

# Estudio del gen VHL en hemangioblastomas cerebelosos

- Autores: Dana Florentina Melián Ramallo  
Laura Martín Meneses
- Tutora: Rosa N. Rodríguez Rodríguez
- Co-tutor: Eduardo Salido Ruiz

Departamento de Ciencias Médicas Básicas, Servicio de Anatomía Patológica del  
Hospital Universitario de Canarias.

## **Agradecimientos**

A nuestras familias, por el apoyo incondicional y darnos la fuerza que necesitábamos para terminar esta carrera de fondo.

A nuestra tutora la Dra. Rosi Rodríguez y co-tutor el Dr. Eduardo Salido, por dejarnos participar en este proyecto tan interesante y apasionante para nosotras.

A todos los técnicos del laboratorio que, de forma directa o indirecta, nos ayudaron en la obtención de las muestras.

En especial, agradecer a Ayelen Ramos, bióloga y biomédica, que fue nuestra guía y nos ayudó en cada paso que dimos, sin ti no habría sido posible realizar este TFG.

*No se diagnostica lo que no se piensa.  
No se piensa lo que no se conoce.*

Dr. Chamoles

# -Índice-

<b>Resumen</b> .....	<b>1</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>1</b>
<b>Palabras clave</b> .....	<b>2</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>2</b>
♦ ¿Qué es el síndrome de Von Hippel-Lindau? <sup>1,2,3</sup> .....	<b>2</b>
♦ ¿Cuántos enfermos de VHL hay en España? <sup>4</sup> .....	<b>3</b>
♦ <b>Clínica</b> <sup>7</sup> .....	<b>4</b>
▪ Hemangioblastomas en el Sistema Nervioso Central.....	5
▪ Hemangioblastomas retinianos.....	5
▪ Tumor del saco endolinfático.....	6
▪ Cistoadenoma del epidídimo.....	6
▪ Cistoadenoma del ligamento ancho.....	6
▪ Feocromocitoma .....	6
▪ Quistes y tumores renales .....	7
▪ Quistes, cistoadenomas serosos o tumores neuroendocrinos pancreáticos .....	7
♦ <b>Diagnóstico del VHL</b> .....	<b>7</b>
♦ <b>Estudio histológico del cerebelo sano vs hemangioblastoma cerebeloso</b> <sup>8,9</sup> .....	<b>8</b>
▪ Cerebelo sano .....	8
▪ Hemangioblastoma cerebeloso .....	9
▪ Diagnóstico diferencial entre hemangioblastoma cerebeloso y el carcinoma renal de células claras metastásico.....	10
♦ <b>Estudio del gen VHL</b> .....	<b>10</b>
♦ <b>Estudio de la proteína VHL (pVHL)</b> <sup>12</sup> .....	<b>11</b>
♦ <b>Estudio de HIF</b> <sup>12,13</sup> .....	<b>11</b>
♦ <b>Relación de HIF y cáncer</b> .....	<b>12</b>
♦ <b>Terapias dirigidas en la enfermedad VHL</b> .....	<b>13</b>
♦ <b>¿Cuáles son las mutaciones más frecuentes?</b> .....	<b>14</b>
<b>Justificación del trabajo</b> .....	<b>15</b>
<b>Objetivos</b> .....	<b>16</b>
♦ <b>Objetivo principal</b> .....	<b>16</b>
♦ <b>Objetivos secundarios</b> .....	<b>16</b>
<b>Material y métodos</b> .....	<b>16</b>
♦ <b>Diseño del estudio</b> .....	<b>16</b>
♦ <b>Sujetos del estudio</b> .....	<b>17</b>
♦ <b>Desparafinado de las muestras histológicas</b> .....	<b>18</b>
♦ <b>Extracción y purificación del ADN</b> .....	<b>19</b>
♦ <b>Cuantificación del ADN</b> .....	<b>20</b>
♦ <b>Diseño de primers</b> .....	<b>20</b>

◆ Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	21
◆ Electroforesis .....	22
◆ Secuenciación de Sanger .....	22
▪ Limpieza del producto .....	22
▪ Reacción de secuenciación .....	22
▪ Precipitación del ADN .....	23
▪ Secuenciación final .....	23
<i>Resultados</i> .....	24
<i>Discusión</i> .....	26
<i>Conclusiones</i> .....	29
<i>¿Qué he aprendido durante este TFG?</i> .....	29
<i>Bibliografía</i> .....	30
<i>Anexos</i> .....	33
◆ Anexo 1: Protocolo internacional de seguimiento de pacientes afectados de VHL .....	33
◆ Anexo 2: Cuantificación del ADN .....	33
◆ Anexo 3: Diseño de primers .....	33

## **Resumen**

El síndrome Von Hippel-Lindau (VHL) es una enfermedad rara, de herencia autosómica dominante, producida por mutaciones en la línea germinal del gen supresor de tumoral VHL (3p25.3). Se caracteriza por el desarrollo de quistes y tumores como: carcinoma renal de células claras (CCR), hemangioblastomas del SNC y de retina, feocromocitomas, tumores neuroendocrinos pancreáticos y tumores del saco endolinfático. Dada la variabilidad de expresión fenotípica, la aparición de quistes o tumores que se asemejan a los de otros síndromes y la ausencia de un registro formal de pacientes, es una enfermedad infradiagnosticada. Mutaciones en el gen supresor tumoral VHL afectan a la estructura o función de la proteína supresora tumoral (pVHL) que juega un papel clave en la detección de los niveles de oxígeno celular. En este trabajo hemos realizado un estudio experimental con el fin de aprender las técnicas para localizar mutaciones genómicas. Para ello se emplearon muestras histológicas anonimizadas (trabajamos con muestras identificadas por un número) de hemangioblastomas cerebelosos en enfermos de VHL, recogidas en el servicio de Anatomía Patológica del HUC. En ellas se detectaron 4 mutaciones patogénicas que condicionaron una alteración en la función de la pVHL, lo que se traduce en el acúmulo (falla la degradación fisiológica) del factor inducido por hipoxia (HIF) que provoca la expresión de múltiples genes relacionados con la génesis tumoral. En la actualidad, no existen tratamientos curativos para esta enfermedad, por ello los esfuerzos deben enfocarse al desarrollo de nuevas terapias dirigidas, diagnóstico precoz y seguimiento, mejorando el pronóstico de estos pacientes.

## **Abstract**

Von Hippel-Lindau (VHL) syndrome is a hereditary autosomal dominant rare disease caused by germline mutations in the tumor suppressor gene VHL (3p25.3). It is characterized by the development of cysts and tumors such as: clear renal cell carcinoma (ccRCC), CNS and retinal hemangioblastomas, pheochromocytomas, pancreatic neuroendocrine tumors and endolymphatic sac tumors. Given the variability of phenotypic expression, the appearance of cysts or tumors that resemble other syndromes, and the absence of a comprehensive patient registry, it is an underdiagnosed disease. Mutations in the VHL tumor suppressor gene affect the structure or function of the protein (pVHL), which plays a key role in sensing cellular oxygen levels. In this project we have done an experimental study in order to learn to locate the genomic mutations. Thus, we used anonymous histological samples (identified by numbers) of cerebellar hemangioblastomas in VHL patients from the Pathology department at HUC. We detected four pathogenic mutations that conditioned an alteration in the function of pVHL leading to the accumulation of the hypoxia-induced factor (HIF) which causes the expression of multiple genes

related to tumorigenesis. Nowadays there are no curative treatments for this disease therefore efforts should be focused on the development of new target therapies, early diagnosis and follow-up, improving the prognosis of these patients.

## Palabras clave

Von Hippel-Lindau (VHL), Hemangioblastoma cerebeloso, Factor inducible por hipoxia (HIF), Proteína VHL (pVHL).

## Introducción

### ♦ ¿Qué es el síndrome de Von Hippel-Lindau?<sup>1,2,3</sup>

El síndrome de Von Hippel-Lindau (VHL) es una enfermedad genética que se produce por mutaciones en la línea germinal del gen supresor tumoral VHL, ubicado en el cromosoma 3p25.3. Tiene un patrón de herencia autosómica dominante, aunque hay un 20% de mutaciones “de novo”, es decir, la persona afectada es el primer caso en su familia. A consecuencia de ello, se produce un aumento del riesgo de desarrollar **quistes** y **tumores hipervasculares** en distintos órganos:

- Hemangioblastomas retinianos (40-60%).
- Hemangioblastomas del Sistema Nervioso Central (SNC), (60-80%).
- Tumores del saco endolinfático (2-11%).
- Feocromocitomas (10-25%).
- Quistes pancreáticos o tumores del islote pancreático (60-80%).
- Quistes renales y carcinoma renal de células claras (30-60%).
- Cistoadenomas papilares de epidídimo y ligamento ancho del útero (20-60%).

Entorno al 5-20% de pacientes con VHL presentan policitemia, pues los tumores (por ejemplo: hemangioblastomas del Sistema Nervioso Central) ocasionalmente producen eritropoyetina, lo que de forma secundaria lleva a un aumento anormal de glóbulos rojos. Además, mutaciones del gen VHL pueden causar la proliferación de células hematopoyéticas, dando lugar a la eritrocitosis familiar tipo 2 (o policitemia de Chuvash). Sin embargo, los pacientes con eritrocitosis familiar tipo 2 no presentan un riesgo incrementado de desarrollar tumores ya que la frecuencia de tener ambas patologías es rara.

El síndrome de Von Hippel-Lindau se incluye dentro de las enfermedades raras, afectando a 1 de cada 30.000-50.000 nacidos vivos, sin preferencia conocida por sexo o raza. Esta enfermedad es crónica y altamente incapacitante si se deja evolucionar. Hasta que comenzaron los controles periódicos, las principales causas de muerte de estos pacientes eran las metástasis del carcinoma renal de células

claras y las complicaciones neurológicas de los hemangioblastomas cerebelosos. Es por esto, que asociaciones como “Alianza española de familias de Von Hippel-Lindau” tratan de potenciar el conocimiento de esta enfermedad, incluso dentro del sector sanitario pues es desconocido para la inmensa mayoría de los médicos, así como fomentar la investigación y establecer un protocolo de seguimiento para los pacientes afectados de VHL. Esto último es sumamente importante, ya que en la actualidad no existe ningún tratamiento curativo, por lo que, se debe hacer hincapié en su seguimiento y tratamiento (si fuera necesario). (En *Anexo 1* se adjunta el protocolo internacional de seguimiento recomendado).

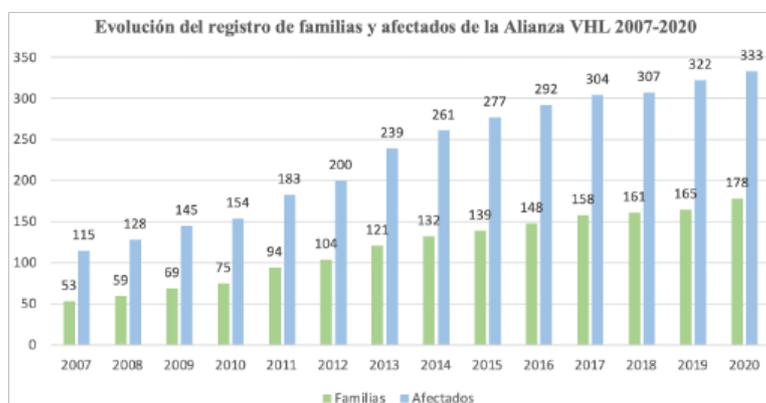
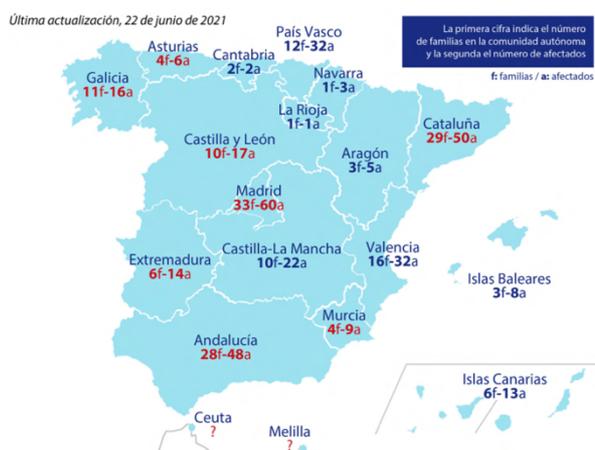
De igual modo, a nivel internacional también existe la “VHL Alliance” creada para promover la investigación y educación sobre esta enfermedad.

### ♦ ¿Cuántos enfermos de VHL hay en España?<sup>4</sup>

Como se comentó anteriormente, al tratarse de una enfermedad hereditaria de patrón dominante, a excepción de los casos “de novo”, los casos de personas afectadas se agrupan en familias.

En España las enfermedades raras no son de declaración obligatoria, por lo que el registro más fiable procede de las propias asociaciones de afectados. Para aproximarnos al número de casos de VHL que hay en España, hemos recurrido a la asociación alianza VHL que recoge datos de los afectados de todo el país, (última actualización el 22 de junio de 2021). Los datos aportados son de carácter voluntario, por lo que hay pacientes no recogidos en esta gráfica.

Recientemente se ha puesto en marcha el Registro de Enfermedades Raras del Instituto de Salud Carlos III, dependiente del Ministerio de Salud y Política Social. Este registro es de carácter voluntario, y son los propios afectados los que han de aportar los datos. A día 25 de mayo de 2022 solo 17 pacientes de todo el país afectados de VHL se han incluido en el registro.



