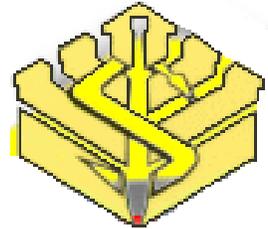




**UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
DIRECCIÓN DE POSTGRADO
DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS**



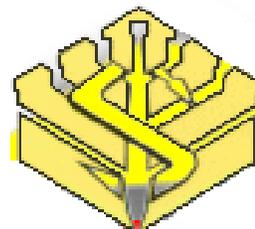
**NEUROFIBROMATOSIS TIPO 1. VARIABILIDAD FENOTÍPICA E
INTRODUCCIÓN AL ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS DE LONGITUD
DE ADN EN EL GEN NF1**

**Autor: Jorge A. Vargas Arenas
Tutor: Dra. Nancy Moreno de Martínez**



Valencia, Venezuela. Diciembre 2010

UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
DIRECCIÓN DE POSTGRADO
DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS



VEREDICTO

Nosotros, Miembros del Jurado designado para la Evaluación del Trabajo de Grado Titulado “**NEUROFIBROMATOSIS TIPO 1. VARIABILIDAD FENOTÍPICA E INTRODUCCIÓN AL ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS DE LONGITUD DE ADN EN EL GEN NF1**” presentado por el Ciudadano **JORGE VARGAS ARENAS, C.I. N° 1.970.816** para optar al título de **DOCTOR EN CIENCIAS MÉDICAS**, acordamos que el mismo reúne los requisitos para ser considerado:

Aprobado

<i>Nombre y Apellido</i>	<i>C.I.</i>	<i>Firma Del Jurado</i>
Dr. Raul Fachin Viso	1-348602	
Dra. Flor Herrera	632632	
Dr. Alvaro Rodriguez Larralde	3178355	

En Valencia a los Catorce (14) días del mes de Diciembre de Dos Mil Once



AGRADECIMIENTOS

- A los pacientes y sus familiares representados en el grupo muestral, quienes han sido nuestra fuente de inspiración y de enseñanza para lo que sé de esta patología genética y a los cuales he tratado de orientar y ayudar. De igual modo, al CDCH -UC por la subvención parcial otorgada.

- Al personal profesional y técnico del Laboratorio de Biología Molecular del CIADANA, F.C.S. Universidad de Carabobo. Núcleo Aragua, dependencia en la cual, buena parte del trabajo laboratorial fue realizado. En particular mi reconocimiento, a la Dra. NANCY MORENO de MARTINEZ, por su profesional y científica conducción tutorial; al Prof. JOSÉ A. MARTINEZ (UPEL) en su callado, pero efectivo, asesoramiento técnico y metodológico. Al médico-cirujano, CARLOS FLORES. A las Lics. NARVYS PULIDO y TERESA OROPEZA. A la Bióloga, MARIA FÁTIMA BAETA y a la Lic. CARMEN PIÑA. Mi agradecimiento extensivo a la Dra. FLOR HERRERA del BIOMED – UC, por su solidaridad en aspectos logísticos durante el desarrollo de la Tesis.

- A la Asistente de la Unidad de Genética Médica y Citogenética, Departamento de Ciencias Fisiológicas, Escuela de Ciencias Biomédicas y Tecnológicas, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo, Sra. FRANCIS ABZUARDE, antigua y consecuente colaboradora.

- Por su dedicación en labores secretariales, a la Srta. ELENA OLIVERO P. y a los miembros de la Comisión Coordinadora del Programa de Doctorado en Ciencias Médicas, en particular, en la persona del Dr. JOSÉ RAMÓN LÓPEZ GÓMEZ, por su tenacidad y dedicación académica para adelantar el Programa; tanto como, al personal secretarial de la Comisión Coordinadora, y en especial por su labor orientadora, a la Sra. ALEXANDRA GONZÁLEZ.

- Este afán investigativo, no puede ser ajeno al grupo familiar del que derivamos y al que pertenecemos, el cual ha sido siempre fuente de inspiración; tanto como, de comprensión y sacrificios compartidos. Por ello, no puedo menos que recordarlos y dedicarles en estos momentos de balance, parte de la obra que ellos me han ayudado a realizar. A la memoria de mis padres, PEDRO MANUEL y CARMEN TERESA y a la viva presencia de mi esposa, MARIA ISABEL y de mis hijos: MARIA EUGENIA, JORGE ANTONIO y PEDRO MANUEL, va este recuerdo agradecido.

- Al Dr. Antonio Eblén Z. por la lectura crítica del Análisis Estadístico de la Tesis.

ÍNDICE GENERAL

CONTENIDO	Pp.
ÍNDICE DE TABLAS	v
ÍNDICE DE GRÁFICOS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
RESUMEN	viii
ABSTRACT	x
INTRODUCCIÓN	1
 CAPÍTULO	
I EL PROBLEMA	4
1.1. Delimitación del estudio	4
1.2. Objetivos de la investigación	5
1.3. Justificación de la investigación	8
 II MARCO TEÓRICO	9
2.1. Características clínicas de la NF1	9
2.2. Criterios diagnósticos	14
2.3. Variabilidad en la expresión fenotípica	14
2.4. Rasgos Citogenéticos	16
2.5. Rasgos Moleculares	19
2.6. Definición de Términos	31
 III MATERIAL Y MÉTODOS.....	35
 IV RESULTADOS	45
Discusión	83
Conclusiones	94
 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101
 ANEXOS	113

ÍNDICE DE TABLAS

TABLAS		Pp.
1.	Matriz Epistémica	6
2.	Sumario de Tipos de Mutaciones en NF1	15
3.	Marcadores Microsatélites usados en la investigación	39
4.	Prevalencia de Rasgos Fenotípicos en afectados Familia R-M....	48
5.	Valores representativos (Promedio y DE) del número de MCL y NF en pacientes (Familia 0885) por generación	57
6.	Comparación (MCL y NF) entre las generaciones (0885).Prueba de Mann – Whitney (U) y comparación de promedios(Z).....	58
7.	Valores representativos (Promedio y DE) para MCL y en pacientes (Familia 0906)	61
8.	Valores representativos (Promedios y DE) del número de MCL y NF Pacientes (Familia 0912)	63
9.	Comparación de la Distribución (MCL y NF) entre las generaciones (0912). Prueba de Mann - Whitney (U) y Comparación Promedios (Z)	64
10.	Número de MCL y NF en Familias con un afectado por generación	66
11.	Incidencia de Escoliosis, Convulsiones y DA (Familia 0885) expresada porcentualmente en base al número de individuos por generación	69
12.	Incidencia de Escoliosis, Convulsiones y DA (Familia 0906) expresada porcentualmente en base al número de miembros	71
13.	Incidencia de Escoliosis, Convulsiones y DA (Familia 0912) expresada porcentualmente en base al número de miembros	71
14.	Incidencia de Escoliosis, Convulsiones y DA en familias con un afectado	72
15.	Distribución de los alelos de los marcadores microsatélites IVS27AC28.4 e IVS38GT53.0 en los casos índice y en los controles sanos	74
16.	Alineamiento de la secuencia del exón 7-9 del paciente 0891 con la de un control sano	80
17.	Alineamiento de la secuencia del exón 7-9 del paciente 0912 con la de un control sano	81
18.	Comparación de las secuencias del exón 9 y parte del exón 10 en el paciente 0912 y una secuencia control	82

ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICOS	Pp.
1. Mecanismos de control de la proliferación celular por la p53....	26
2. Variedad de máculas “café con leche” en pacientes con NF1....	49
3. Variedad de neurofibromas cutáneos en pacientes con NF1	50
4. Variedad de neurofibromas plexiformes en pacientes con NF1..	51
5. Nódulos de Lisch en estroma iridiano	52
6. Manifestaciones esqueléticas de NF1	53
7. Escoliosis y acortamiento de Miembro Inferior	53
8. Variedad Espinal de NF1. Caso 1.....	55
9. Variedad Espinal de NF1. Caso 2.....	56
10. Media con Error y DS del número de MCL según generación(0885)	60
11. Media con Error y DS del número de NF según generación (0885)	60
12. Media con Error y DE del número de MCL según generación (0906).....	62
13. Media con Error y DE del número de NF según generación (0906)	62
14. Media con Error y DE del número de NF según generación (0912)	64
15. Media con Error y DE del número de MCL según generación(0912)	65
16. Número de MCL en Familias con generaciones de un afectado...	67
17. Número de NF en Familias con generaciones de un afectado.....	68
18. Incidencia de Escoliosis, Convulsiones y DA en pacientes (0885) expresado porcentualmente	70
19. Electroforesis ADN humano (NF1) en gel agarosa al 1%	73
20. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 8% donde se muestra una distribución de alelos del microsatélite IVS27AC28.4 en individuos sanos (A) y Casos Índice (B)	75
21. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 8% donde se muestra una distribución de alelos del microsatélite IVS38GT53.0 en individuos sanos (A) y Casos Índice (B)	76
22. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 6 por ciento, donde se muestra el perfil electroforético de productos amplificados de la secuencia que contiene a los exones 7-9 del gen <i>TP53</i>	77
23. Electroforesis en gel de poliacrilamida 8% para evidenciar el Polimorfismo de Conformación de Cadena Sencilla (SSCP) en secuencias de los exones 7-9 de 6 pacientes con NF1	78

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURAS		Pp.
1.	Ideograma del cromosoma 17 bandeado (G)	18
2.	Esquema de la estructura genómica del gen NF1	19
3.	Mecanismo de acción de la Neurofibromina	22
4.	Ejemplificaciones de Genealogías estudiadas con casos segregantes	47

UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
DIRECCIÓN DE POSTGRADO
DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS

**NEUROFIBROMATOSIS TIPO 1. VARIABILIDAD FENOTÍPICA
E INTRODUCCIÓN AL ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS DE LONGITUD
DE ADN EN EL GEN NF1**

Autor: Jorge A. Vargas Arenas

Tutora: Dra. Nancy Moreno de Martinez

RESUMEN

Neurofibromatosis *tipo 1* (NF1) es una condición autosómica dominante, notable por su variabilidad en la expresión fenotípica. El locus NF1 mapea en 17q11.2 y codifica una proteína, la neurofibromina, cuya función principal es la de ser un supresor tumoral. Como una aproximación que nos permita adelantar en el reconocimiento de las causas que determinan la amplia variabilidad fenotípica de la condición, incluso entre miembros afectados de una misma familia que se infiere portan la misma mutación, se cumplió este estudio en 33 familias con casos afectados provenientes de distintas localidades del país, que incluyó: evaluación genealógica, clínica, estadística y molecular. Un número total de 70 pacientes fue diagnosticado de acuerdo a criterios internacionalmente establecidos: 53 de sexo femenino y 17 de sexo masculino. De estos, 51 corresponden a casos segregantes y 19, a casos esporádicos resultantes de neomutaciones. Las principales manifestaciones diagnósticas incluyen: máculas “café con leche”, neurofibromas cutáneos y nódulos de Lisch, cuyo número y tamaño varía grandemente de paciente a paciente. Además, pueden darse otras manifestaciones características, que solo se presentan en algunos de los pacientes. El estudio muestra que, la relación con la edad es diferente para las máculas y los neurofibromas. El número de neurofibromas se incrementa con la edad, en tanto que el de máculas declina con la edad. De hecho, la correlación o parecido fenotípico en casos familiares se diferencia, en la medida en que se hace más distante la relación familiar. Por otra parte, en la muestra poblacional estudiada se identificaron dos casos (hembra y varón) no relacionados, afectados por la “rara” Variedad Espinal de NF1: uno segregante y el otro resultante de una neomutación. Así mismo, previo consentimiento informado, se realizaron estudios moleculares en ADN, tanto en afectados como en familiares accesibles, con fines de adelantar en el conocimiento de factores que pudieran estar influenciando o determinando la variabilidad fenotípica de la condición. De este modo, las secuencias de dos microsatélites-marcadores

intragénicos: IVS27AC28.4 e IVS38GT53.0 fueron amplificadas mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y las formas alélicas fueron observadas por electroforesis. Se obtuvo en ambos marcadores una distribución alélica diferente entre afectados y no-afectados, resultando el microsatélite IVS38GT53.0 el más polimórfico. Aún cuando el tamaño de los alelos detectados todavía no ha sido determinado, los hallazgos reportados en esta Tesis son sugerentes de una asociación preferencial entre ciertas formas alélicas y la condición NF1. De ahí que, si esto resultara cierto, marcadores ligados al locus NF1 como los usados en estos ensayos, serían de gran utilidad en los procedimientos de diagnóstico prenatal y de diagnóstico de niños “presintomáticos” en situación de riesgo, provenientes de familias con antecedentes de la enfermedad. Por otra parte, como las mutaciones en el gen TP53, un represor tumoral, frecuentemente están presentes en NF1, se seleccionó un grupo de afectados por la condición y se amplificaron por PCR las secuencias correspondientes a los exones 7-9 del mismo. En este segmento genómico de TP53 suelen reportarse distintos tipos de mutaciones asociadas a NF1, por lo que cuatro de los productos PCR de casos índice y tres de familiares afectados fueron escrutados mediante análisis de Polimorfismo de Conformación de Cadena Sencilla (SSCP). En tres de las muestras de casos índice se observó un patrón de movilidad electroforética distinto al control normal y en otra no se evidenciaron alteraciones. La secuenciación de los segmentos genómicos correspondientes fue realizada en el CeSSAN (IVIC) y posible solo en dos de las muestras (0891 y 0912). Mediante alineamiento de las respectivas secuencias se comprobó que, 0891 no mostraba alteraciones en este segmento; en tanto que, 0912 evidenció la inserción de un nucleótido (T) hacia el extremo 3' del exón 9, la cual causa un cambio en el marco de lectura que origina una modificación en la secuencia de aminoácidos del transcrito (TP53), además que la cadena peptídica queda truncada por la introducción de un codón de parada (tga) en la posición 336. La mutación ocurrió en el dominio carboxi-terminal de la TP53 (residuos 319-360), el cual media en la oligomerización de la molécula; que es el proceso conformacional mediante el cual, en condiciones normales, la TP53 forma tetrámeros para desempeñar su actividad de supresor tumoral. Su truncamiento lleva a la formación de dímeros en lugar de tetrámeros, afectando la estabilidad termodinámica del dominio de tetramerización y con ello su correcto plegamiento. Por cuanto la TP53 es solo marginalmente estable a la temperatura corporal, cualquier mutación que reduzca aún más su estabilidad, contribuye a la alteración del proceso de plegamiento de la molécula *in vivo*. Este trabajo se enmarca dentro de las líneas de investigación del Programa de Doctorado en Ciencias Médicas relativas a la Genética Médica y la Biología Molecular (Genética Molecular).

Palabras clave: Neurofibromatosis tipo 1. Variabilidad fenotípica. Marcadores Microsatélites. TP53.

UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
DIRECCIÓN DE POSTGRADO
DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS

**NEUROFIBROMATOSIS TYPE 1. PHENOTYPIC VARIABILITY AND
INTRODUCTION TO THE ANALYSIS OF DNA LENGTH POLYMORPHISM
IN THE NF1 GENE**

Author: Jorge A. Vargas Arenas
Tutor: Nancy Moreno de Martínez, PhD.

ABSTRACT

Neurofibromatosis type 1 (NF1) is an autosomal dominant condition remarkable for its variable phenotypic expression. NF1 locus which maps in 17q11.2 encodes a protein, the neurofibromine, whose main function is being a tumor suppressor. As an approximation to the causes which determined its phenotypic expression variability, even among members affected from the same family, 33 families with the condition were studied: clinically, statistically and by molecular methods. A total number of 70 patients were diagnosed according to international criteria: 53 females and 17 males, being 51 familial cases and 19 the result of neomutation events (sporadic cases). The major diagnostic features include: café-au-lait macules, cutaneous neurofibromas, and Lisch nodules, but the number of lesions varies greatly from patient to patient. In addition, there are a number of characteristic features which only occur in a minority of cases; examples include severe learning difficulties, scoliosis, epileptic seizures, pseudoarthrosis...

Our study showed that the relationship between café-au-lait spots and neurofibromas was different. The number of neurofibromas increased markedly with age, whereas number of macules decline with age. In fact, the degree of phenotypic comparison (resemblance) decrease in familial cases with the degree of relationship, being strongest between close relatives and decreasing for more distant relatives in the same NF1 family. In addition, two cases of the "rare" variant, Spinal Neurofibromatosis 1, were recognized from distinct families: one familial and the other one, as result of a neomutational event.

Molecular studies were conducted in order to explore factors which may influence phenotypic variability of the condition; with that purpose, DNA was obtained with informed consent by a salting-out method, from a group of affected individuals and unaffected family members; so that, two STRs (short tandem repeat) intragenic

microsatellite-markers sequences IVS27AC28.4 and IVS38GT53.0 were amplified by PCR. Allelic forms were noticed by electrophoresis in a 8 per cent polyacrilamide gel. A different allelic distribution was obtained between NF1 patients and unaffected individuals, and between the two microsatellite-markers, being IVS38GT53.0 the most polymorphic one. Linkage disequilibrium among STRs in the neurofibromatosis 1 region has been previously reported. Since recombination and disequilibrium are closely related, the pattern of allelic association between these physically related markers could be useful to detect a recombinational “hot spot”. Although alleles size has not being yet determined, these finding suggest a preferential association for some alleles with NF1, which may have implications in the phenotypic variability of the disease. Besides, if that is true, markers linked to the NF1 locus could be useful as a tool for the diagnosis of “presymptomatic children” from families with the condition.

On the other hand, amplification by PCR of sequences from TP53 gene (exons 7 through 9), was carried out for a selected group of seven NF1 patients and thereafter, mutational events were looked for into this segments by single-strand conformation polymorphisms analysis (SSCP) in 8% polyacrilamide gels. Three of the samples showed a mobility shift as result of a conformational change in the TP53 sequences (exons 7-9). The PCR products were then sequenced (CeSSAN); this procedure was only possible in two samples (0891 and 0912). By annealing the sequences, sample 0891 showed no changes with respect to a normal control; whereas sample 0912, showed a nucleotide insertion (T) toward the 3' end from the exon 9. This insertion caused a shift in the translational reading frame (frameshift mutation), which resulted in a completely different sequence of amino acids downstream of the mutation and the polypeptide is truncated by the introduction of a premature termination codon (tga) occurring in position 336.

The mutation was localized at the C-terminal domain of TP53 (residues 319-360), which mediates oligomerization by which, in normal conditions, TP53 forms a tetramer to perform its tumor suppressor activity. Truncation led to the formation of dimers instead of tetramers, affecting the thermodynamics stability of the tetramerization domain and therefore preventing its correct folding. Since TP53 is only marginally stable at body temperature, any mutation which further reduces stability is likely to lead to unfolding/misfolding events of the molecule *in vivo*.

