tagaatgcag tggcgcgatt gcggctcatt gcaacatctg ccacctggg
2101 tcaagtggtt ctcttgccctc agcctcccga ggagcgggga ttactggcgt cgcgccacc
2161 tcttgctaa ttttttttt agtagagacg ggggttctgt cttttggct aggctggtct
2221 cgaactcctg acctcagatg atccaccgc cttggcctcc caaagtctg agattacagg
2281 tgtaagccac tgcgccagc cctttgaaag ttttccagta tttatgtata tatatttttg
2341 agttggagtc tggatctgtc gccagactgg agtgctgttg cacaatctg gctcactgca
2401 atctccgact ccctggttca agcagattctc ctgctcagc ctcccagta gctgggatta
2461 caggcacgca ctaccattcc cagctaattt tttgtattct tagtagagac agggtttcac
2521 catgttggcc aggatggctc ccatctctg cgtcgtgat ctgctgctt aggcctccca
2581 aagtgtggg attacaggcg tctgtggatt tcggccaca cgtccgaccg aaagttttta
2641 agcagggaca tgacattgtc agatttatat actgaaaagc tcaccaggt tgccaagtgg
2701 tttggagggg aaagactgct gtcgaggaag cagttaggta gttgtgaaaa cccagggtgag
2761 gaataactag gccttaccta agtgagggc agtaactctg ccatggcctt taagcagaga
2821 agtagtccta gtgtcactta atctttacaa aggatttttg caaggatccc gatctttctt
2881 ccttgagggt ggtgtactta atacactttt acaccagact tctaagtta gatgaagaac
2941 acagtatttc cagggatcaa catttctgta ggctcctatt ttatatagga aattgtatga
3001 attttgtatt ttactccaaa attttctgt gcccgattta atataaaaa ttactgagcc
3061 tgggtgcagt ggctcatgcc tgtgatctca gcactttggg aggctgagcc aggagattt
3121 cttgagccca ggagctggag accagcctgt gcaacatagt gagaccctgt ctgtatttaa
3181 aaaaaaaaa aaattcttga aaaattagca gggcacattc ctgccttag tcccagctac
3241 ttgggaagct gaggcaggaa gatcaccoga acccaggagt tggaggctac agtgaactat
3301 gatggtgctt ctgaatagtt gctgtactct agtctggtaa cacagcaaga ccctgtctct
3361 ctatcttgtc ttttttttt ttttttttg agacaggatg tctgctgtt gcctgggctg
3421 gagtgtggag gctggagttt ggtggcatga tcacggctca ttgcaccctt aacctgggt
3481 caagcagctc tcccagactc tcagcttccc aaagttagct ggactatagg catgctccac
3541 tatgtctggc taatttcttt ttttatttt atttttagta gagatgaggt cttgctatgt
3601 tgcccaggct gagacctcat ctctttttta tttttttta atttttatt atactttaag
3661 ttctagggta catgtgcaca acgtgcaggt ttgttacata tgtaaacatg tgccatggtg
3721 gtgtgctgca ccatagaga cctcgtctta aaaaaagaaa ataacattac ttttgaaggt
3781 acttaatgca ctgaattgta catttaaaaa tggttaaaa ggtaaatggt tgaggcaggt
3841 agatccacct gaggtcagga gttcaagacc agcctgacca atatggtgga acctgtctc
3901 tgctaaaaat acaaaagtta gctgcatgtg gtggcatgct cctgtttagt cccagctact
3961 cgggaggtcg aggcaggaga attgcttgaa cctgggagcc ggaggtggca gtgagccaag
4021 atcacaccac tacactccag cctgggcaac agagcaagac tccatctcta aataataaat
4081 aaaatggtaa cttttatgta tattttacca aaatttaaaa aattacaagt ttacatttct
4141 taaaatttcc catcaaatct gtaagtaaat ttatgcccc aggaacaagt gctatattta
4201 ttctgagaca acctcctcct tccttaaaaa gaatcttagg gctggaggat tgcttctgct
4261 cctcttttgt ttgtgatgta tgcattttga aaattctggg cggggcgcag tggctcactc
4321 ctgtaatccc agcactttgg gaggccgagg cgggcggatc acaagatcag gagattgaga
4381 ccatcctggc taatacgggtg aaacctgtc tctactgaaa ataacaaaaa attagccggg
4441 cgtggtggcg ggcacctgtg gtcccagctt tttgggagcc tgtggcagga gaatggcata
4501 aacctgggag gcggagcttg cagtgcagcc agatcgtgcc actgcactcc agcctgggctg
4561 acagagcgag actgcactct aaaaaaaaa aaaaagaaaa agaaaagaaa attctggtat
4621 aatttacata cagtaaaatg cacagatctt agggtttgat gagttttctc tcgacatggt
4681 tttgcacttc cttgtttttg agaagcactg atttgagaag tcagtggctt tttctcttta
4741 gtttgcaggg tttgctgtga tttgtaatca cgtacttgac ctaggcttcc cttttccacc
4801 atggtagcag aaagggcatg ggatttagag ctttaagtac gcgctctttg ctactgtct
4861 tataccttga gcatgtcact tctctctca gacttgtttt ctcatctgta aatggatctg
4921 ttgtgaggac tgactgagat aatgttacta gaagggcttt gtataatatt taagcagagt
4981 gagaggtaa ctttttgtgt aggtcagggg aatggagaa aataggtgcc ctgactcaga