Imágenes obtenidas de Alianza española VHL

◆ **Clínica**<sup>7</sup>

Las manifestaciones clínicas de la enfermedad de VHL son muy heterogéneas. Clásicamente el VHL se ha clasificado en dos tipos:

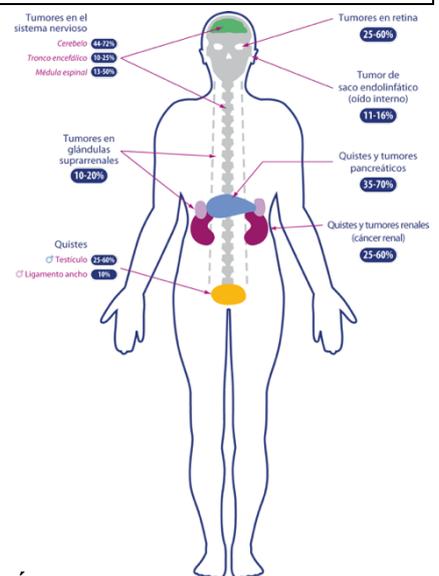
- **Tipo 1:** cuando no presenta feocromocitoma. En él encontramos los siguientes tipos de tumores:

<b>Tipo 1</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Angiomas de retina (hemangioblastomas)</li> <li>- Hemangioblastomas en el sistema nervioso central</li> <li>- Cáncer renal (carcinoma de células claras)</li> <li>- Tumores y quistes pancreáticos</li> </ul>
---------------	--

- **Tipo 2:** cuando presenta feocromocitoma. Se subclasifica en 2A, 2B o 2C dependiendo de los tumores que presente:<sup>5</sup>

<b>Tipo 2A</b> <i>(Bajo riesgo de CCR)</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Feocromocitomas</li> <li>- Hemangioblastomas de retina</li> <li>- Hemangioblastomas del sistema nervioso central</li> </ul>
<b>Tipo 2B</b> <i>(Alto riesgo de CCR)</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Feocromocitomas</li> <li>- Hemangioblastomas de retina</li> <li>- Hemangioblastomas del sistema nervioso central</li> <li>- Cáncer renal (carcinoma renal de células claras)</li> <li>- Tumores y quistes pancreáticos</li> </ul>
<b>Tipo 2C</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Solo feocromocitomas</li> </ul>

Las neoplasias aparecen a edades tempranas en los pacientes con VHL a diferencia de los pacientes que desarrollan estos tumores de forma aislada. De tal manera, que a los 50 años el 95% de los afectados ya habrá desarrollado una o más lesiones tumorales. Por tanto, ante una persona de 60 años que desarrolla un primer hemangioblastoma en el Sistema Nervioso Central no debemos sospechar en primer lugar que tenga el síndrome de Von Hippel-Lindau.



**Órganos afectados en la enfermedad VHL.**  
Imagen obtenida de Alianza española VHL

### ▪ **Hemangioblastomas en el Sistema Nervioso Central**

Son tumores benignos, circunscritos, de origen vascular (liberan factores angiogénicos como el *Vascular Endothelial Growth Factor; VEGF*). Sin embargo, su localización, crecimiento y aparición de múltiples lesiones tumorales, les confiere un comportamiento agresivo.

El 75% corresponden a hemangioblastomas infratentoriales, principalmente localizados en cerebelo. El otro 25% se pueden encontrar en la médula espinal (sobre todo en la región cervical), troncoencéfalo, cerebro, retina y en las raíces nerviosas lumbosacras, siendo los supratentoriales muy raros. También pueden ocurrir fuera del SNC como en hueso y partes blandas, hígado, páncreas, riñón, intestino y piel.<sup>1</sup>

Alrededor del 25-30% de hemangioblastomas cerebelosos diagnosticados ocurren en el contexto de VHL, a diferencia de los tumores de médula, en los que este porcentaje asciende hasta el 80%.

Los síntomas fundamentalmente se deben al crecimiento del tumor o de quistes asociados a él, que puede ejercer presión sobre el parénquima nervioso o bloquear la circulación del líquido cefalorraquídeo, produciendo: cefalea, dolores de espalda, alteraciones de la sensibilidad o pérdida de fuerza, mareo, sensación de inestabilidad, entre otros síntomas.

La prueba de imagen de elección para el diagnóstico es la resonancia magnética con contraste. Además, se recomienda el seguimiento del tumor para determinar el momento ideal en el que llevar a cabo el tratamiento quirúrgico. Este consiste en una cirugía abierta por un neurocirujano experto en hemangioblastomas VHL. No se recomienda la cirugía en tumores asintomáticos, salvo en los localizados en el bulbo raquídeo, que se deben operar antes del comienzo de los síntomas (1 cm) por la gravedad de su localización. En caso de cirugías de alto riesgo existen otras opciones terapéuticas como la radiocirugía estereotáxica.

El pronóstico de hemangioblastomas cerebelosos en el VHL es excelente si se realiza una escisión completa de la lesión. Los déficits neurológicos permanentes son raros y se pueden evitar con un tratamiento precoz. Sin embargo, se debe tener en cuenta que los tumores de aparición esporádica tienen un mejor pronóstico que aquellos asociados a la enfermedad de VHL ya que éstos últimos suelen ser múltiples y aparecer junto con otras neoplasias asociadas a esta enfermedad, así como en edades más tempranas.

### ▪ **Hemangioblastomas retinianos**

Suele ser la manifestación inicial más frecuente de la enfermedad (entre los 10-40 años), y su localización habitual es la periferia retiniana. Estos tumores, pueden desarrollar exudación, membranas epirretinianas y desprendimiento de retina, lo que provoca pérdida de agudeza visual. Los tumores

periféricos pueden tratarse con fotocoagulación con láser argón o crioterapia, mientras que los yuxtapapilares no pueden tratarse sin dañar la visión de forma irreversible.

Para la exudación se emplean inyecciones intravítreas anti-VEGF (ej: bevacizumab). El tratamiento de las membranas epirretinianas y del desprendimiento de retina es quirúrgico.

- **Tumor del saco endolinfático**

Es un tumor infrecuente en la población general, pero aparece en un 15% de la población VHL. Son tumores muy vascularizados y localmente agresivos. Produce pérdida auditiva, tinnitus y vértigo. A menudo son confundidos clínicamente con la enfermedad de Menière, debido al acumulo de líquido que se produce por bloqueo de la reabsorción de endolinfa en el saco endolinfático, hemorragia o producción de líquido por parte del tumor. El tratamiento es la resección quirúrgica completa, sin él, el crecimiento tumoral erosiona las estructuras adyacentes. Esto puede afectar al acueducto vestibular, fosa posterior o estructuras nerviosas, lo que produce paresia facial, hipoestesia y síndrome del foramen yugular (pares IX, X y XI), pudiendo ocasionar así la muerte del paciente.

- **Cistoadenoma del epidídimo**

Son tumores quísticos benignos (1-5 cm), asintomáticos, aunque pueden ocasionar hematuria o molestias cuando son múltiples. El cáncer testicular no se asocia a VHL, pero si son dolorosos puede llevarse a cabo una epididimectomía. Dependiendo de su localización pueden bloquear el transporte de espermatozoides y provocar infertilidad.

- **Cistoadenoma del ligamento ancho**

Es un tumor benigno, infrecuente en la población general. Normalmente asintomático, aunque, a veces, ocasiona molestias. Dado que hay receptores de progesterona en los tumores VHL, en las pacientes con este síndrome se recomienda utilizar píldoras anticonceptivas con bajo nivel de progesterona, DIU de cobre o liberadores de bajas dosis de progestágenos.

- **Feocromocitoma**

Es un tumor productor de catecolaminas, que se puede originar en cualquier localización donde existan células cromafines del sistema nervioso simpático, bien en la médula adrenal o extraadrenal (paragangliomas). Raramente son malignos (<7%). Suelen ser hipofuncionantes, diagnosticándose de forma incidental. Si son funcionantes, se producen elevaciones súbitas de tensión, lo que provoca cefaleas, sudoración profusa, palpitaciones o ansiedad. El tratamiento habitual es la adrenalectomía parcial, tratando de conservar el córtex de la glándula para evitar la necesidad de reemplazo esteroideo, por si en el futuro se tuviera que intervenir la otra glándula.

### ▪ **Quistes y tumores renales**

El quiste renal en la enfermedad de VHL suele ser una lesión preneoplásica, en cuyo interior se desarrollará un carcinoma renal de células claras a lo largo de los años. No hay ningún síntoma específico que permita identificar el tumor renal en sus inicios, los riñones seguirán funcionando sin alteraciones clínicas ni analíticas por lo que es vital la vigilancia estricta. Aunque se recomienda intervenir quirúrgicamente a partir de los 3 cm, la decisión sobre cuándo operar debe tomarla el equipo médico completo, siendo de elección una nefrectomía parcial. La ablación por radiofrecuencia y la crioterapia son alternativas útiles en tumores de pequeño tamaño. Si se extirpan los riñones, los pacientes son buenos candidatos a trasplante renal, puesto que el riñón trasplantado tiene el material genético del donante por lo que el riesgo de desarrollar un nuevo tumor es similar al de la población general. Además, el tratamiento inmunosupresor utilizado en trasplantados no parece influir en el crecimiento de otros tumores VHL.

### ▪ **Quistes, cistoadenomas serosos o tumores neuroendocrinos pancreáticos**

La mayoría son asintomáticos y se detectan durante el screening. Es importante realizar el diagnóstico diferencial entre las tres entidades ya que los quistes y cistoadenomas normalmente no precisan tratamiento, aunque si invaden todo el tejido glandular pueden ocasionar insuficiencia pancreática y diabetes mellitus. Por otro lado, los tumores neuroendocrinos pancreáticos son lesiones sólidas, bien circunscritas, múltiples y localizadas en cabeza de páncreas, que requieren un estrecho seguimiento, pues pueden malignizar y metastatizar a distancia (especialmente en hígado y ganglios linfáticos). Además, se recomienda extirparlos si tienen mutación en el exón 3 del gen, si se duplica su tamaño en menos de 500 días o si tienen un tamaño mayor o igual a 3 cm.

### ◆ **Diagnóstico del VHL**

La aproximación diagnóstica se realiza por los hallazgos clínicos, pero el diagnóstico confirmatorio se establece mediante un estudio genético de las mutaciones presentes en el gen VHL. No existen guías universales sobre quién debe someterse a dichos estudios. Sin embargo, se debe sospechar esta enfermedad cuando nos encontremos pacientes con las siguientes características:

- **Pacientes sin historia familiar de VHL que tengan:**
  - Hemangioblastomas múltiples en el cerebelo, la médula espinal o el ojo.
  - Un hemangioblastoma y otra lesión característica (carcinoma renal de células claras, quistes pancreáticos, feocromocitoma, tumor del saco endolinfático o quiste del epidídimo).
  - Persona joven con carcinoma renal de células claras.

- **Pacientes con historia familiar positiva para VHL.** Solo requieren la presencia de una lesión característica (hemangioblastoma en SNC, médula ósea o retina, carcinoma renal de células claras, feocromocitoma...) para sospechar el diagnóstico.

◆ **Estudio histológico del cerebelo sano vs hemangioblastoma cerebeloso**<sup>8,9</sup>

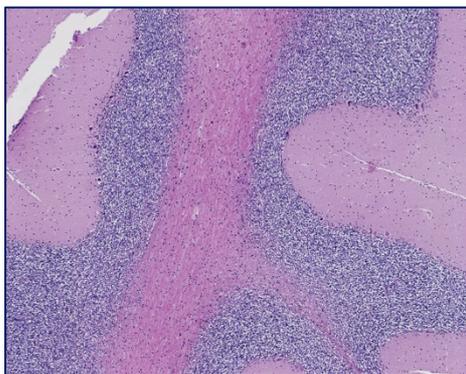
Al realizar el estudio histopatológico del hemangioblastoma, debemos reconocer las características de un cerebelo sano. Para ello, hemos revisado cortes histológicos teñidos con hematoxilina-eosina de un cerebelo sano, reconociendo las distintas estructuras que éste presenta y haciendo una comparación posterior con las muestras de hemangioblastoma cerebeloso a estudio.

▪ **Cerebelo sano**

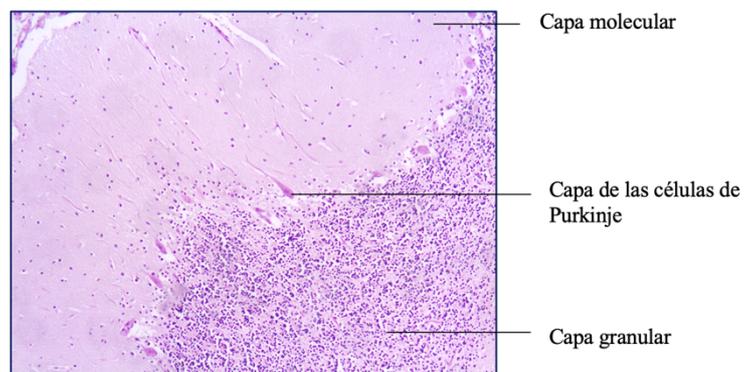
- Visión general: a pequeño aumento se distingue en la zona central la sustancia blanca que forma el eje de la laminilla cerebelosa, y la sustancia gris en la región periférica de dicha estructura (*figura 1.1*). Con mejor detalle podemos ver las tres capas de la sustancia gris (*figura 1.2*) (de dentro hacia fuera):

- *Capa granular.*
- *Capa de las células de Purkinje.*
- *Capa molecular.*

La sustancia blanca está en íntimo contacto con la capa granular, tiene una gran cantidad de fibras nerviosas y escasas células gliales.



**Figura 1.1. Sustancia blanca cerebelosa.**  
Foto de obtención propia (HUC)

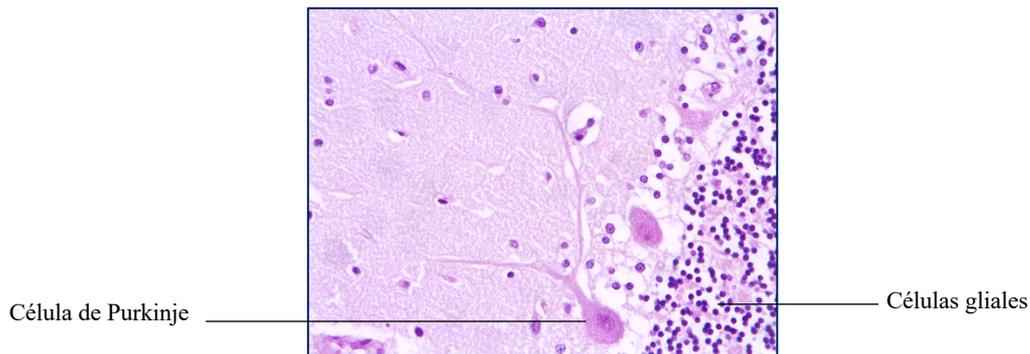


**Figura 1.2. Sustancia gris cerebelosa.**  
Foto de obtención propia (HUC)

- Visión específica: a mayor aumento en la capa molecular encontramos escasas células gliales y proyecciones axonales de las células neuronales.