Key words: Neurofibromatosis type 1. Phenotypic variability. Microsatellite markers. TP53

INTRODUCCIÓN

La Neurofibromatosis Tipo 1 (NF1), también conocida como Neurofibromatosis Periférica o Enfermedad de Von Recklinghausen, es causada por una mutación en el gen NF1 localizado en el cromosoma 17q11.2. Su transcrito protéico, la neurofibromina, tiene una actividad supresora de tumores y probablemente también otras funciones.

El diagnóstico de NF1 está basado en criterios diagnósticos internacionalmente establecidos y reconocidos. Los rasgos clínicos diagnósticos incluyen los más frecuentes y distintivos, a saber: manchas o máculas “café con leche” (MCL), neurofibromas cutáneos, neurofibromas plexiformes, efélides en áreas no sujetas a exposición solar, nódulos de Lisch en el iris, displasia de alas esfenoidales y adelgazamiento de la cortical de huesos largos. Otras importantes manifestaciones comprenden: dificultades de aprendizaje, riesgo incrementado de ciertas enfermedades malignas, escoliosis e hipertensión arterial entre otras.

NF1 es una condición autosómica dominante. Cerca del 50 por ciento de los casos, según literatura mundial consultada, serían el resultado de neomutaciones o mutaciones frescas, correspondiendo a los casos esporádicos en un núcleo familiar. La rata mutacional del gen NF1, se encuentra entre las más elevadas del ser humano. Se estima que el gen NF1 tiene una penetrancia completa, pero exhibe también una substancial y llamativa variabilidad en su expresión fenotípica, notoria en miembros afectados de una misma familia. La mayoría de los estudios realizados, no han encontrado una relación obvia entre particulares mutaciones del locus NF1 y las manifestaciones clínicas resultantes, pero algunas posibles variantes alélicas han sido reconocidas. La amplia variabilidad del fenotipo NF1, incluso entre individuos con el

mismo tipo de mutación, sugiere que otros factores estarían involucrados en la determinación de las manifestaciones clínicas, incluyendo las complicaciones de la enfermedad, pero la naturaleza de estos factores no ha sido aún determinada.

El gen NF1 está localizado en el cromosoma 17q11.2 y codifica una proteína, la neurofibromina, ambos caracterizados en el año 1990. El gen es grande, abarcando 350 kilobases de ADN genómico y contiene 60 exones. La neurofibromina pertenece a la familia de proteínas conocidas como: proteínas activantes de GTPasa (*"GTPase activating protein"*) las cuales son reguladores negativos del proto-oncogene RAS. Se entiende que la neurofibromina acciona como un supresor tumoral (*"Tumor Suppressor"*), pero ella tendría también otras funciones. Su función como supresor tumoral estaría también respaldada por el hallazgo de mutaciones somáticas, que se producen como un segundo golpe (*"second hit"*) en el gen NF1, situación que ocurriría, tanto en tumores benignos como malignos de pacientes con la enfermedad.

Ciertos tipos de cáncer se presentan más frecuentemente en individuos afectados con NF1, entre ellos, el Tumor Maligno de la Membrana de Nervios Periféricos (*"Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumors"*) (MPNST), a menudo referidos como neurofibrosarcomas, son los más comunes en NF1. También, tumores del SNC, incluyendo tumores de la vía óptica, astrocitomas, ependimomas, meduloblastomas y otros, ocurren a menudo en estos enfermos. De igual modo, en pacientes NF1 existe un riesgo incrementado de sufrir de Leucemia Mieloide y Leucemia Mielomonocítica Crónica. El riesgo incrementado de malignización en NF1 sería compatible con el hallazgo de que, la neurofibromina tiene actividad GTPasa activadora, lo cual supone y resultaría en una regulación negativa del oncogene RAS. De ahí que, un incremento del riesgo de malignización pudiera anticiparse como resultado de la inactivación de esta función de supresor tumoral, por causa de la mutación en el gen NF1.

Con frecuencia, procesos malignos que se desarrollan en afectados por NF1 están acompañados por mutaciones en el gen TP53, un supresor tumoral cuyo locus mapea en 17p13.1 y codifica una fosfoproteína nuclear la p53, que es una fosfoproteína nuclear con propiedades de inhibidor canceroso en respuesta a daños que hayan podido producirse en el ADN. Si tales daños se producen, la p53 es activada y sirve de mediador en un set de respuestas antiproliferativas, que incluyen la detención del ciclo celular y apoptosis.

Bajo un enfoque complejo-dialógico se pretende abordar la fractalidad que tiene la condición en su expresión fenotípica, tomando en consideración determinadas características que tiene el gen NF1, entre ellas: la presencia a lo largo de su ADN de repeticiones cortas en tándem intragénicas, como los microsatélites, que constituyen sitios vulnerables expuestos a frecuentes errores recombinantes; todo ello, con el propósito de adelantar conocimientos que ayuden a explicar la notable variabilidad que en su expresividad fenotípica tiene la Neurofibromatosis Tipo 1 y en ciertos casos, la predisposición a desarrollar lesiones malignas por la afectación asociada de genes represores como TP53 y su transcrito p53. Con esta finalidad y bajo el siguiente título se presenta la Tesis: **“Neurofibromatosis tipo 1. Variabilidad Fenotípica e Introducción al Análisis de Polimorfismos de Longitud de ADN en el Gen NF1”**.

Este trabajo se enmarca dentro de las líneas de investigación del Programa de Doctorado en Ciencias Médicas de la FCS- UC, relativas a la Genética Médica y a la Biología Molecular (Genética Molecular).

CAPÍTULO I

1.1. Delimitación del estudio

Recursos físicos-ambientales: La investigación se desarrolló, simultáneamente, en las instalaciones de la Unidad de Genética Médica y Citogenética (UGMC) de la Cátedra de Fisiopatología, Departamento de Ciencias Fisiológicas, Escuela de Ciencias Biomédicas de la Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo, Valencia y en el Laboratorio de Biología Molecular CIADANA, Escuela de Medicina, Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad de Carabobo, Sede Aragua, Maracay.

Recursos humanos: Personal profesional y técnico de la UGMC y del Laboratorio de Biología Molecular.

Recursos financieros: Solicitados y aprobados, sobre la base de proyecto de investigación en NF1, por ante el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad de Carabobo (CDCH-UC) en la modalidad de Ayuda Menor (N° 1747-04). Un incentivo otorgado al Laboratorio de Biología Molecular por el FONACIT (N° 2008001177) dentro del Plan de Desarrollo de Talento Humano de alto nivel. A su vez, la adquisición de algunos equipos menores y los servicios de secuenciación de ADN, mediante el financiamiento del sub-proyecto Dengue Misión Ciencia N° UC-2008000911-1.

Recursos de materiales y suministros: Los existentes en la UGMC y en Laboratorio de Biología Molecular, conjuntamente con las adquisiciones por

vía de la Subvención otorgada por el CDCH-UC al proyecto de investigación en NF1.

Muestra: El universo a estudiar en la investigación estuvo integrado, por individuos afectados por NF1 , de ambos sexos y todas las edades , en los que se incluyen casos esporádicos y casos familiares , referidos desde el Departamento de Dermatología del Hospital Central de Valencia (CHET) y por médicos de distintas localidades del país. Pacientes fueron estudiados bajo consentimiento informado y en seguimiento de las pautas bioéticas que regulan la investigación en humanos.

1.2. Objetivos (fines) de la investigación

Son fines de la investigación, aportar conocimientos que ayuden a interpretar la variabilidad que, en su expresión fenotípica , tiene la Neurofibromatosis Tipo 1, bajo un enfoque Complejo-Dialógico. (**Tabla 1**). Son fines específicos de la investigación:

- a) Comprobar y verificar estadísticamente la variabilidad fenotípica enunciada para la enfermedad, tanto en casos resultantes de neomutaciones como en aquellos familiares (segregantes).
- b) Determinar el porcentaje de neomutaciones en la población muestral estudiada.
- c) Precisar la presencia o ausencia de focos geográficos, en el origen de ancestros para casos neomutantes.
- d) Determinar la eventual influencia de las edades parentales en el condicionamiento de casos afectados.
- e) Establecer el curso natural de aparición de las manifestaciones diagnósticas de la

enfermedad. Reconocimiento de variedades fenotípicas de la condición.

f) Formar un Banco de ADN de pacientes NF1 y familiares.

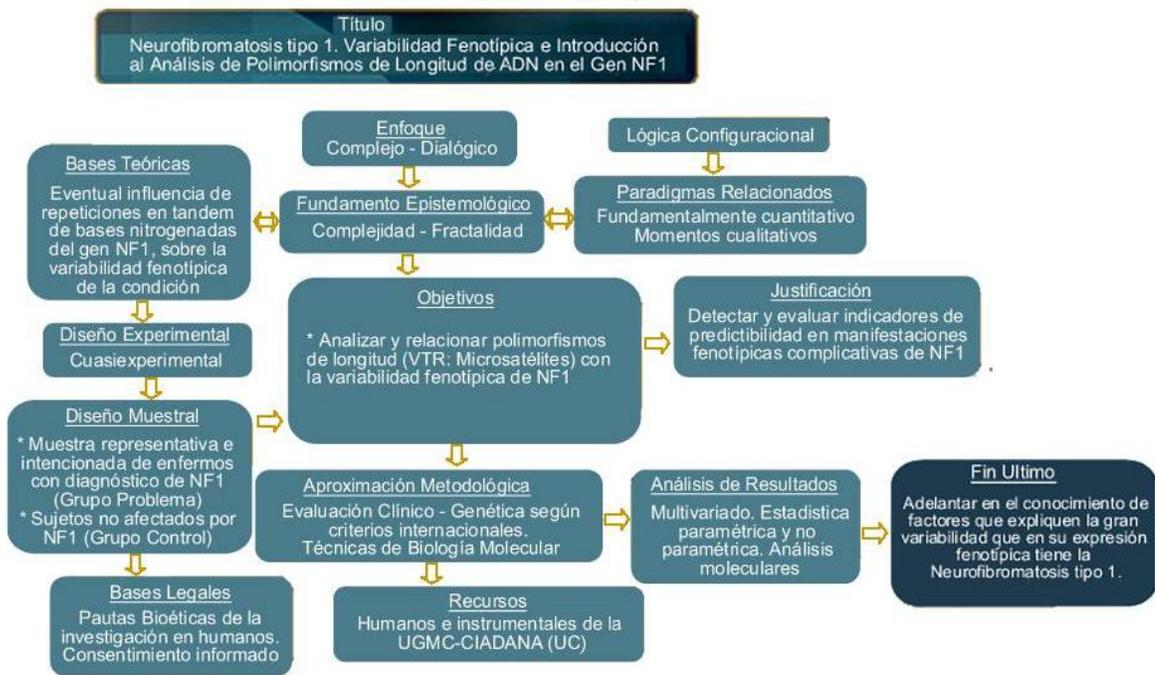
g) Determinar el porcentaje de malignización presente en la muestra.

h) Establecer diferencias entre individuos afectados vs. sanos en cuanto a los polimorfismos de los microsatélites IVS27AC28.4 e IVS38GT53.0.

i) Determinar si el patrón polimórfico influye en parámetros clínicos: fecha de inicio, curso de la enfermedad, tipo de manifestaciones.

j) Realizar análisis asociados del gen represor TP53 como indicador de predictibilidad tumoral en grupo muestral relevante.

Tabla 1
Matriz Epistémica NF1
Matriz Epistémica de la Complejidad
Deductivo-Abstracto



Para ello se procederá a la:

Caracterización fenotípica y diagnóstica de sujetos afectados por NF1, de acuerdo a pautas internacionalmente establecidas.

Verificación y concreción de la variabilidad fenotípica mediante el registro y tratamiento estadístico de rasgos cuantitativos p.e.: número y tamaño de MCL, número de neurofibromas cutáneos, mediante métodos paramétricos; y paralelamente, registro y tratamiento estadístico de rasgos o manifestaciones cualitativas (binarios) p.e.: presencia o ausencia de: nódulos de Lisch, escoliosis, convulsiones y dificultades de aprendizaje.

Reconocimiento de casos aislados, causados por neomutaciones en el

grupo familiar, y de casos familiares (segregantes) en las genealogías correspondientes.

Creación de un Banco de ADN, a partir de células sanguíneas de pacientes con NF1, previa comprobación espectrofotométrica de la concentración por muestra y de su integridad, mediante electroforesis en gel de agarosa.

Obtención de patrones electroforéticos en gel de poliacrilamida, para la determinación de polimorfismos de longitud en los microsatélites IVS27AC28.4 e IVS38GT53.0

Análisis del Polimorfismo de Conformación de Cadena Sencilla (SSCP) en secuencias nucleotídicas de los exones 7-9 del gene supresor TP53, en el ADN de pacientes seleccionados con NF1, para la búsqueda de mutaciones en este segmento del genoma, que de estar presentes serán secuenciadas.

1.3. Justificación de la investigación

La extrema variabilidad que en su expresión fenotípica tiene la Neurofibromatosis Tipo 1; por la cual, en un mismo grupo familiar podemos detectar individuos diversamente afectados, con casos de severidad manifiesta y por ello rápidamente diagnosticables; hasta otros, con manifestaciones tan leves, que pueden pasar desapercibidos, coloca el punto de la variabilidad fenotípica de la condición en un asunto que requiere dilucidación, a fin de poder incrementar nuestra agudeza y capacidad diagnóstica, tanto como el valor predictivo de nuestras observaciones clínicas y las que pudieran surgir, eventualmente, de potenciales marcadores moleculares que llegaran a ser identificados.

Por otro lado, conjuntamente con la variable expresividad que de ordinario tiene el gen NF1, este también muestra un amplio pleiotropismo que puede llevar, en ciertos individuos, a una afectación multisistémica de diversos órganos y tejidos: SNC (cerebro, médula espinal...), ojos, piel, esqueleto... Esta circunstancia, igualmente forma parte de la expresividad fenotípica y ella, pudiera ser explicada y comprendida, si logramos avanzar en la identificación de los factores que puedan influenciar su variabilidad.

CAPITULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. Características Clínicas de la Neurofibromatosis tipo 1

NF1 es la forma de Neurofibromatosis descrita por Von Recklinghausen y llamada formalmente Neurofibromatosis Periférica o Tipo 1. Es también, la forma más común de la enfermedad y uno de los más frecuentes desórdenes monogénicos; en oposición a la Neurofibromatosis Central (NF2), una entidad nosológica diferente, caracterizada por neuromas acústicos, meningiomas y escasas lesiones cutáneas de neurofibromas (1). Para NF1, diversos estudios han mostrado una prevalencia de la enfermedad de 1 en 4.500 aproximadamente (2,3); otros sin embargo, la sitúan entre 1 en 3.000 a 1 en 4.000 recién nacidos vivos (4).

La NF1 es una condición genético - hereditaria que se trasmite bajo un patrón Autosómico Dominante con variable expresividad fenotípica, pero virtualmente con un cien por ciento de penetrancia a la edad de 5 a 6 años (5,6). Se estima que, aproximadamente, un cincuenta por ciento de los casos representan nuevas mutaciones (neomutaciones o mutaciones frescas), siendo la rata mutacional para el locus una de las más elevadas en el humano. Así, Crowe y Col (1956), calcularon una rata mutacional para el locus en el orden de $1,4 - 2.6 \times 10^{-4}$ (2); aún cuando, subsecuentes estudios han mostrado una rata menor de $3 - 6.6 \times 10^{-5}$ (7) y otros como Rasmussen y Friedman (2000) la colocan entre 1/7.800 a 1/23.000 gametos (6). Al respecto, se ha señalado que la edad paterna sería significativamente mayor en los casos esporádicos (neomutaciones) de NF1, como un estudio en Texas lo habría indicado(8). Pero al parecer, el efecto de la edad paterna avanzada para casos esporádicos es muy pequeño

o no existe (6,8).

Los principales rasgos fenotípicos definitorios de la condición incluyen: manchas o máculas “café con leche” (MCL), neurofibromas periféricos y nódulos de Lisch, que se presentan en la amplia mayoría de los individuos afectados y constituyen la base de la fundamentación diagnóstica (1, 2, 5, 6, 9, 10, 11).

Las MCL suelen ser el primer signo de la enfermedad y algunas pueden estar presentes desde el nacimiento, continuando su aparición y desarrollo e incrementando su tamaño hasta la pubertad. El número de MCL decrece con el tiempo y algunos pacientes de mayor edad pueden llegar a tener menos de seis máculas (5). El diámetro de estas manchas es variable, entre 0.5 a 50 cm, pero en general suelen tener menos de 10 cm. Corrientemente su contorno es liso, pero en algunas, especialmente las de mayor tamaño, puede ser irregular y ocasionalmente cubiertas de pelo. Otra de las características pigmentarias de pacientes con NF1 es la aparición de efélides en zonas que normalmente no tienen exposición solar: región submaxilar, huecos axilares y la ingle. La aparición de efélides ocurriría, después de la presencia de las MCL (1, 2, 3, 4, 5).

En pacientes adultos con NF1 se presentan los neurofibromas dérmicos, localizados en la unión dermo-epidérmica. Se manifiestan como nódulos discretos de color blanco-violáceo, de consistencia suave, casi gelatinosa al tacto y de 0.1 a varios centímetros de diámetro. Se ubican mayormente en el tronco, pero pueden presentarse en otras áreas: cuero cabelludo, cara, extremidades. En pacientes de edad y en aquéllos con numerosos nódulos, algunos de ellos incrementan su tamaño y se hacen papilomatosos. Estas lesiones son raramente dolorosas y más frecuentemente pruriginosas. Son tumores benignos que se forman en nervios periféricos y compuestos por:

células de Schwann, componentes neurales, fibroblastos y mastocitos. Una forma menos común de lesiones son los neurofibromas nodulares, que pueden presentarse en un 5 por ciento de los pacientes. Estos se desarrollan subcutáneamente sobre los principales nervios periféricos, teniendo una consistencia más firme y límites más definidos que los neurofibromas dérmicos. A menudo, ellos provocan síntomas neurológicos y suelen ser dolorosos, particularmente a la presión (5).

La presencia de otra variedad de neurofibromas, como son los neurofibromas plexiformes, los cuales constituyen una de las complicaciones, la segunda en frecuencia después de las dificultades de aprendizaje, que pueden presentar individuos afectados por NF1. Algunos estudios sitúan su incidencia en un 26.7 por ciento de los casos con la enfermedad (5). Los neurofibromas plexiformes son clínica y patológicamente distintos de los neurofibromas dérmicos. En su mayoría son obvios durante el primero o segundo año de vida. Se presentan como grandes inflamaciones subcutáneas, de márgenes mal definidos, de varios centímetros de diámetro que comprometen una porción del cuerpo (cabeza, cara, tronco, extremidades...). Su consistencia es habitualmente blanda; aún cuando ocasionalmente, troncos nerviosos hipertrofiados pueden palparse dentro de la masa tumoral, que es difusa y muy vascularizada. Neurofibromas plexiformes pueden, eventualmente, experimentar transformaciones sarcomatosas; si bien, estas pueden desarrollarse *de-novo*.