5041 ccagctctggc tctttttttt tttttttttg gagacggagt cttgctctgt caccaggct
5101 ggagtgcagt ggcgcatct cggctcacgg caagctccac ctctggggtt cacaccattc
5161 tctgcctca gccctccgag tagctgggac tacaggcgt cgcacacac ctggtcaatt
5221 tttttgtatt ttttagagag acgaggtttc accacgttag ccaggacggt ctgatctcc
5281 tgacctcatg atccgctgc ctggcctcc caaagtgtg ggattacagg tgtgggccac
5341 cgtgcccagc caccggtgtg gctcttaac aacctttgct tgtcccgata ggtcaccttt
5401 ggctcttcag agatgcagg acacacgatg ggctctggt taaccaaact gaattatttg
5461 tgcatctct caatgttgac ggacagcta tttttgcaa tatcacactg ccaggtagctg
5521 acgttttact ttttaaaaag ataagttgt tgtggtaagt acaggataga ccacttgaaa
5581 aattaagccc agttctcaat ttttgctga tgtcaggcac ggtatccaat ctttttgtat
5641 cctattctct accataaata aaatggaagt gatgtattg tacgttatgt gttaaagggtg
5701 ttatgggtgc tcaaaagcac tttgggtct taagagacia gcgaaattaa agtatcatat
5761 cataggttag tttgtagaa ttgtagaatt acgaatgcct tttgtttccc tggccaaatt
5821 gtgccctgga gttccaggag aacaatgtgt agagcatgag atattttggc ttatttgttg
5881 ctgacttcta atttttttta ttttttgag acagaatctc gctgtgtag ctaggctgga
5941 gtgcagtggc gcaatctcgg ctcactgcaa cctccgcta ctgggttcca gcgattctct
6001 tgtctcagcc tcccagtag ctgggactac aggcgtgtgc caccactctc gataattttt
6061 tgtattttta gtagagacgg ggtttcaccg tgttagccag gatggtctcc atctctgac
6121 ctcatgatct gccgcctac gcctccaaa gtgctgggat tacaggcctc agccacagca
6181 cctggcctat gtattttcaa tttaacacia tcaagctcac agtgccaatc agaggtgttt
6241 ttttttttt taatttttat ttttagagag tctcacagt tcatccaggc tggagtgcag
6301 tggtcgatt tcagctcact gcaacctctg catcctgggt tcaagtgatt ctctgctc
6361 agcctcctgg gttagctggg ttataggtgc ctgtcaccac acctggctaa tttttgtatt
6421 ttttagtagag atgaggtttc accatgttg ccaggctgat cttgaactcc tgacctcagg
6481 tgatctgccc acctcagcct cccaaagtgc tgggattaca ggcgtgagcc actgcgtcca
6541 gcctgttttt tttttttttt aaatcattga agattggtat aatacttccac tatttgtttg
6601 aagctcaaat gättttatca gggtaaaacc taataaactg atgttctgtt gggtaaaaaa
6661 aacctcacta aagaccagca gtgtgtgtgt gctcctgct gtaatcatgc ctgtaattcc
6721 agcacttagg gaggtatgg cgggaggttc gcttgagacc aggagttctt gaccagcctg
6781 gacaacaaag tgagaccca gctccacaaa aaaatttttt ttaattacc tgggcatctt
6841 agcatatgcc tgtggtcaca gctatttggg aggttaggt gggaggatcc ctgagccca
6901 ggagtttgag gctgcagtga gccatgatca taccactgca ctccagccca ggtgacagag
6961 tgagatcctg tctcaaaaaa agaaaaaaa aactcaaaaa cccccaaat acatgggttt
7021 cataagatcc aaactactat gtgtgtatag atcctgtttt aaggaagtag atataaaaa
7081 atgagcattg ctaagttaa tttggtaaat ttgccttata gaacacctc gagtacgttt
7141 ccagttagtg taaaatagga attgggatac ccaattcagt tgtactaaat tttctttttt
7201 ttttttttt ttgagacgga gtctcgtct gtcgccagg ctggagtgca gtggcgggat
7261 ctcggtcacc tgcaagctcc gccctccggg ttcacgcat tctcctgct cagcctccca
7321 agtagctggg actacaggcg cccgccacta cgcgccgcta attttttga ttttttagtag
7381 agacggggtt tcaccgtttt agccgggatg gtctcgatct cctgacctcg tgatccgccc
7441 gccctcggct cccaaagtgc tgggattaca ggcgtgagcc accgcgccg gcctagattt
7501 tctaagtaca cattgttttg gttatgtgt ttgtgactac caccceaaa ctaataacca
7561 ctttttttt ttttttgaga cagagctca ctgtgtcacc caggctggag tgcagtggcg
7621 tgtgatcttg gctcactgca acctctgct ctgggttca agtgattctc ctgcttcagc
7681 agctgggact acaggtgtgc accaccaagc ctggctaatt ttttgcatt tagtgagac
7741 ggggttttca ccatgttgac caggctgatc ttaaactctt gagctcaggc agtctgctg
7801 cctcagcctc ctaaagtgt aggttacag gcgtgagcca ctgcgccag cccaccgttt
7861 tattgttca taattctgta gtccaggctg ggctcagcta ggcagttact ctgctgggtg
7921 tagctgttg tgtgctgce ttttgetgge agctgggggc tgggcctgtc cctctttttt
7981 tttttctct tttcttttt cttttttttc aagatagggt ctactctgt caccagggtt
8041 ggagtgcagt ggcagatct tagctcactg caacctctgc ctccagggt caagtatcc
8101 tcccacctca gccctcccag tcgctgggac cacaggcatg tgcaccatg cctggctaatt
8161 tttttgtgta tttttagag acgggtttc gccatgttgc caggctggtc tgaactcct
8221 gagctcagge gatctactga cgttggcctc ccaaagtgtt gggatcacag gcatgaacca
8281 ccatgctgg ccaggcctg tctctttta tgtgtctct ctagcagggt agctcagggc
8341 tttcaaaagt ataaaagcag aagtcagcag gcctttttaa ggettcggcc tagaattgcc
8401 agtgcgctt catcgacatt cagttagtta aagcaatcac aagcccagcc catttcaagg
8461 tgaattact acagaggcat gaacaccatg aggtgtccat agggggccat cagcataaca
8521 cactgccaca tacatgact cacttttttt cttaaccta aagtgagatc catcagtagt

8581 acaggtagtt gttggcaaa cctcttgttc gttccttgta ctgagaccct agtctgtcac
8641 tgaggatttg gtttttggcc ttccagtgta tactctgaaà gagcgatgcc tccaggttgt
8701 ccggagccta gtcaagcctg agaattacag gagactggac atcgtcaggt agctctacga
8761 agatctggaa gaccaccaa atgtgcagaa agacctggag cggctgacac aggagcgcat
8821 tgcacatcaa cggatgggag attgaagatt tctgttgaaa cttacactgt ttcattctcag
8881 cttttgatgg tactgatgag tcttgatcta gatacaggac tggttccttc cttagtttca
8941 aagtgtctca ttctcagagt aaaataggca ccattgctta aaagaaagtt aactgacttc
9001 actaggcatt gtgatgttta ggggcaaaaca tcacaaaatg taatttaatg cctgccatt
9061 agagaagtat ttatcaggag aagggtgttg catttttgc tctagtaag tcaggacagc
9121 ttgtatgtaa ggaggtttat ataagtaatt cagtgggaat tgcagcatat cgtttaatt
9181 taagaaggca ttggcatctg cttttaatgg atgtataata catccattct acatccgtag
9241 cggttggtga cttgtctgcc tctgtcttg ggaagactga ggcatccgtg aggcagggac
9301 aagtctttct cctctttgag accccagtgc ctgcacatca tgagccttca gtcagggttt
9361 gtcagaggaa caaacaggg gacactttgt tagaaagtgc tttagaggttc tgctctatt
9421 tttgtgggg ggtgggagag gggacctaa aatgtgtaca gtgaacaaat gcttaagg
9481 gaatcatttt tgtaggaagc atttttata attttctaag tctgtcactt tctcggcca
9541 ctctgttga agtgctgttt tattactgtt tctaaactag gattgacatt ctacagttgt
9601 gataatagca tttttgtaac ttgccatccg cacagaaaa acgagaaaa ctgcatgttt
9661 gattatagta ttaatggaca aataagtttt tgctaaatgt gattatttct gttccttttt
9721 gtaaatatgt gacattcctg attgatttgg gttttttgt tgttgttgtt ttgttttgtt
9781 ttgtttttt gggatggagk ctactcttg tcaccaggc tggagtgcag tggcgccatc
9841 tccgtcact gcaacctctg cctcctgagt tcacgtaatc ctctgagta gctgggatta
9901 caggtgcctg ccaccacgct ggccaatttt tgtactttta gtagagacag tgtttcgcca
9961 tgttgccag gctggttca aactcctgac ctcaggtgat ccgccacct cagcctcca
10021 aaatggtggg attacaggtg tgtgggccac cgtgcctggc tgattcagca tttttatca
10081 ggcaggacca ggtggacttc cacctccagc ctctggctct accaatggat tctaggagta
10141 gctggactg tttcatagtt ttctaaatgt acaaattctt ataggctaga cttagattca
10201 ttaactcaaa ttcaatgctt ctatcagact cagttttttg taactaatag atttttttt
10261 ccacttttgt tctactcctt ccctaatagc tttttaaaaa aatctcccca gtagagaaac
10321 atttgaaaa gacagaaac taaaaaggaa gaaaaaagat ccctattaga tacacttctt
10381 aaatacaatc acattaacat tttgagctat ttccttccag cctttttagg gcagattttg
10441 gttggttttt acatagttga gattgtactg ttcatacagt tttataacct ttttcattha
10501 actttataac ttaaatattg ctctatgta gtataagctt ttcacaaaca ttagtatagt
10561 ctccctttta taattaatgt ttgtgggtat tctttggcat gcatctttaa tctctatcc
10621 tagcctttgg gcacaattcc tgtgctcaaa aatgagagtg acggctggca tgggtggctc
10681 cgcctgtaat ccagactt tgggaagcca aggtaagagg attgcttgag cccagaactt
10741 caagatgagc ctgggctcat agtgagaacc cgtctataca aaaaattttt aaaaattagc
10801 atggcggcac acatctgtaa tctagctac ttggcaggct gaggtgagaa gatcattgga
10861 gtttaggaat tggagcggc agtgagtcat gagtatgccg ctgcactcca gcctggggga
10921 cagagcaaga ccctgcctca aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa tcaggccggg aatggtggtt
10981 cacgctgta atccagcac tttgggggtg cgagggtggc agatcacctg aggtcaggag
11041 ttcgagacca gctggccaa catggtaaaa cccatttct actaaaaaat acaagaatta
11101 gctgggtgtg gtggcgcag cctgtaatcc tagctactca ggaggctgag gcaggagaat
11161 cacttgacc caggaggcga agattgcagt gagctgatat cgcaccattg tactccagcc
11221 tgtgtgacag agcaatactc ttgtcccaa aaaaaaaaaa attcaaatca gtagaagtg
11281 aatgagacac tccagttttc cttctactcc gaatttttagc tctcctttc aacattcaac
11341 aaatagtctt ttttttttt ttttttttt ggggatggag tctcctctg ttgccaggc
11401 tggagtgcag aggtgcgatc tctgctcact acaagctctg cctcccgagt tcaagtgatt
11461 ctctggctc accctcctga gctgggatta caggcgcctg ccaccatgcc tggctaattt
11521 tgtgttttta gtggagacgg ggtttcacea tgttgtccag gatggtcttg atctcctgac
11581 cttgtgatcc acccacctca gcctccaaa gtgggtgggat tacagggtg agccacggc
11641 tccagccagc tttattatt tttttaagct gtctttgtgt caaaatgata gttcatgctc
11701 ctctgtttaa aacctgcagg ccgagcacag tggtcatgc ctgtaatccc agcattttg
11761 gagaccaagg cggatggatc acctgaggtc aggagctcaa gaccagcctg gctaacatgg
11821 tgaacctca tetccactta aaatacaaaa attgccggcc gcggcggtc atgctgttaa
11881 tcccagcact ttgggagcc taggcgggtg gatcacgac tcaggaaatc gagaccatcc
11941 tggctaacac gggtaaac ccgtctctat taaaaaatag aaaaaattag gcggcggtg
12001 tggtagcgc ctgtagtccc agctactcga gagcctgagg caggagaatg gcatgaacct
12061 ggaaggtgga gcttgcagt agctgagatg gtgccactgc actctaactt gggcgacaga