En la capa de células de Purkinje observamos somas neuronales, de citoplasma eosinófilo y núcleo redondeado con nucléolo en su interior. Además, tienen grandes axones que traspasan esta capa llegando a la molecular (*figura 1.3*).

Por último, en la capa granular, destaca una gran cantidad de células de la glía de morfología redondeada y pequeño tamaño.

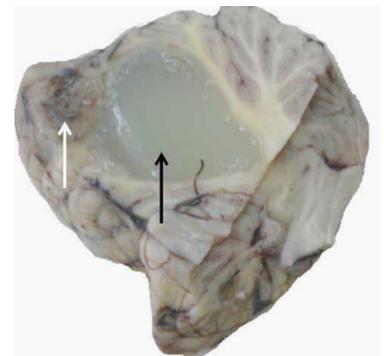


**Figura 1.3. Células de Purkinje y de la glía.**  
Foto de obtención propia (HUC).

### ▪ Hemangioblastoma cerebeloso

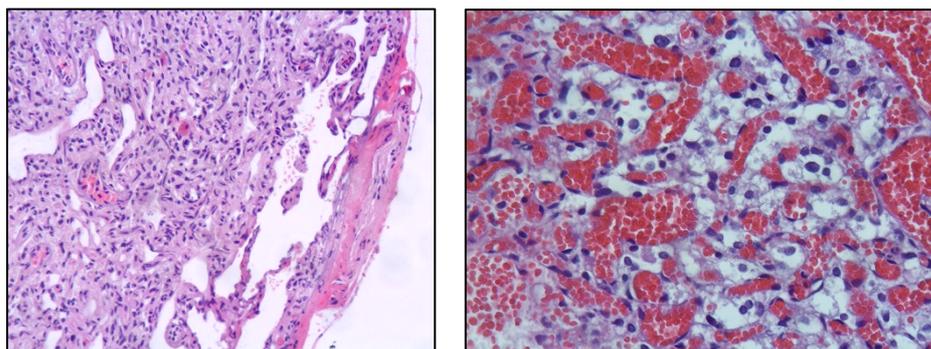
Los hemangioblastomas son tumores de crecimiento lento, bien delimitados y altamente vascularizados con fibrosis y células estromales que van desde epitelioides claras a espumosas.

- **Visión macroscópica:** habitualmente se presentan como masas pseudoencapsuladas quísticas con un nódulo sólido (*figura 2.1*) o totalmente sólidas (menos frecuente).
- **Visión microscópica:** En la periferia se distingue una lámina de tejido fibroso que contiene vasos nutricios. Se diferencian dos proliferaciones celulares (*figura 2.2*):



**Figura 2.1. Lesión sólida en hemisferio izquierdo (flecha blanca) y quística en vermis (flecha negra)(8).**

- **Células estromales neoplásicas:** grandes, con citoplasmas claros por la presencia de vacuolas lipídicas intracitoplasmáticas. Los núcleos son hipercromáticos, tienen distintos tamaños y atipias ocasionales. Son raras las mitosis. En aproximadamente el 10% pueden verse focos de hematopoyesis extramedular, relacionado con la producción de eritropoyetina por las células estromales.
- **Células vasculares reactivas:** aumentan la vascularización capilar con extravasación sanguínea.



**Figura 2.2. A la izquierda: lámina fibrosa que delimita el tumor. A la derecha: células estromales de citoplasma claro con gran vascularización circundante.** Foto de obtención propia (HUC)

**Nota aclaratoria:** en las muestras que hemos estudiado no se aprecia cerebelo sano ya que estos tumores se resecan de la forma más conservadora posible, extirpando solo el tejido neoplásico, para limitar las posibles secuelas neurológicas.

Se distinguen dos variantes histológicas del hemangioblastoma:

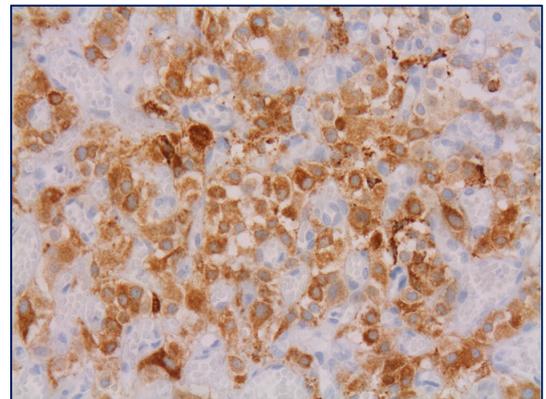
- **Reticular.** Es la más habitual (85-90%) con predominio de proliferación capilar.
- **Celular** (10-15%) donde predominan las células estromales.

Ambas variantes se consideran histológicamente benignas.

Es importante destacar que no se han demostrado diferencias histológicas específicas que distingan los hemangioblastomas de pacientes afectados de VHL con los de aparición esporádica.

▪ **Diagnóstico diferencial entre hemangioblastoma cerebeloso y el carcinoma renal de células claras metastásico**

En muchos casos la morfología de las células estromales del hemangioblastoma es similar a la de las células claras del carcinoma renal y, el hecho de que ambos tumores sean frecuentes en pacientes con VHL y que, con frecuencia, el carcinoma renal metastatiza en el sistema nervioso central, dificulta el diagnóstico. Por todo esto, cuando en un estudio histológico se visualiza gran componente celular de aspecto claro, debemos hacer el diagnóstico diferencial entre ambas entidades, para lo que son útiles las técnicas inmunohistoquímicas (*figura 2.3*).

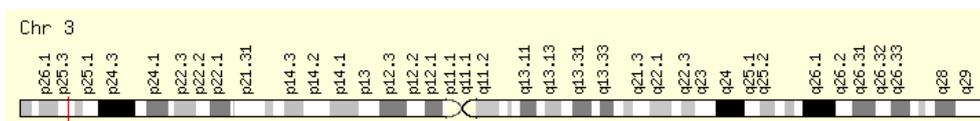


**Figura 2.3.** Células estromales marcadas con inhibina, confirman el diagnóstico de hemangioblastoma cerebeloso. Imagen de obtención propia (HUC).

Las células estromales de hemangioblastomas suelen expresar positividad ante marcadores como la alfa-inhibina, D2-40 (proteína Podoplanina) y expresión citoplasmática de la proteína braquiuria (brachyury). Mientras que las células claras del carcinoma renal son negativas para ellas y expresan positividad con marcadores de carcinoma renal (RCCm), CD10, EMA y CAM 5.2.

◆ **Estudio del gen VHL**

Es un gen supresor tumoral, situado en el brazo corto del cromosoma 3p25.3, y está constituido por 11.890 bases. Está formado por tres exones y da lugar a seis transcritos, de entre los cuales, cinco son capaces de codificar a la proteína VHL.<sup>10,11</sup>

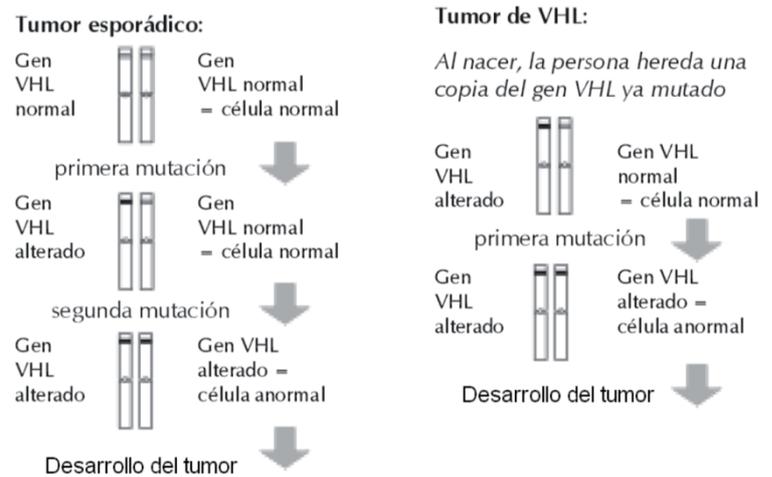


**Imagen obtenida de Genecards**

El síndrome de VHL sigue un patrón de herencia autosómica dominante, de penetrancia casi completa, por lo que la mutación siempre es la misma en los miembros de una familia. Sin embargo, cerca del

20% de los pacientes tienen una mutación “de novo” (es decir, son el primer afectado en su familia) que pudo originarse en la gametogénesis o al inicio de la embriogénesis.

Este síndrome responde al modelo *two-hits* o “teoría de los dos golpes” de Knudson. Según este modelo, los pacientes heredan un alelo mutado del progenitor afectado (mutación germinal, *first hit*), que le predispone al desarrollo de tumores, pero necesitan una segunda mutación en el alelo normal por mutaciones puntuales o hipermetilación, procedente del progenitor sano (mutación somática,

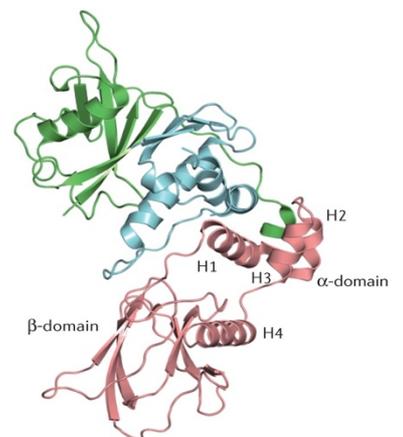


*Ilustración del Dr.S.Richard y del Grupo Francés de Estudio de VHL*

*second hit*), para que el tumor aparezca, pues solo cuando las dos copias del gen supresor tumoral estén inactivas, aparecerá la neoplasia. En cambio, una persona que no haya heredado la mutación, precisa que las dos copias del gen se dañen e inactiven, esto requiere más tiempo, por lo que el tumor aparece a una edad más tardía y en una única localización.

#### ◆ Estudio de la proteína VHL (pVHL)<sup>12</sup>

El gen VHL codifica para dos isoformas distintas, en función de si contienen o no el exón 2: una isoforma grande (pVHL30) de 213 aminoácidos, que contiene los tres exones (incluyendo los aminoácidos Met 1 y Met5 4) y otra de 160 aminoácidos (pVHL19), constituida por el exón 1 y 3. En esta última, se inicia la lectura en el codón 54 Met del exón 1. Los estudios funcionales demuestran que ambas tienen efectos equivalentes de actividad supresora tumoral. En condiciones normales, esta proteína tiene dos dominios estrechamente acoplados (alfa y beta). Por un lado, el dominio alfa se une a un complejo multiproteico que incluye la elongina C y B, cullin 2 y RBX1 (complejo VCB-CR). Por otro lado, al dominio beta se unen las sustancias a degradar.



Nature Reviews | Cancer

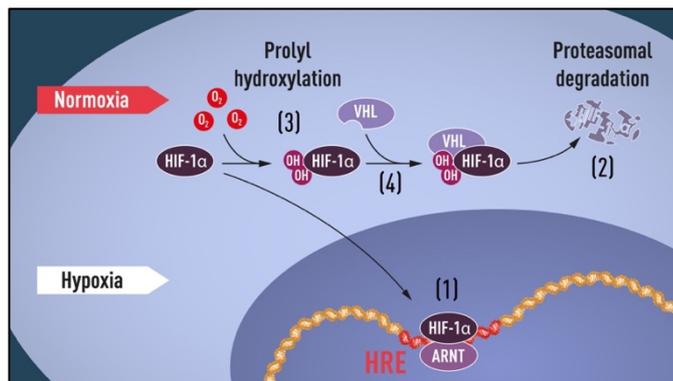
*Estructura secundaria del complejo elongina C y B de la proteína VHL (12)*

#### ◆ Estudio de HIF<sup>12,13</sup>

La disponibilidad de oxígeno regula muchos procesos fisiológicos que son controlados de forma estricta por una red compleja de moléculas, siendo los factores inducibles por hipoxia (HIF)

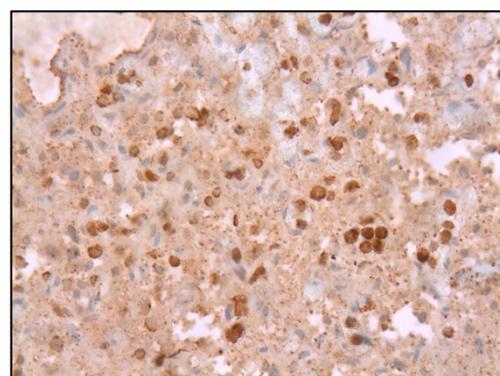
fundamentales. Estos factores de transcripción son heterodímeros constituidos por una subunidad  $\alpha$  (isoformas HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  y HIF-3 $\alpha$ ) y una  $\beta$ , la función de ésta última es independiente del oxígeno.

En condiciones normales de oxígeno, HIF-1 $\alpha$ , se somete a hidroxilación dependiente de oxígeno por hidroxilasas del dominio proлил hidroxilasa (PHD), lo que genera un sitio de unión para el complejo E3-ubiquitina ligasa de la proteína VHL. Como consecuencia, HIF-1 $\alpha$  es poliubiquitinada y degradada en el proteosoma. MDM2/p53 también están involucrados en la ubiquitinación y degradación



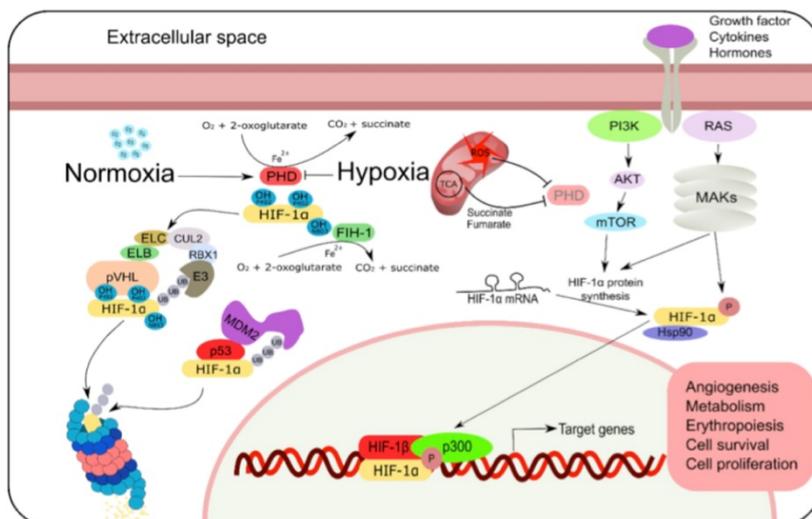
*HIF-1 $\alpha$  en condiciones normales de oxígeno e hipoxia (15)*

de la proteína HIF1 $\alpha$  de forma independiente a pVHL. En hipoxia (bajos niveles de oxígeno), el dominio PHD está inhibido, HIF-1 $\alpha$  se transloca al núcleo (figura 3) y se dimeriza con HIF-1 $\beta$  uniéndose al elemento de respuesta a la hipoxia (HRE) de la región promotora del ADN, lo que promueve la transcripción de genes diana. Estos genes están involucrados en diversos procesos biológicos: angiogénesis, eritropoyesis, metabolismo anaeróbico, supervivencia y proliferación celulares. La cadena transportadora de electrones mitocondrial consume la



*Figura 3. Inmunohistoquímica de HIF-1 $\alpha$ . La tinción nuclear marrón indica que hay acúmulo de HIF-1 $\alpha$ . Imagen de obtención propia (HUC).*

mayor parte de oxígeno celular y puede jugar un papel determinante en la regulación de HIF-1 $\alpha$  pues determina la cantidad de oxígeno disponible para las enzimas PHD. En este sentido, la inhibición genética o farmacológica de la respiración mitocondrial podría prevenir la acumulación de HIF-1 $\alpha$  en hipoxia. Además, otras moléculas como citoquinas, hormonas o factores de crecimiento también regulan a HIF-1 $\alpha$ .