Los nódulos de Lisch, por otra parte, son hamartomas asintomáticos del iris y no meramente manchas hiperpigmentadas, los cuales pueden llegar a ser apreciados a simple vista; aún cuando, con tales propósitos es preferible utilizar el examen del iris con lámpara de hendidura (gonioscopia). Los nódulos suelen

desarrollarse durante la infancia, después de la aparición de las MCL, pero antes que los neurofibromas periféricos. Otsuka y col. (2001) realizaron exámenes oftalmológicos seriados en 70 pacientes de varias edades afectados por NF1, encontrando que los nódulos de Lisch fueron más frecuentes en casos familiares que en casos esporádicos de la enfermedad (11).

NF1 está asociada con una tendencia a la degeneración maligna de los neurofibromas, en un estimado de 3 a 15 por ciento de los casos. Knight y col (1973) revisaron 69 pacientes con un neurofibroma y 45 con múltiples neurofibromas. De ellos, 5 pacientes del grupo tenían un total de 11 lesiones secundarias malignas, incluyendo 3 fibrosarcomas, 3 carcinomas de células escamosas y 1 neurofibrosarcoma entre otras formas (12). Korf (2000), sin embargo, considera que, aún cuando la malignización de lesiones en NF1 es un componente importante de la enfermedad, la frecuencia de tales procesos suele estar sobrestimada por sesgos muestrales en la selección de casos (13).

Si bien los neurofibromas son tumores benignos, tumores malignos de la membrana de nervios periféricos pueden ocurrir (“*malignant peripheral nerve sheath tumors*” – MPNST). Además de gliomas, particularmente astrocitomas pilocíticos del nervio óptico y leucemias. El MPNST, en el pasado referido como “schwannoma maligno o neurofibrosarcoma” puede presentarse en la población general, pero es una complicación distintiva de NF1, que en su mayor parte surge a partir de neurofibromas preexistentes. Mutaciones de ambas copias del gen NF1 han sido demostradas en MPNST, pero ello parece ser también característico de neurofibromas benignos (13, 14, 15).

Existe un substancial cuerpo de evidencias que apoyan la hipótesis de que, NF1 funciona como un supresor tumoral en la patogénesis de al menos ciertos

tumores vistos en la enfermedad. Entre las evidencias se incluye, el hallazgo de pérdida de heterocigosidad (LOH) o de homocigosidad, causada por mutaciones en el gen NF1 de neurofibromas benignos (14), tanto como en tumores malignos (MPNST, Gliomas Ópticos, Leucemia no-linfocítica, Rbdomiosarcomas, Feocromocitomas...). De ahí que, pudiera colegirse que, la pérdida de la función como supresor tumoral que sufre la neurofibromina, el transcrito normal del gen NF1, es probablemente un evento crítico en la formación de neurofibromas dérmicos; pero al menos en tejido neural, no es suficiente como para causar malignización. Al efecto, hay evidencias para respaldar el papel de p53 en la formación de MPNST. Así, ratones heterocigotos dobles con mutaciones en *nf1* y *p53* desarrollan sarcomas (16, 17) y también en humanos con mutaciones en ambos loci, ocurre lo mismo para MPNST (18).

Este doble proceso mutacional conduce a la inactivación de genes que en condiciones normales funcionan como supresores tumorales. Proceso conocido como “hipótesis del doble golpe” (“*two-hit hypothesis*”), término acuñado por Alfred Knudson en su clásica monografía sobre el retinoblastoma. Por tanto, al mutar las proteínas codificadas por genes supresores tumorales se altera el crecimiento y la diferenciación ordenada de la célula, al adquirir estas una ventaja de crecimiento desregulado que predispone a su transformación (19).

Otras manifestaciones clínicas de la condición comprenden: las dificultades de aprendizaje, la macrocefalia y la baja estatura proporcionada, pero ellas no son específicas de la enfermedad y no pueden ser utilizadas, por separado, como elementos de diagnóstico. Complicaciones adicionales a las ya señaladas incluyen: hipertensión arterial (causa adicional de mortalidad en pacientes con NF1), convulsiones, neurofibromas espinales... (5, 20, 21).

Por otro lado y a título anecdótico señalaremos que, por un tiempo existió la creencia en círculos médicos, de que Joseph Merrick, inmortalizado en el cine como el “Hombre Elefante” estaba afectado de NF1 (22). Sin embargo, hoy se sabe que padecía de una rara y esporádica condición denominada Síndrome de Proteus. La confusión surge por el hecho de que ambas condiciones, el Proteus y NF1, están incluidas en el grupo de los síndromes hamartomatosos, con compromiso multisistémico y agrandamiento de segmentos corporales en un patrón mosaico y con manifiesta variabilidad fenotípica. De hecho, en el curso del programa de investigación sobre NF1 que da origen a la presente Tesis, una niña de 2 ½ años de edad nos fue referida con un diagnóstico erróneo de NF1, cuando en verdad estaba afectada por un Síndrome de Proteus (23).

2.2. Criterios diagnósticos

De acuerdo con el Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos de Norteamérica (*The National Institutes of Health – NIH. Consensus Development Conference Statement, 1988*), los criterios diagnósticos que deben cumplir pacientes con NF1 incluyen dos o más de los siguientes criterios (5,6):

1. Seis o más máculas “café con leche” de más de 5mm de diámetro en prepúberes y de más de 15 mm de diámetro en individuos postpúberes.
2. Dos o más neurofibromas de cualquier tipo o un neurofibroma plexiforme.
3. Efélides en regiones axilares o inguinales.
4. Glioma óptico.
5. Dos o más nódulos de Lisch.
6. Presencia de una lesión ósea distintiva, tal como: displasia esfenoidal o adelgazamiento de la cortical en huesos largos.
7. Existencia de un familiar en primer-grado afectado.

2.3. Variabilidad en la expresión fenotípica.

La Neurofibromatosis Tipo 1 (NF1) es notable por su variable expresión fenotípica, la cual ha sido invariablemente reportada en trabajos sobre la condición (4, 6, 24, 25, 26, 27, 28, 29). Aún cuando los principales rasgos diagnósticos: MCL, neurofibromas cutáneos y los nódulos de Lisch, suelen estar cada uno presente en más de un 90 por ciento de los casos a edades puberales, el número de lesiones y/o las manifestaciones complicativas varían grandemente, tanto entre familias con casos afectados como dentro de las mismas. Si bien la aparición de las manifestaciones acostumbra ser edad-dependientes, las razones de la variabilidad extrema ha sido objeto de varios estudios. En algunos se ha encontrado un supuesto efecto materno en la severidad de la condición (25), pero no en otros (26, 27). Tampoco se ha comprobado correlación alguna entre los estigmas fenotípicos exhibidos y el sexo del individuo afectado.

Algo de la variación en la expresión fenotípica observada, pudiera ciertamente, reflejar la naturaleza variable de mutaciones diferentes en el gen NF1. Sin embargo, ¿cómo explicar tal variabilidad en casos con agregación familiar, en los cuales la mutación segregante o transmitida sería de una misma naturaleza? (28). Por otro lado, casi la mitad de los casos reportados de NF1, serían el resultado de neomutaciones y un número de diferentes mutaciones ha sido identificado (Tabla 2).

Tabla 2
Sumario de Tipos de Mutaciones en NF1 (*)

Tipo de Mutación	Número de Casos
-------------------------	------------------------

Anormalidad Cromosómica	4
Anormalidad Completa del Gene	18
Delección Multiexónica	38
Delección Pequeña	55
Inserción Grande	3
Inserción Pequeña	27
Substitución de Aminoácido	29
Mutación de Parada	43
Mutación Intrónica	25
Mutación en Región 3' no-codificante	4
Total	246

(*)Fuente: Reportadas al NF1 Genetic Analysis Consortium. Febrero 1999 (6).

Sin embargo, estaría claro que la variable naturaleza de las mutaciones en el locus NF1, no sería la única fuente de variación fenotípica, ya que hay también considerables diferencias en la expresión fenotípica, entre miembros afectados de una misma familia (26, 29). Carey y col. (1979) por ejemplo, mostraron que tres cuartos de las familias estudiadas exhibían considerables diferencias en severidad entre los individuos afectados con NF1 (26). La variación fenotípica restante pudiera ser debida, a la acción de otros “genes modificadores”, factores ambientales o una combinación de ambos.

Al efecto, Easton y col. (29) reportan como resultado de su estudio que, la correlación de diversos rasgos fenotípicos de la condición decrece, en la medida en que el grado de relación o parentesco se hace más distante. Ello sugeriría que, genes no ligados al locus NF1 son importantes determinantes de esos rasgos. A su vez, la falta de correlación dentro de los individuos para los ocho rasgos estudiados (neurofibromas plexiformes, gliomas ópticos, escoliosis, epilepsia, dificultades de aprendizaje (Educación Especial), MCL, circunferencia cefálica y neurofibromas dérmicos), también sería sugerente de que, grupos de genes no ligados a NF1

probablemente están envueltos en la determinación de cada rasgo (29). Este patrón, pudiera eventualmente ser también, el resultado de un efecto ambiental. Sin embargo, la alta correlación encontrada entre gemelos monocigóticos cuando se compara con otros familiares, sugiere (al menos para MCL y neurofibromas) un fuerte componente genético en su expresión (29, 30).

Por otro lado, el gen NF1 es uno de los de mayor tamaño en el genoma humano, junto con los de cadenas pesada y liviana de las inmunoglobulinas (Ig's) y el de la distrofina. Tiene además dispersas en su ADN, repeticiones cortas en tándem como los microsatélites, que lo exponen a sufrir frecuentes errores recombinantes, los cuales podrían jugar algún papel en el condicionamiento de la extrema variabilidad fenotípica que tiene la condición. Tales repeticiones están presentes, tanto en secuencias codificantes como no-codificantes del gen NF1 (intragénicas); así como, en secuencias flanqueantes de sus extremos (5' y 3').

2.4. Rasgos Citogenéticas.

Upadhyaya y col. (1996) reportaron haber detectado la primera delección física que incluía al gen NF1 en un caso esporádico. El mismo presentaba, rasgos dimórficos y marcado retraso pondoestatural (31). Seguidamente, Streubel y col. (1999) describieron lo que consideraron el tercer caso mosaico de NF1, en un paciente que exhibía una manifiesta delección en 17q11.2, la cual comprometía totalmente al gen NF1. La delección fue sospechada inicialmente en cromosomas tratados con bandas G y luego confirmada, mediante la técnica fluorescente de hibridización *in-situ* (fluorescence *in-situ* hybridization. "FISH"), usando sondas que escaneaban totalmente las 350 kb del genoma perteneciente al gen NF1. Streubel y col. (1999) sugirieron también que, el complejo fenotipo mostrado por el paciente podía ser explicado, por el compromiso de secuencias que flanquean al gen NF1,

apoyando así la existencia de un síndrome de genes contiguos en 17q11.2 (32).

Los otros casos de mosaicismo somático para una delección que comprometiera por entero al gen NF1, según constatación por FISH, fueron los reportados por Tonggard y col. (1997) y por Wu y col. (1997) (33, 34). Ulteriormente, Gervasini y col. (2002) reportaron una duplicación en tandem del gen NF1, mapeada en 17q11.2 mediante FISH de alta resolución. La realización del FISH en metafases dispersas, utilizando sondas locus-específicas, reveló la duplicación del gen NF1, desde el promotor a la región 3' no transcrita ("*unstraslated region. UTR*"), pero con la ausencia del exón 22 (35). Sin embargo, en contraste con los hallazgos de Gervasini y col. Kehrer-Sawatzki y col. (2002) estudiaron una mujer quien presentaba una translocación recíproca en t (17,22) (q11.2; q11.2), lo cual determinaba que hay un solo gen en la región 17q11.2 (35, 36).

El mapeo inicial de la Neurofibromatosis Periférica (NF1) ubica al gen, en el cromosoma 17 y específicamente, en la región pericentromérica de su brazo largo (q) (Figura 1), en razón de tres evidencias: **a)** su cercano ligamiento a pAI0-41 (utilizando la sonda D17S71 que mapea en p11.2) y p3-6 (mediante la sonda D17S21, que se corresponde con las secuencias satélites alfa de la región pericentromérica). **b)** su débil ligamiento al marcador para brazo largo, como es el receptor para el factor de crecimiento nervioso NGFR, que mapea en q21-22 (37, 38); y **(c)** más recientemente se ha encontrado que, la sonda PHHH202 (D17S33) está fuertemente ligada a NF1. En tal sentido, Ledbetter y col. (1989) mediante el estudio de un paciente afectado por NF1, quien presentaba una translocación balanceada entre los cromosomas 17 y 22, evidenciaron que el punto de ruptura estaba en el cromosoma 17 en su banda q11.2 (38).

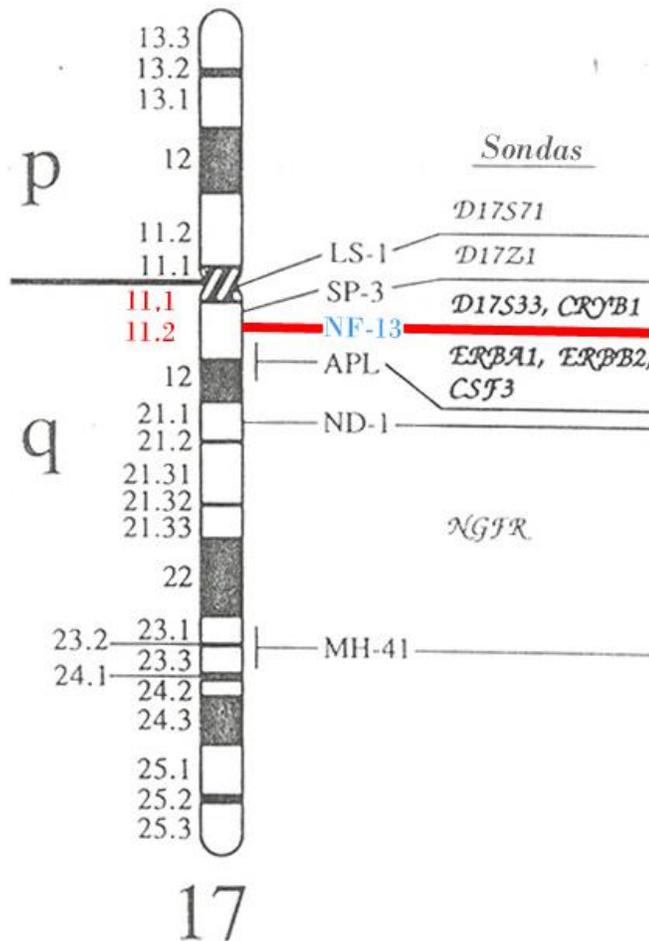


Figura 1. Ideograma del cromosoma 17 bandedo (G) mostrando el locus del gen NF1*

*Modificado de Strachan and Read 1996 (41).

2.5. Rasgos Moleculares.

El gen NF1 fue mapeado mediante análisis de ligamiento en 17q11.2 en 1987, encontrándose también que otros tres genes distintos, a saber: OMGP, EV12B y EV12A yacen intercalados en el intrón 27b del gen NF1 (37, 38). La orientación transcripcional de los tres genes está revertida (opuesta) a la que sigue el gen NF1 propiamente tal. Cada uno de estos tres genes contiene dos exones . El OMGP

codifica la glicoproteína mielínica oligodendrocítica (“*oligodendrocyte myelin glycoprotein*“); en tanto que, el EV12B y EV12A son homólogos humanos de genes/murino, que se piensa están envueltos en la leukogénesis (linfoide específicos) y localizados en sitios ectrópicos de integración viral (“*ectropic viral integration sites*“) (39,40)). (Figura 2)

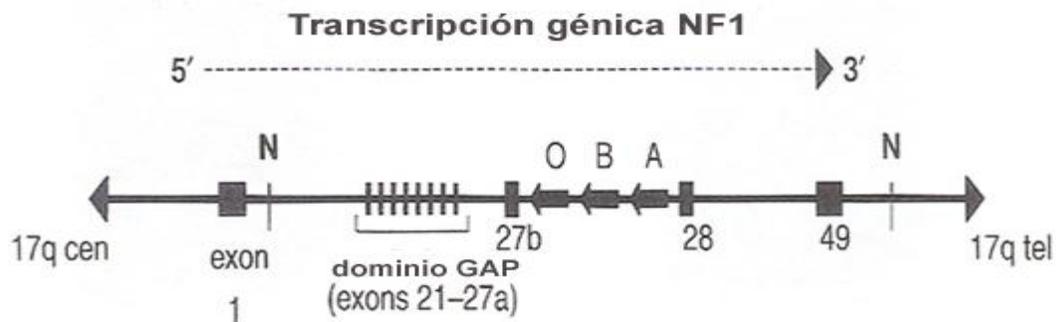


Figura 2. Esquema de la estructura genómica del gen NF1 y dirección de la transcripción*

*Fuente: Wallace and MacCollins 2001 (62).

La superposición parcial de genes, no es común en el genoma de organismos superiores como el humano. Esta suele ser más frecuente en organismos simples (procariotes), en los que la densidad génica promedio es mayor (*E. coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhaboditis elegans*). En el humano, cuando esta superposición ocurre, los genes superpuestos son transcritos a partir de hebras de ADN diferentes y ellos se sitúan en regiones cromosómicas de alta densidad, por ejemplo en la región 6p21.3 para genes del Complejo HLA, que tienen una densidad promedio de un gen por 20 kb. (39, 40, 41).

Desde el clonamiento del gen NF1, una gran cantidad de investigaciones han

contribuido a la comprensión y entendimiento de la naturaleza de las mutaciones y distribución de la proteína que codifica; así como, la creación de un modelo animal (ratón) con disrupción del gen *nf1* (41, 42).

El gen NF1 se dispone sobre 350kb del ADN genómico y codifica un mRNA de 11-13kb, que a su vez codifica 2.818 aminoácidos con una masa molecular de 220 kDa (6, 37, 40). Al respecto se ha planteado que, la elevada tasa mutacional del gen obedecería a los siguientes factores: su gran tamaño, a la presencia de secuencias intragénicas repetitivas y a la probable ocurrencia de conversión génica de interlocus (“*interlocus gene conversion*”) de varios pseudogenes-NF1 (37, 40, 41).

