



---

# LA ENFERMEDAD DE VON HIPPEL LINDAU

---

DE LA CLÍNICA A LA GENÉTICA



---

**Universidad de Valladolid**

AUTORA: MARINA FIDALGO DE LA ROSA  
TUTOR: CARLOS ALBERTO RODRÍGUEZ ARIAS  
FACULTAD DE MEDICINA  
SERVICIO DE NEUROCIRGÍA  
HOSPITAL CLÍNICO UNIVERSITARIO DE VALLADOLID

## RESUMEN

La enfermedad de Von Hippel-Lindau es una enfermedad genética rara, de herencia autosómica dominante, producida por mutaciones en el gen VHL localizado en el cromosoma 3p25. Se caracteriza por conferir a los individuos afectados una predisposición a desarrollar tumores y quistes en múltiples localizaciones. Presenta una gran heterogeneidad tanto clínica como genética, siendo numerosos los estudios realizados con el fin de establecer la asociación entre determinadas mutaciones genéticas y un fenotipo concreto. En este trabajo se ha realizado un estudio observacional retrospectivo con el objetivo de contextualizar la correlación clínico-genética en nuestros pacientes y correlacionarlo con la bibliografía descrita. Actualmente, el estudio genómico es imprescindible para el diagnóstico de confirmación de la enfermedad, no siendo suficiente el diagnóstico de sospecha según los criterios clínicos. En el caso de confirmación genética, no existe una correspondencia exacta para predecir la gravedad de la clínica, debido a la penetrancia incompleta de estas mutaciones. Además, en los casos en los que existe solamente feocromocitoma debe realizarse un completo diagnóstico genético diferencial.

**PALABRAS CLAVE:** Von Hippel-Lindau (VHL), Hemangioblastoma, Factores Inducibles por hipoxia (FIH), Gen supresor tumoral VHL.

## ABSTRACT

Von Hippel-Lindau disease is a rare genetic disorder of dominant autosomal inheritance, caused by mutations in the VHL gene located on chromosome 3p25. It is characterized by a predisposition of affected individuals to develop tumours and cysts in multiple locations. It presents a wide clinical and genetic heterogeneity, being numerous the studies carried out in order to establish the association between certain genetic mutations and a specific phenotype. In this work, a retrospective observational study has been executed with the aim of contextualizing the clinical-genetic correlation in our patients and correlating it with the described bibliography. The genomic study is nowadays essential for the diagnosis of confirmatory diagnosis of the disease, not being sufficient the diagnosis of suspicion according to clinical criteria. In case of genetic confirmation, there is no exact correspondence to predict the severity of the clinical disease, due to the incomplete penetrance of these mutations. Furthermore, in cases where only pheochromocytoma exists, a complete differential genetic diagnosis must be practiced.

**KEY WORDS:** Von Hippel-Lindau (VHL), Hemangioblastoma, Hypoxia-inducible factors (HIF), VHL tumor suppressor gene.

## **AGRADECIMIENTOS**

La realización de este trabajo ha sido posible gracias al apoyo de numerosas personas, que han contribuido de forma directa o indirecta a su elaboración.

En primer lugar, me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento a mi tutor Carlos A. Rodríguez Arias por haberme acompañado en este proceso.

Agradecerle también a mi familia, por mantener mi estabilidad mental durante este año. Y, por último, gracias a todas aquellas compañeras/os con las que he crecido durante la carrera y compartido juntas esta experiencia.

Gracias Miguel, por hacerme creer en mí, y que con esfuerzo todo se consigue.

## ÍNDICE

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1.INTRODUCCIÓN</b> .....                                    | <b>1</b>  |
| DEFINICIÓN.....  | 1         |
| HISTORIA .....   | 1         |
| CLASIFICACIÓN .....  | 2         |
| ÓRGANOS AFECTADOS .....  | 4         |
| Hemangioblastoma retiniano .....                               | 4         |
| Hemangioblastoma SNC .....                                     | 4         |
| Feocromocitoma.....  | 4         |
| Carcinoma de células renales .....                             | 5         |
| Páncreas .....   | 6         |
| Otros .....  | 6         |
| FISIOLOGÍA (PROTEÓMICA) .....                                  | 7         |
| GEN .....  | 8         |
| <b>2. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....                             | <b>10</b> |
| PACIENTES .....  | 10        |
| PROCESAMIENTO DE MUESTRAS.....                                 | 10        |
| Obtención, amplificación y secuenciación.....                  | 11        |
| Análisis de grandes alteraciones genómicas mediante MLPA ..... | 11        |
| PCR cuantitativa a tiempo real.....                            | 12        |
| <b>3. RESULTADOS</b> .....                                     | <b>13</b> |
| <b>4. DISCUSIÓN</b> .....                                      | <b>14</b> |
| <b>5. CONCLUSIONES</b> .....                                   | <b>16</b> |
| <b>6. BIBLIOGRAFÍA</b> .....                                   | <b>17</b> |
| <b>7. ANEXOS</b> .....   | <b>20</b> |

## **1. INTRODUCCIÓN**

### **a. DEFINICIÓN**

La enfermedad de Von Hippel-Lindau es una enfermedad genética rara, de herencia autosómica dominante. Tiene una incidencia de 1 por cada 36000 recién nacidos vivos. Se produce a consecuencia de mutaciones en el gen VHL, en el cromosoma 3p25, caracterizada por conferir a los individuos afectados una predisposición a desarrollar tumores y quistes en múltiples localizaciones. Presenta una gran heterogeneidad clínica, lo que dificulta tanto su reconocimiento y tratamiento como el trabajo de identificación de la genética responsable del fenotipo concreto.

### **b. HISTORIA**

La descripción histológica de esta enfermedad (entonces desconocida) se realizó por primera vez en 1894 por Treacher Collins, oftalmólogo británico, que describió hemangioblastomas de retina presentes en dos hermanos. Etiquetó las lesiones de formaciones neovasculares que llamó `nevus capilar´.

A su vez, Eugene von Hippel, oftalmólogo también, pero de origen alemán, se encontraba estudiando estas lesiones retinianas, llegando a citar los estudios realizados por Collins. Adquirió gran reconocimiento internacional por sus investigaciones en la anatomía patológica ocular, así como las malformaciones congénitas. En 1895 describió los hallazgos en un fondo de ojo realizado a un paciente de 23 años, que sufría pérdida progresiva de visión de dos años de duración. En 1904 presentó más detalles sobre el mismo paciente, cuya evolución había llevado al desarrollo de tres lesiones retinianas añadidas a las previamente descritas, y lo correlacionó con otro caso similar de un paciente de 28 años. Tras analizar los resultados obtenidos en 1911 denominó a sus hallazgos como angiomatosis retinae congenita.