12121 gtgagactcc gtctcaaaaa aaaaaacaaa aacccaaaact tatccagggtg tggcgggtggg
12181 cgectgtgag gcagggcgaat ctcttgaacc cgggaggcgg agggttgcagt gagccaagat
12241 cacaccattg cactccagcc tgggaaacaa gagtgaatt ccatctcaa accaaatttt
12301 caaaaaaaaa acatgccgct tgagtactgt gtttttgggtg ttgtccaagg aaaattaata
12361 cctgtagcat gaataatggt tgttttcatt tgaatcttg tgaatgtatt aaatataatc
12421 ctcttaagag acggtgaagt tcctatttca agttttttt gttttgttt gtttttaagc
12481 tgttttttaa tacattaat ggtgctgagt aaaggaaata ggcagggtgt gttgtgtggt
12541 gttttaacta ggcgcttctc tctcagagag ttttgaacc tgtttacata aaggccaag
12601 atgggaagga gatccaaaca taagccacca gcctcattcc aagtctcttc tctttccaac
12661 cctggatttt tttttttat ttaacattgt ttcttttagc tttattttc ttataaaaga
12721 aatgtatcac tataaaaaat tacacactac agaaaaatat taagaagaaa aacattcaca
12781 tcggaacaa agttttttcc catgaaaaca gaacccaaaa gggtaagtgg ttagtatctc
12841 accagcaatt atgttgagaa taaggccagg cgagggtggt cacgcctgta atctcagcac
12901 tttgggaggc cagggcaggc agatcatctg aggtcaggag tttgagacca gcctggccaa
12961 catggtgaaa ccttatctct actaaaaatt aaaaaattag ctgggtgtgg tggcatgtac
13021 ctgtaatccc agctattcag gaggctgagg caggagaatt gcttgaacct gggaggcggg
13081 ggttgcagt agctgagatt gcaccattgc actctagcct gggcaacgag tgaactccg
13141 tctcaaaaga aaaaaatata tatatataga gagagagaga gagagaata cacagtgagg
13201 gcatgggcta gaaatcagt cactaaggat atgaaataga tgtcaatgtg aactttcgg
13261 atactttgac cctgggtctt tgtatctct tcttagcacc tcagtccac gctctgctag
13321 tcattggctt cctgatacc cttcaatata gactgagtat ccctaacca aaaatttcaa
13381 atccaaagca ctccaaaatc caagagtcca acgtgacgcc acaagtggaa agttccacat
13441 gcgagtactt aacacaaact tgtttcacgt gcaaaactgg ggaaaatatt gcttacaatt
13501 acctacagcc tgtgtctata aggtgtttat gaaactgggtg ttatgatgta tatgttttct
13561 tttttgttc ctggctcata actcccatag cccttgttac ggatgtgagc caccttgct
13621 ggctgatttt taagttttt gtagagatgg ggtctcgtg tgttgccctg gctggttta
13681 actcctgggc tcaagcgatc ctcccactt ggectccaa agcctggga ttacagggtg
13741 gattacaacc ctcatctcag agaaggtcct accccatacc ctgggggaag gaatggtgac
13801 atcataaagc ctcgtaaaa cccatgagga cagtggagag tgtcaggata gctgaactac
13861 gtgtagaggt tcttgagggg tggcgccc agggaggga cagaagctct ggcgccctta
13921 tcccatacct tgggtgacgc atctcttcat ctgtatcctt cgtaatatcc tttatgataa
13981 accaggtagg ccgggcgtgg tggctcacac atataatccc agcactttgg gaggctgagg
14041 taggaggatt gcttcagcct gggagttcaa gataacatca tagtgagatc ctgtctctac
14101 tagaaaaaaaa aagaacaacc aggagtgggtg gcgcatgctt gcagtcccag ctgttcagtt
14161 tgcactccag cctgggagac agagcaagac ctgctgtctc aaaaaaaaaa gactggtaaa
14221 catttttccac tgagtctgt tagccactcc agcaaattaa acccaaagcg aagggtggtg
14281 gaaccccaac ttgaagctgg ttggtcagaa gttctggagc cctaaacttg ctactggtgt
14341 gtgggtgggg gcagtcttg ggactgagge ctcaacctgc aggatctgat attattcca
14401 gaaagatggt gttggaagt aattagagga tacctaattg gtgttactg cagaattgat
14461 tgcttgctcg ctctcgggaa gaaatctaca catttggaac cgaaagtgtt ctgggttgg
14521 attgtgtag tgtggaatct aga

//

Von Hippel–Lindau disease germline mutations in Mexican patients with cerebellar hemangioblastoma

ASTRID RASMUSSEN M.D., M.Sc., SONIA NAVA-SALAZAR, B.S., PETRA YESCAS, M.Sc., ELISA ALONSO, M.D., ROGELIO REVUELTA, M.D., IVÁN ORTIZ, M.D., SAMUEL CANIZALES-QUINTEROS, Ph.D., MARÍA TERESA TUSIÉ-LUNA, M.D., Ph.D., AND MARISOL LÓPEZ-LÓPEZ, Ph.D.