Entre las secuencias intragénicas repetitivas en NF1 destacan la familia de repeticiones Alu, así llamadas debido a los intentos tempranos de caracterizarlas utilizando la nucleasa de restricción Alu I. Ellas representan, una de las principales repeticiones que suelen entremezclarse con las secuencias de ADN genómico, constituyendo la más conspicua clase de SINEs humanos (“*Short Interspread Nuclear Elements*”); esto es, “elementos cortos nucleares intercalados”. Ellas son primate-específicas, pero han logrado tener un elevado número de copias en el genoma humano. Relativamente, estas repeticiones Alu tienen un alto contenido de GC; aún cuando se encuentran dispersas, principalmente en las regiones eucromáticas del genoma y en la bandas R de los cromosomas teñidos con Giemsa (42, 43).

Se ha demostrado que, frecuentemente ocurren apareamientos defectuosos entre estas repeticiones Alu (tal como AAAT Alu *repeat*) y ellas son causa de inserciones y/o deleciones. Genes de gran tamaño como NF1, al tener muchas repeticiones internas Alu son susceptibles a este tipo de alteraciones recombinantes; de ahí que, estas secuencias sean consideradas como “puntos calientes” (“*hot spot*”)

en el genoma (44,45).

Por otro lado, la familia de los microsatélites de ADN incluye, pequeños arreglos de repeticiones en tándem de secuencias simples, a menudo de 1-4 pb, que están dispersas a lo largo del genoma. Repeticiones en tándem en ADN codificante, pueden llegar a ser sitios que predispongan a expansiones patogénicas. Además de mutaciones simples (inserciones/delecciones), igualmente se presentan otras clases de mutaciones que envuelven el intercambio de secuencias, entre secuencias alélicas y no-alélicas, en las que a menudo participan repeticiones en tándem. De ahí que, el ADN con repeticiones en tándem esté predispuesto a polimorfismos causados por inserciones/delecciones de nucleótidos; mediante las cuales, diferentes alelos pueden llegar a variar en el número de copias integrales de las repeticiones en tándem. Tal variación en el número de repeticiones en tándem, polimorfismos (VNTR), puede ocurrir en el caso de repeticiones cortas como es el caso de los microsatélites.

Por ello, la alta tasa mutacional que tiene el locus NF1 está relacionada también, con la presencia de secuencias intragénicas repetitivas, tales como los microsatélites, IVS27AC28.4, ACI27.2 (ambos en intron 27b) e IVS38GT53.0 (intron 38), localizados a lo largo de un segmento de ADN de 65 kb en el gen NF1 y en desequilibrio de ligamiento. De ahí que hasta el año 2003, se habían registrado para el locus 246 tipos de mutaciones diferentes (*National Neurofibromatosis Foundation – International NF1 Mutation Analysis Consortium*) (43).

El gen NF1 codifica para un transcrito de gran tamaño, la neurofibromina, que está truncada o mutada en sujetos afectados por NF1. Por cuanto el gen estaría inactivado en células tumorales, se piensa que normalmente actúa como un supresor tumoral (45, 46). Cuatro trozos o segmentos del transcrito han sido identificados,

siendo tres de ellos examinados, encontrándose que muestran actividad diferencial en varios tejidos (5).

La neurofibromina tiene un segmento (dominio) central de 150 aminoácidos, que muestra homología con la familia de proteínas conocidas como: proteínas Ras-específicas activadoras de GTPasa (“Ras-specific GTPase activating proteins”). Esta región es llamada “GAP-Related Domain” (NF1- GRD) y apenas representa el 10 por ciento del segmento codificante del gen (19, 45). Las proteínas GTPasa activadoras, a su vez, están envueltas en la regulación negativa o represora del proto-oncogene ras. Al efecto, la función normal de la neurofibromina es la de acelerar la conversión de ras activo ligado al GTP, en ras inactivo ligado al GDP mediante la hidrólisis de GTP. En consecuencia, al ocurrir la expresión normal de la neurofibromina hay menos Ras activo y se reduce la señalización para que la célula se divida y multiplique en mitosis. Por el contrario, en células tumorales NF1, al producirse la inactivación funcional del gen NF1, la neurofibromina deja de producirse o lo hace de forma estructuralmente anormal y ello acarrea, la pérdida de actividad ras GAP (Figura 3). Esta ausencia de neurofibromina tiende al incremento de los niveles de actividad del oncogenes Ras y con ello, del crecimiento celular (46, 47).

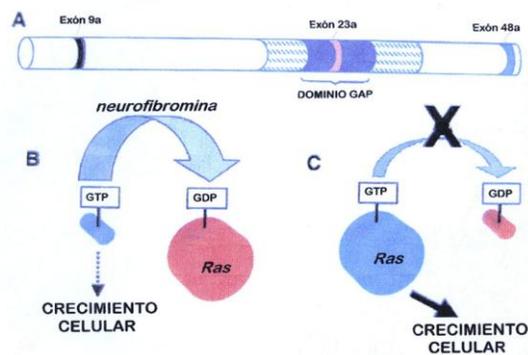


Figura 3. Mecanismo de acción de la Neurofibromina*

***Fuente: Gutmann DH, 2001 (19)**

Por tanto, la neurofibromina está envuelta en el control del crecimiento y la diferenciación celular, al menos por tres posibles mecanismos: a) como regulador negativo o represor (“*down-regulator*”) aguas arriba del p21 ras; b) como un efector aguas abajo (“*downstream effector*”) y c) como una proteína de unión entre la tubulina y el p21 ras. Asimismo, experiencias han mostrado que las mutuas regulaciones entre ras y NF1-GAP son esenciales para la normal diferenciación neuronal; de ahí que, su alteración pudiera estar relacionada con las dificultades de aprendizaje y reducción del cociente intelectual que llegan a exhibir una buena cantidad de pacientes afectados por NF1. (47, 48).

De otra parte, ratones homocigotos para el mutante *nf1*, carecen de neurofibromina en todos los tejidos y no sobreviven más allá del día 14 de su periodo embrionario, mostrando anomalías de desarrollo generalizadas. Pero, los ratones heterocigotos, si bien no muestran los rasgos clásicos de NF1, parecen tener una mayor susceptibilidad hacia algunos tumores que son frecuentemente vistos en la enfermedad humana, tales como: feocromocitomas, leucemia mieloide, leucemia linfoide, adenocarcinoma del pulmón, hepatoma y fibrosarcoma. Estas evidencias, también respaldan el papel de supresor tumoral que tendría el transcrito del gen NF1 (49).

Aún cuando la función de supresor tumoral que tiene la neurofibromina ha sido atribuida a su actividad rasGAP, esta porción de la molécula solo representa un 10 por ciento de la región codificante del gen NF1 ; de manera que, surge la posibilidad de que algunos rasgos clínicos de NF1 puedan ser atribuidos a otras funciones no-rasGAP de la neurofibromina (19).

En tal sentido, estudios en *Drosófila* han sugerido que la neurofibromina pudiera funcionar también, regulando la señalización de la proteína kinasa A (PKA) (50). Esta noción estaría respaldada en experimentos en los cuales, la pérdida de neurofibromina influencia la respuesta de las células de Schwann al AMP cíclico (51). Aún cuando, una relación directa entre deficiencia de neurofibromina, señalización de PKA y niveles de cAMP no ha sido demostrada en células de mamíferos, estos estudios sugieren que el mecanismo de regulación del crecimiento celular pudiera extenderse más allá de la actividad rasGAP que tiene la neurofibromina.

Otras pistas acerca de posibles funciones no-rasGAP de la neurofibromina se han derivado del estudio en fragmentos del gen NF1. En tal sentido, tres fragmentos alternativos se han reportado: exón 9^a, exón 23^a y exón 48^a. Mientras el exón 48^a de la neurofibromina se expresa específicamente en tejido muscular (52), la neurofibromina contentiva del exón 9^a está restringida a las neuronas cerebrales y su expresión está regulada, tanto regionalmente como durante el desarrollo (53). Este especial residuo -10 del exón en el extremo N-terminal de la proteína, pudiera conferirle a la neurofibromina, especiales propiedades que resultan relevantes en el funcionalismo neuronal.

Por otra parte, la neurofibromina se ha encontrado asociada con los microtúbulos, sugiriéndose su involucramiento en la señalización de la traducción de la vía micotúbulo-mediada y con ello, su papel en la reorganización estructural del citoesqueleto (54). Por otra parte, la tubulina inhibe la actividad GAP y la región de acoplamiento con la tubulina parece superponerse con el “GAP-Related Domain” (NF1GRD) (*vidae supra*) (55).

En un esfuerzo por determinar los eventos genéticos que pudieran cooperar junto con la pérdida funcional de neurofibromina, para promocionar la aparición y progresión tumoral, diversos grupos han centrado su atención en la proteína p53. En tal sentido, estudios realizados a finales de los años 70 revelaron que, es una fosfoproteína celular con una masa molecular relativa de cerca 53.000 Daltons que forma un apretado complejo con el antígeno del virus SV40, de ahí deriva su denominación de p53. Trabajos posteriores mostraron que, la p53 también forma complejos con otros productos oncogénicos virales, incluyendo el adenovirus E1B; además de que, estaba presente en bajos niveles en células normales y en altos niveles en células de diversos tumores.

Estos hallazgos iniciales llevaron a sugerir que, los altos niveles de p53 podían contribuir al desarrollo canceroso. Consistente con esta noción, estudios de transferencia de genes aportaron nuevos datos acerca de que p53 funcionaba como un oncogene en experimentos *in-vitro*. Sin embargo, subsecuentes estudios mostraron que p53 era en realidad un supresor tumoral.

El gen supresor tumoral TP53 está localizado en el cromosoma 17p13.1 (Miller C, et al. 1986) con 11 exones y es transcrito en todos los tejidos con diferente grado de eficiencia. Sería el gene más frecuentemente alterado en tumores humanos (56). Mutaciones somáticas de TP53 y desregulación de sus proteínas reguladoras asociadas, han sido implicadas en el desarrollo de una variedad de tumores, incluyendo mutaciones germinales que constituyen la base etiológica del Síndrome de Li Fraumeni (cáncer del seno, tumores del SNC y sarcomas) (57).

La p53 cumple un amplio campo de funciones en la célula y suele ser llamada “el guardián del genoma”. Una de estas funciones es la de representar un punto de chequeo en la progresión del ciclo celular de la fase G1 a S. Así, cuando las células presentan daño en su ADN, ellas son represadas en G1 hasta que el daño sea reparado, para pasar entonces a la fase S de replicación de ADN y luego a la fase M de multiplicación (división) celular. A su vez, la replicación en fase S de un ADN dañado, conduciría a cambios genéticos al azar, algunos de los cuales pueden ser oncogénicos (42).

Probablemente relacionado con este crucial papel de la p53 está, el que ella cumple como estímulo, para que células que muestren cambios oncogénicos progresen hacia la apoptosis o muerte programada (Gráfico 1).

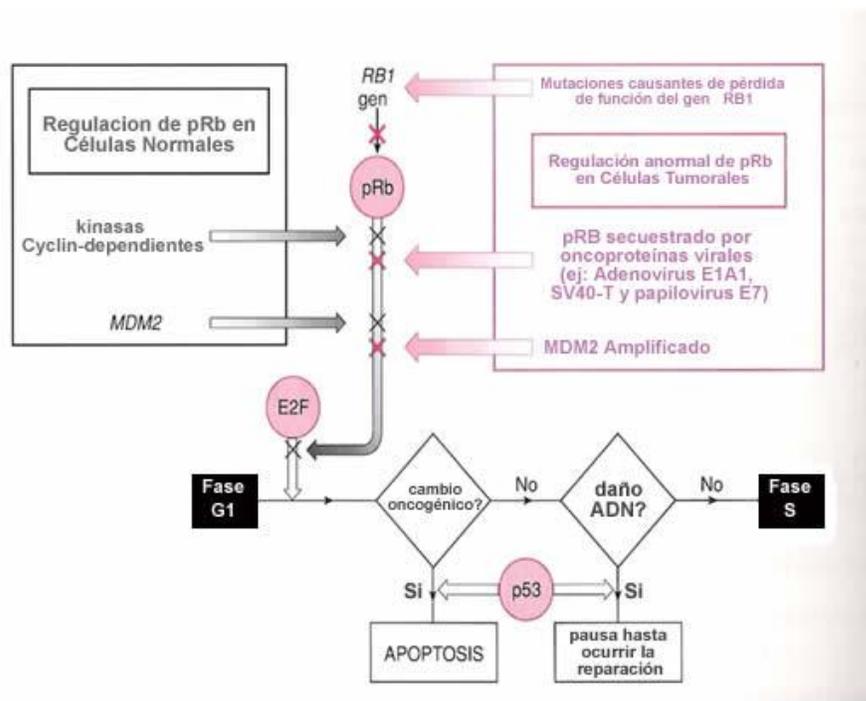


Gráfico 1. Mecanismos de control de la proliferación celular por la p53

*Modificado de T. Strachan y Read A. P (41)

Por el contrario, si la p53 se encontrara ausente o funcionalmente inactiva, el ciclo celular proseguiría con la consiguiente proliferación de clones celulares oncogénicos. Aunque el mecanismo de autodestrucción programada (apoptosis) se activa en respuesta a una diversidad de circunstancias, el proceso de apoptosis sigue los mismos pasos, independientemente de cuál haya sido la circunstancia determinante.

La apoptosis produce primero, la fragmentación del ADN cromosómico, la desorganización estructural de las organelas y la pérdida de la morfología normal, haciéndose esféricas las células apoptóticas. Luego, las células se descomponen en fragmentos celulares pequeños, denominados cuerpos apoptóticos, que son fagocitados por los macrófagos. Los inductores de la autodestrucción son unas proteasas denominadas caspasas (del inglés “cysteine-containing aspartate-specific proteases”), las que al activarse cortan a nivel de determinados residuos de aspartato a las proteínas diana (42, 58).

TP53 es uno de los genes supresores tumorales mejor estudiado y cuyas funciones están afectadas en la mayoría de los procesos malignos. TP53 es un componente clave en los mecanismos de respuesta de emergencia, que convierte una variedad de señales, tanto intra como extracelulares, ante situaciones de stress. Ellas serían las resultantes de daño al ADN, o las derivadas de conflictivos estímulos, positivos y negativos, de detención del crecimiento celular o de apoptosis. El transcrito de TP53, la p53, es un componente esencial del control celular de la senescencia. Su actividad resulta en la eliminación de células dañadas potencialmente peligrosas. Además, la posición única que tiene TP53 en un conjunto de vías de señalización (Gráfico 1) y su involucramiento en numerosas interacciones, la hacen

proclive a la frecuente adquisición de mutaciones con la consiguiente inactivación de su transcrito; pero también, a menudo cambiando sus propiedades, convirtiéndolo de supresor tumoral en oncogene (Komarova EA, et al. 1997; Komarova EA, et al. 2001).

El transcrito (p53) contiene 393 aminoácidos y es difícilmente detectable en células normales, debido a su rápida degradación por los proteosomas. La proteína que codifica TP53 contiene diversos dominios funcionales. El extremo amino-terminal (aminoácidos 1-50) es un dominio de transactivación, envuelto en la modulación de “genes diana”. Este sitio es también responsable de la interacción con MDM2 (*mouse double minute gene*), una proteína con actividad de ligasa que controla la degradación de p53 por los proteosomas (Ko Lj and Prives C. 1996). El dominio central, entre los aminoácidos 100-300, participa directamente en el reconocimiento y enlace con secuencias de ADN específicas (Cho Y, et al. 1994). A su vez, el locus entre los aminoácidos 323 y 356 es responsable de la oligomerización de la molécula p53 en tetrámeros, la forma bajo la cual esta proteína funciona en la célula (Kussie PH, et al. 1996; McLure KG and Lee PW. 1998).

El dominio carboxi-terminal (aa: 363-393) es esencial para la regulación de la actividad de enlace con otras proteínas interactuantes. Además, el extremo carboxi-terminal de p53 es capaz de establecer enlaces no específicos con regiones de ADN de una sola cadena, con bases no-pareadas y con extremos terminales de ADN, indicando su participación en el proceso de reconocimiento del ADN dañado (Bakalkin G, et al. 1995).

La conclusión general derivada de numerosos estudios, es la de que TP53 es un regulador negativo (represor) del crecimiento celular, el cual una vez activado,

induce la detención del crecimiento en puntos específicos y diversos del ciclo celular o la apoptosis dependiendo de la célula y las condiciones de crecimiento. Por ejemplo, timocitos entran en apoptosis después de sufrir daño en el ADN (Clarke AR, et al. 1993); mientras que, los fibroblastos predominantemente van a una detención irreversible del crecimiento (Petitjean A, et al. 2007).

Los mecanismos TP53-dependientes destinados a eliminar células anormales son altamente eficientes y proveen un potente escudo contra la proliferación y supervivencia de células que han quedado expuestas a una variedad de condiciones dañinas o sufren alteraciones en la duplicación celular. Estos mecanismos previenen, cualquier posibilidad de selección de una célula con ventajas de crecimiento o metabólicas sobre sus competidoras. Por tanto, sin inactivación o disrupción de las vías de acción de TP53, el proceso de carcinogénesis es virtualmente imposible. Sin embargo, una vez que los mecanismos TP53 se inactivan, condiciones para la rápida acumulación de cambios genéticos se establecen, los cuales llevan a una dramática desestabilización del genoma y la aceleración de la carcinogénesis.

Se estima que mutaciones en TP53 constituyen la más común de las aberraciones genéticas en el cáncer humano. Aproximadamente, 80 por ciento de las mutaciones en TP53 (mayormente “mutaciones sin sentido”) estarían agrupadas en un segmento de ADN genómico comprendido entre los exones 5-8. En total, 25-50 por ciento de los tumores de mama y hasta 60 por ciento de los tumores ováricos presentan mutaciones en TP53 (Casey G, et al. 1981; Soussi T, et al. 2000; Levine AJ. 1997; Anselmo NP, et al. 2009; Armstrong AB, et al. 2009; Karim S, Ali A. 2009; Olivier M, et al. 2006; Sigal A, Rotter V. 2000, Martin AC, et al. 2002).

En más de 10.000 tumores humanos analizados hasta el 2000, entre 45-50 por ciento contenían mutaciones inactivantes dentro del gen TP53. La frecuencia varía de un tipo de tumor a otro. Mutaciones de punto dentro del gen TP53 han sido observadas en 60-65 por ciento de las neoplasias de pulmón y colon; 40-45 por ciento de cáncer de estómago, esófago y vejiga; 25 por ciento de mama, hígado, próstata y solo un 10-15 por ciento de las leucemias (Komarova EA, et al. 2001; Armstrong AB, et al. 2009; Karim S, et al. 2009; Olivier M, et al. 2006).

