Artículo original
Ginecol Obstet Mex 2014;82:163-169.

Exclusión prenatal del síndrome de von Hippel-Lindau en una familia mexicana con una mutación nueva en el gen *VHL*

Oscar Francisco Chacón-Camacho[1]
Jesús Benitez-Granados[2]
Juan Carlos Zenteno[1,3]

[1] Unidad de Investigación, Departamento de Genética, Instituto de Oftalmología Conde de Valenciana, México DF.
[2] Departamento de Genética, Centro Médico Nacional 20 de Noviembre, ISSSTE, México DF.
[3] Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México DF.

RESUMEN

Antecedentes: el síndrome de von Hippel-Lindau es una enfermedad multisistémica con herencia autosómica dominante, causada por la inactivación del gen *VHL* y caracterizada por diversos tumores hipervasculares benignos o malignos.

Objetivo: describir las características clínicas y el diagnóstico prenatal en una paciente con síndrome de von Hippel-Lindau.

Material y método: informe de caso**;** estudio de una familia mexicana con cinco miembros con síndrome de von Hippel-Lindau en tres generaciones consecutivas. El caso índice fue una mujer con siete semanas de embarazo referida a nuestro servicio por su antecedente familiar y personal de esta enfermedad. El ADN materno se obtuvo de leucocitos de sangre periférica durante la séptima semana de gestación y se aisló ADN fetal a partir de células del líquido amniótico durante la semana 15 de gestación. El análisis del ADN materno y fetal se realizó mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y secuenciación nucleotídica directa del gen *VHL***.**

Resultados: se identificó una nueva mutación en el gen *VHL* en ADN materno (c. 161_168 dup GGAGGCCG). El análisis del ADN fetal indicó que el feto heredó el alelo normal de la madre.

Conclusión: en un caso familiar de síndrome de von Hippel-Lindau se identificó una nueva mutación en el gen *VHL* que permite expandir el espectro mutacional de esta enfermedad. El análisis molecular prenatal a las 15 semanas de gestación demostró que el feto no heredó el alelo mutado. Con base en lo investigado este es el primer caso de exclusión prenatal-molecular del síndrome de von Hippel-Lindau en Latinoamérica.

Palabras clave: síndrome de von Hippel-Lindau, *VHL* gene, VHL, diagnóstico prenatal, amniocentesis, hemangioblastoma

Prenatal exclusion of von Hippel-Lindau syndrome in a Mexican family carrying a novel *VHL* gene mutation

ABSTRACT

Background: von Hippel-Lindau (VHL) disease is an autosomal dominant and familial multisystemic syndrome that is caused by the

Recibido: julio 2012
Aceptado: octubre 2012

Correspondencia
Dr. Juan Carlos Zenteno
Departamento de Genética
Unidad de Investigación
Instituto de Oftalmología Conde de Valenciana
Chimalpopoca 14
06800 México DF
jczenteno@institutodeoftalmologia.org

Este artículo debe citarse como
Chacón-Camacho OF, Benitez-Granados J, Zenteno JC. Exclusión prenatal del síndrome de von Hippel-Lindau en una familia mexicana con una mutación nueva en el gen VHL. Ginecol Obstet Mex 2014;82:163-169.

inactivation of the *VHL* gene and it is characterized by diverse types of high vasculated tumours of benign and malign nature. In this work we describe the clinical characteristics and the prenatal diagnosis of a woman with VHL.

Objective: Describe the first exclusion prenatal case by DNA analysis of the VHL syndrome in Latinoamerican population.

Material and methods: analysis of a Mexican familial pedigree showed 5 affected subjects with VHL on 3 consecutive generations. The proband was a 7 weeks pregnancy woman who was referred to our service for familiar and personal history of this disease. Maternal DNA was obtained from peripheral blood leukocytes, while fetal DNA was isolated from amniotic liquid cells on the 15th week. The maternal and fetal DNA analysis were done by the Polymerase Chain reaction (PCR) and the direct nucleotide sequence of the *VHL* gene.