Department of Neurogenetics and Molecular Biology, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez; Biological Graduate Sciences Program, Universidad Autónoma Metropolitana; Chemistry Faculty, Universidad Nacional Autónoma de México; Neurosurgery Division, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez; Molecular Biology and Genomic Medicine Unit, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán; Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México; and Biologic Systems Department, CBS Division, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, Mexico City, Mexico

Object. Central nervous system (CNS) hemangioblastomas are benign vascular tumors arising either sporadically or as a manifestation of von Hippel–Lindau (VHL) disease, a hereditary cancer syndrome. The authors studied a series of patients with CNS hemangioblastomas and their families to identify germline mutations in the *VHL* tumor suppressor gene and to establish a predictive testing and screening protocol.

Methods. Patients admitted between 2002 and 2004 to the Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía for hemangioblastoma were prospectively enrolled, together with their at-risk family members. The authors performed the molecular analysis of the *VHL* gene by using polymerase chain reaction and direct genetic sequencing. All asymptomatic mutation carriers underwent genetic counseling and tumor surveillance. Ninety-eight individuals were tested for *VHL* mutations—23 symptomatic and 75 asymptomatic individuals belonging to 16 families. Seven of the families had definite clinical criteria of VHL disease, five had sporadic hemangioblastoma, and four had CNS hemangioblastoma combined with minor visceral signs. Molecular genetic testing identified five germline mutations in six of the definite VHL families (sensitivity 85%), but none in the possible VHL and sporadic hemangioblastoma cases; four of these mutations had been previously described and one is a novel mutation present in two unrelated families. After patients carrying the mutation were identified, they underwent clinical screening and asymptomatic VHL-related lesions were identified in 43%.

Conclusions. Genetic testing for mutations in the *VHL* gene is crucial in patients with CNS hemangioblastoma. The prompt identification of patients carrying the genetic mutation allows for a multidisciplinary screening protocol to decrease morbidity and mortality rates in these patients, while avoiding costly and invasive procedures for noncarriers.

KEY WORDS • hemangioblastoma • von Hippel–Lindau disease • gene mutation

CENTRAL nervous system hemangioblastomas are benign vascular tumors that may present sporadically or as a manifestation of the autosomal-dominant hereditary cancer syndrome VHL disease.^{21,24} They affect the cerebellum, brainstem, spinal cord, retina, and occasionally supratentorial structures. Despite their histological benign nature, they are associated with increased morbidity and mortality rates as a result of their expansive nature and

their recurrent behavior in patients with VHL disease.^{11,17,18} In approximately 60 to 65% of all patients one or more CNS hemangioblastomas develop, and more than 20% of all patients with apparently sporadic hemangioblastoma have a germline mutation in the *VHL* gene.^{7,9}

Patients with VHL disease are also at a high risk for the development of other vascular tumors and cysts, with an observed incidence of 1:36,000 in Caucasians and a nearly complete penetrance by the age of 60 years. The associated tumors include endolymphatic sac tumors, benign cysts of the pancreas and kidney, RCCs, pancreatic islet cell tumors, benign or malignant pheochromocytoma, and epididymal or broad ligament cystadenomas.^{7,20} The life expectancy and quality of life in patients with VHL disease are compromised by the high incidence and recurrent nature of the neo-

Abbreviations used in this paper: CNS = central nervous system; INNN = Neurosurgery Clinic of the Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez; pVHL = von Hippel–Lindau protein; RCC = renal cell carcinoma.

TABLE 1

Clinical classification of families prior to genetic testing

Clinical Diagnosis	No. of Families	No. of Cases (symptomatic/asymptomatic)
definite VHL disease	7	84 (14/70)
possible VHL disease	4	8 (4/4)
sporadic hemangioblastoma	5	6 (5/1)
total	16	98 (23/75)

plasms, their malignant potential, and the side effects of current therapeutic strategies.⁷

The cause of VHL disease is the presence of mutations in the *VHL* tumor suppressor gene, which are heterozygous in the germline of patients, and homozygous in the tumors and cysts as a result of somatic loss of heterozygosity. The gene maps to chromosome 3p25-26, and it encodes three isoforms of the pVHL protein, which is an ubiquitin ligase that is involved in the mammalian cells' sensing and response to hypoxemia.^{14,16}

The advent of molecular tools for an early diagnosis of VHL disease has led to the possibility of preventive screening protocols that permit the early detection and treatment of tumors in patients with *VHL* mutations, while allowing the at-risk individuals, who do not carry a mutation, to discontinue costly and invasive monitoring strategies.^{17,28} Furthermore, genotype-phenotype correlations have been reported in affected families; several subphenotypes are now recognized, based on the presence or absence of pheochromocytoma and RCC.^{17,23}

We performed a study of a series of families ascertained through a proband with CNS hemangioblastoma to identify disease-causing *VHL* mutations. Whenever a mutation was identified, asymptomatic family members were offered the possibility of undergoing predictive genetic testing and clinical screening. To the best of our knowledge, this is the largest analysis of *VHL* mutations in a Latin-American population.^{25,26}

Clinical Material and Methods

We prospectively enrolled all the patients with CNS hemangioblastoma admitted to the INNN, between 2002 and 2004. Sixteen probands were identified, and an extended pedigree was obtained for each family. We organized genetic counseling sessions for each family, in which all at-risk individuals were invited to partake. All participants signed informed consent forms approved by the INNN's institutional review board, and in the case of children, assent was obtained if they were between 11 and 17 years of age.

A total of 98 individuals agreed to participate—75 were asymptomatic and 23 exhibited some manifestation of either hemangioblastoma or VHL disease at the time of enrollment (59 were female [60.2%] and 39 were male [39.8%], and 34 were children < 18 years of age). All symptomatic individuals underwent magnetic resonance imaging of craniospinal axis and internal auditory canal, ophthalmological examination, abdominal computerized tomography scanning, and 24-hour urinary catecholamine determination.⁴

According to the evaluation, patients were classified into three clinical groups: 1) definite VHL disease (if individuals fulfilled the clinical criteria proposed by Melmon and

TABLE 2

Von Hippel-Lindau disease germline mutations in patients with CNS hemangioblastoma

Mutation Name*	Type of Mutation	No. of Families	No. of Cases w/ Mutation (symptomatic/asymptomatic)	VHL Phenotype
<i>DelPhe76</i>	in-frame deletion	1	4 (3/1)	Type 1
<i>1012_1013insA†</i>	frameshift insertion	2	19 (7/12)	Type 1
<i>D121G</i>	missense	1	1 (1/0)	Type 2B
<i>R161X</i>	nonsense	1	1 (1/0)	Type 1
<i>P86S</i>	missense	1	1 (1/0)	Type 1

* Nomenclature according to Human Genome Mutation Database and based on the genomic DNA sequence AF0102387.

† The novel mutation.