Un total de 80-85 por ciento de las mutaciones de punto son “mutaciones sin sentido” y localizadas dentro del “evolutivamente conservado dominio específico de enlace con ADN” (*evolutionally conserved specific DNA-binding domain*) (Hansen R and Oren M. 1994; Levine AJ. 1997). TP53 mutantes pierden la habilidad de reconocer sitios apropiados de enlace con el ADN y de activar la transcripción de genes que responden a TP53. De otro lado, p53 tiende a acumularse en la célula debido a la disminución de su degradación. La p53 mutada es capaz de oligomerizarse con el producto de otros alelos normales, ejerciendo un efecto negativo dominante. Por tanto, “mutaciones sin sentido” en TP53, resultan en una inmediata inactivación de los mecanismos TP53 - dependientes.

En todo caso, se ha comprobado que la mutación NF1 puede estar asociada con mutaciones de TP53 en MPNST humanos (*vidae supra*). De igual modo, en ratones heterocigotos dobles *nf1* y *p53* mutantes, se desarrollan grandes sarcomas como resultado de la pérdida de expresión, tanto de neurofibromina como de p53 (19).

En otro orden de ideas, se han adelantado algunos resultados en los que se postula la influencia de secuencias repetitivas en tandem, tanto intragénicas como flanqueantes del gen NF1, en la expresividad de algunas de sus manifestaciones, particularmente en los procesos de malignización y tumorigénesis en general (59, 60, 61). Al efecto, por lo menos un informe sugiere, la presencia de inestabilidad en microsatélites en una porción de neurofibromas (59), pero otros no han encontrado tal anomalía (63). No obstante, las alteraciones de microsatélites siguen siendo utilizadas como marcadores clonales para la detección del cáncer y la caracterización de mutaciones (62,63,64, 65, 66).

Sin embargo, todavía no hay claras correlaciones genotipo-fenotipo en NF1; de ahí que, estudios más extensos sean requeridos y en los que puedan incluirse información clínica más detallada para diferentes edades. Los avances hasta ahora logrados, plantean la posibilidad de que, rasgos fenotípicos que incrementan la variable expresividad, pudieran ser debidos a secuencias intragénicas o flanqueantes del gene NF1, las cuales también predispondrían a la malignización de lesiones tumorales (67, 68, 69).

2.6. Definición de términos (glosario).

Alelo: una de varias formas alternativas de un mismo gen. Una de dos o más formas alternativas de un mismo gen, que ocupan el mismo locus en un cromosoma dado. Su actividad concierne con el mismo proceso bioquímico o de desarrollo.

Alfa-satélite ADN: clase de satélite de ADN con una longitud promedio de repeticiones de cerca 170 bp encontradas en los centrómeros.

Alu (repeticiones o secuencias): familia de repeticiones con un

relativamente alto contenido de GC, dispersas en las regiones eucromáticas del genoma, que han sido reportadas preferencialmente localizadas en las bandas R de los cromosomas. Estas últimas corresponden a las bandas claras de los cromosomas con bandas G (Giemsa). Las repeticiones Alu son las más abundantes del genoma humano y representan regiones de la más alta actividad transcripcional.

Alineamiento: (del inglés “*Annealing*”). La asociación de una cadena de ADN complementario (o ARN) para formar estructuras de doble cadena.

Apoptosis: muerte celular programada.

Bacteriófago: virus que infecta a bacterias.

cADN: ADN sintetizado por la enzima transcriptasa invertida usando mRNA como templado.

CpG: (dinucleótido): un dinucleótido con una citosina en su extremo 5', conectado por un enlace fosfodiéster a guanina en el extremo 3'. Es un punto caliente mutacional, por la tendencia de la citosina a ser metilada y subsecuentemente deaminada a timina.

Cebador: ADN o ARN pequeño y de una sola cadena, que unido a una cadena molde aporta el extremo 3' a partir del que se prolongará la nueva cadena.

Cosegregación: transmisión conjunta de dos genes, a causa de su estrecho ligamiento en un cromosoma.

Dominante: el carácter de un gen, cuando es capaz de expresarse tanto en

estado homocigoto como heterocigoto.

Duplicación en tandem: segmentos cromosómicos de secuencias nucleotídicas idénticas adyacentes.

Enzima de Restricción: Endonucleasa que reconoce una secuencia específica de nucleótidos de ADN como punto de corte y secciona en esa “diana” ambas cadenas de ADN.

Exón: secuencias codificantes de un gen.

Fase G1: Periodo del ciclo celular que precede a la fase S.

Fase G2: Periodo del ciclo celular que sigue a la fase S.

Fase S: Periodo del ciclo celular en el que se realiza la duplicación o replicación (síntesis) del ADN.

Fenotipo: forma que toma un carácter (o conjunto de caracteres) en un individuo particular. Manifestación externa observable de un genotipo concreto.

Gen supresor de tumores: Gen que codifica una proteína que suprime la aparición de tumores, actuando como reguladores negativos de la proliferación celular.

Heterocigoto: individuo portador de alelos diferentes en un mismo locus de un gen.

Homocigoto: individuo portador de alelos idénticos en un mismo locus de un gen.

Intrón: Secuencias no-codificantes, que en el ADN separan los exones de un gen.

LINE: del inglés: “*long interspersed nuclear elements*”. Una clase de secuencias de ADN, moderadamente repetitivas.

LOH: del inglés “*loss of heterozygosity*”. Pérdida de alelos en un cromosoma, detectada por la utilización de marcadores a los cuales el individuo es constitucionalmente heterocigoto.

Minisatélite (ADN): Arreglos intermedios (a menudo menores de 0.1 kb) de repeticiones en tandem de secuencias de ADN.

Microsatélite: Secuencias cortas de repeticiones en tándem constituidas por entre 2 y 6 nucleótidos.

Mutación: Una alteración heredable en la secuencia de nucleótidos del ADN.

Mutator (Gen): Una clase común de genes, que cuando mutan producen la formación de tumores.

Oligonucleótido: Fragmento pequeño de ADN sintético.

Oncogen: Un gen envuelto en el control de la proliferación celular, que al activarse ayuda a transformar la célula normal en tumoral.

PCR: del inglés “*polymerase chain reaction*”. Reacción en cadena de la polimerasa.

Polimorfismo: La existencia de dos o más alelos, en frecuencias

significativas en la población.

Protooncogen: Secuencias alélicas que al ser activadas se convierten en oncogenes.

Promotor: Región reguladora próxima al extremo 5' de un gen y que actúa como punto de unión de la ARN polimerasa.

RFLP: del inglés "*restriction fragment length polymorphism*".

SSCP: del inglés "*Single strand conformation polymorphism*". Polimorfismo de Conformación de Cadena Sencilla.

SINE: del inglés "*Short Interspersed Nuclear Elements*". Tipo de ADN repetido, de pequeño tamaño, que se encuentra disperso en el genoma. El más conspicuo SINE humano es la familia de repeticiones Alu; llamadas así, por los tempranos intentos para caracterizar su secuencia utilizando la nucleasa de restricción AluI.

Transcripción: Proceso de síntesis de ARN a partir de ADN con la mediación de la ARN polimerasa.

CAPITULO III

MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Muestra Poblacional

Se estudiaron 33 familias con un total de 116 individuos, de los cuales 70 exhibían manifestaciones clínicas e imagenológicas diagnósticas de NF1, según criterios internacionalmente admitidos (5, 6). De los afectados, 53 pertenecían al sexo femenino y 17 al masculino. El rango de edades estuvo entre los siete meses y los 75 años de edad. Ancestros (abuelos) de casos índice, eran originarios de diferentes localidades geográficas del país y estos últimos, fueron referidos para la certificación diagnóstica y el Asesoramiento Genético correspondiente, desde el Hospital “Enrique Tejera”. Departamento de Dermatología (Valencia – Edo. Carabobo) y otros centros de atención médica del país, a la Unidad de Genética Médica y Citogenética (Departamento de Ciencias Fisiológicas. Cátedra de Fisiopatología. Escuela de Ciencias Biomédicas y Tecnológicas. Universidad de Carabobo. Valencia-Edo. Carabobo).

3.2. Métodos

Evaluación Clínica:

Incluyó: obtención de la Historia Médica familiar con el mayor número de generaciones y de individuos ubicables, con datos relevantes como: lugar de nacimiento, edad, antecedentes de morbilidad, en particular de afecciones dermatológicas (manchas, tumoraciones..), baja estatura, dificultades de aprendizaje, escoliosis y cualquier otra displasia ósea, procesos malignos, causas de muerte.. Todo pariente biológico del afectado (a) sospechoso y accesible, fue incluido voluntariamente en el estudio, de ser ello

posible.

La evaluación fenotípica comprendió la toma de datos biométricos del paciente: talla, peso, circunferencia cefálica, distancia intercantal interna y externa, tensión arterial; seguida por, examen físico detallado con contaje y medición de máculas “café con leche” y neurofibromas cutáneos.

La evaluación gonioscópica (biomicroscopía), para precisar la existencia de los nódulos de Lisch en el estroma iridiano, fue realizada en el Centro Oftalmológico de Valencia (CEOVAL), con lámpara de hendidura Topcon por la oftalmóloga, Dra. Mónica Suárez M.

En los casos donde fue necesario estudios de Resonancia Magnética (RM), se empleo indistintamente, un resonador Symphony. MR 2002 B o un Marconi, Medical System, Inc-Eclipse.

Cuando se hizo necesario, los estudios histopatológicos (biopsia) fueron realizados en el Servicio de Dermatología del Hospital Central (Valencia) por los Dres. Marco Tulio Mérida (+) y Luz Marina Aular. En todos los pacientes y bajo consentimiento informado, se documentaron fotográficamente las lesiones relevantes.

Toma de Muestra

Con fines de extraer ADN de células linfocitarias, se tomó de cada paciente 1 ml de sangre periférica, utilizando como anticoagulante una solución de ácido Etilén Diamino Tetraacético (EDTA) al cinco por ciento, en una proporción de 1:10.

Extracción de ADN

El ADN genómico se obtuvo a partir de leucocitos aislados de una muestra de

300 μ L de sangre periférica utilizando una modificación del método de Miller y col. 1988 (70), basado en una extracción salina, seguida de precipitación con etanol. Para ello, se pasan 300 μ L de sangre a un tubo de 2 ml y se tratan con 1 ml de solución de lisis de glóbulos rojos N° 1 (Tris HCl 10 mM pH: 7,5; MgCl 5 mM, NaCl 9,9 mM y EDTA Na₂ 2 mM pH: 8), luego se centrifuga a 2.700 revoluciones por minuto (rpm) durante 10 minutos a temperatura de 25 °C, produciéndose la lisis de los glóbulos rojos por choque hipotónico. Se extrae la máxima cantidad posible de sobrenadante que se descarta.

El taco (“pellet”) es luego tratado con 600 μ L de solución de lisis de glóbulos rojos, centrifugándose de nuevo en las mismas condiciones anteriores, con fines de obtener los glóbulos blancos. Estos son resuspendidos en 225 μ L de tampón Tris-EDTA (TE) pH: 7,2 en proporción 20:5, agregándose a continuación 14 μ L de SDS al 10 por ciento y 4 μ L de Proteinasa K con una concentración de 10 mg/ml, para luego incubarse en estufa a 50 °C durante 1-2 horas con agitación suave.

Finalizada la incubación, a la mezcla anterior se le agregaron 13,5 μ L de Acetato de Amonio 7M y 750 μ L de isopropanol, se agitó por inversión y a continuación se observó el ADN extraído en forma similar a una medusa pequeña, el cual es recuperado con punta siliconada o mediante centrifugación a 4.000 rpm a 0 °C durante 15 minutos. El ADN se lava dos veces con isopropanol al 70 por ciento, se seca mediante centrifugación al vacío para evaporar el isopropanol y a continuación, se disuelve en tampón TE 10:1 utilizando entre 200 y 300 μ L, dependiendo del tamaño del “pellet”. Una vez que el ADN fue bien resuspendido, se determinó su concentración y pureza mediante espectrofotometría.

Para ello, se diluyeron las muestras en agua desoionizada y se practicaron lecturas de absorbancia (A) a 260 y 280 nanómetros (nm). Los cálculos se efectuaron utilizando la fórmula siguiente:

$$\text{Concentración de ADN } \mu\text{g/mL} = A_{260} \times \text{dilución} \times 50$$

Cincuenta es un valor constante que indica lo siguiente: una solución de ADN de doble cadena (hebra) que contenga 50 $\mu\text{g/ml}$, tiene una medida de absorbancia de $A_{260} = 1$

Para garantizar que las muestras tengan un mínimo de contaminantes protéicos, se estableció la relación entre las dos lecturas; la obtención de un índice A_{260}/A_{280} con un valor entre 1.7 – 1.9 es indicativo de una buena desproteinización. A su vez, la verificación de la integridad de la muestra de ADN se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al uno por ciento durante una hora a 80 Voltios, empleándose como referencia el marcador de tamaño Fago Lambda Hind III. Una vez finalizada la corrida electroforética, se reveló el gel en una solución de Bromuro de Etídio durante dos minutos. Al visualizar las bandas obtenidas mediante luz ultravioleta, estas deben observarse bien definidas y con una migración pareja entre 21 kb – 23 kb, lo cual garantiza la integridad del ADN (71).

Análisis de Polimorfismos de longitud de microsatélites intragénicos del gene NF1

Como se ha señalado (*vidae supra*), la presencia de secuencias intragénicas repetitivas en el gene NF1, lo hace especialmente vulnerable a distintos tipos de alteraciones recombinantes. Entre esas secuencias repetitivas están las secuencias Alu y los microsatélites IVS27AC28.4 e IVS38GT53.0, cuyos Haplotipos se encuentran en desequilibrio de ligamiento

(43, 72). De ahí que, se considerara pertinente analizar estos dos marcadores microsatélites en una población de individuos afectados por NF1, como aproximación al estudio de las causas de la notable variabilidad en la expresión fenotípica que tiene la enfermedad y por la otra, en la búsqueda de marcadores informativos con poder predictivo para el diagnóstico de NF1 en miembros “presintomáticos” de familias afectadas (Oguzcan y col. 2003, Spits y col. 2005) (43, 87).

La muestra estuvo constituida por 29 casos índice segregantes, afectados por NF1. A todos los individuos se les confirmó el diagnóstico clínico en la UGMC (Dpto. de Ciencias Fisiológicas. Cátedra de Fisiopatología. Escuela de Ciencias Biomédicas y Tecnológicas. FCS.UC. Valencia), de acuerdo a las pautas biomédicas internacionalmente establecidas (5,6). Los pacientes tenían un rango de edad entre 2 ½ años y 69 años. También se incluyeron 50 muestras de ADN de individuos sanos, es decir no padecían la enfermedad, provenientes del Banco de Muestras del Laboratorio de Biología Molecular, las cuales sirvieron como grupo de referencia, para establecer diferencias con la distribución de los alelos de los marcadores microsatélites, en el grupo de sujetos con NF1.

Se estudiaron los polimorfismos de longitud de los marcadores genéticos de tipo microsatélite: IVS27AC28.4 (para repeticiones AC: Adenina y Citosina) e IVS38GT53.0 (para repeticiones GT: Guanina y Timina) cuyas características principales se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3
Marcadores Microsatélites Usados en la Investigación

Microsatélite	Ubicación en Gene NF1	Repetición	Oligonucleótidos Cebadores*	Tamaño del amplicón (pb)
IVS27AC28.4	Intrón 27b	AC	5'GTT CTC AAC TTA AATGTAAGT 3'	207
			5'GAA CATTAA CAA CAA GTAC C 3'	219
IVS38GT53.0	Intrón 38	GT	5' CAG AGC AAG ACC CTG TCT 3'	171
			5'CTC CTA ACA TTT ATT AAC CTTA 3'	187

*Fuente: Genoma Database (73).

La obtención de los productos amplificados (amplicones) se realizó mediante la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), la cual consiste en la amplificación selectiva de una secuencia de ADN de doble cadena (hebra) efectuada *in vitro*, haciendo uso de dos oligonucleótidos cebadores, que se hibridan con secuencias complementarias en cadenas opuestas de ADN, resultando la secuencia blanco sintetizada gracias a la acción de una enzima ADN polimerasa. Para ello, en primer lugar, la muestra de ADN se somete a procesos de calentamiento con fines de separar las dos cadenas y permitir que los cebadores se unan al ADN. Luego, cada hebra es copiada por la polimerasa. Cada una de las dos cadenas de ADN, sirve como molde o patrón para la síntesis de la secuencia específica a partir de los dos cebadores. Este procedimiento realizado en ciclos repetidos, produce la amplificación exponencial de segmentos blancos de ADN de longitud definida (74).

Las condiciones de la reacción de amplificación para ambos microsatélites, se optimizaron tomando como base la información reportada por Fang y col. 2001 (64). Para el microsatélite IVS27AC28.4 las condiciones del ensayo PCR fueron: MgCl₂ 1 mM, dNTPs 180 µM, oligonucleótidos cebadores 0,250 µM, 1 U de la enzima ADN

Taq polimerasa (Promega N° catálogo 8291), 20 ng de ADN, tampón PCR 1X y para el microsatélite IVS38GT53.0 fueron: MgCl₂ 1 mM, dNTPs 130 μM, oligonucleótidos cebadores 0,150 μM, 1 U de la enzima *Taq* Polimerasa (Promega N° catálogo M8291), 8 ng de ADN, tampón PCR 1X. En ambos casos se utilizó un volumen final de 25 μL. En todos los ensayos se incluyó un control negativo que contiene todos los componentes de la reacción, pero sin el añadido de ADN.

El programa de amplificación utilizado para IVS27AC28.4 constó, de una pre-desnaturalización por 120seg a 96°C, seguido de 30 ciclos cada uno de ellos con una desnaturalización de 30seg a 94°C, hibridación de los cebadores 30seg a 55°C, extensión 30 seg. a 72°C y por último, una extensión final de 60seg a 72°C. Respecto a IVS38GT53.0, se emplearon las mismas condiciones, con la diferencia en la temperatura de hibridación de los cebadores que fue de 52°C. La verificación de la presencia del producto PCR se cumplió, mediante la realización de electroforesis en gel de agarosa al dos por ciento, en condiciones similares a las descritas para la verificación de la calidad del ADN durante su proceso de extracción (*vidae supra*).

Para diferenciar los alelos presentes en cada uno de los marcadores analizados en los pacientes seleccionados, se realizó electroforesis en gel de poliacrilamida al 8 por ciento en placas 16 x 30 cm, utilizando tampón Tris-Borato 45 mM EDTA 1 mM pH: 8,19, con un tiempo de migración de 14 horas a 200 Voltios y posteriormente revelado con sales de plata. Se utilizó como referencia el marcador de tamaño de 50 pb para IVS27AC28.4 y de 100 pb para IVS38GT53.0. En virtud de la dificultad de estimar el tamaño de los alelos con la utilización de estos marcadores y el hecho de no disponer de una escalera alélica, se tomó como base que las moléculas de ADN lineal de doble cadena migran a través de una matriz de gel, a una velocidad inversamente proporcional al log₁₀ del número de pares de bases nucleotídicas, que

componen a dicha molécula. Se diseñó un procedimiento dirigido a diferenciar los alelos en función del tamaño, para ello se midió la distancia en cm recorrida, desde el bolsillo hasta la banda correspondiente a cada uno de los alelos. Este procedimiento se realizó al menos con tres geles diferentes y se efectuó otra electroforesis para las muestras de individuos sanos.