*Estructura y regulación de HIF (13)*

### ◆ Relación de HIF y cáncer

Cuando las células tumorales crecen, su acceso al suministro de sangre se encuentra limitado, por ello, reorganizan su metabolismo, adaptándose a situaciones de hipoxia. Esta característica es clave en los

tumores sólidos, pues genera un microambiente tumoral que permite su progresión local y sistémica, así como la falta de respuesta a la radioterapia y quimioterapia, lo cual provoca un incremento en la probabilidad de recurrencia del tumor<sup>16</sup>. Como resultado de la hipoxia intratumoral, HIF-1 $\alpha$  se sobreexpresa en cánceres humanos lo que se asocia con fracaso del tratamiento y aumento de la mortalidad. Las terapias anticancerígenas convencionales se dirigen a las células cancerosas proliferantes y bien oxigenadas, mientras que no hay terapias aprobadas que se dirijan a las células cancerosas hipóxicas<sup>17,18</sup>.

Numerosos estudios han aclarado los mecanismos moleculares involucrados en la respuesta celular a la hipoxia, de hecho, en el año 2019 tres líderes en el campo recibieron el Premio Nobel de Medicina por su trabajo sobre HIF-1 $\alpha$  que ha establecido la base para comprender cómo los niveles de oxígeno afectan al metabolismo celular.

#### ◆ **Terapias dirigidas en la enfermedad VHL**

Actualmente, los tratamientos de elección de los tumores asociados con VHL están dirigidos a su resección. Dado que estos pacientes presentan numerosos tumores a lo largo de su vida, es necesario el desarrollo de tratamientos sistémicos efectivos y seguros que reduzcan el número de cirugías y supongan un nuevo método para tratar esta enfermedad.

Las terapias dirigidas contra el cáncer tienen como objetivo bloquear las vías moleculares específicas de las células tumorales. Debido a que la mayoría de los tumores relacionados con VHL son benignos o tienen una baja tasa de metástasis, la terapia VHL dirigida se enfoca principalmente en inhibir el crecimiento del tumor primario y la angiogénesis.

Además, los tumores VHL son conocidos por su patrón de crecimiento saltatorio con fases de reposo, lo que hace difícil distinguir entre respuesta al tratamiento y comportamiento natural de la enfermedad. Las terapias descritas a continuación, se basan en pequeños reportes de casos y ensayos clínicos que se han realizado en pacientes con tumores en estadios avanzados (carcinoma renal metastásico y hemangioblastomas) sin grupo control, lo que hace necesario el desarrollo de ensayos clínicos grandes que incluyan grupo control. Esto permitirá diferenciar la estabilización terapéutica del comportamiento tumoral natural y estandarizar estos tratamientos.

Los **anticuerpos monoclonales** (Bevacizumab, Ranitizumab y Pegatinib) dirigidos contra VEGF son empleados en inyecciones intravítreas como tratamiento adyuvante de hemangioblastomas retinianos no subsidiarios de tratamiento convencional (fotocoagulación con láser, crioterapia, terapia fotodinámica y vitrectomía de la pars plana). Estos fármacos están relacionados con eventos adversos cardiovasculares, hepatotoxicidad, diarrea y afectación metabólica y hematológica. Los efectos y el perfil de seguridad están menos estudiados en otros tumores relacionados con VHL.

Por otro lado, los **inhibidores de la tirosina quinasa** son fármacos que bloquean la cascada de transducción de señales celulares. Al igual que con los anticuerpos monoclonales, los ensayos clínicos se han centrado principalmente en la vía tumoral de VEGF. Algunos de los que se han empleado en ensayos clínicos para el tratamiento de carcinoma renal de células claras metastásico y hemangioblastomas son Semaxanib, Sunitinib, Pazopanib, Erlotinib, entre otros.<sup>19,20</sup>

Los **modificadores de respuesta biológica** son fármacos que potencian o modulan la respuesta inmunitaria autóloga del huésped a la neoplasia. Algunos ejemplos son: Roquimex, Talidomida, FN- $\alpha$ -2a, Octeótreide/everolimus y Claritromicina.<sup>21,22,23</sup>

Los **inhibidores de HIF-2 $\alpha$** , como el Belzutifan (MK-6482) podrían ofrecer un perfil de seguridad mayor que los fármacos antiangiogénicos. Además, han demostrado actuar sobre los mecanismos fisiopatológicos de la enfermedad con una eficacia significativa tanto en tumores renales asociados al VHL como en hemangioblastomas y tumores neuroendocrinos pancreáticos y con un perfil de seguridad aceptable.<sup>24,25</sup>

Se ha descrito que la **proteína chaperona NQO1** protege a HIF-1 $\alpha$  de su degradación, evitando su ubiquitinización en el citosol. Por ello, actuando en esta interacción de proteínas se podría inactivar HIF-1 $\alpha$ , de tal manera que la inhibición de la expresión de NQO1 puede ser una terapia plausible y novedosa para tratar el cáncer.<sup>13</sup>

#### ◆ ¿Cuáles son las mutaciones más frecuentes?

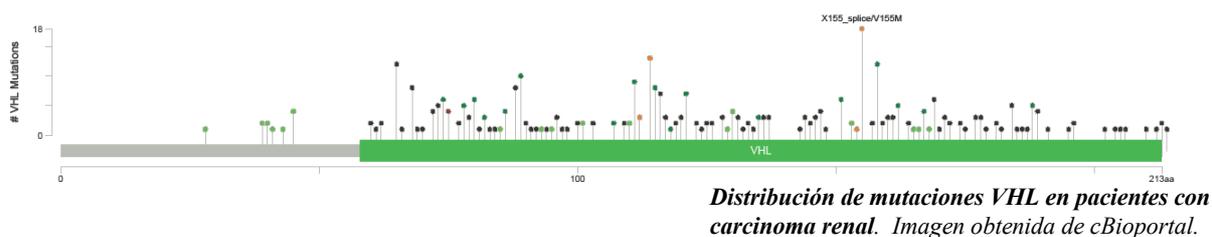
Se han identificado más de 500 mutaciones de línea germinal, es decir, mutaciones en los gametos que se transmitirán a la descendencia. La mayoría se encuentran en los exones 1 (extremo 3' del exón 1) y 3 (extremo 5' del exón 3). En relación con la clasificación clínica, las mutaciones más frecuentes en las familias con VHL tipo 1 (no acompañado de feocromocitoma) se encuentran en el exón 1 y son principalmente mutaciones responsables de proteínas truncadas (deleciones, inserciones, nonsense y frameshift). En cambio, en las familias con VHL tipo 2 (con alto riesgo de producir feocromocitoma), las mutaciones puntuales son las más frecuentes, sobre todo en el exón 3. Dentro de éste, en el subtipo 2A la mutación más común es Y98H (Tyr98His). El subtipo 2B se caracteriza por presentar frecuentemente las mutaciones R167Q (Arg167Gln) y R167W (Arg167Trp). En el subtipo 2C (en el que únicamente aparecen feocromocitomas) encontramos otras mutaciones como L188V (Leu188Val). Las variantes patogénicas más frecuentes son las mutaciones missense (52%), frameshift (13%), nonsense (11%), in-frame deletions/insertions (6%), large/complete deletions (11%), splice site (7%). Se han identificado variantes de nucleótidos aislados en los tres exones.<sup>27</sup>

Las mutaciones somáticas son aquellas que se pueden presentar en cualquier célula del organismo, excepto en las células germinales, por lo que no se transmiten a la descendencia. Para determinar cuáles

son las mutaciones somáticas más frecuentes que se producen en los tumores de personas con VHL, realizamos una búsqueda en la base de datos *cBioPortal* en la que no se recoge información sobre los hemangioblastomas, pero sí sobre el carcinoma renal de células claras. En el diagrama adjunto, aparecen reflejadas las mutaciones más frecuentes en una muestra de 786 pacientes de cinco estudios diferentes. Estas mutaciones, se encuentran fundamentalmente en el dominio beta del gen. La mayoría se corresponden con:

- Mutaciones sin sentido/*Nonsense* (representadas con un punto negro). En ellas, un cambio de la secuencia da lugar a un codón de terminación, en vez de un codón específico de un aminoácido. Esto produce una proteína más corta que probablemente no sea funcional.
- Mutación con cambio de sentido/*Missense mutations* (representada con un punto verde): se produce un cambio en una base del ADN de forma que el triplete codifica para un aminoácido diferente del que debería. Esto puede alterar la función de la proteína codificada.

En menor proporción se encuentran mutaciones sin cambio de marco de lectura (*in-frame mutation*) o mutación de splicing (representada en naranja).



Por otro lado, las mutaciones más comunes de hemangioblastomas son: C162Y (Cys162Tyr), D179N (Asp179Asn), R200W (Arg200Trp) y P81S (Pro81Ser). Estas mutaciones missense afectan a residuos superficiales de pVHL y, por tanto, podrían no interrumpir completamente la función de pVHL.<sup>28</sup>

## Justificación del trabajo

El VHL es una enfermedad poco conocida, incluso por los propios profesionales sanitarios. Esto conlleva a una falta de abordaje multidisciplinar del paciente, tratándose en ocasiones como si tuviera una enfermedad esporádica, cuando hay que tener en cuenta que, si el paciente de VHL tiene un tumor, en un futuro tendrá otros. Antes, los pacientes con VHL tenían una esperanza de vida inferior a los 50 años, mientras que hoy en día, con el desarrollo de protocolos de seguimiento, pueden llegar hasta los 70, aproximándose a la esperanza de vida media del resto de la población.

El mayor problema pronóstico ocurre cuando el paciente es el primer caso dentro de la familia (mutación “de novo”), pues la enfermedad no se sospecha y permanece sin diagnosticar más tiempo. El

25% de los hemangioblastomas se identifican en familias con VHL y el 75% son esporádicos. En  $\frac{3}{4}$  partes de los esporádicos se puede detectar mutación en VHL.

Este estudio pretende realizar un análisis adicional sobre muestras de hemangioblastomas cerebelosos que fueron obtenidas con fines diagnósticos-terapéuticos en el Hospital Universitario de Canarias en los últimos 10 años. Hasta el momento, el servicio de Anatomía Patológica del hospital no ha sido capaz de determinar las mutaciones en el gen VHL. Esto permitiría investigar posibles pacientes con mutaciones “de novo” en línea germinal y ofrecer asesoramiento genético a partir del caso índice. De esta manera, cuando el paciente es el primer caso dentro de una familia, no se tendría que esperar a que tuviera otros tumores para sospechar y diagnosticar este síndrome, mejorando su calidad y esperanza de vida.

## Objetivos

### ◆ Objetivo principal

Aprendizaje de las técnicas para el genotipado de VHL a partir de las muestras histológicas de los pacientes a estudio y relación clínico-genética de las mutaciones encontradas.

### ◆ Objetivos secundarios

- Estudio molecular del gen VHL y de la proteína que codifica.
- Diseño de primers y obtener, cuantificar, amplificar y secuenciar ADN de muestras biológicas de hemangioblastomas cerebelosos.
- Uso de bases de datos científicas (Cbioportal, COSMIC, OncoKB).

## Material y métodos

A continuación, se detalla el protocolo que se ha seguido.

### ◆ Diseño del estudio

Se trata de un estudio experimental de muestras de hemangioblastomas cerebelosos en el Hospital Universitario de Canarias entre los años 2005-2022. Se pretende extraer, purificar y amplificar el material genético de muestras incluidas en parafina, para analizar las mutaciones en los exones 1 y 3 del gen VHL, mediante técnicas de secuenciación. Este proceso lo realizaremos con las muestras de pacientes que previamente han sido diagnosticados con el síndrome de Von Hippel Lindau mediante un estudio genético. También analizaremos muestras de pacientes con hemangioblastomas cerebelosos esporádicos, para descartar la presencia de mutaciones en su genoma. Finalmente, compararemos los resultados obtenidos con bibliografía relevante y las historias clínicas de los pacientes seleccionados.

### ◆ Sujetos del estudio

El método de estudio que seguimos en el trabajo comprende el análisis de muestras biológicas de hemangioblastomas cerebelosos que fueron obtenidas con fines diagnósticos-terapéuticos, y analizadas por parte del servicio de Anatomía Patológica del HUC. También se han estudiado cortes histológicos de muestras de autopsias de cerebelo sano, para realizar estudio comparativo con el hemangioblastoma.

En la búsqueda inicial de pacientes con diagnóstico histológico de hemangioblastoma cerebeloso recogidos en el archivo del servicio resultaron un total de 7 pacientes. De éstos, 3 tenían diagnosticados el síndrome de Von Hippel Lindau mediante estudio genético (dos varones y una mujer), mientras que los otros 4, fueron diagnosticados de hemangioblastomas esporádicos (tres varones y una mujer).