Rosen¹⁹ and modified by Neumann²⁰); 2) possible VHL disease (when family history was suggestive of VHL disease but the information could not be confirmed, or when the proband only had a minor visceral sign, in addition to the CNS hemangioblastoma); and 3) sporadic hemangioblastoma (patients with a solitary CNS hemangioblastoma and a negative family history).

In the families in which a pathogenic mutation was identified, we extended the genetic testing to all the at-risk individuals who had agreed to participate. The predictive diagnostic testing and genetic counseling were offered according to the recommendation of the American Society of Clinical Oncology and with approval of the institutional review board.²

We analyzed genotype-phenotype correlation in every case, and all asymptomatic patients carrying the genetic mutation were offered extensive genetic counseling and the same screening protocol as their symptomatic counterparts.

We obtained genomic DNA from peripheral blood samples by using standard techniques. Polymerase chain reaction was performed to amplify the three exons and promoter of the *VHL* gene according to a previously reported protocol,¹⁰ with slight modifications; in particular, we amplified exon 1 in two fragments instead of four. Polymerase chain reaction products were purified before being sequenced using an ABI Prism 310 Automated Sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA).¹⁰

Results

Sixteen probands with CNS hemangioblastoma agreed to participate in the study. After receiving individual genetic counseling, a family counseling session was scheduled. Ninety-eight individuals attended the informative sessions and, unexpectedly, all of them agreed to participate in the genetic testing program. Of these, 23 were symptomatic and 75 asymptomatic.

Two of the children had already exhibited symptoms of VHL: a 16-year-old girl harbored bilateral retinal angiomas and unilateral amaurosis, pancreatic and renal cysts, in addition to one symptomatic cerebellar hemangioblastoma, which was surgically removed at the age of 15 years; another 12-year-old girl underwent surgery for cerebellar hemangioblastoma at the age of 9 years.

TABLE 3
Tumors present in VHL gene mutation carriers*

Family	Mutation	Presentation†	Age (yrs)	Tumors
A	<i>DelPhe76</i>	symptomatic	34	2 cerebellar HBs, 1 spinal HB, multiple kidney cysts
		symptomatic	35	3 cerebellar HBs
		symptomatic	29	>3 cerebellar HBs
		asymptomatic	11	none
B	<i>1012_1013insA</i>	symptomatic	44	1 cerebellar HB, bilat retinal angiomas
		symptomatic	16	4 cerebellar HBs, 1 bulbar HB, 1 spinal HB, bilat retinal angiomas, pancreatic & kidney cysts
		symptomatic	26	1 cerebellar HB, bilat retinal angiomas, pancreatic & kidney cysts, RCC
		asymptomatic	28	1 cerebellar HB
		asymptomatic	7	none
		asymptomatic	2	none
C	<i>1012_1013insA</i>	symptomatic	45	1 cerebellar HB, pancreatic & kidney cysts, RCC
		asymptomatic	21	epididymal cystadenoma
		asymptomatic	17	none
		asymptomatic	12	none
		asymptomatic	36	2 cerebellar HBs, pancreatic, hepatic, kidney & suprarenal cysts, bilat RCCs
		asymptomatic	54	renal cysts
		asymptomatic	13	none
		asymptomatic	20	1 spinal HB, pancreatic & kidney cysts
		asymptomatic	30	2 spinal HBs
		symptomatic	13	1 cerebellar HB
		asymptomatic	29	none
		symptomatic	30	1 cerebellar HB, pancreatic & kidney cysts
		asymptomatic	9	none
D	<i>D121G</i>	symptomatic	29	2 cerebellar HBs, bilat retinal angiomas, pancreatic & kidney cysts, RCC, pheochromocytoma, broad ligament cystadenoma
E	<i>R161X</i>	symptomatic	32	3 cerebellar HBs, pancreatic & kidney cysts
F	<i>P86S</i>	symptomatic	30	1 recurrent cerebellar HB, kidney cysts, bilat RCCs

* HB = hemangioblastoma.

† Presence or absence of clinical manifestations of VHL disease prior to clinical and imaging scrutiny.

The symptomatic patients had clinical criteria indicative of definite VHL disease in 14 cases (seven families), of possible VHL disease in four cases (four families), and sporadic hemangioblastoma in five cases (five families) (Table 1).

Molecular genetic analysis allowed us to identify mutations in six of seven families with VHL disease (26 mutation carriers), but none in the possible VHL disease cases or sporadic hemangioblastoma cases. We found five different mutations: four previously described mutations (one in-frame deletion, one nonsense mutation, and two missense mutations),^{1,5,31,33} and a novel mutation (a one base insertion) present in two unrelated families (Table 2).

As expected, families carrying a protein truncating mutation had a VHL disease Type 1 phenotype, although in one family with a missense mutation (*P86S*) there was no evidence of pheochromocytoma. One family meeting the clinical criteria of VHL disease tested negative to mutations in the *VHL* gene; however, large deletions were not excluded by the present approach.

The clinical and imaging screening of asymptomatic patients carrying the genetic mutation showed that six (43%) of 14 individuals already had VHL lesions of which they were unaware. In the case of the symptomatic mutation carriers, complete screening also identified new tumors.

A total of 49 CNS hemangioblastomas were identified in the complete cohort; 17 were identified in noncarriers of VHL mutations (11 individuals) and the remaining 32 tumors affected 16 mutation carriers (Table 3). Ten were spinal hemangioblastomas, affecting six individuals: two with-

out mutation and four with mutation in the *VHL* gene. There were three individuals with two spinal hemangioblastomas, two carrying the *1012_1013insA* mutation, and in the other, a sporadic case, no mutation could be identified. The remaining 39 hemangioblastomas affected the cerebellum; we found no brainstem or supratentorial tumors, except for one mutation carrier (*1012_1013insA*) in whom two spinal hemangioblastomas and suprasellar meningioma were present. Central nervous system hemangioblastomas were the initial manifestation of disease in all but two cases, in which retinal angiomas caused the first symptom. One patient died of complications due to resection of the third recurrence of a cerebellar hemangioblastoma.

The associated clinical manifestations in cases of mutation carriers were polycystic kidney disease in 10 (38%), pancreatic cysts in eight (30%), retinal angiomas in four (15%), RCC in four (15%), epididymal or broad ligament cystadenoma, and pheochromocytoma in one (4%) individual. Secondary biliary cirrhosis due to obstruction of the biliary duct by multiple pancreatic cysts developed in one *1012_1013insA* mutation carrier (Table 3).

When analyzing the 12 individuals with tumors that carry the novel *1012_1013insA* mutation (mean age 30.25 years, range 13–54 years), eight (66%) had one or more cerebellar hemangioblastomas, two (16%) presented with one or more medullar hemangioblastomas, three (25%) harbored bilateral retinal angiomas, seven (58%) had renal cysts, six (50%) harbored pancreatic cysts, three (25%) had RCC, and one (8%) harbored an epididymal cystadenoma (Fig. 1).