Detección de mutaciones en la secuencia que contiene los exones 7-9 del gen TP53:

Para este análisis se incluyeron cuatro casos índice con diagnóstico de NF1, los cuales fueron seleccionados por sus manifestaciones tumorales (número y/o tamaño) y/o malignidad de lesiones; también se incluyeron tres familiares afectados de los mismos. La amplificación de esta secuencia mediante PCR, se realizó de acuerdo a las condiciones establecidas previamente en el Laboratorio de Biología Molecular por Flores-Angulo (75). Las concentraciones finales del ensayo PCR fueron: MgCl₂ 2 mM, dNTPs 125 μM, oligonucleótidos cebadores 0,150 μM, 0,75 U de la enzima ADN *Taq* polimerasa (Sigma N^o D4545), 20 ng de ADN, tampón PCR 1X, todo en un volumen final de 25 μL.

Las secuencias de los oligonucleótidos cebadores utilizados son: (sentido) 5'GTG TTATCTCCTAGGTTGGC 3', (antisentido) 5' AGACTTAGTACCT GAAGGGT 3' (73). El producto esperado tiene un tamaño de 780pb. El programa de amplificación incluyó: desnaturalización inicial a 94°C x 2min, seguida de 30 ciclos de amplificación (Desnaturalización 94°C x 45seg; Hibridización de cebadores 60°C x 45seg; Extensión 72°C x 1 seg.). Al final de los 30 ciclos, se realizó una extensión final de 7 min. a 72°C (76,77). Los productos PCR se evidenciaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida

al 8 por ciento, sometido a 150 Voltios durante 2 horas y luego revelado con sales de plata.

Análisis del Polimorfismo de Conformación de Cadena Sencilla (SSCP)

Para este análisis se siguieron las recomendaciones dadas por Hung & Ping (2008), (78). y se modificó el protocolo de Liechti-Gallati (1999), (79). Se tomaron 7 μ L del producto PCR que se obtuvo en la forma descrita en la sección anterior, y el mismo volumen de solución SSCP (formamida 95 por ciento, NaOH 100 mM, xilencianol 0,25 por ciento y azul de bromofenol 0,25 por ciento) y llevadas a 95°C durante 8min; luego la mezcla se colocó en hielo durante 10min y finalizado este tiempo, se colocaron en gel de poliacrilamida (38:2 de acrilamida;bisacrilamida) al 10 por ciento con glicerol al 5 por ciento. La electroforesis se llevó a cabo a temperatura constante de 4 °C a 600 Voltios durante 20 horas y se reveló con sales de plata. El patrón de migración de las muestras fue comparado con el de un control sano, que fue secuenciado previamente con el fin de comprobar que no existen alteraciones en la secuencia.

Con el fin de purificar los productos PCR de la secuencia que contiene los exones 7-9 del gen TP53, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2 por ciento y a continuación, las bandas respectivas fueron extraídas del gel utilizando el estuche Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System de la casa comercial Promega (N° Catálogo A9281). Una vez purificados los productos PCR de los cuatro casos índice, fueron enviados al Centro de Secuenciación y Análisis de Ácidos Nucleicos (CeSAAN) del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC) con el fin de determinar su secuencia; lo cual fue posible, sólo para dos de las secuencias pertenecientes a casos índice.

El alineamiento de las secuencias respectivas reportadas por el CeSAAN (exón 7-9) del gene TP53, fue realizado por el Prof. José A Martínez, utilizando el programa T-Coffee (80). Luego de efectuarse el alineamiento, en caso de encontrarse diferencias entre la secuencia del paciente con la de un control, se investigó en la base de datos de TP53 con el fin de determinar si la alteración encontrada ya había sido descrita por otros autores.

Análisis estadístico de la data

Los resultados del análisis estadístico realizado, con los datos recolectados de cada grupo familiar (Análisis Genealógico, Historia Clínica, Exámen Físico), se llevó a cabo mediante la utilización del paquete estadístico de computación SPSS versión 12.0 para ambiente Windows (2003). Toda la información se presenta en tablas de asociación, donde se muestran: frecuencias absolutas, porcentajes, promedios, desviación estándar, con las correspondientes pruebas (paramétricas y no-paramétricas) y niveles de significación, cuando procede.

Para ello, dos rasgos cuantitativos: número de máculas “café con leche” (MCL) y número de neurofibromas cutáneos (NF) fueron analizados por un método paramétrico (t de student); en tanto que, cuatro binarios: presencia o ausencia de nódulos de Lisch (N), escoliosis (E), convulsiones (C) y dificultades de aprendizaje (DA) se analizaron por un método no-paramétrico (Mann-Whitney) (U). El análisis se realizó en forma pareada, esto es: afectados generación I vs. afectados generación II, I vs. III, I vs. IV, II vs. III, II vs. IV y III vs. IV, de acuerdo al número de generaciones estudiadas en los grupos familiares relevantes.

Ninguna de las variables investigadas se distribuyó acorde a lo normal, según la prueba de Kolmogorov Smirnov realizada a cada grupo familiar. Por tales motivos, cuando fueron comparadas las generaciones no se utilizaron los valores medios de MCL y NF (aunque sean informados más como referencias cuantitativas), sino que se hicieron en base hipótesis nulas, referidas a si las distribuciones de los valores pertenecían o no al mismo universo de donde podrían provenir la data que las generaciones aportaban.

En tal sentido, para este análisis no-paramétrico, se realizaron las comparaciones de las distribuciones entre las generaciones, efectuándose para ello la prueba U de Mann-Whitney.

No obstante, cuando se hizo la comparación de los valores medios generacionales del número de MCL y NF, que presentaban los miembros de la generación I y sus generaciones posteriores, en caso de existir más de un representante generacional, si se utilizaron los promedios; ya que, para el caso de comparación de un promedio con un valor testigo, no es requisito absoluto el que se cumplan los criterios de normalidad. De ahí que, se utilizó la prueba de Z, de comparación de un promedio con un valor único (los correspondientes a la generación I).

Para la comparación de la incidencia - expresada en porcentaje - entre las distintas generaciones con relación a la presencia de N, E, C y DA, se utilizó la prueba Z de diferencia de porcentajes de grupos independientes. El criterio de significación en todos los análisis es menor al 5 por ciento de error; esto es, una probabilidad menor de 0,05 (doble cola).

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

Valoración Fenotípica y Genealógica:

Fueron colectadas y reconocidas 33 familias con 70 individuos afectados por NF1, de los cuales 53 corresponden al sexo femenino y 17 al masculino. El análisis genealógico de cada grupo familiar, no identificó focos geográficos preferenciales como lugar de nacimiento de ancestros (abuelos), en ambas líneas parentales del afectado; como tampoco, incremento de las edades parentales (materna y/o paterna).

Del total de los 70 casos diagnosticados con la condición, 19 son casos no-segregantes, originados por neomutaciones germinales del locus en uno de los progenitores. Los restantes 51 corresponden a casos familiares (segregantes), como los ejemplificados en la figura 4, donde se muestran las genealogías de los grupos familiares R-M (0855), T-R (0912) y P-R (0891), con un número variable de casos afectados por el desorden en cada generación.

Las principales manifestaciones clínicas de la enfermedad están presente en todos los 70 casos diagnosticados con la condición, pero con una notable variabilidad que incluye: número y tamaño de las lesiones para el caso de rasgos cuantitativos: máculas “café con leche” (MCL) y neurofibromas cutáneos (NF); e intensidad y frecuencia para rasgos binarios (presencia o no de: nódulos de Lisch, convulsiones, dificultades de aprendizaje, escoliosis...). De igual modo ocurre, con manifestaciones complicativas como sería el desarrollo de neurofibromas plexiformes (NFP) y la aparición de tumores malignos. Esta manifiesta variabilidad fenotípica es apreciable, tanto en casos no-segregantes (neomutaciones) como en casos segregantes

(familiares), que se infiere tienen el mismo tipo de mutación.

Los resultados obtenidos indican que existe una relación inversa de los rasgos cuantitativos: MCL y NF; por la cual, las MCL que pueden estar congénitamente presentes, incrementan su número y en ocasiones también su tamaño según se avanza de la infancia a la pubertad, para luego declinar paulatinamente en número en la adultez. Por el contrario, los NF suelen estar ausentes en la niñez, pero aparecen y aumentan su número al progresar la adultez.

En la Figura 4 se muestran genealogías de tres grupos familiares con casos segregantes de NF1.

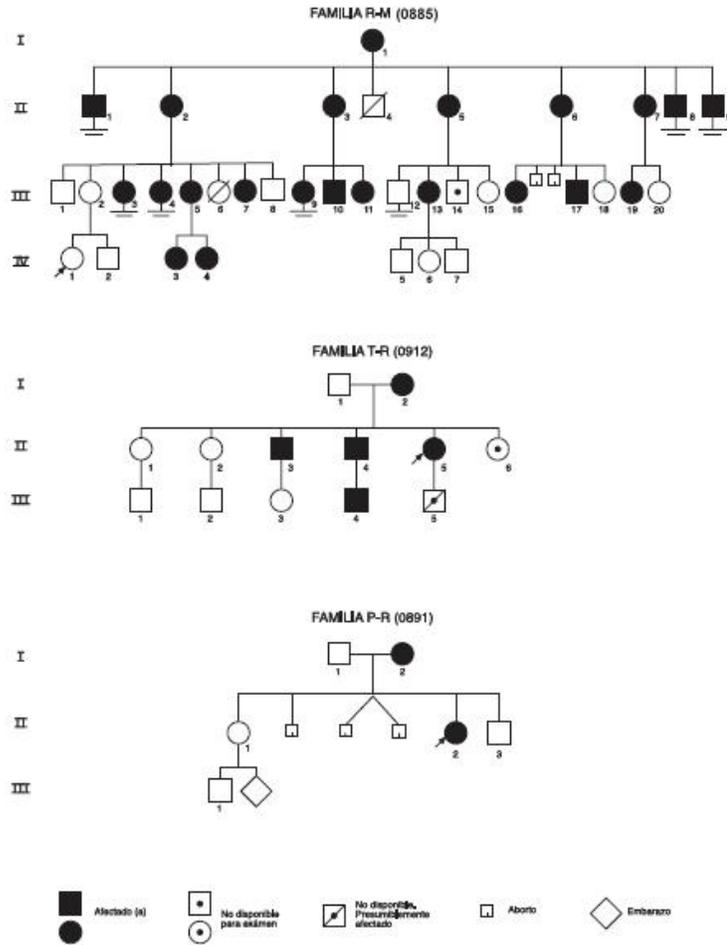


Figura 4. Ejemplificaciones de Genealogías Estudiadas con Casos Segregantes de NF1

Para los rasgos binarios, la data de la familia R-M muestra (Tabla 4) a las dificultades de aprendizaje como la manifestación asociada más frecuente, al menos para este grupo familiar, siguiendo en incidencia la escoliosis. Ésta manifestaciones se concentran en la generación II, con disminución gradual de su incidencia en IV (28).

Tabla 4
Prevalencia de Rasgos Fenotípicos por Edad en Afectados Familia R-M

No. de Pacientes por Edad (años) al Examen					
Rasgo	<10	10-19	20-39	>40	Total
MCL					
<5	4	2	5	2	13
5-9	-	-	-	-	0
10-14	-	3	1	-	4
15-19	-	-	1	1	2
20+	1	1	3	2	7

28

NF cutáneos					
0	3	2	4	-	9
1-9	2	2	4	-	8
10-99	-	-	-	3	3
100-499	-	-	4	1	5
500+	-	-	4	1	5
NFP	-	-	1	-	1
Escoliosis	1	-	5	-	6
Convulsiones	-	-	1	-	1
Dif. Aprendizaje.	1	2	7	3	13

En cuanto a las manifestaciones típicas de la enfermedad: neurofibromas cutáneos (NF), máculas “café con leche” (MCL), nódulos de Lisch y neurofibromas plexiformes, la diversidad es proverbial en el grupo muestral de 71 afectados y ello incluye: formas, tamaño, localizaciones y apariencias de las manifestaciones (Gráficos 2 – 7).



Gráfico 2. Variedad de máculas “café con leche” en pacientes con NF1

2A : MCL gigante. 2B: MCL de pequeño y mediano tamaño.
2C: MCL pilosas. 2D: MCL inguinales y genitales.



Gráfico 3. Variedad de Neurofibromas Cutáneos en pacientes con NF1

3A : NF escasos y de pequeño tamaño. 3B: NF pediculados y en turbante.

3C: NF abundantes y de gran tamaño. 3D: NF en dígitos.



Gráfico 4. Variedad de Neurofibromas Plexiformes en pacientes con NF1

4A : NFP miembro inferior derecho. 4B: NFP miembro inferior y glúteo derecho.
4C: NFP cara posterior brazo derecho.

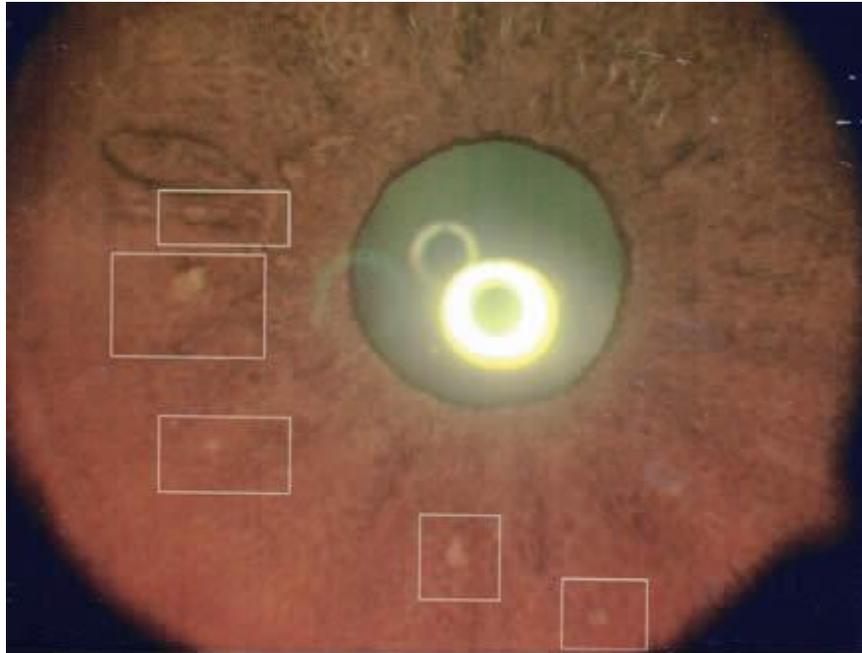


Gráfico 5A. Nódulos de Lisch en estroma iridiano (paciente 0925)

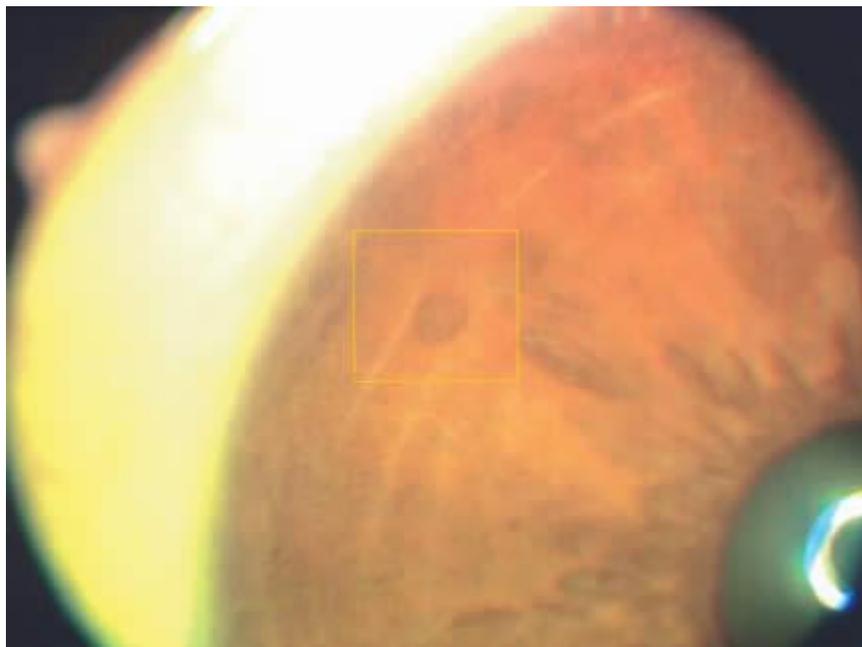


Gráfico 5B. Nódulos de Lisch en estroma iridiano (paciente 0925-1)

Como expresión del pleiotropismo que caracteriza a la mutación NF1, suelen ser relativamente frecuentes las manifestaciones esqueléticas: baja estatura proporcionada, acortamiento de miembros, displasias esfenoidales, displasias de cadera, además de la escoliosis (Gráfico 6 y 7).



Gráfico 6A. Manifestaciones Esqueléticas de Neurofibromatosis tipo 1

6A: Displasia coxofemoral derecha. 6B: Escoliosis lumbar.



Gráfico 7. Escoliosis y acortamiento Miembro Inferior Derecho

Entre las 33 familias estudiadas fueron reconocidas dos, con casos afectados por la “rara” Variedad Espinal de Neurofibromatosis tipo 1 (81). El primer caso corresponde a la familia H-L y es un individuo de sexo masculino (0958) con 23 años de edad. Tres generaciones del grupo familiar fueron estudiadas, siendo hasta ahora el único afectado. Producto de embarazo y parto normal. Al nacer se le apreció estrabismo convergente y criptorquidia derecha. En sus 13 años se le evidencian neurofibromas cutáneos en cara, tronco y miembros superiores e inferiores. A los 20 años de edad surgen molestias dolorosas lumbares, asociadas con dificultades para la marcha y coordinación motora en miembros superiores. En el año 2006 laminectomia descompresiva, mejorando por breve tiempo la locomoción; sin embargo, actualmente se encuentra en estado parapléjico.

Exhibe máculas “café con leche” generalizadas: menos de 10 entre 0,3 cm y menos de 3 cm, conjuntamente con neurofibromas cutáneos más de 15 (Gráfico 8A). Al examen con lámpara de hendidura se aprecian en el estroma iridiano derecho tres

nódulos de Lisch y en el izquierdo dos (Gráfico 8B). El estudio con Resonancia Magnética (RM) contrastada revela extensos neurofibromas de localización pre y paravertebrales, con extensión dural a través de agujeros intervertebrales provocando ensanchamiento que se extiende desde T5-L2 bilateralmente (Gráficos 8C, D, E y F).