Results: A novel mutation (c. 161_168 dup GGAGGCCG) in the VHL gene was identified in maternal DNA. Fetal DNA analysis indicated that the fetus inherited the wild-type allele from the mother.

Conclusion: A novel VHL gene mutation was identified in a familial case of the disease, expanding the mutational spectrum in this disorder. The molecular prenatal testing in the affected woman at 15 weeks of gestation, demonstrated that the fetus did nor inherited the mutated allele. To the best of our knowledge, this is the first example of prenatal-molecular exclusion on VHL syndrome in Latinoamerica population.

Key words: von Hippel-Linau síndrome; VHL gene; VHL; prenatal diagnostic; amniocentesis; hemangioblastoma.

La enfermedad de von Hippel-Lindau (VHL*; OMIM 193300*) es un síndrome autosómico dominante caracterizado por la coexistencia de tumores malignos y benignos que incluyen hemangioblastomas del sistema nervioso central y la retina, feocromocitoma, carcinoma de células renales, quistes renales y tumores pancreáticos, entre otros.[1] La enfermedad es causada por inactivación germinal del gen *VHL*, un gen tumor supresor localizado en el brazo corto del cromosoma 3.[2,3] A la fecha se han demostrado mutaciones en este gen en prácticamente todas las familias analizadas con enfermedad de von Hippel-Lindau. Sin embargo, en el espectro mutacional hay una variabilidad considerable que puede abarcar desde mutaciones puntuales hasta deleciones completas del gen. Las manifestaciones fenotípicas de la enfermedad también son muy variadas, incluso dentro de una misma familia.[4] Está demostrado que en la enfermedad de von Hippel-Lindau el embarazo exacerba y acelera el crecimiento de los tumores cerebrales y del ojo debido a sus grandes cambios hormonales y hemodinámicos.[5,6] En las últimas décadas se han conseguido enormes progresos en el campo de los exámenes prenatales con genética molecular. Con base en los patrones de herencia de la enfermedad y el tipo de mutación, el diagnóstico prenatal es posible a través de métodos de detección directos o indirectos (métodos de cribado).[7] Gracias a los avances en la tecnología y la investigación de la etiología genética de muchas enfermedades, el número de enfermedades genéticas susceptibles

de detección prenatal por análisis de ADN se ha incrementado considerablemente.

El diagnóstico molecular prenatal de la enfermedad de von Hippel-Lindau pocas veces se ha descrito en la bibliografía médica[8-10] y según nuestro conocimiento no hay reportes en familias latinoamericanas. El objetivo de este trabajo es describir el análisis molecular del gen *VHL* en una mujer con enfermedad de von Hippel-Lindau (y su hermana también enferma) durante el primer trimestre de gestación para establecer rápidamente si el feto tenía o no la afección familiar. Además, se describe la nueva mutación identificada en esta familia, expandiendo así el espectro mutacional conocido para el gen *VHL*.

MATERIAL Y MÉTODO

Informe de un caso familiar de síndrome de von Hippel-Lindau valorado y analizado por técnicas de biología molecular para el diagnóstico prenatal de la enfermedad. Este estudio se realizó en el Instituto de Oftalmología Conde de Valenciana.

Historia familiar. Se estudió una familia mexicana con tres generaciones afectadas por el síndrome de von Hippel-Lindau. La familia tenía cinco sujetos enfermos (I-1, II-1, II-10, III-5, y III-6) (Figura 1). Los pacientes I-1, II-1 y II-10 fallecieron durante la quinta década de vida debido a la enfermedad. Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Instituto de Oftalmología Conde de Valenciana y la paciente dio su consentimiento informado para participar. Los individuos I-1 y II-1 tenían antecedentes de tumores cerebrales. En estos pacientes no se determinó la localización anatómica exacta ni la edad al diagnóstico de los tumores. La paciente II-10 tenía antecedentes de hemangioblastomas en el tallo cerebral y la retina, y también pancreáticos. A los 13 años de edad el sujeto III-5 tuvo hemangioblastomas retinianos bilaterales que provocaron desprendimiento de retina y