Partiendo de este mismo paciente, en 1921, Brandt, realizó su autopsia encontrando diversas lesiones: tumores cerebelosos, lesiones quísticas en riñones, páncreas y epidídimo.

Sin embargo, fue Arvid Lindau, especialista en patología y bacteriología en Estocolmo, el que estudió las alteraciones presentes en el sistema nervioso central (central nervous system angiomas) a partir de un estudio de 16 pacientes suyos en correlación con 24 pacientes descritos previamente. Estos pacientes desarrollaron quistes y tumores cerebelosos, en médula espinal y bulbo, asociados con hemangioblastomas retinianos y diversos tumores viscerales. Estableció una asociación entre estas lesiones, en lo que denominó “Angiomas des Zentralnervenssystems”.

En 1928, Cushing y Bailey describieron 11 pacientes con lo que ellos denominaron “Lindau’s disease”. Establecieron la diferencia entre los hemangiomas, originados a partir de remanentes mesodérmicos, y malformaciones angiomasas del SNC, incluyendo descripciones clínicas, quirúrgicas e histopatológicas.

Más tarde, en 1936, Davison puso el nombre definitivo a esta entidad reconociendo las aportaciones tanto de Lindau como de Von Hippel. La primera revisión de la entidad con los criterios diagnósticos se publicó en 1964, por Melmon and Rosen<sup>11</sup> identificándose en 1993 el gen (Latif et al. 1993)<sup>7</sup>.

### **c. CLASIFICACIÓN**

La primera propuesta de criterios clínicos para el diagnóstico de VHL de Melmon and Rosen en 1964<sup>11</sup>, se centraba en la asociación entre hemangioblastoma cerebeloso con hemangioblastoma retinal, quistes pancreáticos, renales.... Posteriormente en 1989 Lamiell<sup>8</sup> añadió la asociación a tumores viscerales.

Actualmente el diagnóstico se basa en criterios clínicos y genéticos.

Clínicos:

- Hemangioblastoma del sistema nervioso central: se establece el diagnóstico con dos o más, de forma independiente a la presencia o no de los otros criterios; o con un hemangioblastoma de SNC asociado a otro criterio
- Carcinoma de células renales
- Feocromocitoma, paraganglioma y/o tumor glómico
- Neoplasias neuroendocrinas y/o quistes en páncreas

Genéticos:

- Identificación de mutaciones ya descritas más al menos uno de los criterios clínicos.
- Identificación en familiares de primer grado de una mutación ya descrita más al menos uno de los criterios clínicos.

En función de las distintas manifestaciones clínicas de la enfermedad se han establecido además diversas categorías fenotípicas: La enfermedad de von Hippel-Lindau tipo 1 incluye a los pacientes que no desarrollan feocromocitoma y tipo 2 a los que sí lo hacen. En 1995, Brauch<sup>1</sup> subdividió el tipo 2 en 2A, pacientes con feocromocitoma, y 2B, pacientes con feocromocitoma y tumor de células renales (CCR). En 2001 Hoffman<sup>4</sup> diferenció el tipo 2C, para denominar a los pacientes con feocromocitoma sin hemangioblastoma ni tumor de células renales. Más tarde, en 2009, Neumann<sup>14</sup> describió que algunos pacientes de familias aparentemente pertenecientes a este último grupo terminaron por desarrollar hemangioblastomas. En este año, McNeill<sup>12</sup> y su equipo propusieron crear un grupo diferente de pacientes para aquellos que presentaban una deleción que incluía el gen HSPC300, lo que se considera como factor protector para el tumor de células renales estableciéndose como tipo 1B.

Tabla 1: Clasificación clínica. Elaboración propia

|         | VON HIPPEL LINDAU TIPO 1   |                | VON HIPPEL LINDAU TIPO2   |   |                |
|---------|--|----------------|---|---|----------------|
|         | 1A   | 1B             | 2A  | 2B  | 2C             |
| CLÍNICA | Hemangioblastomas SNC, Retinianos, CCR, quistes pancreáticos y TNE | Tipo 1 sin CCR | Feocromocitoma, hemangioblastomas SNC, hemangioblastomas retina | Feocromocitoma CCR, hemangioblastomas SNC, hemangioblastomas retina, TNE y quistes pancreáticos | Feocromocitoma |

## **d. ÓRGANOS AFECTADOS**

### **i. Hemangioblastomas retinianos**

Los hemangiomas de retina son lesiones vasculares benignas que se presentan como tumoraciones vasculares redondeadas, bien delimitadas, localizadas en la periferia de la retina temporal o encima de la papila. Se diagnostica en gente joven, en torno a los 25 años. En general se presentan de manera unilateral. Debido a su progresión, se debe realizar un cribado con fondo de ojo anual a los pacientes con VHL. El tratamiento se basa en la coagulación láser, realizándose una enucleación en tumores de gran tamaño.

### **ii. Hemangioblastomas del SNC**

Los hemangioblastomas son tumores benignos de origen vascular con crecimiento lento. Podemos encontrar hemangioblastomas del SNC en casi el 60% de los pacientes con VHL, siendo además un criterio clínico diagnóstico de la enfermedad. Pueden aparecer en cualquier parte del SNC, siendo más frecuentes a nivel del cerebelo (Figura 1), y en menor medida en médula espinal (Figura 2) y troncoencéfalo.

El comportamiento de estas lesiones en general tiende hacia el aumento de tamaño progresivo, aunque al tratarse de tumores benignos con comportamiento variable, pudiendo permanecer estables, la indicación quirúrgica en pacientes asintomáticos está en entredicho. La edad media de diagnóstico es menor que en aquellos pacientes que presentan hemangioblastomas esporádicos (3ª-5ª década de la vida) sin diferencia entre sexos. A pesar de su benignidad, la morbilidad perioperatoria de los mismos se ha relacionado con la morbilidad global de la enfermedad.