El segundo caso es una niña de 12 años de edad (0891), la segunda de tres hermanos (familia P-R) (Figura 4), los restantes fenotípicamente normales; sin embargo, la madre y la abuela materna presentan manifestaciones clínicas diagnósticas de NF1: MCL y neurofibromas cutáneos, sin aparente afectación espinal (asintomáticas).

En sus tres años, le aprecian a la propósis nódulos paravertebrales en el segmento dorso-lumbar, dolorosos al tacto y en sus cuatro años MCL en región abdominal. Al momento de la evaluación fenotípica se observa: telecantus, MCL en un número mayor de 30, con un diámetro variable entre 0,3 cm y más de 1,5 cm. Neurofibroma plexiforme 9 x 7 cm en región subescapular derecha (Gráfico 9A). Efélides en huecos axilares. El estudio con lámpara de hendidura demostró la presencia de tres nódulos de Lisch en el iris del ojo derecho y dos en el izquierdo (Gráfico 9B). La RM en incidencias sagitales, axiales y coronales evidencia: discreta escoliosis lumbar de convexidad izquierda. El canal medular es amplio y de intensidad de señal normal. NF paravertebrales en raíces dorsales inferiores y lumbares superiores a su salida de los agujeros intervertebrales (Gráfico 9C y D).

Por otro lado, cuatro de los pacientes en la muestra estudiada: 0885-1, 0900, 0925-1 y 0927 desarrollaron procesos malignos, previo o durante el curso de la investigación: tumor MPNST (0885-1), cáncer de mama (0900 y 0925-1) y adenocarcinoma del recto (0927-1).

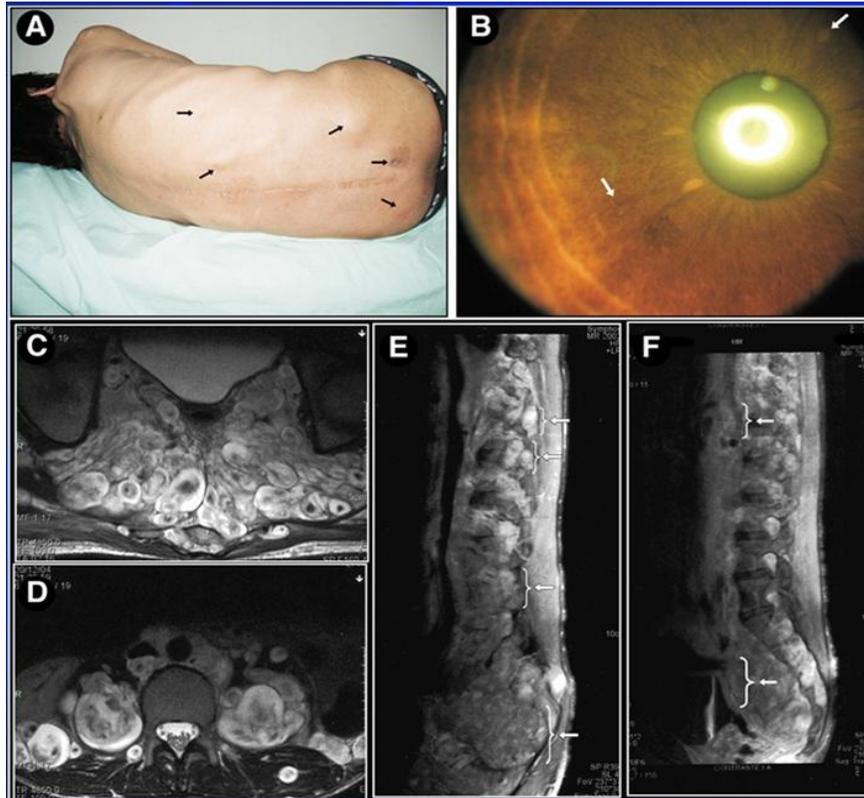


Gráfico 8. Variedad Espinal de Neurofibromatosis tipo 1. Caso 0958

8 A: NF cutáneos en fosa lumbar derecha con la presencia de MCL.

8 B: nódulos de Lisch en estroma iridiano.

8 C y 8D: NF intraespinales con extensión dural a través de agujeros intervertebrales.

8E y 8F: NF pre y paravertebrales con extensión dural a través de agujeros de conjunción.

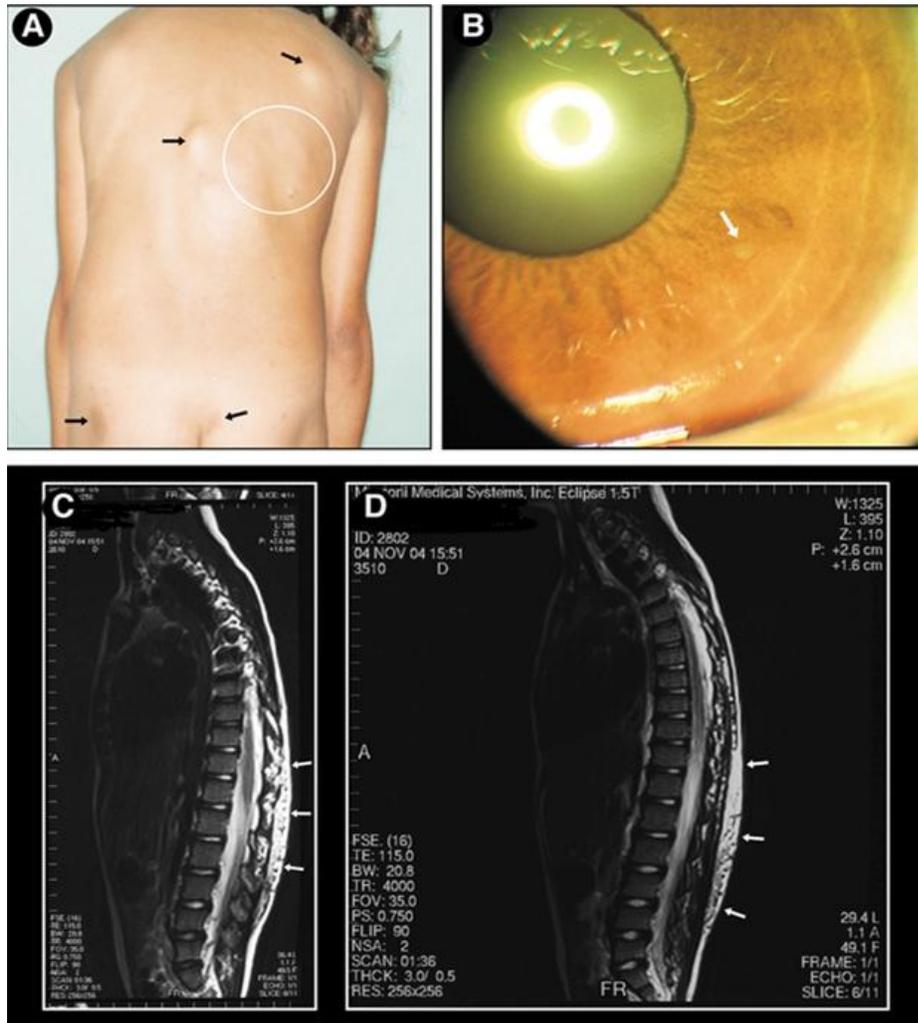


Gráfico 9. Variedad Espinal de Neurofibromatosis tipo 1. Caso 0891

9A: NF cutáneos paravertebrales, dorsales y escapulares con MCL en glúteos.

9 B: nódulos de Lisch en estroma iridiano.

9 C y D: NF paravertebrales dorso-lumbares y plexiforme subescapular derecha

Valoración Estadística

Los resultados del análisis estadístico realizado, están referidos a nueve

familias con casos segregantes en más de una generación; ellas fueron: 0885, 0906, 0912, 0882, 0891, 0895, 0897, 0917 y 0925. Sin embargo, solo pudo efectuarse el análisis comparativo de tipo significativo en tres de ellas: 0885, 0906 y 0912 respectivamente, ya que en las familias restantes solo existe un miembro afectado por generación.

La familia 0885 presenta un total de 23 individuos afectados por NF1 en cuatro generaciones disponibles: 17 de sexo femenino y 6 masculinos. Sus valores representativos (Promedio \pm Desviación Estándar) del número de MCL y NF por generación aparecen señalados en la Tabla 5.

Tabla 5
Valores Representativos (Promedio y Desviación Estándar) del Número de MCL y NF en Pacientes (Familia 0885) por Generación

Generación	Afectados	MCL* X \pm S	Significación Estadística	NF* X \pm S	Significación Estadística
I	1	15		56	
II	8	20,6 \pm 17,8	II vs I t= 0,900 g.l=7. P< 0,398	7,5 \pm 4,0	II vs.I t= -34,925 g.l=7 P= <0,00001
III	12	13,4 \pm 11,0	III vs.I t = -0,498 g.l= 11 P = 0,629	1,4 \pm 2,4	III vs.I t = -76,662 g.l= 11. P<0,00001
IV	2	3,0 \pm 0,0	IV vs. I No Aplicable	0,0 \pm 0,0	IV vs. I No Aplicable

(*) Las cifras de MCL y NF para la Generación I son valores de referencia para la comparación y no promedios ni desviación estándar.

Tabla 6

Comparación de la distribución (MCL y NF) entre las generaciones (0885) mediante la Prueba de Mann-Whitney (U) y comparación de promedios con un valor único de la generación I (Z).

MCL	NF
III vs. II U=37,500 Z= - 0,811 P= < 0,417	III vs. II U= 12,000 Z= -2,876 P=<0,004
IV vs. II U= 6,000 Z= - 0,524 P= <0,600	IV vs. II U = 1,000 Z= -1,856 P<0,063
IV vs. III U= 3,000 Z = -1,656 P= <0,098	IV vs. III U = 7,000 Z = -1,065 P = <0,287

Los valores de **P** se refieren al estadístico Z.

Los valores de MCL y NF para la generación I fueron de 15 y 56 respectivamente, que al ser contrastados con los valores medios de la generación II, no se encontró diferencias significativas ($P < 0,398$) con relación al número de MCL ; sin embargo, si se encontró diferencia altamente significativa ($P < 0,00001$) en el promedio de NF de la generación II con respecto al de referencia (Tabla 5).

En relación al valor medio de MCL de la generación III, comparado con el de referencia (generación I), no da diferencias significativas ($P < 0,629$). Para el caso de los NF, la diferencia entre generación III y la de referencia, al igual que II y la de referencia, es altamente significativa ($P < 0,00001$) (Tabla 5).

En cuanto a la generación IV, los valores medios de MCL y NF son iguales en los dos pacientes reportados; de ahí que no fuera posible realizar la comparación estadística. Sin embargo, ambas manifestaciones se presentan en un número, que está muy por debajo del que exhibe el paciente que integra la generación I. (Gráficos 10-

11).

Por otro lado, los valores de las desviaciones estándar de las generaciones II y III son muy altos ; de ahí que se optó, por utilizar un método de análisis no-paramétrico para contraste de las distribuciones de dos muestras independientes, en específico la prueba de Mann-Whitney (U) (Tabla 6). La misma igualmente fue utilizada con respecto a la generación IV, cuyos valores no presentan desviación estándar diferente a cero. Todo ello bajo la premisa, de que, si el resultado del test es no significativo, indicaría que las dos distribuciones provienen de un mismo universo y por lo tanto no difieren. En caso contrario, de haber un resultado significativo se asume, con el error (significación) que se obtenga, que las dos distribuciones provienen de universos diferentes y por lo tanto, su comportamiento en el fenómeno investigado no admite que sean iguales; sea para el caso, las MCL o los NF.

De acuerdo a lo anterior, resultó que los valores de MCL de la generación III y los de la generación IV, no son significativamente diferentes ($P < 0,417$ y $P < 0,600$) a las cifras de la II; ni los de la IV con relación a la III ($P < 0,098$) (Tabla 6). Por tanto se puede asumir que, todos estos valores pertenecen al mismo universo; esto es, no son estadísticamente hablando, de generaciones distintas, aunque representan diferentes grupos generacionales.

Al comparar las distribuciones de los valores para los NF, de las tres generaciones consideradas resultó que, solo hay diferencias significativas en las distribuciones III vs. II ($P < 0,004$); pero convencionalmente no en la IV vs. II ($P < 0,063$), si bien estuvo próximo al nivel de significación establecido; como tampoco fue significativo en la IV vs. III ($P < 0,287$) (Tabla 6).

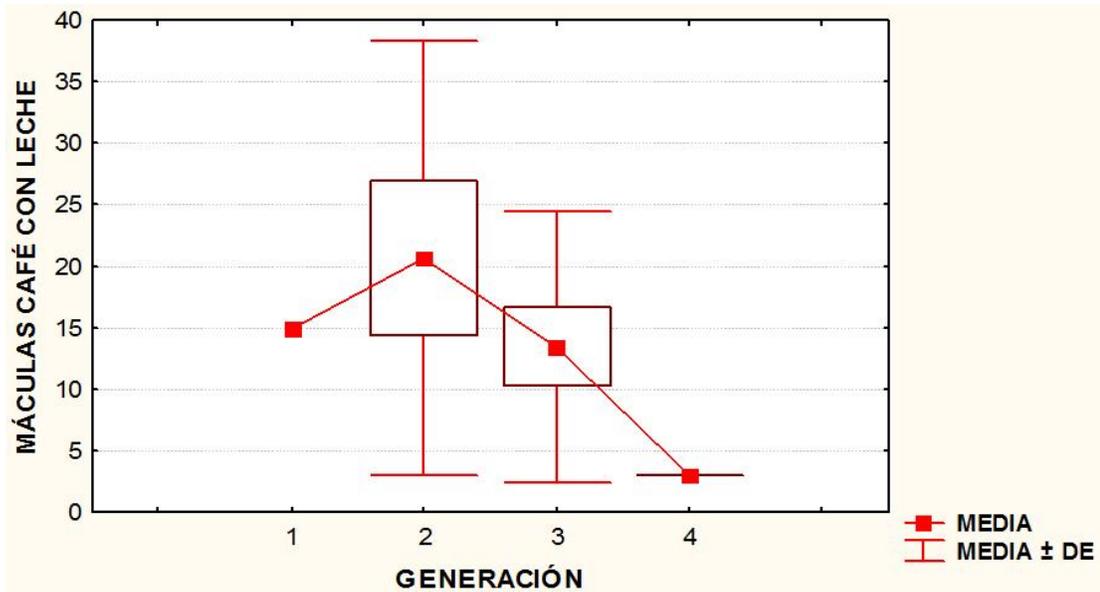


Gráfico 10. Media con Desviación Estándar del Número de MCL según Generación (0885)

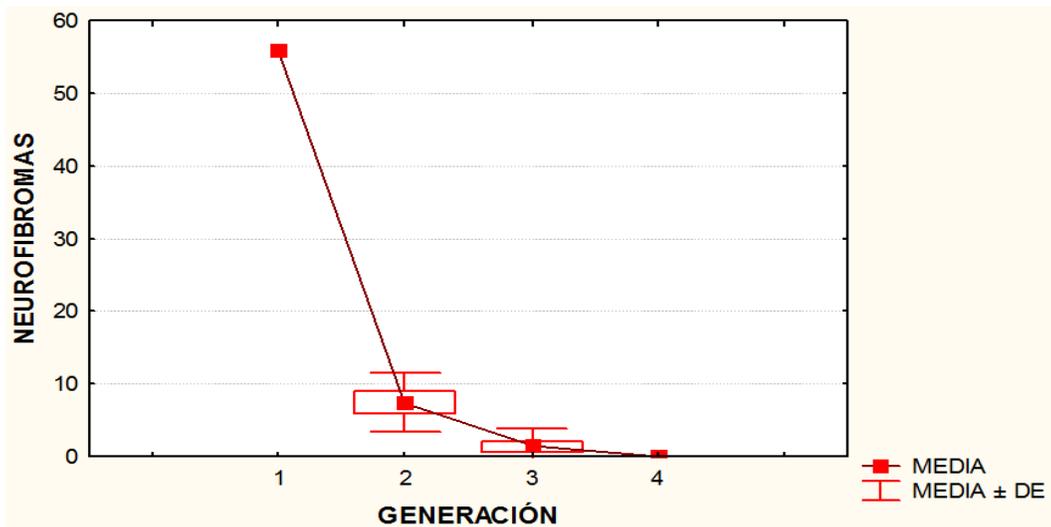


Gráfico 11. Media con Error y Desviación Estándar del Número de NF según Generación (0885)

La familia 0906 fue otra de las analizadas estadísticamente. Incluye tres individuos afectados por NF1: dos de sexo femenino y uno masculino en dos generaciones informativas (Tabla 7). La paciente de la generación I presenta 30 MCL y 25 NF, valores que comparados con los valores medios de los dos individuos de la segunda generación: 3,5 y desviación estándar de 0,7 para las MCL, establecen una diferencia significativa ($P < 0,012$). De igual modo, se encontró una diferencia significativa para el promedio de los NF ($P < 0,015$), que en los pacientes de la generación II presentan promedio de 3,5, con desviación estándar de 0,7 (Gráficos 12 -13).

Tabla 7
Valores Representativos (Promedio y Desviación Estandar) para MCL y NF en
Pacientes Familia 0906

Generación	Afectados	MCL* X±S	Significación Estadística	NF* X±S	Significación Estadística
I	1	30		25	
II	2	3,5 ± 0,7	II vs. I. t = - 5,300 g.l= 1 P < 0,012	3,5 ± 0,7	II vs. I. t = - 4,3007 g.l= 1 P < 0,015

(*) La cifra de MCL y NF para la generación I, son valores de referencia para la comparación y no promedios ni desviación estándar.