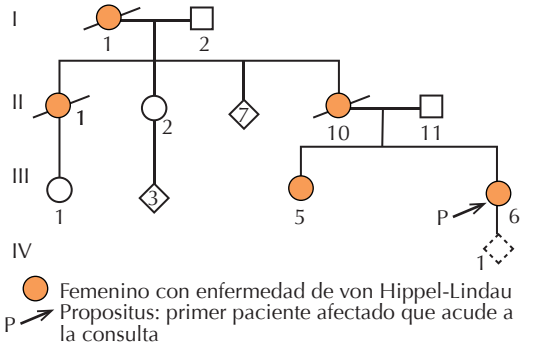


Figura 1. Árbol genealógico simplificado de una familia mexicana con enfermedad de von Hippel-Lindau.

enucleación de ambos ojos. Esta paciente también tuvo quistes pancreáticos de diagnóstico reciente.

Caso índice

El *propositus* (III-6) es de una paciente de 24 años de edad que fue referida al servicio de Genética con diagnóstico de síndrome de von Hippel-Lindau y siete semanas de embarazo. La paciente solicitó consejo genético y cuidado prenatal debido a sus antecedentes familiares y personales de síndrome de von Hippel-Lindau. A la edad de 11 años se le diagnosticaron hemangioblastomas retinianos bilaterales. Poco después se le realizó una resonancia magnética de la columna en la que se identificaron hemangioblastomas medulares. A la edad de 21 años tuvo cefaleas y vómitos intensos; por eso se le realizó una resonancia magnética de la cabeza en la que se encontró un hemangioblastoma quístico del hemisferio cerebelar derecho (Figura 2B, C y D). El tratamiento fue quirúrgico y con radioterapia un año después. Una exploración oftalmológica completa reveló la existencia de hemangioblastomas retinianos multifocales y cicatrices retinianas debidos al tratamiento previo con láser (Figura 2A). Durante la séptima semana de embarazo se le tomó una muestra de sangre

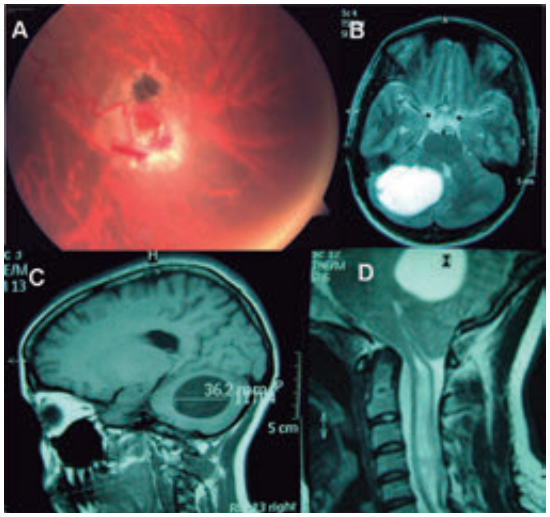


Figura 2. Características clínicas del caso índice con enfermedad de von Hippel-Lindau. (A) Fotografía del fondo de ojo que muestra un hemangioblastoma retiniano en el ojo izquierdo y vasos sanguíneos dilatados adyacentes al tumor. (B) Imagen de resonancia magnética (corte axial) preoperatoria que muestra un área bien circunscrita de intensidad incrementada en el hemisferio cerebelar derecho que corresponde a un hemangioblastoma cerebelar. (C) Resonancia magnética (corte sagital) preoperatoria que muestra el mismo tumor sin medio de contraste. (D) Resonancia magnética (corte sagital) que muestra medio de contraste, mismo tumor, y siringomielia cervical.

periférica para aislar el ADN genómico y realizar el análisis molecular del gen *VHL*.

En el trascurso de la décimasegunda semana de gestación se le realizó la prueba de cribado del primer trimestre de embarazo en el suero materno (*duotest*), que incluyó PAPP-A (pregnancy-associated plasma protein A) y b-hCGH (human chorionic gonadotropin b subunit). También se le practicó un examen ultrasonográfico estructural del primer trimestre (semana 13) para valorar la translucencia nucal, el hueso nasal y el ductus venoso. En el trascurso de la décimaquinta semana de gestación se efectuó una amniocentesis para obtener células fetales y aislar ADN a partir de ellas. De manera simultánea se utilizó parte del líquido amniótico y se sembró en dos diferentes frascos de cultivo para realizar cariotipo con técnica de bandas GTG.