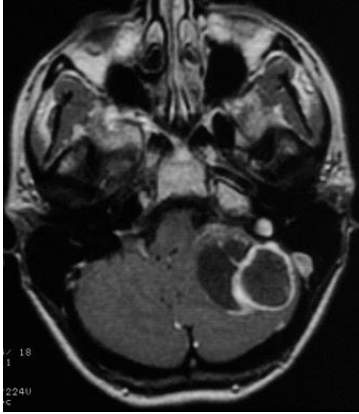


Figura 1: RM craneal con contraste de gadolinio mostrando una captación en anillo de un nódulo en el hemisferio cerebeloso izquierdo sobre un quiste, correspondiente a un hemangioblastoma.

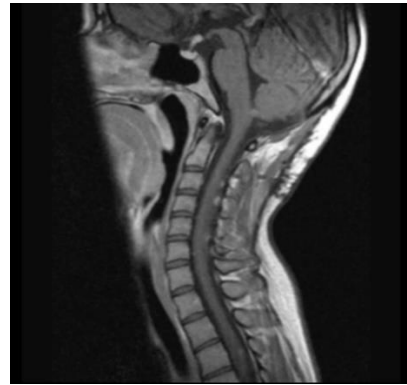


Figura 2: RM con contraste mostrando los nódulos en la médula correspondiendo a hemangioblastomas.

### iii. Feocromocitoma

Esta lesión (Figura 3) permite también la distinción fenotípica de la enfermedad entre tipo 1 -sin feocromocitoma- y tipo 2 - con feocromocitoma-. Es una neoplasia neuroendocrina de células cromafines adrenales que conduce a la liberación de concentraciones elevadas de catecolaminas y sus metabolitos. La media al diagnóstico es de 30 años (En pacientes sin Von Hippel-Lindau en torno a la 4<sup>a</sup>-5<sup>a</sup> década). En condiciones normales, el riesgo de malignización del feocromocitoma es de un 10% sin embargo, en pacientes con feocromocitoma en contexto de enfermedad por von Hippel Lindau es menor (5%). Una vez diagnosticado debe ser extirpado.

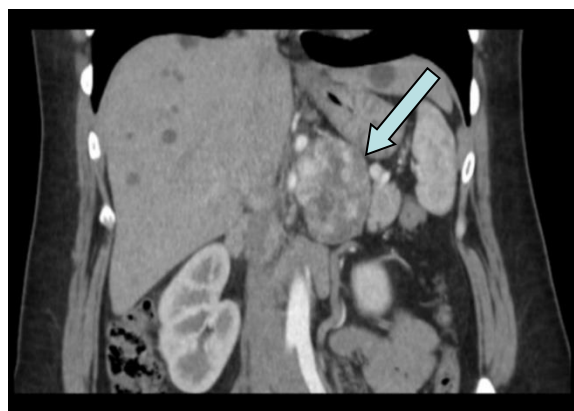


Figura 3: TAC abdominal con contraste, en un corte coronal, donde se observa una lesión de 5 cm, isodensa, que capta contraste, localizada en el espacio retroperitoneal y suprarenal izquierdo (flecha), que corresponde con un feocromocitoma.

#### iv. Carcinoma de células renales

El carcinoma de células renales (CCR) es una neoplasia renal maligna que surge de los túbulos renales (Figura 4). Puede precederse de la aparición de quistes renales múltiples simples. Esta lesión permite la clasificación fenotípica de la enfermedad (pacientes 1A -con CRR- y 1B -sin CCR-). Se estima que el riesgo de desarrollar un carcinoma de células renales en los pacientes con Von hippel-Lindau es de un 70% a lo largo de la vida, siendo la media de edad al diagnóstico 40 años (en pacientes sin Von Hippel-Lindau en torno a la 6ª década) a pesar de que se diagnostica en ocasiones antes en pacientes asintomáticos. Sin embargo, es la primera causa de muerte. En la mayoría de los casos se trata de una lesión multifocal y bilateral. El manejo depende del tamaño: para aquellos menores de 3 cm se realiza una tumorectomía, siendo de elección la nefrectomía cuando el tamaño es mayor.



Figura 4: TAC abdominal que muestra lesión quística en polo renal derecho (flecha).

#### v. Páncreas

Los tumores neuroendocrinos pancreáticos aparecen en 15-56% de los pacientes. Los quistes y cistoadenomas (la mayoría serosos) tienen una prevalencia de hasta el 72%. En total, las lesiones pancreáticas aparecen en 35-70% de los pacientes con VHL. La media de edad es de 35 años para los tumores neuroendocrinos y de 37 para los quistes. En general los quistes se presentan de forma múltiple y son asintomáticos, llegando a ser la primera manifestación de la enfermedad en un 12 % de los pacientes en algunas series. Raramente se han descrito adenocarcinomas de páncreas y metástasis de carcinoma de células renales.

## **vi. Otros**

Los tumores del saco endolinfático son tumores benignos (cistoadenomas) y localmente invasivos. Son considerados como patognomónicos de la enfermedad. Se detectan con una media de edad de 22 años (Siendo extremadamente raros en la población sin Von Hippel-Lindau) Aparecen en general de forma bilateral. Cursa con cambios de audición de intensidad variable, acompañado o no de tinnitus, mareos y sensación de ocupación del oído.

También han aparecido paragangliomas parasimpáticos de cabeza y cuello, siendo el más frecuente en tumor del cuerpo carotídeo. Se trata de tumores derivados de las células cromafines extraadrenales.

Los cistoadenomas del epidídimo ocurren en casi el 25-60% de los hombres con la enfermedad, en general de forma bilateral. Se diagnóstica en adolescentes

Está descrita además la rara asociación con cistoadenomas del ligamento ancho en mujeres afectas.

### **e. FISIOPATOLOGÍA (PROTEÓMICA)**

Alteraciones en el gen VHL, de herencia autosómica dominante y penetrancia casi completa, son las responsables de esta entidad. En condiciones normales, el gen VHL es un gen supresor de tumores, situado en el cromosoma 3p25. Sin embargo, determinadas mutaciones llevan a la pérdida de la normofunción del gen.