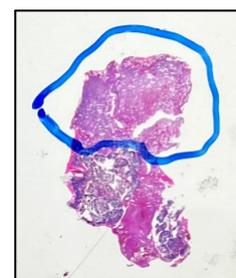
De los tres pacientes diagnosticados de VHL se pudo analizar el material genético de dos de ellos (pacientes 2 y 3, ambos varones), pues la muestra de la otra paciente no estaba guardada en el archivo al ser del año 2012 (las muestras en tejido parafinado se conservan 10 años). De los cuatro pacientes diagnosticados de hemangioblastoma cerebeloso esporádicos, seleccionamos uno (paciente 4) con la mayor cantidad de tejido para la extracción del material genético.

Paciente	Clínica	Tratamiento	Sexo-edad
1	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Hemangioblastomas cerebelosos múltiples (&gt;3)→Hidrocefalia y edema cerebral. (<i>figura 11</i>)</li> <li>- Hemangioblastomas medulares múltiples (6) y en cono medular.</li> <li>- Lesiones quísticas en cola y cuerpo de páncreas y lesión sólido-quística en cabeza.</li> <li>- Lesiones quísticas en ambos riñones</li> </ul>	Exéresis de tumores cerebelosos de mayor tamaño y drenaje ventricular externo.	Mujer (49)
2	- Hemangioblastomas cerebelosos derecho e izquierdo→ataxia, mareos e hidrocefalia obstructiva. ( <i>figura 11</i> )	Exéresis y radiocirugía.	Hombre (49)
	- Carcinoma renal de células claras bilateral	Nefrectomía bilateral y trasplante renal.	
	- Hemangioblastoma medular (C5-C6)→parálisis de hemicuerpo derecho.	Exéresis de lesión intramedular.	

	- Hemangioblastoma retiniano → ceguera.	Exéresis de globo ocular por dolor.	
	- Tumor endolinfático de oído izquierdo→hipoacusia.	Exéresis	
	- Quistes en cuerpo y cola de páncreas.	Seguimiento	
3	- Hemangioblastomas cerebelosos bilaterales derechos→ ataxia, cefalea e hidrocefalia obstructiva.	Exéresis de la lesión	Hombre (57)
	- Quistes renales bilaterales	Seguimiento	
	- Cistoadenoma papilar en epidídimo derecho	Epididimectomía derecha	
	- Lesión quística en cabeza pancreática.	Seguimiento	
4	- Hemangioblastoma cerebeloso derecho→ ataxia, cefalea holocraneal, crisis tónico-clónica, hidrocefalia obstructiva	Exéresis de la lesión	Hombre (43)
5	- Hemangioblastoma cerebeloso derecho → ataxia, dificultad para deglución, dismetría dedo-nariz derecha	Exéresis de la lesión → meningitis bacteriana y hematoma subdural derecho → exitus	Hombre (70 – exitus)
6	- Hemangioblastoma medular cervical→ inestabilidad de la marcha y vértigo	Exéresis parcial de la lesión	Mujer (89)
7	- Hemangioblastoma cerebeloso derecho→ vértigo, inestabilidad y caídas. (figura 10)	Exéresis de la lesión → meningitis postquirúrgica (buena evolución).	Hombre (75)

#### ◆ Desparafinado de las muestras histológicas

Se buscaron en el archivo las muestras seleccionadas, y se eligieron los cortes con mayor cantidad de células tumorales para la extracción del ADN de dichas células. Para la extracción de la mayor cantidad de ADN posible, se delimita la zona que contenga mayor cantidad de células tumorales (área rodeada en la *figura 4*), evitando zonas de necrosis (zona inferior hiper cromática en la *figura 4*).



**Figura 4. Corte histológico. Imagen de obtención propia (HUC)**

Las muestras con las que trabajamos son cortes seriados consecutivos a los portaobjetos teñidas con hematoxilina-eosina, embebidas en parafina. Por lo que para extraer el ADN se llevó a cabo su desparafinado: se hacen dos lavados de 5 minutos en xilol posteriormente, se hacen lavados de 30 segundos en concentraciones decrecientes de etanol (100° -96°- 80°) y finalmente, se lava con agua destilada para rehidratación.



*Procedimiento: Desparafinado e hidratación (14).*

### ◆ Extracción y purificación del ADN

Como el material genético se encuentra dentro de la célula, en primer lugar, se lleva a cabo una **lisis celular** para extraerlo. Para ello, con una punta desechable se recoge el material tumoral y se añade en un Eppendorf, en el que incluiremos las siguientes sustancias:

- **TENS (0.5 mL):** está compuesto por cuatro componentes; 1) Tris (HCl): solución buffer que mantiene el pH de la solución estable, entre 7.5-8.2; 2) EDTA: sustancia quelante de  $Ca^{2+}$  y  $Mg^{2+}$  que funcionan como cofactores de las nucleasas de DNA, por lo que inhiben su función, evitando la degradación del ADN; 3) NaCl: proporciona la salinidad necesaria para la actividad enzimática de la proteinasa K; 4) Sodio dodecilo sulfato (SDS); actúa como detergente, degradando la membrana celular.
- **Proteinasa K (50µL):** degrada proteínas, ayudando a purificar el ADN.

Se agita el contenido de los tubos con el vórtex. Posteriormente, se incuban a 56°C durante toda la noche. Al día siguiente se incuban los tubos a 90°C durante 1 hora para romper los puentes (crosslinking) de grupos amino por el formaldehído. Posteriormente, centrifugamos a máxima velocidad (1300 rpm) durante 1 minuto.

Para llevar a cabo el proceso de **purificación**, añadimos en un nuevo tubo 0.5 mL de fenol-cloroformo al cual añadiremos el sobrenadante del tubo previamente centrifugado y agitamos hasta que ambas fases sean homogéneas.

Posteriormente se centrifuga 5 minutos a máxima velocidad (1300 rpm). Tras este proceso, se diferencian dos fases: una en el fondo que contiene el material orgánico, una acuosa arriba en la que se encuentra el ADN disuelto, y una interfase entre ambas en la que quedan atrapadas proteínas de membrana y las nucleasas liberadas durante la lisis celular. A este proceso se le llama extracción orgánica.

Por último, es necesario **precipitar el ADN**, por lo que recogemos la fase acuosa con una pipeta, con cuidado para no arrastrar la interfase ni la fase orgánica, y la introducimos en un nuevo tubo que contiene 40 µL de acetato sódico 3M. Rellenamos el tubo con etanol al 100%, lo agitamos y lo dejamos

1 hora en el congelador a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Pasado el tiempo, introducimos los tubos en la centrífuga a máxima potencia durante 10-15 minutos. El ADN precipita y se queda como pellet en el fondo. Se desecha el sobrenadante que queda en la parte superior del tubo y se añaden  $400\ \mu\text{L}$  de etanol al 70% para eliminar el exceso de sales. Se centrifuga de nuevo durante 5 minutos y se desecha el etanol. Se mantiene el tubo abierto sobre un papel absorbente para secarlo o se colocan los tubos con tapa abierta en el termobloque a  $56^{\circ}\text{C}$  para acelerar el proceso de evaporación del etanol. Luego, se resuspende el pellet con  $50\ \mu\text{L}$  de TE (10 mM de tris-clorhídrico y 3 mM de EDTA). Por último, se agita el tubo en el vórtex para mezclar todo el contenido y para que el pellet se disuelva en el buffer mencionado.



*Centrífuga*

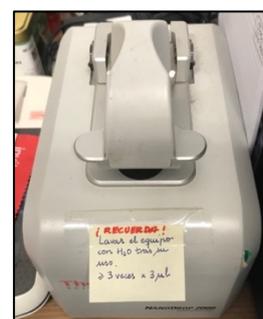
*Termobloque*

*Vórtex*

#### ◆ **Cuantificación del ADN**

A continuación, cuantificamos el ADN obtenido de la extracción con el espectrofotómetro (NanoDrop). En primer lugar, hacemos un blanco con agua para que el NanoDrop haga una comparación con las muestras sabiendo que el agua no tiene ADN. De esta manera, comparando la absorbancia puede determinar cuál es la concentración de ADN de la muestra en  $\text{ng}/\mu\text{L}$  añadiendo  $1\ \mu\text{L}$  de cada muestra.

Este procedimiento lo realizamos con un total de seis muestras de tres pacientes (*pacientes 2, 3 y 4 de la tabla*), recogemos los resultados en el *Anexo 2*.



*Espectrofotómetro*

#### ◆ **Diseño de primers**

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite amplificar pequeños fragmentos de ADN para su posterior análisis molecular. De tal manera que a partir de pequeñas muestras se pueden obtener millones de copias de ADN.

Para llevar a cabo este proceso, se realizó un diseño de primers (o cebadores), una secuencia de oligonucleótidos, que se hibridan a los extremos de la muestra que se quiere amplificar. Como el VHL tiene más de 500 mutaciones descritas, nuestro objetivo es amplificar los exones clave en los que se encuentran la gran mayoría de mutaciones (exones 1 y 3), para secuenciarlos y encontrar las mutaciones específicas de cada paciente. Para este diseño, utilizamos la base de datos del genoma

“Ensembl” y el programa open-source “Primer3Plus”. La primera nos permitió extraer la secuencia de intrones y exones.

El exón 1 es de gran tamaño, y las muestras parafinadas no nos permiten amplificar productos de más de 300 pares de bases, por lo que dividimos el exón en dos realizando el diseño de primers para dos PCR y secuenciaciones. Sin embargo, dado que las mutaciones más comunes en el exón 3 se concentraban en las primeras 200 pb, solo tuvimos que diseñar un conjunto de primers que amplificasen este exón. Una vez diseñados los primers, comprobamos en “PrimerBlast” que fueran específicos para nuestra región de interés y no se uniesen inespecíficamente a otras partes del genoma. Tras el diseño de primers, se envía el archivo a el laboratorio español Condalab que sintetizará los cebadores específicos (forward y reverse). El diseño de primers se adjunta en el *Anexo 3*.

### ♦ Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

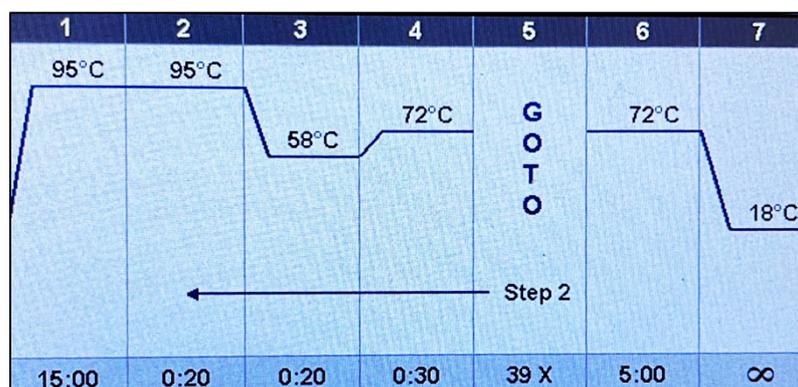
La empresa nos envía los cebadores a una concentración de 100 M pero para la PCR los necesitamos a 25 M. Para preparar dichos primers aplicamos la fórmula:  $C_1 \cdot V_1 = C_f \cdot V_f$ ;  $100 \cdot V_1 = 25 \cdot 25$ ;  $V_1 = 6,25 \mu\text{L}$ . Por tanto, necesitamos  $6,25 \mu\text{L}$  del primer forward,  $6,25 \mu\text{L}$  del reverse y  $12,5 \mu\text{L}$  de TE (tris-clorhídrico y EDTA).

Para realizar la PCR debemos pasar MIX QIAGEN 2x (Taq polimerasa + dNTPs +  $\text{Mg}^{2+}$ ) a 1x, que se prepara con  $188 \mu\text{L}$  Mix 2x +  $157.5 \mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$ . Tras este proceso, se utilizan:  $15 \mu\text{L}$  de Mix 1x,  $0,5 \mu\text{L}$  de primer y  $100 \text{ ng}$  de ADN de la muestra. En caso de que la concentración de ADN de la muestra esté entre  $100$  y  $150 \text{ ng}/\mu\text{L}$ , se añade  $1 \mu\text{L}$  de ADN.

La parte superior de los tubos se sella con cinta adhesiva y se inicia el proceso en un termociclador al que le pusimos el programa 58HOT. Este programa consta de un primer paso a  $95^\circ\text{C}$  durante 15 minutos para la activación de la polimerasa. Luego se repiten 39 ciclos con la siguiente secuencia:  $95^\circ\text{C}$  durante 20 segundos,  $58^\circ\text{C}$  durante 20 segundos y  $72^\circ\text{C}$  durante 30 segundos. Por último,  $72^\circ\text{C}$  durante 5 minutos. Finalmente se produce el enfriamiento a  $18^\circ\text{C}$ .



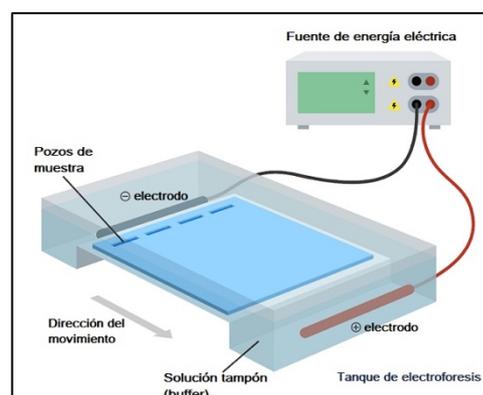
*Termociclador*



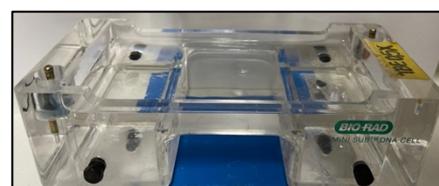
## ◆ Electroforesis

Tras realizar la PCR se comprueba mediante una electroforesis, si la PCR ha funcionado y se ha producido la amplificación del producto deseado. Para ello, preparamos un gel con agarosa al 2%, mezclando 0.8 gramos de agarosa, 40 ml de TBE 0,5x y 20  $\mu$ L de Bromuro de Etidio. Se deja reposar durante 20 minutos hasta su polimerización y se obtiene un gel con diferentes pocillos, en cuyo interior se añaden: en el primero un ADN control y en los siguientes 3 microlitros de los productos “control” y “muestra” de los exones 1.1, 1.2 y 3.