Análisis mutacional del gen *VHL*

Con el *Wizard Genomic DNA Purification Kit* (Promega, Madison, WI, USA) se aisló el ADN genómico fetal (aproximadamente 10 mL) de las células de la amniocentesis. Además, el ADN genómico del propositus y de su hermana afectada se extrajeron con el sistema *Quickgene system* (Fujiflim, Tokio, Japan). Por PCR se amplificaron los tres exones de la secuencia codificante del gen *VHL* utilizando nucleótidos derivados de la secuencia de *VHL* (*Ensembl transcript ID VHL-001: ENST00000256474)*. Cada 25 mL de reacción de amplificación de PCR contienen 1X buffer, 200 ng de ADN genómico, 0.2 mM de cada dNTP, 2 U de Taq polimerasa, 1mM de primer sentido y antisentido. Los productos de PCR se analizaron en geles de agarosa donde las bandas fueron escindidas y posteriormente el ADN se purificó con el equipo *Qiaex II* (Qiagen, Hiden, Germany).

Con el equiupo *BigDye Cycle Sequencing* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) se realizó la secuenciación directa-automatizada del gen *VHL*, se agregaron 15 ng de ADN templado en cada reacción y se utilizaron 25 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, alineamiento a 50°C durante 15 segundos, y extensión a 60° por espacio de cuatro minutos. Todas las muestras se analizaron en un secuenciador *ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems*). Las secuencias silvestres (*Ensembl transcript ID VHL-001: ENST00000256474*) y la mutada se compararon manualmente.

RESULTADOS

Después de la secuenciación completa de la región codificante del gen *VHL* se identificó

una inserción-duplicación de ocho nucleótidos c. 161_168 dup GGAGGCCG en el ADN del caso índice (Figura 3A) y de su hermana (Figura 3B). Esta mutación desplazó el marco de lectura y la introducción de un codón de paro (UGA) 16 codones "corriente abajo" (M54M*fs**16). Esta nueva mutación no se identificó con la secuenciación directa en la región codificante completa del gen *VHL* del ADN genómico del feto (Figura 3C), lo que indica que el alelo mutado no se trasmitió de la madre al feto.

Ni en el *duotest* ni en el ultrasonido fetal del primer trimestre se encontraron anomalías. El análisis citogenético mostró un cariotipo femenino en 36 metafases analizadas (46, XX [36]).

DISCUSIÓN

El síndrome de von Hippel-Lindau es una enfermedad neoplásica multisistémica heredada de manera dominante y que se diagnostica por los siguientes criterios: *1)* uno o más hemangioblastomas en el sistema nervioso central (principalmente cerebelo); *2)* lesiones viscerales

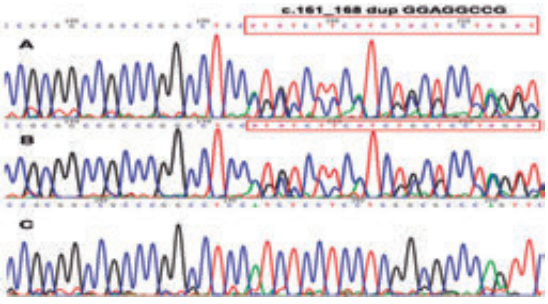


Figura 3. Secuencias nucleotídicas parciales del exón 1 del gen *VHL* en el caso índice; (A) hermana del caso índice (B) y en el feto (C). La cadena antisentido se muestra en los electroferogramas. (A y B) El rectángulo de la parte superior derecha indica la sobreposición de los alelos debido al estado heterocigoto de la mutación nueva c.161_168 dup GGAGGCCG. (C) La mutación no se identificó en el ADN fetal.