Family history of VHL-related tumors was reported by

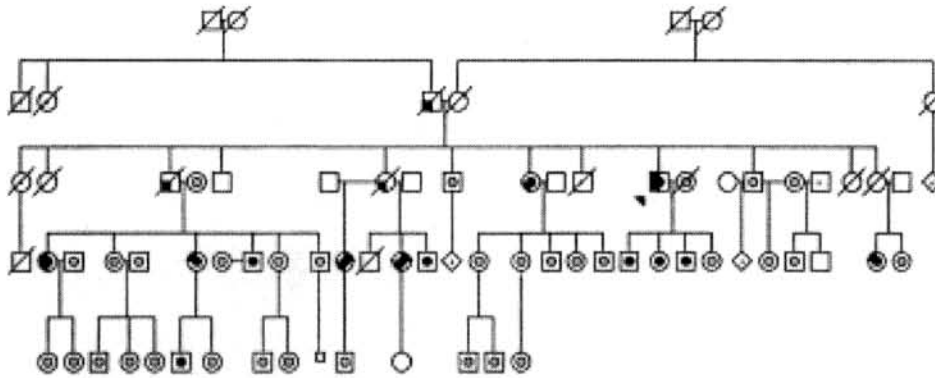


FIG. 1. Pedigree of Family C carrying the *1012_1013insA*. Black upper-left quadrant = one or more cerebellar hemangioblastomas; black upper-right quadrant = one or more medullar hemangioblastomas; black lower-left quadrant = visceral lesions including renal and/or pancreatic cysts and/or kidney cancer; black central spot = mutation carrier; gray central spot = nonmutation carrier.

five (71%) of seven of the definite VHL disease probands but by none of those with possible VHL disease or sporadic hemangioblastomas.

Discussion

We analyzed a prospective series of patients presenting with CNS hemangioblastoma to identify germline mutations in the *VHL* tumor suppressor gene. We identified five mutations in six families; four of the mutations have been described previously, but the *1012_1013insA* is a novel mutation. This out-of-frame insertion in exon 1 was present in two unrelated families, and cosegregates with the disease. In Family B, 10 individuals underwent testing (four were symptomatic and six asymptomatic, of whom three were < 10 years of age), and all the clinically affected individuals carried the mutation. The three asymptomatic individuals were noncarriers, whereas in two of three asymptomatic children the mutation was present. The second family with the *1012_1013insA* mutation, Family C, consisted of 46 individuals who underwent testing: three were clinically affected and 43 described themselves as asymptomatic. Testing of DNA samples identified 13 mutation carriers, which included the three symptomatic patients, five with asymptomatic VHL disease lesions, and five without evidence of VHL disease-related lesions (age range 9–29 years; Fig. 1).

The *1012_1013insA* mutation is out-of-frame, leading to a modification of 31 amino acids downstream and a premature stop codon at nucleotides 5441–5443 (amino acid residue 131). The modified amino acids are located in a domain common to all pVHL isoforms, the highly conserved cct-binding domain of the protein, involved in the formation of the pVHL elongin complex that is crucial for tumor suppression. Furthermore, the mutant protein is prematurely truncated and lacks the C-terminal half of exon 2 and exon 3 completely, which includes the nuclear export signal and the elongin C binding site of pVHL. Thus, this truncated protein would affect the two functional isoforms of pVHL: the major isoform pVHL30 and pVHL19, but not isoform 2, which lacks exon 2 but is not functional.^{8,13}

We analyzed phenotype-genotype correlations for all the mutations identified in this study, because it has been shown

that the pattern of mutations present in familial VHL disease correlates with clinical subclassification in terms of predisposition to tumor type.^{17,23} Twenty-three individuals carried a protein-truncating mutation (*R161X* and *1012_1013insA*) or a small deletion (*DelPhe76*). Seventeen of them had a VHL Type 1 phenotype; the remaining eight are young and have not developed VHL disease-related tumors. This is in accordance with previous reports in which investigators have proposed that deletions, protein-truncating mutations (frameshift and nonsense), and some missense mutations, are associated to a low risk of pheochromocytoma.^{17,22}

Two missense mutations (*D121G* and *P86S*) were identified in one family each. The patient carrying the *D121G* mutation has the full VHL phenotype (2B), including multiple cerebellar hemangioblastomas, bilateral retinal angiomas that have caused bilateral amaurosis, multiple pancreatic and renal cysts, unilateral RCC, one pheochromocytoma, and broad ligament cystadenoma. The family history of this patient is negative for the disease; one possibility is that she carries a de novo mutation, which is the case of up to 20% of patients with VHL disease,²⁷ although we could not rule out the possibility of nonpaternity. This mutation was described initially in 1994 by Whaley, et al.,³¹ and has been associated with an increased risk of pheochromocytoma, albeit not in the hotspot associated with type 2B (codon 167).

One individual with Type 1 VHL disease, and with no family history of pheochromocytoma, carried another missense mutation, *P86S*. Missense mutations have traditionally been associated with a high risk of pheochromocytoma; this mutation has been reported in a Japanese patient harboring a sporadic cerebellar hemangioblastoma,¹ two individuals only described as having “VHL disease,”³³ and one individual with RCC and one pheochromocytoma.^{3,22} The affected individuals in our Family D have died at an early age; the prospective follow-up study of the proband will determine if there is an increased risk for pheochromocytoma in this family.

We also compared the phenotype of the two families presenting with the novel *1012_1013insA* mutation, both classified as Type 1 VHL disease based on the lack of history of pheochromocytoma. There was a high incidence of heman-

gioblastoma in both families, with 83% of the affected individuals harboring one or more CNS hemangioblastoma. In one asymptomatic individual a suprasellar meningioma and two spinal hemangioblastomas were present; meningiomas have previously been reported as an unusual manifestation in patients with VHL disease.¹⁵ Because the earliest presentation of CNS hemangioblastoma occurred in a 9-year-old girl, we proposed early mutation detection and screening in the rest of the family members.

The disease manifestations were similar in both families, except for a striking difference in the risk of retinal angiomas. In Family B bilateral retinal angiomas was documented in three of four symptomatic individuals, whereas this lesion was absent in Family C. We intentionally questioned members of Family C to determine whether relatives we did not interview had experienced visual problems, but that was not the case. In addition, the overall incidence of retinal angiomas in this series was lower (in four [15%] of 26 mutation carriers) than the usual 40 to 60% reported in other series.^{6,24,29} Webster, et al.,³⁰ analyzed data obtained in a large cohort of patients carrying the *VHL* mutation and found no correlation between mutation type and risk of retinal angiomas. More recently, Zatyka, et al.,³² described the association of a single nucleotide polymorphism in the cyclin D1 (*CCND1*), with a modified risk for retinal angiomas. It would be interesting to analyze the *CCND1* genotype in this cohort.

Our predictive testing and screening protocol helped us identify asymptomatic tumors in 43% of the at-risk individuals, as well as asymptomatic tumors in previously affected individuals. In the case of the asymptomatic patients, because this is the first time they were screened for tumors, their future morbidity and prognosis remain to be seen. It is our hope that the early detection of the neoplasia will lead to improved surveillance, treatment, and therefore outcome in this cohort, but this issue should be addressed in a future study when time has allowed for prospective follow-up evaluation and comparison of data in these patients with those in their symptomatic counterparts.

Thus far, this strategy has allowed for careful planning to determine appropriate treatment options, as exemplified by a 36-year-old asymptomatic woman, in whom we identified bilateral RCC that was still encapsulated and permitted nephron-sparing surgery with a low risk of metastases.

Conclusions

The present study illustrates the relevance of undertaking genetic testing in all patients with CNS hemangioblastoma to identify carriers of mutations in the *VHL* gene. The prompt identification of asymptomatic mutation carriers allowed for a multidisciplinary screening protocol to decrease morbidity and mortality rates in these patients, while avoiding costly and invasive procedures for noncarriers. This is also important in countries such as Mexico, where limited medical resources are a consideration. In our population, one novel mutation was present in two unrelated families. It remains to be investigated if this is a common mutation in Mexican patients with VHL disease.