Para comprobar los resultados se introduce el gel en el sistema de imágenes compacto y automatizado “Gel Doc EZ Imager” de BioRad y gracias al programa “Image Lab” se obtiene una imagen en negativo, donde se observó una buena amplificación de nuestro producto de PCR por lo que continuamos con la secuenciación.



*Cubeta para la electroforesis*



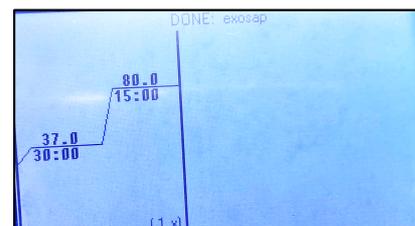
*Técnica de electroforesis*

## ◆ Secuenciación de Sanger

La secuenciación de ADN es el proceso que determina el orden preciso de bases nitrogenadas (adenina, timina, citosina y guanina) de un fragmento de ADN. La secuenciación de Sanger permite secuenciar regiones de ADN de hasta 900 pares de bases.

### ▪ Limpieza del producto

Se utilizan 0.5  $\mu$ l de Exonucleasa I + 1  $\mu$ l de SAP por muestra + 1.5  $\mu$ l de producto PCR del exón 1.1 (porque era el peor amplificado). En los exones 1.2 y 3 se utiliza 0,75  $\mu$ l de producto. A continuación, estas muestras se ponen en el termociclador con el programa llamado “exosap” en el que están 30 minutos a 37°C y 15 minutos a 80°C.



*Secuencia del termociclador*

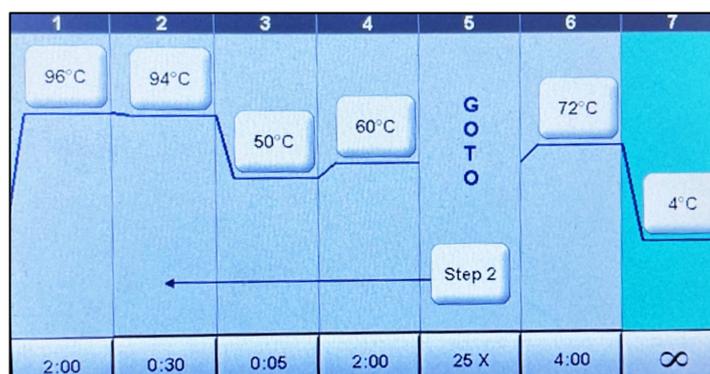
### ▪ Reacción de secuenciación

En primer lugar, la muestra de ADN que se secuenciará se combina en un tubo con el cebador, la ADN polimerasa y los nucleótidos del ADN (dATP, dTTP, dGTP y dCTP). También se añaden los cuatro nucleótidos didesoxi terminadores de la cadena, marcados con pigmento (B.D.TV.3.1).

Para esta reacción debemos tener la luz apagada (ya que el B.D.TV.3.1 es un producto fluorescente) y emplearemos por cada muestra 3  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O, 2  $\mu$ l Buffer y 1  $\mu$ l de B.D.TV.3.1.

A continuación, añadimos 6 µl de este mix y 1 µl del primer Forward o Reverse (5 µM) al producto de PCR tras la limpieza. Primero se calentará la mezcla para desnaturalizar el molde de ADN (separar las cadenas), luego se enfría para que el cebador pueda unirse al molde de cadena sencilla y se vuelve a elevar la temperatura para que la ADN polimerasa pueda añadir nucleótidos hasta que aleatoriamente agregue un nucleótido didesoxi en lugar de uno normal terminando la cadena. Para llevar a cabo este proceso se introducen las muestras en el termociclador con un programa llamado “rx seq” en el cual están a 96°C 2 minutos. Luego se repiten 25 ciclos con la siguiente secuencia: 94°C durante 30 segundos, 50°C durante 5 segundos y 60°C durante 2 minutos. Por último, 72°C durante 4 minutos. Finalmente se produce el enfriamiento a 4°C y se conserva en la nevera hasta comenzar con el siguiente paso.

Al finalizar, cada tubo contendrá fragmentos de diferentes longitudes que terminan respectivamente en cada una de las posiciones de los nucleótidos del ADN original. Los extremos de los fragmentos tendrán el pigmento que indica su nucleótido final<sup>26</sup>.



*Secuencia del termociclador*

#### ▪ **Precipitación del ADN**

En esta fase se añaden a cada muestra 3, 5 µl de H<sub>2</sub>O estéril, 2.5 µl de EDTA (125mM) y 30 µl de alcohol (EtOH) al 100%. Luego, se invierten los tubos 4 veces y se pone en el vórtex. A continuación, se deja reposar 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Luego se centrifuga 30 minutos a 3000g y se decanta (con pipeta se quita el sobrenadante). Se lava con 30 µl de EtOH 70% y se centrifuga 15 minutos a 3000 g. Se decanta otra vez y se deja secar 10 minutos en estufa a 37°C. Luego se añade 10 µl de formamida. Finalmente se deja resuspendiendo un par de horas.

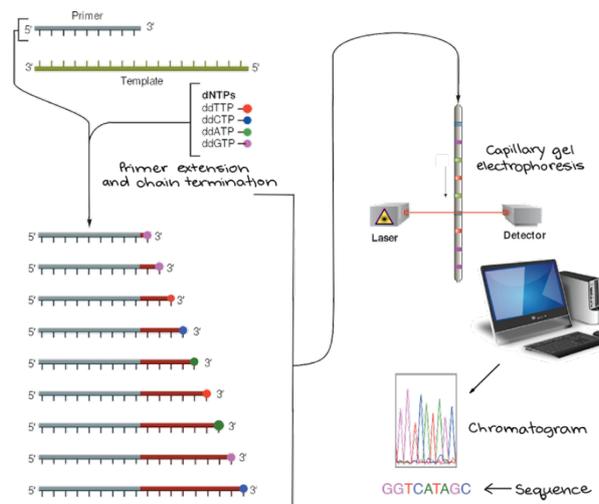
#### ▪ **Secuenciación final**

Las muestras se introducen en el Secuenciador Genetic Analyzer durante una hora y media en el que se realiza una electroforesis capilar en gel. Un láser ilumina cada fragmento de ADN y un detector registra la intensidad de la fluorescencia, desde el fragmento más pequeño (termina un nucleótido tras el cebador) hasta el mayor, reconstruyendo nucleótido a



*Secuenciador Genetic Analyzer 3130xl*

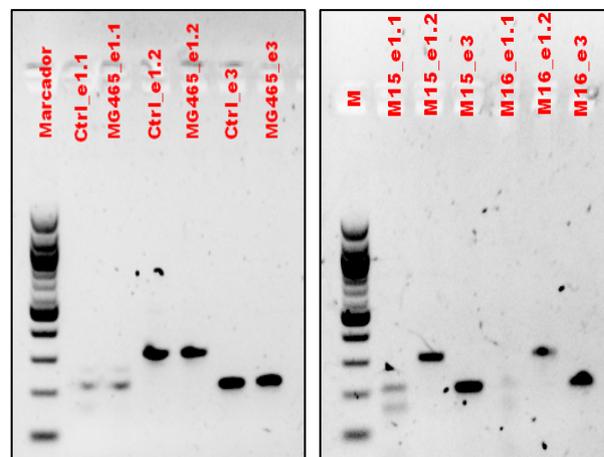
nucleótido la secuencia de ADN original. Esta secuencia se lee a partir de los picos en el cromatograma.<sup>26</sup>



*Imagen modificada de Secuenciador de Sanger (26) de Estevezj*

## Resultados

En primer lugar, se comentan los resultados obtenidos de la electroforesis. El paciente 2 se corresponde con los resultados de MG465 (exones 1.1, 1.2 y 3), el paciente 3 es M16 y el paciente 4 es M15 (hemangioblastoma esporádico). Se adjuntan los resultados de los pacientes a estudio en la *figura 5*.



*Figura 5. Resultados de electroforesis*

Tal y como se observa en las imágenes, los exones 1.2 y 3 amplificaron correctamente. Sin embargo, el exón 1.1 de los tres pacientes a estudio muestra una amplificación insuficiente, razón por la que no continuamos con el análisis de este.

Tras realizar la secuenciación y comparar la secuencia obtenida con la de referencia, encontramos una serie de mutaciones somáticas que describimos a continuación. Es necesario recordar que, al trabajar con tejidos tumorales, no podemos determinar si el paciente tiene una mutación de línea germinal pues

para ello deberíamos analizar muestras de tejidos sanos (por ejemplo: saliva o sangre) de las que no disponemos. Las mutaciones que hallamos en las muestras son:

- En el paciente 2 se evidenció una mutación puntual en el codón 78 del exón 1, con nomenclatura de proteína **p.N78S** (p.Asn78Ser) y con nomenclatura de ADN c.233 A>G (cambio de Adenina por Guanina en la posición 233 lo que provoca el cambio de aminoácido Asparagina por Serina), (figura 6). Por otro lado, en este paciente hemos encontrado una mutación de tipo inserción de una Timina en la posición 272 (**c.272-273insT**), (figura 7). Sabemos que ambas mutaciones son ciertas porque las leímos tanto en forward como en reverso.

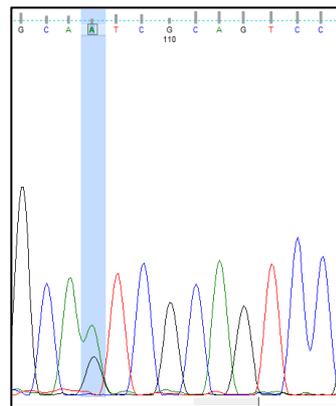


Figura 6. c.233 A>G (p.N78S)

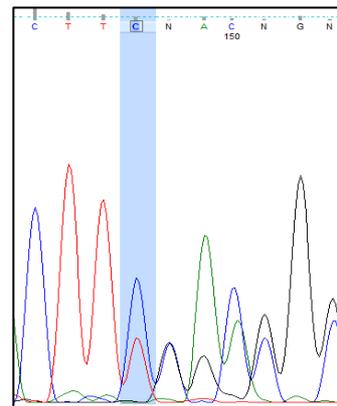


Figura 7. c.271-273insT

- En el paciente 3 se encontró una mutación puntual en el codón 65 del exón 1, con nomenclatura de proteína **p.S65W** (p.Ser65Trp) y con nomenclatura de ADN c.194C>G (cambio de Citosina por Guanina en la posición 194 que provoca el cambio de aminoácido Serina por Triptófano). La mutación encontrada la leímos tanto en forward como en reverso (figura 8).

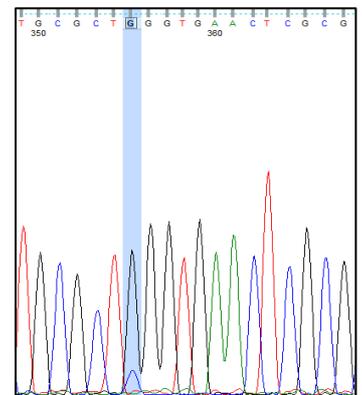


Figura 8. c.194 C>G (p.S65W)

- En el paciente 4 se encontró una mutación puntual en el codón 158 del exón 3, con nomenclatura de la proteína **p.L158V** (p.Leu158Val) y con nomenclatura de ADN c.472 C>G (cambio de Citosina por Guanina en la posición 472 lo que provoca un cambio de aminoácido Leucina por Valina) (figura 9). En el codón 34 del exón 1 encontramos una mutación puntual G34C, con nomenclatura de ADN c.100 G>C. Al realizar la revisión encontramos que solo está descrita en una ocasión en adenocarcinoma de pulmón, además solo la leemos en reverso por lo que descartamos que sea cierta. Encontramos cambios C>T en las posiciones 118 y 133 solo en forward, que se ha descrito en muestras

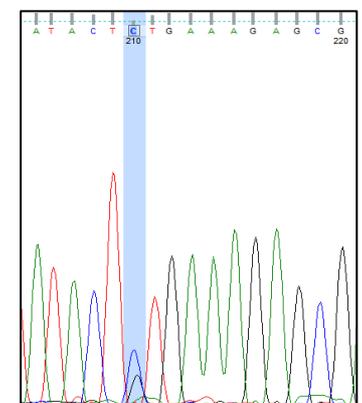


Figura 9. c.472 C>G (p.L158V)

antiguas que han sido preservadas en parafina, como es nuestro caso. En el codón 213 del exón 3 destaca un cambio de base c.637 G>A (D213N), que solo encontramos en forward y además no está descrita en las bases de datos mencionadas.

Mutación	Paciente 2	Paciente 3	Paciente 4
Exón 1	c.233 A>G – p.N78S (17) c.272-273 insT (0)	c.194C>G – p.S65W (7)	-
Exón 3	-	-	c.472 C>G – p.L158V (28)

*Nota aclaratoria:* entre paréntesis incluimos el número de coincidencias de la mutación descritas en COSMIC.

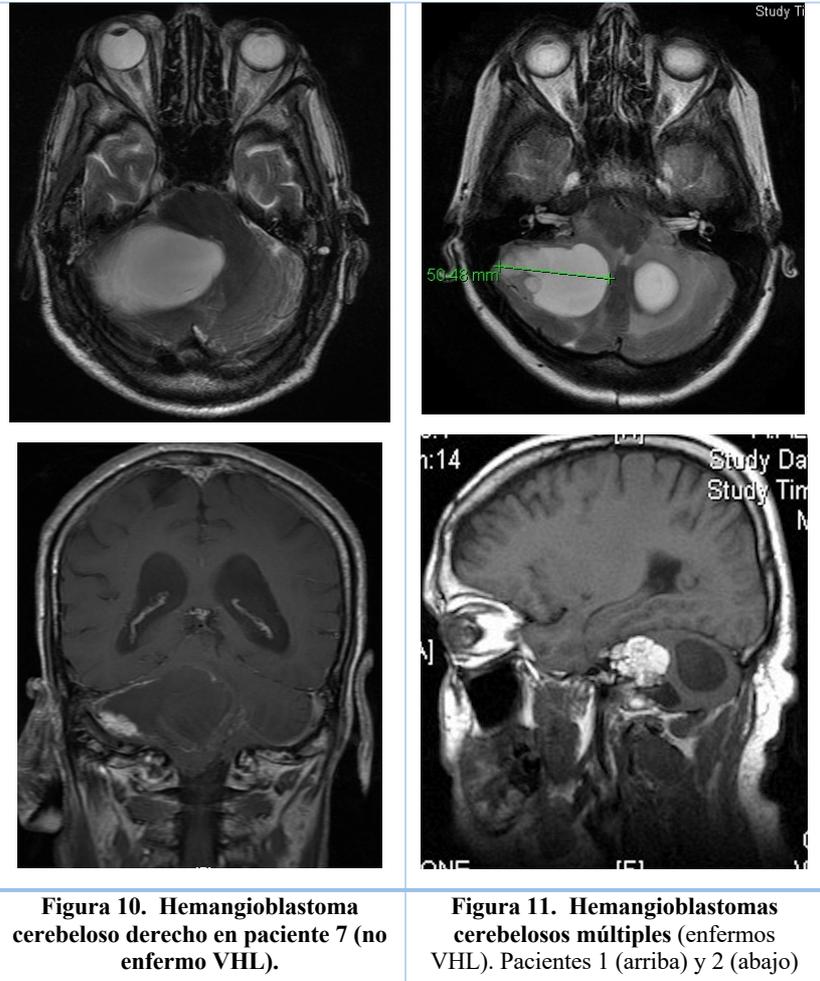
## Discusión

Teniendo en cuenta la clínica que presentan los pacientes con hemangioblastomas cerebelosos, destacamos ataxia y vértigo tanto en pacientes con VHL como con hemangioblastomas esporádicos.