(tumores o quistes renales o pancreáticos) y *3)* incidencia familiar.[11] La herencia de un alelo mutado del gen tumor supresor *VHL* predispone a la enfermedad siguiendo las reglas de Knudson en la teoría del "doble golpe".[12] En este estudio se describe el análisis molecular de una familia mexicana, incluida una mujer embarazada a la que se le realizó diagnóstico prenatal por análisis de ADN. En el ADN de esta paciente y de su hermana afectada se identificó una mutación nueva de VHL y en el análisis del ADN fetal se demostró que el hijo heredó el alelo normal de su madre.

De acuerdo con la Sociedad Americana de Oncología Clínica, el síndrome de von Hippel-Lindau es un padecimiento en el que el examen genético molecular, incluido el diagnóstico prenatal-molecular, es el patrón de referencia para el cuidado del riesgo de miembros de la familia.[13] En este estudio se identificó una nueva mutación (c. 161_168 dup GGAGGCCG) que introduce una señal de paro que produce una proteína truncada no funcional. Aunque en el síndrome de von Hippel-Lindau hay una considerable variabilidad clínica, incluso en individuos con la misma mutación, se han establecido algunas correlaciones genotipo-fenotipo. Los primeros estudios descritos compararon el riesgo de tumores específicos en pacientes con mutaciones de sentido equivocado con otro tipo de mutaciones y encontraron que las primeras tienen un riesgo más elevado para feocromocitoma.[14] Hace poco, Ong y su grupo describieron el caso de 573 pacientes con cinco lesiones mayores del síndrome von Hippel-Lindau: hemangioblastomas retinianos, cerebelares y espinales, carcinoma de células renales y feocromocitoma. El promedio de edad al diagnóstico y la frecuencia de estas lesiones fueron: hemangioblastoma retiniano 25 años (73%), hemangioblastomas cerebelares 29.9 años (57%), carcinoma de células renales 39.7 años (35%), hemangioblastoma espinal 33.3 años (25%) y feocromocitoma 24 años

(20%). En la propositus y su hermana los hemangioblastomas retinianos fueron los primeros tumores en aparecer a los 11 y 13 años de edad, respectivamente, circunstancia que coincide con lo descrito en la bibliografía.[15,16] La propositus también tuvo, antes de los 20 años, hemangioblastomas espinales y un hemangioblastoma quístico cerebeloso antes de los 20 años y a los 23 años, respectivamente; a su hermana se le diagnosticaron quistes pancreáticos sin hallazgo alguno de hemangioblastomas en el sistema nervioso. Estos datos apoyan la gran variabilidad fenotípica de esta enfermedad, incluso en una misma familia.[16] Las dos pacientes estudiadas tuvieron edad de inicio mucho más temprana de aparición de los tumores aunque estas características también concuerdan con lo descrito que mencionan que las mutaciones por deleción o inserción pequeñas que provocan desplazamiento del marco de lectura y, por lo tanto, una proteína truncada hacen que la edad de inicio sea más temprana para la aparición de los hemangioblastomas en el sistema nervioso central (ojo y cerebelo).[4,15] La importancia de este estudio también radica en que de acuerdo con el tipo de mutación y la relación genotipo-fenotipo descrita hasta la fecha, nuestras pacientes con síndrome de von Hippel-Lindau aunque aún no tienen datos relacionados con quistes renales o carcinoma de células renales, sí tienen un alto riesgo de padecerlos en los próximos años; por esto debe mantenerse una estrecha vigilancia para evitar su evolución o complicaciones.

Los síntomas de ciertos tumores intracraneanos, como los hemangioblastomas en pacientes con síndrome de von Hippel-Lindau, suelen empeorar durante el embarazo, quizá debido a los cambios endocrinológicos y al incremento del volumen sanguíneo materno propio de la fisiología materna de la gestación. No obstante, la mayor parte de los embarazos tiene resultados favorables e incluso 96.4% de los fetos superviven y sólo 5.4% de las madres afectadas con el síndrome tienen alguna morbilidad.[18] El caso índice no tuvo síntomas relacionados con el síndrome de von Hippel-Lindau durante la gestación; esto porque la enfermedad tiene un carácter autosómico dominante, por lo que la descendencia de una persona afectada puede tener un riesgo de 50% de heredar la enfermedad durante cada embarazo. La paciente del caso índice acudió a nuestra consulta para recibir asesoría genética y ver la posibilidad de realizar algún examen genético-molecular, en el que se identificó la nueva mutación en la embarazada y, afortunadamente, no en el feto, quien heredó el alelo silvestre materno.