La transcripción y traducción del gen codifica para dos isoformas de una misma proteína: la primera formada por 213 aminoácidos-pVH30-; y pVHL18 es la segunda isoforma más pequeña, sin los primeros 53 aminoácidos. En condiciones normales esta proteína presenta dos dominios de unión: alfa, a través del cual se une a un complejo multiproteico, que incluye la elongina B y C, y Cullin 2 -complejo VCB-CUL2<sup>17</sup>- y beta, mediante el que une las sustancias a degradar. Dicho complejo se encarga de la ubiquitinación y degradación de la subunidad alfa de los factores inducibles por hipoxia 1 y 2 (HIFs) que juegan un papel muy importante en la correcta adaptación del organismo a los cambios en los niveles de oxígeno. HIF controla la expresión de numerosos genes implicados en diversas funciones, como la división celular, la formación neovascular, y es el principal regulador de los niveles de eritropoyetina.

En condiciones normales (no hay hipoxia) el complejo VCB-CUL2 destruye HIF 1 y 2<sup>6</sup>, evitando su expresión, y por tanto acción (Figura 5). Cuando existe una mutación que conlleva la pérdida de función de VHL, estos factores se acumulan, y estimulan la transcripción y expresión de numerosos factores tumorigénicos, como el factor de crecimiento endotelial y el factor de crecimiento de plaquetas.

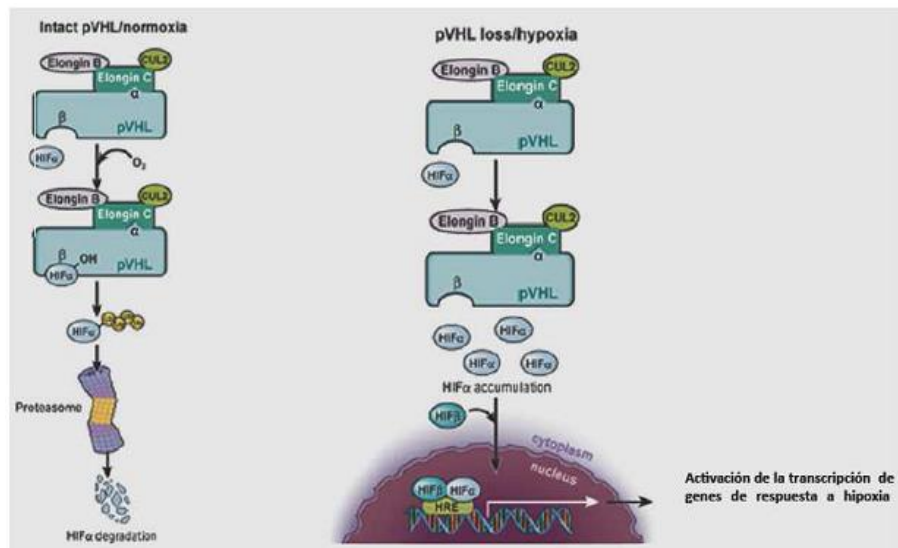


Figura 5: Función proteína

#### f. GEN

Los estudios realizados para tratar de filiar la etiología de esta entidad señalan que el gen VHL es el responsable de la misma. Presenta un patrón de herencia autosómico dominante. La penetrancia es casi completa. Se trata de un gen supresor de tumores, situado en el cromosoma 3p25<sup>7</sup>. Diversas mutaciones descritas conducen a una pérdida de la normofunción de este gen, tanto en los casos familiares como esporádicos.

La teoría de los dos golpes de Knudson explica esta enfermedad, en la que se requiere una mutación en la línea germinal de una de las copias de VHL, apareciendo la clínica cuando se pierda la expresión de la otra copia, ya sea por mutaciones o deleciones somáticas del segundo alelo o por hipermetilación del promotor.

Este gen (Figura 6) está compuesto por tres exones que codifican dos isoformas distintas en función de si contienen o no el exon 2: la isoforma grande -pVHL30, conteniendo los tres exones (incluyendo los aminoácidos Met1 y Met 54)- y la pequeña -pVHL18, únicamente exon1 y exon 3-. Esto se debe a un cambio en el marco de lectura, produciéndose un procesamiento alternativo en el que se inicia la lectura en un lugar interno: codon 54 AUG (Met) en el exon 1.

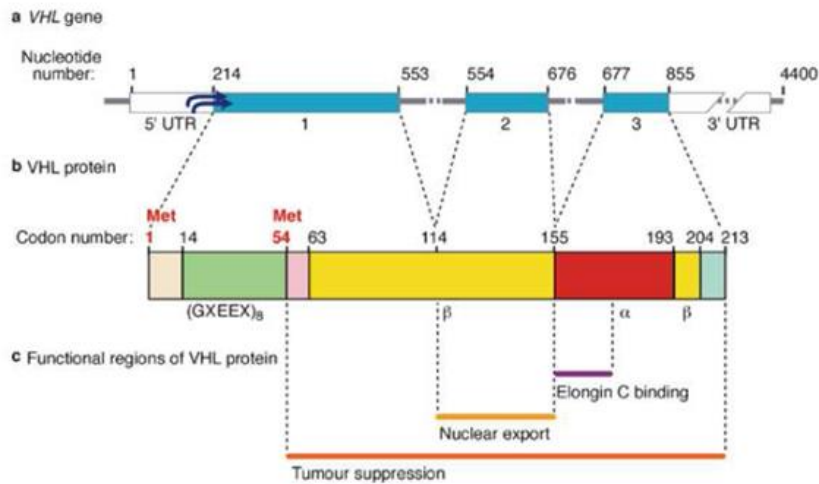


Figura 6: Gen VHL

En algunos CCR se han encontrado la isoforma II inalterada, lo que sugiere que esta isoforma carece de actividad supresora tumoral. Sin embargo, estudios en ratones con CCR se ha demostrado que al introducir pVHL18 -isoforma II- en aquellos que carecen de pVHL30 esta actúa como el alelo salvaje, recuperando la función supresora tumoral.