La diferencia entre ambos grupos es la edad de aparición. En pacientes diagnosticados de VHL mediante estudios genéticos, la edad de aparición de los hemangioblastomas fue: 34 años, 23 años, 51 años, sin embargo, en pacientes con hemangioblastomas esporádicos se les diagnosticó a la edad de 70, 71, 81 y 36. Además, los tres pacientes con VHL tienen hemangioblastomas cerebelosos múltiples lo que les ha llevado a padecer hidrocefalia obstructiva frente a la lesión única de los esporádicos.

Debido a esto, se han sometido a múltiples cirugías para el drenaje de los quistes y exéresis de las lesiones, a diferencia de los esporádicos cuyo tratamiento es curativo si la resección quirúrgica se hace completa.

Asimismo, los pacientes con Von Hippel-Lindau tienen otros tumores asociados como hemangioblastomas retinianos, lesiones quísticas pancreáticas y renales (con posibilidad de malignización), tumores en saco endolinfático y tumores en epidídimo con sus correspondientes consecuencias (comentado en apartado de *Clínica*). Todo lo comentado anteriormente conduce a una mayor morbimortalidad y dependencia en pacientes jóvenes además de un claro empeoramiento en su calidad de vida. Para comparar las diferencias entre ambos grupos de pacientes, en las *figuras 10 y 11* se adjuntan imágenes de resonancia magnética de hemangioblastomas cerebelosos.



**Figura 10. Hemangioblastoma cerebeloso derecho en paciente 7 (no enfermo VHL).**

**Figura 11. Hemangioblastomas cerebelosos múltiples (enfermos VHL). Pacientes 1 (arriba) y 2 (abajo)**

Enfocándonos en los pacientes con hemangioblastomas cerebelosos y enfermedad de Von Hippel-Lindau (n=3), se incluyen dentro del VHL tipo 1 según sus manifestaciones clínicas, al no presentar ninguno de ellos feocromocitoma (tipo 2). En este grupo son más frecuentes las mutaciones en el exón 1 de tipo nonsense y missense. En nuestro caso, las mutaciones del gen VHL en la primera paciente no pudieron ser estudiadas al haberse desechado sus muestras. En cambio, pudimos estudiar las muestras de los otros dos pacientes con VHL (paciente 2 y 3) y de un paciente con hemangioblastoma esporádico (paciente 4). Todas las mutaciones, las hallamos en los exones 1 y 3.

En el paciente número 2 descubrimos dos mutaciones. En primer lugar, una mutación puntual en el exón 1 (p.N78S) que tras realizar una revisión en la base de datos COSMIC<sup>29</sup> y UMD<sup>30</sup>, se determina que es una variante patogénica (score 0.98). De los 17 casos reportados en COSMIC, 14 son carcinoma renal de células, 2 hemangioblastomas y uno en páncreas. Además, el codón Asn78 es considerado un “hotspot” de mutaciones en el gen<sup>31</sup>. Se realizó una búsqueda en PubMed, y encontramos un estudio en el que se recoge esta mutación como frecuente en línea germinal. Sin embargo, no podemos asegurar que ésta sea la mutación de línea germinal del paciente pues para ello es necesario analizar células sanas, de las que no disponemos. El codón 78 se localiza en el dominio  $\beta$  de la proteína VHL, por lo que esta mutación impide la unión entre la proteína VHL (pVHL) y HIF, dando lugar a un exceso de

transcripción de genes diana.<sup>32</sup> Asimismo en este paciente encontramos una segunda mutación (c.272-273insT) de tipo inserción de una timina en la posición 272-273 no descrita previamente en las bases de datos consultadas (COSMIC, ClinVar). Sin embargo, sí están descritas inserciones de Timina en otras posiciones del gen (c.245-246insT, c.257-258insT).

Por último, en el paciente 3 encontramos una mutación puntual en el exón 1 (p.S65W) que tras realizar una revisión en COSMIC, se determina que es una variante patogénica (score 0.99). Todos los casos reportados, fueron hallados en carcinoma renal de células claras. Además, disponemos del estudio del ADN genómico obtenido de sangre periférica del paciente y mediante secuenciación, en el que se confirma la presencia en heterocigosis de la variante c.194C>G; (p.S65W), determinando que es la mutación de línea germinal. La variante p.S65W es una sustitución del aminoácido Serina por el Triptófano en el codón 65. La serina se localiza en la región de unión (loop L1) de la proteína VHL (pVHL), que es la zona N-terminal mediante la que se une a HIF-1 $\alpha$ . Esta posición está frecuentemente mutada en VHL (S65C, S65P, S65L y S65W), confiriéndole a pVHL una pérdida de su habilidad para unirse a HIF-1 $\alpha$  impidiendo su ubiquitinación y posterior degradación, a pesar de que el complejo VCB-CR sea totalmente funcional.<sup>33</sup>

Por otro lado, dentro del grupo de pacientes con hemangioblastomas esporádicos (n=4), solo secuenciamos las muestras del paciente 4, para comparar los hallazgos. Se trata de una mutación puntual en el exón 3 (p.L158V) que está descrita en las bases de datos UMD y COSMIC como una variante patogénica (score 0.84). Se han reportado 28 casos, de los cuáles 25 se han hallado en carcinoma renal de células claras y 3 en tejido blando (hemangioblastoma). Se produce un cambio puntual del aminoácido Leucina por Valina en el codón 158, lo que afecta a la estructura del dominio  $\alpha$  de pVHL.<sup>34</sup> Debemos tener en cuenta, que este paciente tuvo un hemangioblastoma a una edad temprana (36 años) en comparación con el resto de los pacientes con hemangioblastomas esporádicos que recogemos en este trabajo. Además, la mutación que encontramos (p.L158V) se ha descrito también en línea germinal, por lo que sería recomendable realizar un estudio genético en sangre periférica para descartar que el paciente tenga una mutación “de novo” y sea el primer caso de la enfermedad VHL en su familia.

Dado que la electroforesis mostró una mala calidad de amplificación del exón 1.1, no lo pudimos secuenciar y, por tanto, detectar mutaciones en esta zona. Esto pudo deberse, a un inadecuado diseño de los primers o a que las muestras histológicas presentaban cierta degradación al encontrarse preservadas en parafina durante varios años.

Finalmente, podemos concluir que el hecho de hallar una o varias mutaciones en el gen VHL de hemangioblastomas cerebelosos, no implica que la persona tenga la enfermedad. Para el diagnóstico,

es necesario la presencia de tumores característicos (clínica) y mutaciones detectadas en línea germinal (células sanas). Actualmente, el estudio genético de éstas se ofrece a pacientes que tienen varios tumores característicos del Von Hippel-Lindau. Determinar mutaciones en el gen VHL de las células tumorales sería útil en pacientes jóvenes que tienen un hemangioblastoma cerebeloso sin historia familiar conocida, ya que se les podría recomendar un estudio genético para detectar mutaciones “de novo” de línea germinal. Al identificarlos como casos índices se les podrá realizar un seguimiento clínico-radiológico antes de que desarrollen otros tumores, además de un asesoramiento genético a su descendencia. Es necesario realizar estudios con mayor número de muestras para poder estandarizar este procedimiento como una herramienta diagnóstica.

## **Conclusiones**

El objetivo principal de este trabajo se ha cumplido ya que hemos sido capaces de identificar 4 mutaciones en el gen VHL de las muestras de nuestros pacientes, 3 de las cuales estaban descritas previamente en la bibliografía consultada. En cuanto a la relación clínico-genética, los pacientes con VHL se incluyen en el tipo 1 (al no tener ninguno de ellos feocromocitomas). A pesar de que todos formen parte del mismo grupo, hay gran variabilidad fenotípica entre ellos, es decir, desarrollan diferentes tumores. No hay diferencias entre la clínica que presenta un paciente con hemangioblastoma en el contexto de la enfermedad VHL y los que lo desarrollan de forma esporádica, aunque hay mayor recurrencia y peor evolución en los primeros.

En cuanto a los objetivos secundarios, que son eminentemente prácticos, también logramos realizarlos. Fuimos capaces de estudiar la estructura molecular del gen y proteína a la que codifica, realizar el diseño de primers, y, obtener, amplificar y secuenciar el material genético de las muestras histológicas de hemangioblastomas cerebelosos de los pacientes a estudio. Para la comprensión de nuestros hallazgos nos apoyamos en bases de datos científicas como: CBioportal, COSMIC, OncoKB y ClinVar.

## **¿Qué he aprendido durante este TFG?**

Este TFG ha supuesto un gran aprendizaje. Hemos cambiado el enfoque clínico en el que nos hemos centrados los últimos tres años de carrera por una vuelta al estudio de las bases moleculares de una enfermedad, un área compleja y desconocida para nosotras. Para elaborar el trabajo comenzamos desde cero, recordando y trabajando conceptos tan básicos como ¿qué es un gen?, ¿cómo lo localizamos en un genoma?, ¿qué proteínas codifica?, ¿tiene estas implicaciones terapéuticas?, ¿puedo correlacionar la mutación que encuentro con la clínica que muestra el paciente? Y de esta manera, de preguntas simples a cada vez más complejas, fuimos dando forma a lo que ahora es nuestro Trabajo de Fin de Grado.

Desde el desconocimiento casi absoluto en el sector de la investigación, pasamos a adquirir nociones, que nos ayudaron a comprender cómo una mutación desencadena toda una serie de procesos que, finalmente, dan lugar a la expresión clínica de la enfermedad que tiene el paciente. También hemos aprendido a utilizar y comprender bases de datos de genómica, muy empleadas en el área de investigación, que nosotras desconocíamos previamente (CBioPortal, COSMIC, OncoKB...).

Todo esto nos ha permitido, no sólo conocer más sobre la investigación de distintas mutaciones y enfermedades, sino adquirir gran interés por el campo de la investigación del que nos gustaría formar parte en nuestro futuro profesional.

A pesar de la frustración, errores y repetición en cada paso que dábamos, hemos crecido como personas y profesionales, demostrándonos a nosotras mismas que con estudio, esfuerzo y dedicación, se puede mejorar, y mucho.

## Bibliografía

1. International Agency for Research on Cancer. WHO classification of tumours of the central nervous system: Who classification of tumours. 5a ed. Who Classification of Tumours Editorial Board, editor. IARC; 2022.
2. Findeis-Hosey JJ, McMahon KQ, Findeis SK. Von Hippel-Lindau Disease. *J Pediatr Genet*. 2016 Jun;5(2):116-23. doi: 10.1055/s-0036-1579757. Epub 2016 Apr 4. PMID: 27617152; PMCID: PMC4918695.
3. Nuñez-Martínez, Paulina M. et al. Eritrocitosis familiar 2 y enfermedad de von Hippel Lindau en el mismo paciente. *Bol. Med. Hosp. Infant. Mex.* [online]. 2021, vol.78, n.4, pp.341-345. Epub 23-Ago-2021. ISSN 1665 1146. <https://doi.org/10.24875/bmhim.20000129>.
4. Martínez, S. Villar, K. Alianza española de familias de von Hippel-Lindau. [citado el 2 de enero de 2022]. Disponible en: <https://alianzavhl.org/>.
5. Rebollar González S, Ascaso Matamala Á, Santamaría González M, Puente Lanzarote JJ, Garagorri Otero JM, Bueno Lozano G. Feocromocitoma asociado a enfermedad von Hippel-Lindau. *Rev lab clín* [Internet]. 2016 [citado el 31 de enero de 2022];9(1):21-4. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-revista-del-laboratorio-clinico-282-articulo-feocromocitoma-asociado-enfermedad-von-hippelin-lindau-S1888400816000040>.
6. Salinas Vert I, Oriola Ambros J. La enfermedad de Von Hippel-Lindau. *Endocrinol Nutr* [Internet]. 1999 [citado el 26 de mayo de 2022];46(2):68. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-endocrinologia-nutricion-12-articulo-la-enfermedad-von-hippel-lindau-8573>
7. Virginia Albiñana Díaz Luisa M. Botella Cubells Ángel M. Cuesta Martínez. Enfermedad de Von Hippel Lindau Guía básica para profesionales de la salud [Internet]. 2020 ene. Disponible en: <https://www.alianzavhl.org/archivos/guia-vhl-medicos.pdf>.
8. Villalobos León Kennette. Hemangioblastoma cereberoloso en el síndrome de von Hippel-Lindau, como causa de muerte: Reporte de un caso. *Med. leg. Costa Rica* [Internet]. 2015 Dec [cited 2022 Mar 24]; 32(2): 152-159. Available from: [http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1409-00152015000200017&lng=en](http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1409-00152015000200017&lng=en).
9. Arie Perry, Daniel J. Brat. *Practical Surgical Neuropathology: A diagnostic Approach*, 2<sup>nd</sup> Edition. UK: Elsevier; 2017.