References

1. Anonymous: Germline mutations in the von Hippel-Lindau dis-

- ease (*VHL*) gene in Japanese VHL. Clinical Research Group for VHL in Japan. *Hum Mol Genet* 4:2233-2237, 1995
2. Anonymous: Statement of the American Society of Clinical Oncology: genetic testing for cancer susceptibility. Adopted on February 20, 1996. *J Clin Oncol* 14:1730-1740, 1996
3. Bérout C, Hamroun D: **Universal Mutation Database**: <http://www.umd.be/>, 2005
4. Choyke PL, Glenn GM, Walther MM, Patronas NJ, Linehan WM, Zbar B: von Hippel-Lindau disease: genetic, clinical and imaging features. *Radiology* 194:629-642, 1995
5. Crossey PA, Richards FM, Foster K, Green JS, Prowse A, Latif F, et al: Identification of intragenic mutations in the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene and correlation with disease phenotype. *Hum Mol Genet* 3:1303-1308, 1994
6. Dollfus H, Massin P, Taupin P, Nemeth C, Amara S, Giraud S, et al: Retinal hemangioblastoma in von Hippel-Lindau disease: a clinical and molecular study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43:3067-3074, 2002
7. Friedrich CA: Genotype-phenotype correlation in von Hippel-Lindau syndrome. *Hum Mol Genet* 10:763-767, 2001
8. Genbank accession number AF010238, accessible at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=2282063>
9. Gläsker S, Bender BU, Apel TW, Natt E, van Velthoven V, Scheremet R, et al: The impact of molecular genetic analysis of the *VHL* gene in patients with haemangioblastomas of the central nervous system. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 67:758-762, 1999
10. Gnarr JR, Tory K, Weng Y, Schmidt L, Wei MH, Li F, et al: Mutations of the *VHL* tumour suppressor gene in renal carcinoma. *Nat Genet* 7:85-90, 1994
11. Hes FJ, McKee S, Taphoorn MJ, Rehal P, van Der Luijt RB, McMahon R, et al: Cryptic von Hippel-Lindau disease: germline mutations in patients with haemangioblastoma only. *J Med Genet* 37:939-943, 2000
12. Human Genome Mutation Database, available at http://archive.uwcm.ac.uk/uwcm/mg/docs/mut_nom.html
13. Infobiogen database entry for pVHL (<http://www.infobiogen.fr/srs7bin/>)
14. Kaelin WG Jr: Molecular basis of the VHL hereditary cancer syndrome. *Nat Rev Cancer* 2:673-682, 2002
15. Kanno H, Yamamoto I, Yoshida M, Kitamura H: Meningioma showing VHL gene inactivation in a patient with von Hippel-Lindau disease. *Neurology* 60:1197-1199, 2003
16. Latif F, Tory K, Gnarr J, Yao M, Duh FM, Orcutt ML, et al: Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. *Science* 260:1317-1320, 1993
17. Lonsler RR, Glenn GM, Walther M, Chew EY, Libutti SK, Linehan WM, et al: Von Hippel-Lindau disease. *Lancet* 361:2059-2067, 2003
18. Maher ER, Yates JRW, Harries R, Benjamin C, Harries R, Moore AT, et al: Clinical features and natural history of von Hippel-Lindau disease. *Q J Med* 77:1151-1163, 1990
19. Melmon KL, Rosen SW: Lindau's disease: review of the literature and study of a large kindred. *Am J Med* 36:595-617, 1964
20. Neumann HP: Prognosis of von Hippel-Lindau syndrome. *J Vasc Dis* 16:309-311, 1987
21. Neumann HPH, Eggert HR, Weigel K, Friedburg H, Wiestler OD, Schollmeyer P: Hemangioblastomas of the central nervous system. A 10-year study with special reference to von Hippel-Lindau syndrome. *J Neurosurg* 70:24-30, 1989
22. Olschwang S, Richard S, Boisson C, Giraud S, Laurent-Puig P, Resche F, et al: Germline mutation profile of the *VHL* gene in von Hippel-Lindau disease and in sporadic hemangioblastoma. *Hum Mutat* 12:424-430, 1998
23. Richards FM: Molecular pathology of von Hippel-Lindau disease and the *VHL* tumour suppressor gene. *Expert Rev Mol Med* 19 March, 2001 (<http://www.expertreviews.org/01002654h.htm>)
24. Richard S, Campello C, Taillandier L, Parker F, Resche F: Haemangioblastoma of the central nervous system in von Hippel-

- Lindau disease. French VHL Study Group. **J Intern Med** **243**: 547–553, 1998
25. Rocha JCC, Silva RLA, Mendonça BB, Marui S, Simpson AJG, Camargo AA: High frequency of novel germline mutations in the *VHL* gene in the heterogeneous population of Brazil. **J Med Genet** **40**:E31, 2003
 26. Sansó G, Rudaz MC, Levin G, Barontini M: Familial isolated pheochromocytoma presenting a new mutation in the von Hippel-Lindau gene. **Am J Hypertens** **17**:1107–1111, 2004
 27. Sgambati MT, Stolle C, Choyke PL, Walther MM, Zbar B, Linehan WM, et al: Mosaicism in von Hippel-Lindau disease: lesson from kindreds with germline mutations identified in offspring with mosaic parents. **Am J Hum Genet** **66**:84–91, 2000
 28. Sims KB: Von Hippel-Lindau disease: gene to bedside. **Curr Opin Neurol** **14**:695–703, 2001
 29. Webster AR, Maher ER, Moore AT: Clinical characteristics of ocular angiomas in von Hippel-Lindau disease and correlation with germline mutation. **Arch Ophthalmol** **117**:371–378, 1999
 30. Webster AR, Richards FM, MacRonal FE, Moore AT, Maher ER: An analysis of phenotypic variation in the familial cancer syndrome von Hippel-Lindau disease: evidence of modifier effects. **Am J Hum Genet** **63**:1025–1035, 1998
 31. Whaley JM, Naglich J, Gelbert L, Hsia YE, Lamiell JM, Green JS, et al: Germ-line mutations in the von Hippel-Lindau tumor-suppressor gene are similar to somatic von Hippel-Lindau aberrations in sporadic renal cell carcinoma. **Am J Hum Genet** **55**: 1092–1102, 1994
 32. Zatyka M, Fernandes da Silva NF, Clifford SC, Morris MR, Wiesener MS, Eckardt KU, et al: Identification of cyclin D1 and other novel targets for the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene by expression array analysis and investigation of cyclin D1 genotype as modifier in von Hippel-Lindau disease. **Cancer Res** **62**:3803–3811, 2002
 33. Zbar B, Kishida T, Chen F, Schmidt L, Maher ER, Richards FM, et al: Germline mutations in the von Hippel-Lindau disease (*VHL*) gene in families from North America, Europe, and Japan. **Hum Mutat** **8**:348–357, 1996

Manuscript received February 21, 2005.

Accepted in final form October 25, 2005.

Address reprint requests to: Marisol López-López, Ph.D., Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, Calzada del Hueso 1100, Col. Villa Quietud, 04960 Mexico City, Mexico. email: mlopez@correo.xoc.uam.mx.