Modificaciones en el gen VHL se asocian además con otras enfermedades a parte del síndrome de Von Hippel Lindau. La policitemia de Chuvash<sup>16</sup> es una de ellas. La relación de la función de este gen con la vía de señales de la hipoxia, y la pérdida de su función que conduce a un aumento de los HIF explica la aparición de la eritrocitosis: se produce una regulación positiva de la vía de hipoxia, con un aumento de la respuesta a la misma, aunque los niveles de oxígeno sean normales. Esto provoca un aumento de los niveles de eritropoyetina, y ello a la eritrocitosis. La regulación por un promotor alternativo del gen VHL conduce a la formación de una nueva isoforma de la proteína, que contiene el exon 1 junto con secuencias intrónicas (E1' cryptic-exon) traduciéndose en una proteína de 193 aminoácidos llamada X1 que se expresa en condiciones normales en tejidos sanos. Sin embargo, mutaciones en este segmento han sido identificadas en numerosas familias con eritrocitosis, como la sustitución de un aminoácido R200W (Cambio de arginina por triptófano)

## 2. OBJETIVOS

- Objetivo general: Comparar las manifestaciones clínicas y alteraciones genéticas de los pacientes incluidos en el estudio con la bibliografía y estudios previos.
- Objetivos específicos:
  - Revisar y verificar las correlaciones clínico-genéticas descritas en la bibliografía
  - Describir las alteraciones genéticas encontradas en los pacientes a estudio.
  - Relación entre la clínica presentada por los pacientes (estableciendo fenotipo correspondiente) y la genética encontrada.

## 3. MATERIAL Y MÉTODOS

### a. PACIENTES

Se incluyeron 9 pacientes, 4 mujeres y 5 hombres, que tras su estudio y realización de pruebas radiológicas presentaban diagnóstico clínico de enfermedad de VHL, procediendo posteriormente a su estudio genético. (Tabla 2)

Tabla 2: Descripción pacientes

| PACIENTE | CLÍNICA  | Sexo |
|----------|--|------|
| 1        | Hemangioblastoma retiniano y de fosa posterior   | M    |
| 2        | Hemangioblastoma de fosa posterior   | M    |
| 3        | Hemangioblastoma Retiniano → Ciega<br>Hemangioblastoma de cerebelo<br>Hemangioblastoma médula espinal → Paraplejia | M    |
| 4        | Hemangioblastoma de cerebelo y médula espinal  | H    |
| 5        | Hemangioblastoma de cerebelo   | H    |

|   |                           |   |
|---|---------------------------|---|
| 6 | Feocromocitoma            | H |
| 7 | Feocromocitoma            | H |
| 8 | Hemangioblastoma cerebelo | M |
| 9 | Hemangioblastoma cerebelo | H |

M: Mujer/ H: Hombre

## **b. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS**

### **i. Obtención, amplificación y secuenciación**

A partir de una muestra de sangre periférica, obtenida por venopunción, se realizó una centrifugación repetida y lisis eritrocitaria, obteniéndose el DNA. Una vez aislado, se realizó una amplificación de las secuencias que corresponden a los exones 1, 2 y 3 del gen VHL. Estos fragmentos amplificados fueron separados en función de su tamaño mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%. Para monitorizar su migración se utilizaron dos colorantes: el xileno cianol, que migró con los fragmentos 5 Kb, y el azul de bromofenol, con los fragmentos de 0,5 Kb. La visualización de dichos fragmentos se realizó utilizando SYBR Safe DNA Gel Stain que emite fluorescencia al ser expuesto a luz ultravioleta.

Los restos de oligonucleotidos y dNTPs sobrantes utilizados durante la PCR fueron digeridos con una exonucleasa previamente a la secuenciación de DNA.

### **ii. Análisis de grandes alteraciones genómicas mediante MLPA**

Para el análisis de grandes cambios genómicos (pérdidas o amplificaciones) en el gen VHL se empleó la técnica MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification. Figura 7). Las sondas MLPA consisten en dos oligonucleótidos, cada uno de los cuales contiene una secuencia cebador PCR y una secuencia complementaria al objetivo (fragmento a amplificar), conocida como secuencia de hibridación. Las dos sondas se hibridan inmediatamente adyacentes entre sí. Cuando las sondas se hibridan correctamente con la secuencia objetivo, son ligadas por una enzima ligasa termoestable.

Los cebadores PCR amplifican exponencialmente las sondas ligadas. Uno de los primers está etiquetado con un tinte fluorescente para visualizar el producto de amplificación de la sonda. Posteriormente los productos amplificados se someten a cromatografía capilar, visualizando el resultado en forma de electroferograma.

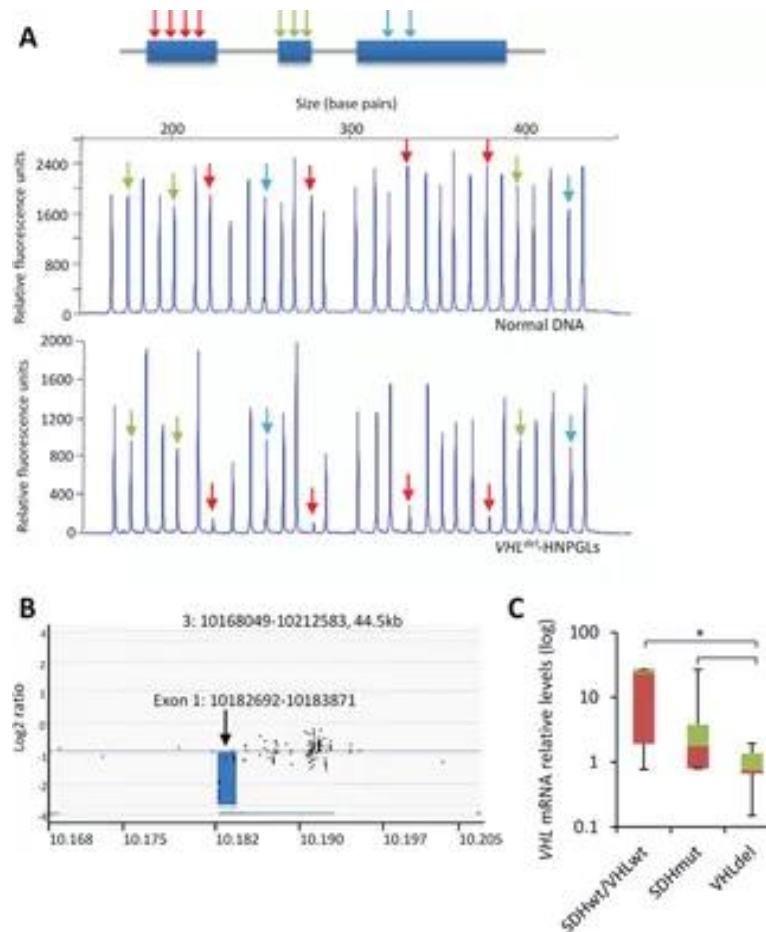


Figura 7: Técnica MLPA

### iii. PCR cuantitativa a tiempo real

Tras realizar la técnica MLPA, se sometió a la muestra de los pacientes en los que se identificaron alteraciones a un análisis mediante PCR (Polymerase chain reaction) a tiempo real cuantitativa comparativa. La PCR cuantitativa es una variante de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizada para amplificar y simultáneamente cuantificar de forma absoluta el producto de la amplificación de ADN. La técnica es similar a la PCR convencional, añadiendo una sustancia marcada con un fluoróforo que permita medir la tasa de generación de uno o más productos específicos en un termociclador provisto de sensores de fluorescencia, tras excitar el fluoróforo a la longitud de onda apropiada. Dicha medición se realiza tras cada ciclo de amplificación.