10. GeneCards Human Gene Database. VHL gene - GeneCards [Internet]. Genecards.org. [citado el 1 de junio de 2022]. Disponible en: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=VHL&keywords=vhl>
11. Gene: VHL (ENSG00000134086) - Summary - Homo\_sapiens – Ensembl genome browser 106 [Internet]. Ensembl.org. [citado el 1 de junio de 2022]. Disponible en: [https://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000134086;r=3:10141778-10153667](https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000134086;r=3:10141778-10153667)
12. Gossage L, Eisen T, Maher ER. VHL, the story of a tumour suppressor gene. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2015 [citado el 1 de junio de 2022];15(1):55–64. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/nrc3844>
13. Salido E, Timson DJ, Betancor-Fernández I, et al. Targeting HIF-1 $\alpha$  Function in Cancer through the Chaperone Action of NQO1: Implications of Genetic Diversity of NQO1. *J Pers Med*. 2022;12(5):747. Published 2022 May 5. doi:10.3390/jpm12050747
14. Megías M, Molist P, Pombal MÁ. Técnicas Histológicas. 5. Tinción. Generales. Atlas de Histología Vegetal y Animal [Internet]. Uvigo.es. [citado el 2 de junio de 2022]. Disponible en: <https://mmegias.webs.uvigo.es/6-tecnicas/5-general.php>
15. Reddy MM. Nobel prize in physiology or medicine 2019. Reson [Internet]. 2019 [citado el 5 de junio de 2022];24(12):1375–80. Disponible en: <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2019/press-release/>
16. Arvelo F, Cotte C. Hipoxia en la malignidad del cáncer. Revisión [Hypoxia in cancer malignity. Review]. *Invest Clin*. 2009 Dec;50(4):529-46. Spanish. PMID: 20306726.
17. Semenza, G. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 3, 721–732 (2003). <https://doi.org/10.1038/nrc1187>
18. Schito L, Semenza GL. Hypoxia-Inducible Factors: Master Regulators of Cancer Progression. *Trends Cancer*. 2016 Dec;2(12):758-770. doi: 10.1016/j.trecan.2016.10.016. Epub 2016 Nov 16. PMID: 28741521.
19. Jennens RR, Rosenthal MA, Lindeman GJ, Michael M. Complete radiological and metabolic response of metastatic renal cell carcinoma to SU5416 (semaxanib) in a patient with probable von Hippel-Lindau syndrome. *Urol Oncol*. 2004 May-Jun;22(3):193-6. doi: 10.1016/j.urolonc.2004.01.011. PMID: 15271314.
20. Rogers LR, LoRusso P, Nadler P, Malik G, Shields A, Kaelin W. Erlotinib therapy for central nervous system hemangioblastomatosis associated with von Hippel-Lindau disease: a case report. *J Neurooncol*. 2011;101(2):307-310. doi:10.1007/s11060-010-0244-3
21. Tan DS, Evanson J, Plowman PN, Chew SL. Post-radiation inflammatory reaction controlled with thalidomide and rofecoxib. *Clin Oncol*. 2004;16(8):585–586. doi: 10.1016/j.clon.2004.09.005
22. Sardi I, Sanzo M, Giordano F, et al. Monotherapy with thalidomide for treatment of spinal cord hemangioblastomas in a patient with von Hippel-Lindau disease. *Pediatr Blood Cancer*. 2009;53(3):464–467. doi: 10.1002/pbc.22065
23. Ma X, Jing Y, Liu Y, Yu L. Effect of clarithromycin in von Hippel-Lindau syndrome: a case report. *J Int Med Res*. 2019;47(2):973–981. doi: 10.1177/0300060518792368
24. Jonasch E, Donskov F, Iliopoulos O, Rathmell WK, Narayan VK, Maughan BL, et al. Belzutifan for renal cell carcinoma in von Hippel-Lindau disease. *N Engl J Med* [Internet]. 2021;385(22):2036–46. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa2103425>

25. Hasanov E, Jonasch E. MK-6482 as a potential treatment for von Hippel-Lindau disease-associated clear cell renal cell carcinoma. *Expert Opin Investig Drugs* [Internet]. 2021;30(5):495–504. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1080/13543784.2021.1925248>
26. Secuenciación del ADN [Internet]. Khan Academy. [citado el 7 de junio de 2022]. Disponible en: <https://es.khanacademy.org/science/ap-biology/gene-expression-and-regulation/biotechnology/a/dna-sequencing>
27. Van Leeuwaarde RS, Ahmad S, Links TP, Giles RH. Von Hippel-Lindau Syndrome. En: *GeneReviews®* [Internet]. University of Washington, Seattle; 2018.
28. Emma R. Woodward, Kerry Wall, Joan Forsyth, Fiona Macdonald, Eamonn R. Maher, *VHL* mutation analysis in patients with isolated central nervous system haemangioblastoma, *Brain*, Volume 130, Issue 3, March 2007, Pages 836–842, <https://doi.org/10.1093/brain/awl362>
29. Forbes SA, Beare D, Boutselakis H, Bamford S, Bindal N, Tate J, et al. COSMIC: somatic cancer genetics at high-resolution. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2017 [citado el 7 de junio de 2022];45(D1):D777–83. Disponible en: <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/analysis?ln=VHL>
30. VHL mutations database-UMD [Internet]. [citado el 8 de junio de 2022]. Disponible en: <http://www.umd.be/VHL/>.
31. Razafinjatovo C, Bihl S, Mischo A, Vogl U, Schmidinger M, Moch H, et al. Characterization of VHL missense mutations in sporadic clear cell renal cell carcinoma: hotspots, affected binding domains, functional impact on pVHL and therapeutic relevance. *BMC Cancer* [Internet]. 2016;16(1):638. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1186/s12885-016-2688-0>
32. Qi X-P, Liu W-T, Li J-Y, Dai Y, Ma J-M, Zhao Y, et al. p.N78S and p.R161Q germline mutations of the VHL gene are present in von Hippel-Lindau syndrome in two pedigrees. *Mol Med Rep* [Internet]. 2013;8(3):799–805. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3892/mmr.2013.1578>
33. Miller F, Kentsis A, Osman R, Pan Z-Q. Inactivation of VHL by tumorigenic mutations that disrupt dynamic coupling of the pVHL.hypoxia-inducible transcription factor-1alpha complex. *J Biol Chem* [Internet]. 2005;280(9):7985–96. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M413160200>
34. Gergics P, Patocs A, Toth M, Igaz P, Szucs N, Liko I, et al. Germline VHL gene mutations in Hungarian families with von Hippel-Lindau disease and patients with apparently sporadic unilateral pheochromocytomas. *Eur J Endocrinol* [Internet]. 2009;161(3):495–502. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1530/EJE-09-0399>

## Anexos

### ◆ Anexo 1: Protocolo internacional de seguimiento de pacientes afectados de VHL

Seguimiento del paciente VHL (periodicidad anual si no se indica otra)		0 años	1-4 años	5-15 años	≥16 años
<b>Atención Primaria: exploración física completa, con especial atención a estos signos</b>	Neurológicos	Cualquiera	Cualquiera	Cualquiera	Cualquiera
	Oftalmológicos	Nistagmo, estrabismo, leucocoria, cualquier otra alteración	Nistagmo, estrabismo, leucocoria, cualquier otra alteración	Nistagmo, estrabismo, leucocoria, cualquier otra alteración	Nistagmo, estrabismo, leucocoria, cualquier otra alteración
	Endocrinológicos		Alteraciones en la tensión arterial	Tensión arterial en decúbito y bipedestación	Tensión arterial en decúbito y bipedestación
<b>Pruebas complementarias y Atención Especializada</b>	<b>Laboratorio</b>			Metanefrinas libres en plasma. En su defecto, metanefrinas y catecolaminas en orina de 24 h.	Metanefrinas libres en plasma. En su defecto, metanefrinas y catecolaminas en orina de 24 h.
	<b>Radiología</b>			≥ 8 años: ecografía abdominal. Antes, si hay indicación	Ecografía abdominal
	<b>Oftalmología</b>		Oftalmoscopia indirecta con pupilas dilatadas	Oftalmoscopia indirecta con pupilas dilatadas	Oftalmoscopia indirecta con pupilas dilatadas
	<b>Otorrino</b>	Pruebas auditivas en recién nacido		Cada 2-3 años, con audiometría. Anualmente si hay pérdida auditiva, tinnitus o vértigo. RMN de conducto auditivo interno (con contraste), con cortes finos en caso de otitis de repetición (para descartar ELST)	Cada 2 años, con audiometría. Anualmente si hay pérdida auditiva, tinnitus o vértigo. El ORL determinará la frecuencia de RMN (siempre con cortes muy finos)
	<b>Neurología/ Neurocirugía</b>			Valoración clínica. Desde los 8-10 años y cada 2 años, RMN con contraste de SNC (encéfalo y médula espinal)	Cada 2 años RMN con contraste, de SNC (encéfalo y médula espinal), con cortes finos a nivel de fosa posterior y hueso petroso (posible ELST)

### ◆ Anexo 2: Cuantificación del ADN

Paciente	DNA (ng/μL)
2	a: 215 b: 245,1 c: 326 d: 359,9
3	295,6
4	255,4

**NOTA:** del paciente número 2, finalmente seleccionamos la muestra c (326 ng/ μL) al contener gran cantidad de ADN.

### ◆ Anexo 3: Diseño de primers

#### VHL exón 1.1 y 1.2

ggaggtcgactcgggagcggcaacGCAGCTCCGCCCGCGTCCGACCCGCGGATCCCGCGGCGTCCGGCCCGGGTGGTC  
TGGATCGCGGAGGGAATGCCCCGGAGGGCGGAGAAGTGGGACGAGGCCGAGGTAGGCGCGGAGGAGGCA  
GGCGTCGAAGAGTACGGCCCTGAAGAAGACGGCGGGGAGGAGTCCGGGCGCCGAGGAGTCCGGCCCGGAA  
GAGTCCGGCCCGGAGGAACTGGGGCGCCGAGGAGGAGATGGAGGCGGGCGGCCGCGGCCCGTGTGCTGCGCT  
CGGTGAAGTCCGCGGAGCCCTCCAGGTCATCTTCTGCAATCGCAGTCCGCGCGTCTGTGCTGCCCGTATGG  
CTCAACTTCGACGGCGAGCCGACGCCCTACCCAACGCTGCCGCTGGCACGGGCCCGCCGATCCACAGCTA  
CCGAGgtacgggcccggcgcttaggcccagccagcaggagcagtagcagcggctcgaagcccc

• **Exón 1.1 (253pb)**

**F1:** GGAGGTCGACTCGGGAGC  
**R1:** TCCATCTCCTCCTCGGCGCC

**Primer pair 1**

	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GGAGGTCGACTCGGGAGC	18	61.52	72.22	6.00	2.00
Reverse primer	CTCCTCCTCGGCGCCAGTT	20	66.52	70.00	8.00	4.00

**Products on target templates**

>[NC\\_000003.12](#) Homo sapiens chromosome 3, GRCh38.p13 Primary Assembly

product length = 253

Features associated with this product:

[von hippel-lindau disease tumor suppressor isoform 1](#)

[von hippel-lindau disease tumor suppressor isoform 2](#)

Forward primer	1	GGAGGTCGACTCGGGAGC	18			
Template	10141754	.....	10141771			
Reverse primer	1	CTCCTCCTCGGCGCCAGTT	20			
Template	10142006	.....	10141987			

• **Exón 1.2 (305pb)**

**F2:** GAGTCGGGCGCCGAGGAGTC  
**R2:** GGGGCTTCAGACCGTGCTAT

**Primer pair 1**

	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GAGTCGGGCGCCGAGGAGTC	20	67.08	75.00	6.00	3.00
Reverse primer	GGGGCTTCAGACCGTGCTAT	20	61.97	60.00	4.00	2.00

**Products on target templates**

>[NC\\_000003.12](#) Homo sapiens chromosome 3, GRCh38.p13 Primary Assembly

product length = 305

Features associated with this product:

[von hippel-lindau disease tumor suppressor isoform 1](#)

[von hippel-lindau disease tumor suppressor isoform 2](#)

Forward primer	1	GAGTCGGGCGCCGAGGAGTC	20			
Template	10141941	.....	10141960			
Reverse primer	1	GGGGCTTCAGACCGTGCTAT	20			
Template	10142245	.....	10142226			

**VHL exón 3 (213 pb)**

tgtagtagacccctagtctgccactgaggaattggttttgcccctccagTGTATACTCTGAAAGAGCGA**TGC**CTCCAGGTTGTCC**[GGA]**GC  
 CTAGTCAAGCCTGAGAATTACAGGAGACTGGACATCGTCAGGTCGCTCTACGAAGAT**CTG**GAAGACCACC  
 CAAATGTGCAGAAAGACCTGGAG**CGG**CTGACACAGGAGCGCA**TGACACATCAACGGATGGGA**GATTGAAG  
 ATTTCTGTTGAAACTTACACTGTTTCATCTCAGCTTTTGATGGTACTGATGAGTCTTGATCTAGATACAGGA  
 CTGGTTCCTTCCTTAGTTTCAAAGTGTCTCATTCTCAGAGTAAAAATAGGCACCATTGCTTAAAAGAAAGTTA  
 ACTGACTTCACTAGGCATTGTGATGTTTAGGGGCAAACATCACAAAATGTAATTTAATGCCTGCCATTAG  
 AGAAGTATTTATCAGGAGAAGGTGGTGGCATTTTTGGCTTCCTAGTAAGTCAGGACAGCTTGTATGTAAGGA  
 GTTTGTATAAGTAATTCAGTGGGAATTGCAGCATATCGTTTAATTTAAGAAGGCATTGGCATCTGCTTTT  
 A

**F:** ccctagtctgccactgagga

**R:** TCCCATCCGTTGATGTGCAA

### Primer pair 1

	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CCCTAGTCTGCCACTGAGGA	20	60.32	60.00	4.00	2.00
Reverse primer	TCCCATCCGTTGATGTGCAA	20	59.96	50.00	4.00	2.00

#### Products on target templates

>[NC\\_000003.12](#) Homo sapiens chromosome 3, GRCh38.p13 Primary Assembly

product length = 213

Features associated with this product:

[von hippel-lindau disease tumor suppressor isoform 1](#)

[von hippel-lindau disease tumor suppressor isoform 2](#)

Forward primer	1	CCCTAGTCTGCCACTGAGGA	20
Template	10149747	.....	10149766
Reverse primer	1	TCCCATCCGTTGATGTGCAA	20
Template	10149959	.....	10149940