ANEXO 5

UBICACIÓN DE LAS MUTACIONES IDENTIFICADAS (CON RESPECTO A LA SECUENCIA DE REFERENCIA DEL GEN VHL, AF010238)

INSERCIÓN 1012_1013insA EXON 1

421 tccaaaaaaa aaaaaaaaaa ccaaacctta gaggggtgaa aaaaaat ttt atagtggaaa
 481 tacagtaacg agttggccta gcctgcctc cgttacaaca gctacggtg ctggaggatc
 541 cttctgcgca cgcgcacagc ctcgcccgg ctatttcgc gaggcgttc catcctctac
 601 cgagcgcgcg cgaagactac ggaggtcgac tggggagcgc caccgcagct ccgccccgcg
 661 tccgaccgcg ggatcccgcg gcgtccggcc cgggtggtct ggatcgcgga gggatgccc
 721 cggagggcgg agaactggga cgaggccgag gtaggcgcgg aggaggcagg cgtcgaagag
 781 tacggccctg aagaagacgg cggggaggag tggggcgcg aggagtcgg cccggaagag
 841 tccggcccgg aggaactggg cggcaggag gagatggagg cggggcggc gcggcccgtg
 901 ctgcgctcgg tgaactcgg cgagccctcc caggatcatct tctgcaatcg cagtccgcgc
 961 gtctgtctgc ccgatggct caacttcgac ggcgagcgc agcctacc aacgctgccc
 1021 cctggcacgg gcgcgcgat ccacagctac cgaggtacgg gcccggcgct taggcccgcg
 1081 ccagcagggg cgatagcacg gcttgaagcc cctctaccgc cccggggctc attttgca

- Comentario [AR1]:** Inicia promotor nt565
- Comentario [AR2]:** Inicia 5'UTR exón 1 nt643
- Comentario [AR3]:** Termina promotor nt670
- Comentario [AR4]:** Termina 5'UTR exón 1 nt714
- Comentario [AR5]:** Codón de inicio
- Comentario [AR6]:** Inserción nt1012_1013, aa 100

5341 cgtgcccagc caccggtgtg gctctttaac aacctttgct tgtcccgata ggtcaccttt
 5401 ggctcttcag agatgcaggg acacacgatg ggcttctggt taaccaaact gaattatttg
 5461 tgccatctct caatgttgac ggacagccta tttttgcaa taccacactg ccaggtactg
 5521 acgttttact ttttaaaaag ataaggttgt tgtgtaagt acaggataga ccaactgaaa

- Comentario [AR7]:** Inicia exón 2, pos 5392
- Comentario [AR8]:** Codón de paro en inserción aa 131 nt 5441-5443
- Comentario [AR9]:** Termina exón 2, pos 5514

DELECIÓN Delphe76 EXON 1

421 tccaaaaaaa aaaaaaaaaa ccaaacctta gaggggtgaa aaaaaat ttt atagtggaaa
 481 tacagtaacg agttggccta gcctgcctc cgttacaaca gctacggtg ctggaggatc
 541 cttctgcgca cgcgcacagc ctcgcccgg ctatttcgc gaggcgttc catcctctac
 601 cgagcgcgcg cgaagactac ggaggtcgac tggggagcgc caccgcagct ccgccccgcg
 661 gaccgcg ggatcccgcg gcgtccggcc cgggtggtct ggatcgcgga gggatgccc
 721 cggagggcgg agaactggga cgaggccgag gtaggcgcgg aggaggcagg cgtcgaagag
 781 tacggccctg aagaagacgg cggggaggag tggggcgcg aggagtcgg cccggaagag
 841 tccggcccgg aggaactggg cggcaggag gagatggagg cggggcggc gcggcccgtg
 901 ctgcgctcgg tgaactcgg cgagccctcc caggatcatct tctgcaatcg cagtccgcgc
 961 gtctgtctgc ccgatggct caacttcgac ggcgagcgc agcctacc aacgctgccc
 1021 cctggcacgg gcgcgcgat ccacagctac cgaggtacgg gcccggcgct taggcccgcg
 1081 ccagcagggg cgatagcacg gcttgaagcc cctctaccgc cccggggctc attttgca

- Comentario [AR10]:** Inicia promotor nt565
- Comentario [AR11]:** Inicia 5'UTR exón 1 nt643
- Comentario [AR12]:** delPhe76 nt 661-663
- Comentario [AR13]:** Termina promotor nt670
- Comentario [AR14]:** Termina 5'UTR exón 1 nt714
- Comentario [AR15]:** Codón de inicio
- Comentario [AR16]:** Termina exón 1 nt 1054 aa114
- Comentario [AR17]:** Termina intrón 1 nt5391
- Comentario [AR18]:** Inicia exón 2 nt5392
- Comentario [AR19]:** Cambia a por g (gat por gct) nt5413 aa 121
- Comentario [AR20]:** Termina exón 2 nt 5514
- Comentario [AR21]:** Inicia intrón 2 nt 5515

SENTIDO ERRONEO D121G (Asp121Gly) EXON 2

5341 cgtgcccagc caccggtgtg gctctttaac aacctttgct tgtcccgata ggtcaccttt
 5401 ggctcttcag agatgcaggg acacacgatg ggcttctggt taaccaaact gaattatttg
 5461 tgccatctct caatgttgac ggacagccta tttttgcaa taccacactg ccaggtactg
 5521 acgttttact ttttaaaaag ataaggttgt tgtgtaagt acaggataga ccaactgaaa

SENTIDO ERRONEO P86S (Pro86Ser) EXON 1

541 cttctgcgca cgcgcacagc ctccgcccgttctatttcgcg gagcgcgttc catcctctac
601 cgagcgcgcg cgaagactac ggaggtcgac tcgggagcgc cacgcagct ccgccccgcg
661 tccgaccgcg ggatcccgcg gcctccgcg ggggtggtct ggatcgcgga gggatgccc
721 cggagggcgg agaactggga cgaggccgag gtaggcgcgg aggaggcagg cgtcgaagag
781 tacggccctg aagaagacgg cggggaggag tcgggcgcgg aggagtcgg cccggaagag
841 tccggcccgg aggaactggg cgcgaggag gagatggagg cggggcgccc gggcccctg
901 ctgcgctcgg tgaactcgcg cgagccctcc caggtcatct tctgcaatcg cagtccgcgc
961 gtcgtgctgc ccgatggct caacttcgac ggcgagccgc agccctacce aacgctgccg
1021 cctggcacgg gccgcccgat ccacagctac cgactacgg gcccgccgct taggcccgac

MUTACION SIN SENTIDO R161X (ARG161STOP) EXON 3

8641 tgaggatttg gttttgccc tccagtgt tactctgaaa gagcctgccc tccaggttg
8701 ccggagccta gtcaagcctg agaattacag gagactggac atcgtcaggt cgctctacga
8761 agatctggaa gaccacccaa atgtgcagaa agacctggag cggctgacac aggagcgcac
8821 tgcacatcaa cggatgggag attgagatt tctgttgaaa cttacactgt ttcactcag

- Comentario [AR22]:** Inicia promotor nt565
- Comentario [AR23]:** Inicia 5'UTR exón 1 nt643
- Comentario [AR24]:** Termina promotor nt670
- Comentario [AR25]:** Cambia CCC por TCC nt689
- Comentario [AR26]:** Termina 5'UTR exón 1 nt714
- Comentario [AR27]:** Codón de inicio
- Comentario [AR28]:** Termina exón 1 nt 1054
- Comentario [AR29]:** Inicia intrón 1 nt1055
- Comentario [AR30]:** Termina intrón 2 nt 8666
- Comentario [AR31]:** Inicia exón 3 nt 8667
- Comentario [AR32]:** Cambia CGA por TGA nt8684
- Comentario [AR33]:** Inicia 3'UTR nt8667