Las cantidades relativas de los dos productos seguirán siendo las mismas si la cantidad de DNA de partida de ambas muestras es igual o, por el contrario, si hubiera una discrepancia en estos valores iniciales, la cantidad de fragmentos amplificados mostraría diferente cinética y por tanto diferente fluorescencia emitida.

### 3. RESULTADOS

Tabla 3: Resultados

| PACIENTE | CLASIFICACIÓN CLÍNICA              | GENÉTICA         |
|----------|------------------------------------|------------------|
| 1        | Tipo 1                             | Exón 1           |
| 2        | Tipo 1                             | Exón 3           |
| 3        | Tipo 1                             | Exón 3           |
| 4        | Tipo 1                             | Región promotora |
| 5        | Tipo 1                             | Región promotora |
| 6        | Tipo2C                             | Exón 3           |
| 7        | Tipo2C                             | -                |
| 8        | Tipo 1 (Hemangioblastoma cerebelo) | Región promotora |
| 9        | Hemangioblastoma cerebelo          | -                |

En la tabla 3 se las alteraciones genéticas obtenidas. En los pacientes clasificados clínicamente como tipo 1 (sin feocromocitoma) se encontraron mutaciones distintas: En el paciente 1 se evidenció una mutación puntual en el exón 1, que se correspondía con una mutación ya descrita y que justifica el proceso clínico. En el caso familiar (Pacientes 2 y 3: Madre e hija) se encontró una mutación en el primer aminoácido del exón 3, p.Tyr175Ter (cambio de una tirosina por una codón de terminación) no descartando que la afectación se extienda al intrón adyacente, lo que confirma la enfermedad tanto clínica como genéticamente (ANEXO 3). El estudio de los dos pacientes 4 y 5 (Hermanos) mostró una alteración en la región promotora, que se traduce en una ausencia de proteína VHL.

Esta alteración también se encontró en un paciente con afectación sólo cerebelosa (Paciente 8)

Con respecto a los pacientes clasificados clínicamente como VHL 2C (Feocromocitoma aislado) se identificó en el paciente 6 una mutación puntual en el exón 3 correspondiente a p.Arg176GlyfsX26, mutación ya descrita, que confirma la enfermedad. En el paciente 7 no se identificó ninguna alteración, por lo que el estudio debería ampliarse a otros genes implicados en la aparición aislada de feocromocitoma (ANEXO 4)

A pesar de la confirmación genética en la mayoría de los pacientes, ni en el paciente 7 ni en el 9 se encontró una mutación causante genéticamente de VHL, que si cumplían criterios clínicos de la enfermedad.

#### **4. DISCUSIÓN**

Con el objetivo de establecer la correlación clínico-genética existente en la enfermedad de Von Hippel-Lindau, se comparan los resultados del estudio con la literatura e investigaciones previas.

Las mutaciones causantes de una pérdida de función del gen VHL se han relacionado con la predisposición a numerosos tumores correspondientes con VHL tipo 1. Existen numerosas identificadas <sup>15</sup>, sin embargo, aquellas causantes de una ganancia de función se han identificado en VHL tipo 2C<sup>18</sup>. Esto se debe a que la presencia de un determinado tumor está asociado con varios alelos mutantes, con diferentes funciones bioquímicas, pudiendo ser algunas de ellas tejido-específicas.

En lo correspondiente a nuestra paciente 1 y pacientes 2 y 3 las mutaciones encontradas en los exones 1 y 3 respectivamente se correspondían con una pérdida de la normofunción proteica, siendo la responsable del fenotipo concreto-VHL tipo 1-.

El caso de las pacientes 2 y 3 requiere un análisis más detenido, ya que, si bien ambas cumplen criterios diagnósticos tanto clínicos como genéticos, los fenotipos con la misma mutación son distintos. La alteración genómica hace que en vez de codificar una Tyr (TAC) codifica un fin de señal (TAA) lo que hace que la proteína quede truncada perdiendo una importante cadena de aminoácidos de su estructura. La paciente 2 (madre) presenta únicamente un hemangioblastoma de fosa posterior, mientras que su hija (la paciente 3) tiene una clínica mucho más florida, asociando hemangioblastoma retiniano (que le provocó una pérdida completa de la visión, siendo bilateral), hemangioblastoma de cerebelo y hemangioblastoma en la médula espinal (que ha terminado por producir una paraplejía).

Esto se considera debido a una herencia autosómica dominante, pero de penetrancia incompleta de la mutación heredada en este caso (ANEXO 2).

En torno al 12-24% de todos los feocromocitomas son hereditarios, formando parte de síndromes familiares hereditarios, como por ejemplo MEN 2 (Neoplasia endocrina múltiple tipo 2) Neurofibromatosis tipo 1 o VHL.

En pacientes con VHL, los feocromocitomas determinan la clasificación clínica como tipo 2 de la enfermedad. De acuerdo con Hes et al<sup>5</sup>, están causados por una mutación missense, causando un cambio de aminoácido, que provoca una ganancia de función (en contraposición con las mutaciones descritas causantes del tipo 1, que provocan una pérdida de función)

Hoffman et al.<sup>6</sup> describió a partir de experimentos en ratones que existen determinadas mutaciones causantes del tipo VH 2C en las que la proteína VHL mantiene la capacidad para unirse a HIF (como por ejemplo pVHL L188V). Estos alelos podrían realizar la poliubiquitinación de HIF in vitro e in vivo, lo que conduce a una disminución de la activación de los genes diana de HIF. En contraste, esta variante muestra una disminución en la unión de la fibronectina y por ello, una disminución de la capacidad para restaurar el ensamblaje de la matriz de fibronectina extracelular. Esto sugiere que el ensamblaje de la matriz de fibronectina podría desempeñar un papel especialmente importante en el desarrollo del feocromocitoma.