CONCLUSIÓN

Este estudio es el primer ejemplo de diagnóstico prenatal genético-molecular del síndrome de von Hippel-Lindau en una familia latinoamericana. Esto es importante porque puede asistirse a parejas en quienes existe un afectado con alguna enfermedad mendeliana; esto permite saber antes del nacimiento que tendrán un hijo saludable. Además, se describió una nueva duplicación en el gen *VHL*, lo que expande el espectro mutacional conocido para ese gen en la bibliografía internacional.

Agradecimientos

Este trabajo fue apoyado por el Patronato de la Fundación Conde de la Valenciana.

REFERENCIAS

1. Shuin T, Yamasa K, Tamura K, Okuda H, Furihata, et al. Von Hippel-Lindau disease: molecular pathological basis clinical criteria, genetic testing, clinical features of tumors and treatment. Jpn J Clin Oncol 2006;36:337-343.
2. Chan C, Collins A, Chew E. Molecular pathology of the eyes with von Hippel-Lindau (VHL) disease. A review. Retina 2007;27:1-7.
3. Kaelin WG. Von Hippel-Lindau disease. Annu Rev Pathol Mech Dis 2007; 2:145-73.

4. Wong WT, Agron E, Coleman HR, Reed GF, Csaky K, et al. Genotype-phenotype correlation in von Hippel-Lindau disease with retinal angiomatosis. Arch Ophthalmol 2007;125:239-245.
5. Depret-Mosser S, Jomin M, Monnier JC, Vinater D, Bouthors-Ducloy AS, et al. Cerebral tumors and pregnancy. Apropos of 8 cases. J Gynecol Obstet Biol Reprod 1993;22:71-80.
6. Brown PF, Dababo MA, Hladick CL, Eagan KP, et al. Hormone receptor immunoreactivity in hemangioblastomas and clear renal cell carcinomas. Mod Pathol 1998;11:55-59.
7. Tantravahi U, Wheeler P. Molecular genetic testing for prenatal diagnosis. Clin Lab Med 2003;23:481-502.
8. Levy M, Richard S. Attitudes of von Hippel-Lindau disease patients towards presymptomatic genetic diagnosis in children and prenatal diagnosis. J Med Genet 2000;37:476-478.
9. Stanojevic BR, Lohse P, Neskovic GG. Germline VHL gene mutations in three Serbian families with von Hippel-Lindau disease. Neoplasma 2007;54:402-6.
10. Siu WK, Ma RC. Molecular basis of von Hippel-Lindau syndrome in Chinese patients. Chin Med J 2011;124:237-41.
11. Melmon KL, Rosen SW. Lindau's disease. Review of the literature and study of a large kindred. Am J Med 1964;36:595-617.
12. Frew IJ, Krek W. pVHL: a multipurpose adaptor protein. Sci Signal 2005; 1: pe 30.
13. Maher ER, Webster AR, Richards FM, Green JS, Crossey PA, Payne SJ, Moore AT. Phenotypic expression in von Hippel-Lindau disease: correlations with germline VHL gene mutation. J Med Genet 1996;33:328-332.
14. Ong KR, Woodward ER, Killick P, et al. Genotype-phenotype correlations in von Hippel-Lindau disease. Hum Mut 2007;28:143-149.
15. Maher ER, Yates JR, Harries R, et al. Clinical features and natural history of von Hippel-Lindau disease. QJ Med 1990;77:1151-1163.
16. Nordstrom-O'Brien M, van der Luijt RB, van Rooijen E, et al. Genetic analysis of von Hippel-Lindau disease. Hum Mut 2010;31:521-537.
17. Grimbert P, Chauveau D, Richard S, et al. Pregnancy in von Hippel-Lindau disease. Am J Obstet Gynecol 1999; 180:110-111.