En nuestra paciente 6, clasificada clínicamente como VHL tipo 2C, se confirmó el diagnóstico mediante el análisis genético. Sin embargo, en el paciente 7, también con etiqueta diagnóstica previa de VHL tipo 2C, no se encontró ninguna alteración genética compatible con VHL, por lo que debería realizarse un diagnóstico diferencial de los posibles síndromes causantes de la clínica. Actualmente son más las alteraciones genéticas no relacionadas con el VHL que las que si lo están, las que se encuentran al realizar el estudio genético de los pacientes afectados de feocromocitoma (ANEXO 3).

En lo que concierne a la región promotora, los estudios realizados son menos numerosos. Lucía Anna Muscarella<sup>13</sup> identificó una duplicación en heterocigosis (ca. -44\_-54dup11) de 11 pb en la región promotora de VHL 65 pb antes del codón de inicio en un paciente con hemangioblastoma cerebeloso (al igual que nuestro paciente 8) Estas investigaciones coinciden con Martella et al<sup>10</sup>. En nuestros pacientes hermanos (4 y 5) se encontraron también mutaciones en la región promotora. En el caso del paciente 5 observamos como la mutación además se asocia a una clínica más amplia, presentando el mismo un hemangioblastoma medular.

Por último, no se encontró ninguna mutación causante de VHL en el paciente 9, clasificado clínicamente como VHL por presentar un hemangioblastoma cerebeloso. Esto nos lleva a pensar en diagnósticos alternativos responsables de este cuadro. Los hemangioblastomas son los tumores primarios intraaxiales más frecuentes en la fosa craneal posterior en adultos, con predominio en el sexo masculino y debut entre la 4ª y 5ª década de vida. La mayoría son espontáneos, siendo un 20-25 % los que se encuentran asociados al VHL.

## 5. CONCLUSIONES

1. El estudio genómico resulta imprescindible, hoy día, para confirmar el diagnóstico de VHL.
2. En los casos de clínica de feocromocitoma debe realizarse un completo diagnóstico diferencial, ampliando los genes a estudiar, buscando aquellos relacionados con enfermedades o síndromes hereditarios que en su evolución cursan con esta patología.
3. A pesar de la asociación de distintos genotipos con fenotipos determinados, una alteración genética se correlaciona con distintos niveles de gravedad, basado en la penetrancia incompleta de las mutaciones causantes de VHL.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

1. Brauch H, Kishida T, Glavac D, et al. Von Hippel-Lindau (VHL) disease with pheochromocytoma in the Black Forest region of Germany: evidence for a founder effect. *Human Genetics*. 1995;95(5): 551-556.
2. Crossey PA, Richards FM, Foster K, Green JS, et al. Identification of intragenic mutations in the von Hippel-Lindau disease tumour suppressor gene and correlation with disease phenotype. *Human Molecular Genetics*. 1994;3(8):1303-1308.
3. Cybulski C, Matyjasik J, Soroka M, et al. Mutations in the von hippel-lindau tumour suppressor gene in central nervous system hemangioblastomas. *Hered Cancer Clin Pract*. 2004;2(2):93–97. doi:10.1186/1897-4287-2-2-93.
4. Hoffman MA, Ohh M, Yang H, et al. Von Hippel-Lindau protein mutants linked to type 2C VHL disease preserve the ability to downregulate HIF, *Human Molecular Genetics*, 2001; 10(10): 1019–1027, <https://doi.org/10.1093/hmg/10.10.1019>.
5. Hes F, Zewald R, Peeters T, et al. Genotype-phenotype correlations in families with deletions in the von Hippel-Lindau (VHL) gene. *Human Genetics*. 2000;106(4):425-431.

6. Knauth K, Bex C, Jemth P, Buchberger A. Renal cell carcinoma risk in type 2 von Hippel-Lindau disease correlates with defects in pVHL stability and HIF-1alpha interactions. *Oncogene*. 2006;25(3):370–377.
7. Latif F, Tory K, Gnarr J, et al. Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. *Science* 1993; 260 (5112): 1317–1320.
8. Lamiell JM, Salazar FG, Hsia YE. von Hippel–Lindau disease affecting 43 members of a single kindred. *Medicine*. 1989;68 (1):1–29.
9. Marcos HB, Libutti SK, Alexander HR, et al. Neuroendocrine tumours of the pancreas in von Hippel-Lindau disease: spectrum of appearances at CT and MR imaging with histopathologic comparison. *Radiology*. 2002; 225 (3): 751–758.
10. Martella M., Salviati L., Casarin A., et al. Molecular analysis of two uncharacterized sequence variants of the VHL gene. *Journal Of Human Genetics*, 2006; 51 (11), 964-968.
11. Melmon KL, Rosen SW. Lindau's disease. Review of the literature and study of a large kindred. *The American Journal of Medicine*. 1964; 36 (4):595–617
12. McNeill A, Rattenberry E, Barber R, et al. Genotype-phenotype correlations in VHL exon deletions. *The American Journal of Medical genetics. Part A*. 2009; 149 (10): 2147-2151.
13. Muscarella L, Barbano R, Bartolomeo A, et al. An 11-bp duplication in the promoter region of the VHL gene in a patient with cerebellar hemangioblastoma and renal oncocytoma. *Journal of Human Genetics*. 2007;52 (6): 485-491.
14. Neumann H, Wiestler O D. Clustering of features of von Hippel-Lindau syndrome: evidence for a complex genetic locus. *Lancet*. 1991; 337 (8749): 1052-1054.
15. Nordstrom-O'Brien M, Van der Luijt R, Van Rooijen E, et al. Genetic analysis of von Hippel-Lindau disease. *Human Mutation* 2010; 31 (5): 521-537.
16. Capodimonti S, Teofili L, Martini M, et al. Von Hippel-Lindau Disease and Erythrocytosis. *Journal of Clinical Oncology* 2012; 30 (13) :137-139.
17. Stebbins C, Kaelin W Jr, Pavletich N. Structure of the VHL-ElonginC-ElonginB complex: implications for VHL tumor suppressor function. *Science*. 1999; 284 (5413):455–61.
18. Schreinemakers J, Zonnenberg B, Höppener J, et al. A patient with bilateral pheochromocytoma as part of a Von Hippel-Lindau (VHL) syndrome type 2C. *World journal of surgical oncology*, 2007; 5, 112. doi:10.1186/1477-7819-5-112
19. Wong W, Agron E, Coleman H, et al. Genotype-phenotype correlation in von Hippel-Lindau disease with retinal angiomas. *Archives of Ophthalmology*. 2007; 125(2): 239-245.

## 7. ANEXOS

### ANEXO 1

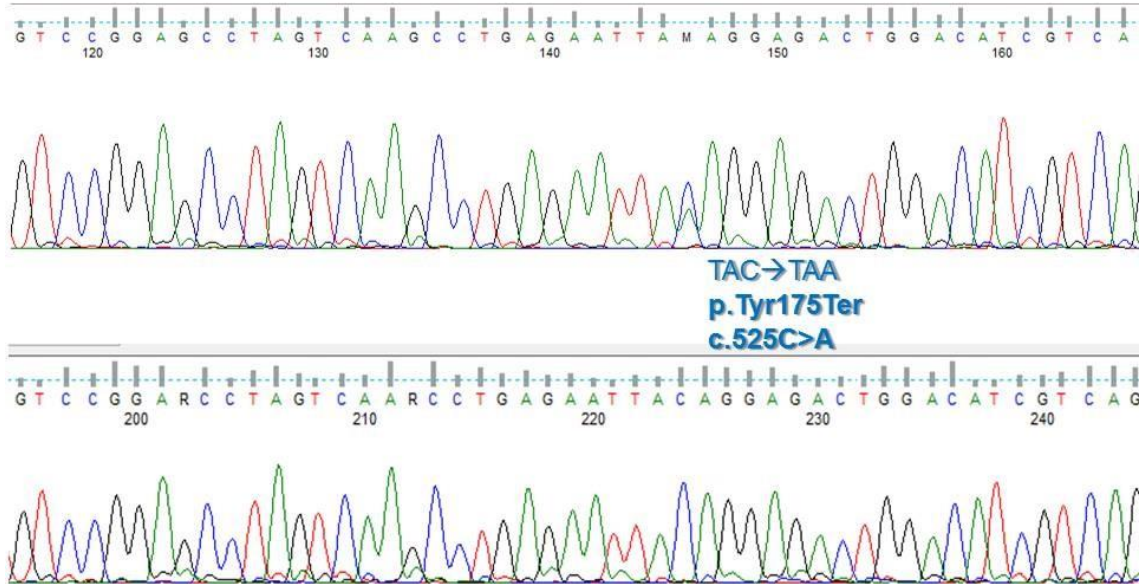
Relación clínica-genética por órganos en VHL.

| ÓRGANO               | ÓRGANO/LESIÓN                       | CLÍNICA   | GENÉTICA  |
|----------------------|-------------------------------------|---|---|
| SNC                  | <b>Hemangioblastomas</b>            | Incremento de la presión intracraneal<br>Efecto masa<br>Mareo<br>Pérdida fuerza extremidades<br>Variable según localización | Mutaciones puntuales (Cybulski, Cezary et al. <sup>3)</sup>   |
|                      | <b>Hemangioblastomas retinianos</b> | Disminución agudeza visual<br>Desprendimiento vítreo posterior<br>Desprendimiento de retina<br>Hemorragias retinales        | Mutaciones de tipo sustitución de aminoácido o aquellas que conducen a la síntesis de proteínas truncadas tienen mayor riesgo que deleciones completas del gen VHL (Wong et al. (2007) <sup>19)</sup> |
| RIÑÓN                | <b>Carcinoma de células renales</b> | Asintomáticos<br>Hematuria<br>Dolor lumbar<br>Insuficiencia renal<br>Recurrencia postquirúrgica<br>Muerte                   | Factor protector: deleción HSPC300 (C3orf10) McNeill et al. (2009) <sup>12</sup>  |
| GLÁNDULA SUPRARRENAL | <b>Feocromocitoma</b>               | Hipertensión arterial<br>Cefalea<br>Taquicardia<br>Rubor<br>Intolerancia al calor   | Aumento Riesgo: mutaciones arg238-trp y arg238-gln (1994, Crossey et al.) <sup>2</sup><br><br>Factor protector: deleción codon 238 (Hes et al. (2000) <sup>5</sup>                                    |
| PÁNCREAS             | <b>Quistes</b>                      | Asintomáticos<br>Obstrucción biliar (Cabeza)  | No está descrita la correlación genotipo-fenotipo<br>Relación con feocromocitoma (Marcos et al. 2002) <sup>9</sup>  |
|                      | <b>Tumores</b>                      | Metástasis<br>Efecto masa   |   |

## ANEXO 2

Mutación non sense en el exón 3 de las pacientes 2 y 3.

### Mutation non sense gen VHL (exón 3)



### ANEXO 3

Conjunto de genes relacionados con el feocromocitoma:

| Gen     | Función                                      | Tipo de gen      | Tumor                        |
|---------|--|------------------|------------------------------|
| NF1     | Ras-GAP                                      | Supresor tumoral | Feocromocitoma               |
| RET     | Receptor quinasa                             | Oncogén          | Feocromocitoma               |
| VHL     | Ubiquitin-ligasa                             | Supresor tumoral | Paraganglioma feocromocitoma |
| SDHA    | SDH, cadena respiratoria                     | Supresor tumoral | Paraganglioma                |
| SDHB    | SDH, cadena respiratoria                     | Supresor tumoral | Paraganglioma feocromocitoma |
| SDHC    | SDH, cadena respiratoria                     | Supresor tumoral | Paraganglioma                |
| SDHD    | SDH, cadena respiratoria                     | Supresor tumoral | Paraganglioma feocromocitoma |
| SDHAF2  | SDH, cadena respiratoria                     | Supresor tumoral | Paraganglioma                |
| TMEM127 | ¿Regulación de mTOR?,<br>¿Tráfico endosomal? | Supresor tumoral | Feocromocitoma               |
| MAX     | Antagonista de MYC                           | Supresor tumoral | Feocromocitoma               |

NF: Neurofibromatosis. RET: rearranged during transfection (reordenado durante la transfección) SDH: Succinato Deshidrogenasa. TMEM127: Proteínas transmembrana 127. MAX: myc-associated factor X (Factor x asociado a myc)