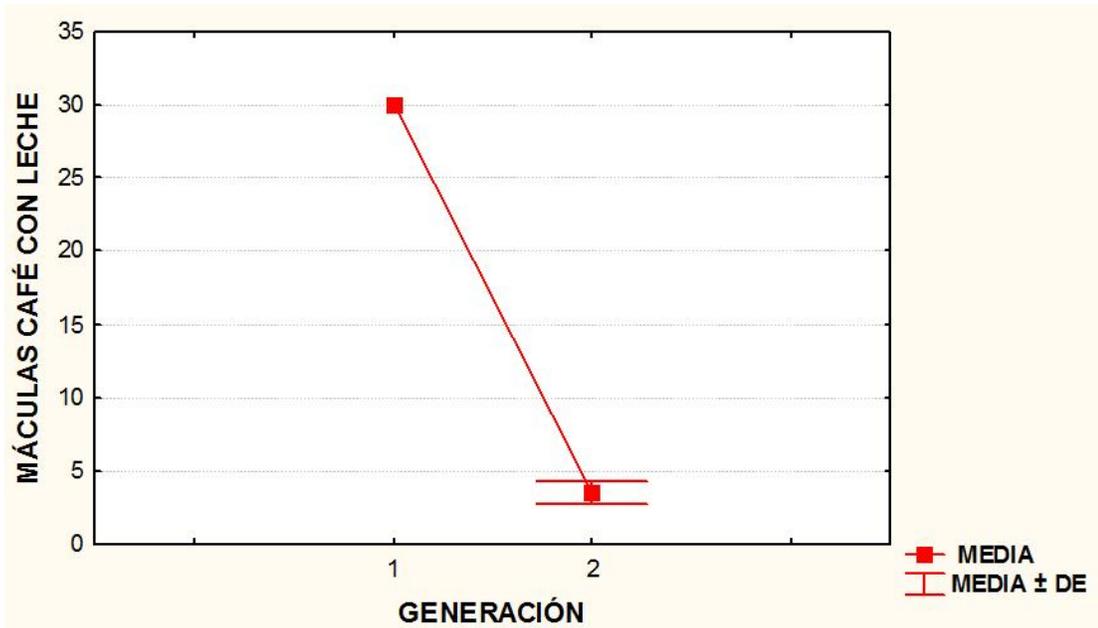


Gráfico 12. Media con Error y Desviación Estándar del Número de MCL según Generación (0906)

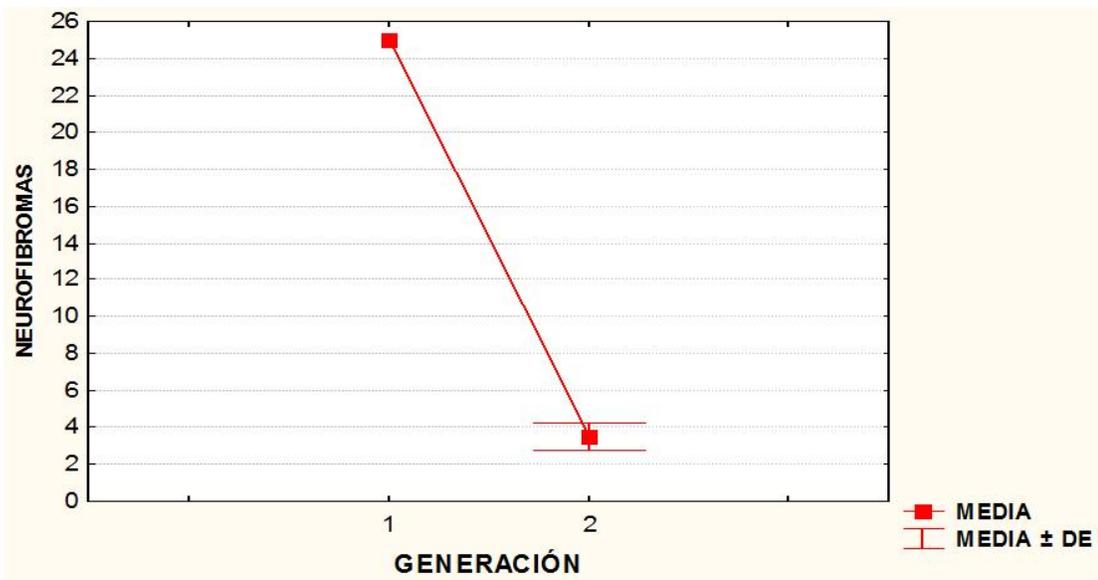


Gráfico 13. Media con Error y Desviación Estándar del Número de NF según Generación (0906)

Otra de las familias segregantes analizada fue la 0912, en la que se estudiaron tres generaciones, con un total de siete afectados por NF1: tres de sexo femenino y cuatro del masculino. En la generación I el número de MCL fue cuatro y de NF dos (Tabla 8). Para la generación II y III los valores medios de MCL y NF fueron 11,7 y 31,5, con desviaciones estándar de 18,8 y 59,0 respectivamente (Gráfico 14-15). Ninguno de estos valores parecen, en términos promedios, diferir significativamente; ya que, para las MCL el error de azar fue de 0,471 ($P > 0,05$) y para los NF de 0,391 ($P > 0,05$). En la generación III, siguiendo con el mismo análisis de significación estadística, solo se contrastó el valor medio de las MCL, ya que los dos pacientes estudiados presentaban tan solo un NF. La comparación del valor medio de MCL en la generación III, no fue significativo (Tabla 8).

Al utilizar el test de Mann-Whitney, se determinó que no hubo diferencias en cuanto a las distribuciones del número de MCL y NF, por cuanto la significación fue mayor del 5 por ciento ($P < 0,348$ y $P < 0,273$) (Tabla 9).

Tabla 8
Valores Representativos (Promedio \pm Desviación Estándar) del Número de MCL y NF en Pacientes Familia 0912

Generación	Afectados	MCL* X \pm S	Significación Estadística	NF* X \pm S	Significación Estadística
I	1	4		2	
II	4	11,7 \pm 18,8	II vs. I. t= 0,823 g.l = 3. P < 0,471	31,5 \pm 59	II vs. I. t= 1,000 g.l = 3. P = 0,391
III	2	5,0 \pm 1,4	III vs. I. t=	1,0 \pm 0,0	No Aplicable

			1,000 g.1 = P < 0,500		
--	--	--	------------------------------------	--	--

(*) Las cifras de MCL y NF para la generación I son valores de referencia para la comparación y no promedios ni desviación estándar.

Tabla 9

Comparación de la Distribución (MCL y NF) entre las Generaciones (0912) mediante la Prueba de Mann-Whitney (U) y Comparación de Promedios con un Valor Único (Z)

MCL	NF
III vs. II : U = 2,000 Z = -0,939 P < 0,348	III vs. II: U= 2,000 Z = - 1,095 P < 0,273

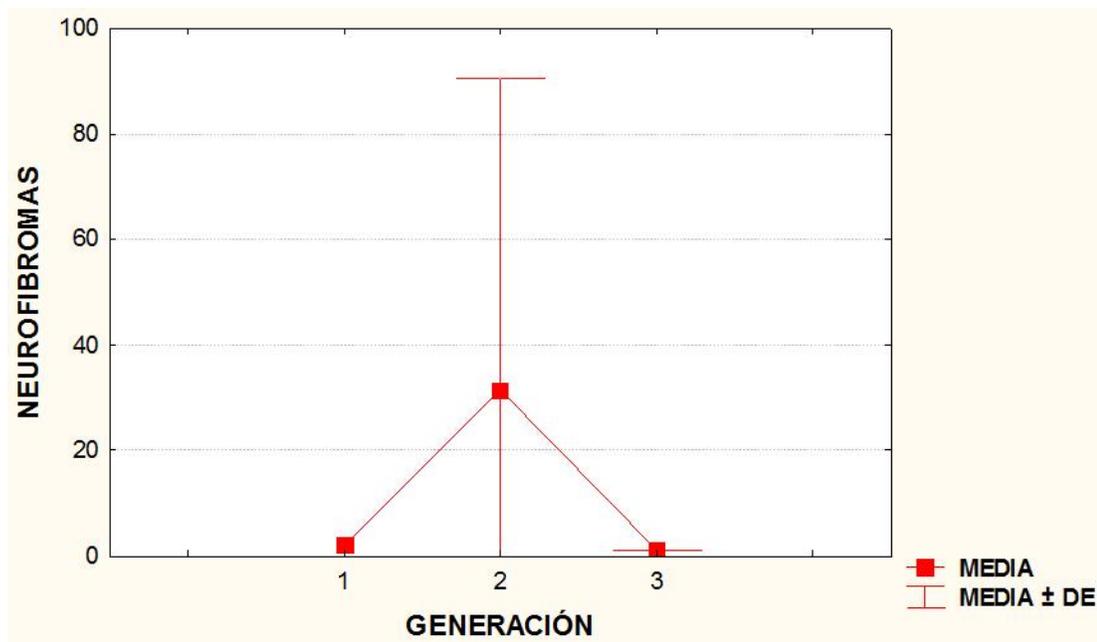


Gráfico 14. Media con Error y Desviación Estándar del Número de NF según

Generación (0912)

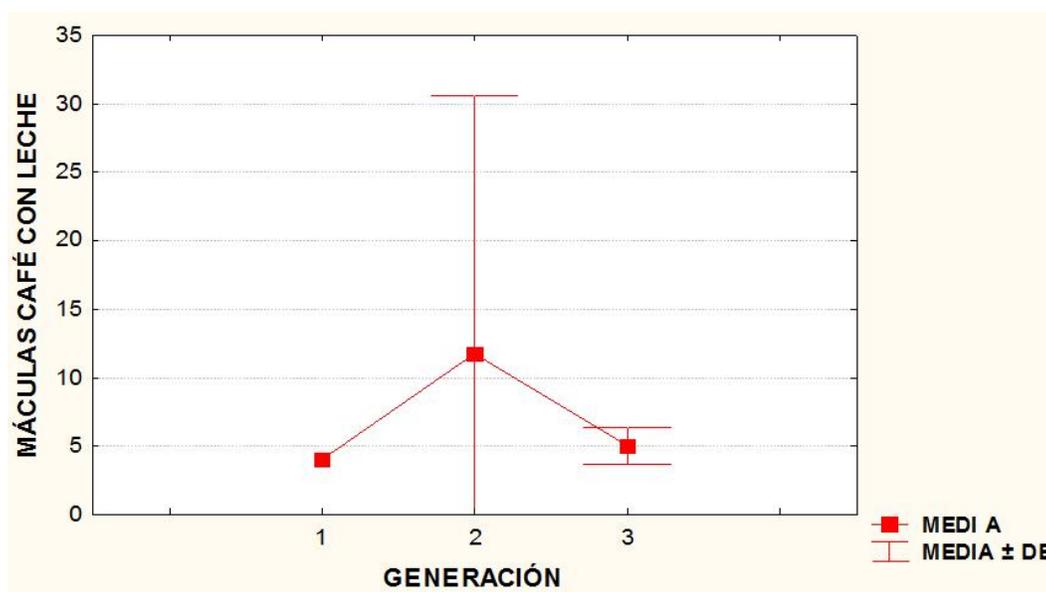


Gráfico 15. Media con Error y Desviación Estándar del Número de MCL según Generación (0912)

En el conjunto de familias estudiadas existe un grupo, en las que solo tienen o llegó a estar disponible para estudio, un individuo afectado por generación. Ese grupo está integrado por las familias: 0882, 0891, 0895, 0897, 0917 y 0925. En tales casos no es factible practicar análisis comparativos de tipo significativo y solo es posible, comparar las cifras y ver si aumentan o disminuyen (MCL y NF) entre generaciones (Tabla 10).

Tabla 10
Número de MCL y NF en Familias con solo un Miembro Afectado por Generación

Familia	MCL			NF		
	G I	G II	G III	G I	G II	G III
0882	10	21	37	14	36	3
0891	17	39	---	1	8	---
0895	32	42	---	18	0	---
0897	22	42	---	36	1	---
0917	10	29	---	79	6	---
0925	25	29	---	5	5	---

X ± S 19,3 ± 8,7 33,7 ± 8,6 ---- 25,5 ± 29,9 9,3 ± 13,41 ----

Generación	Edad (años)	
	I	II
0882	76	34
0891	40	8
0895	42	14
0897	30	4
0917	51	24
0925	37	10
X ± S	46,0 ± 16,2	15,7 ± 11,3

MCL	NF	Edad (años)
-----	----	-------------

	t = ± 2,865	t = ± 1,242	t = ± 3,763
	gl = 10	gl = 10	gl = 10
	P < 0,017	P = 0,242	P < 0,004
Significación			
	U = 5,000	U = 10,500	U = 1,000
Estadística	Z = - 2,093	Z = - 1,207	Z = - 2,722
	P < 0,041	P < 0,227	P < 0,006

Apreciamos que, la diferencia entre el promedio del número de MCL en sujetos afectados de la generación II con respecto a los de la generación I, es significativamente mayor ($t = \pm 2,865$. $P < 0,017$. $Z = - 2,093$. $P < 0,041$). Tanto como que, no existen diferencias significativas en el promedio del número de NF entre individuos de la generación I vs. II. Con respecto a la edad, la diferencia entre la edad promedio de los individuos de la generación I vs. II, también resulta significativamente mayor ($t = \pm 3,763$. $P < 0,004$. $Z = -2,722$. $P = 0,006$)

Respecto a las MCL, en el cien por ciento de las familias su número se incrementó en el pase de I a II generación (Gráfico 16-17). En tanto que para NF, en el 50 por ciento de las familias su número se redujo, en otro 33,3 por ciento aumentaron y en el 16,6 por ciento se mantuvieron en igual número (Tabla 10)

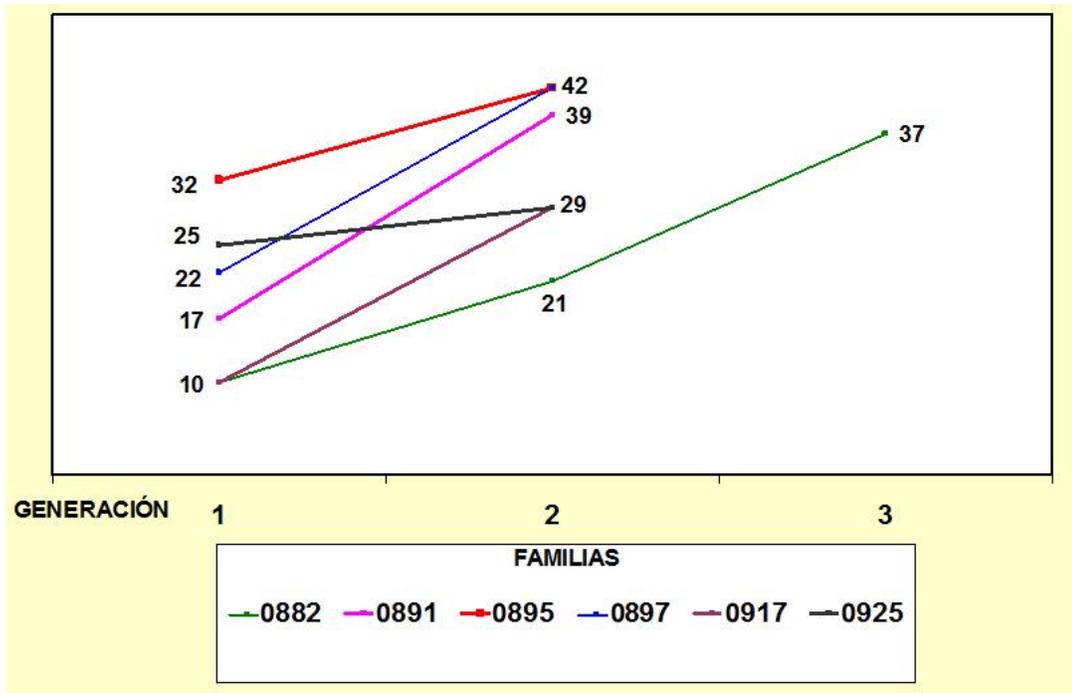


Gráfico 16. Número de MCL en Familias con Generaciones de un solo Afectado

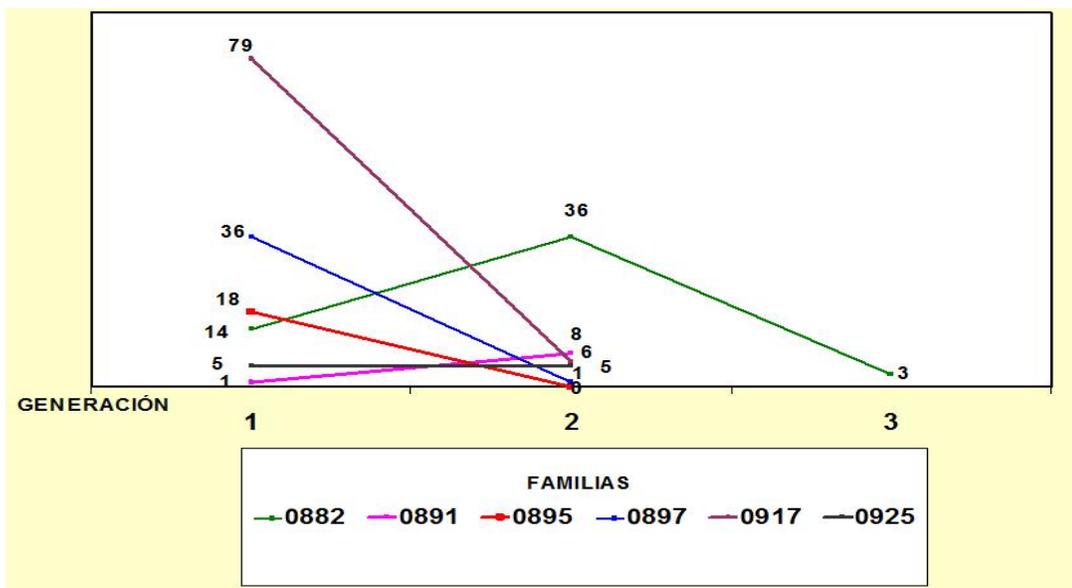


Gráfico 17. Número de NF en Familias con Generaciones de un solo Afectado

Respecto a la incidencia de Escoliosis (E), Convulsiones (C) y Dificultades de Aprendizaje (DA) en miembros afectados por NF1 en la familia 0885: (E) se manifestó en el 37,5 por ciento de los individuos de la generación II, en 8,5 por ciento de la generación III y en ninguno de la generación IV (Gráfico 18).

En cuanto a convulsiones, la incidencia fue de 25,0 por ciento en la generación II, 8,5 por ciento en la generación III y 0,0 por ciento en la IV. Finalmente, las DA se expresaron en todos los miembros afectados de la generación II, en 33,35 por ciento de la generación III y 0,0 por ciento de la generación IV (Tabla 11).

Tabla 11
Incidencia de Escoliosis (E), Convulsiones (C) y Dificultades de Aprendizaje (DA) en Afectados de la Familia 0885 Expresada Porcentualmente en Base al Número de Individuos de cada Generación

Familia	Generación (N)	E (%)	C (%)	DA (%)
0885	II (8)	37,5	25,0	100
	III (12)	8,5	8,5	33,3
	IV (2)	0,0	0,0	0,0
	II vs. III	Z = 1,02 P < 0,310	Z = 0,37 P < 0,710	Z = 2,52 P < 0,012

Significación Estadística	II vs. IV	Z = 0,17 P < 0,863	Z = 0,00 P < 1,000	Z = 2,17 P < 0,030
	III vs. IV	Z = 0,00 P = 1,000	Z = 0,00 P < 1,000	Z = 0,12 P < 0,905

Por último, la incidencia porcentual de nódulos de Lisch fue de 62,5 por ciento en afectados de la II generación (N= 5), 25 por ciento (N = 3) en la III generación y 0,25 por ciento para la IV generación (familia 0885).

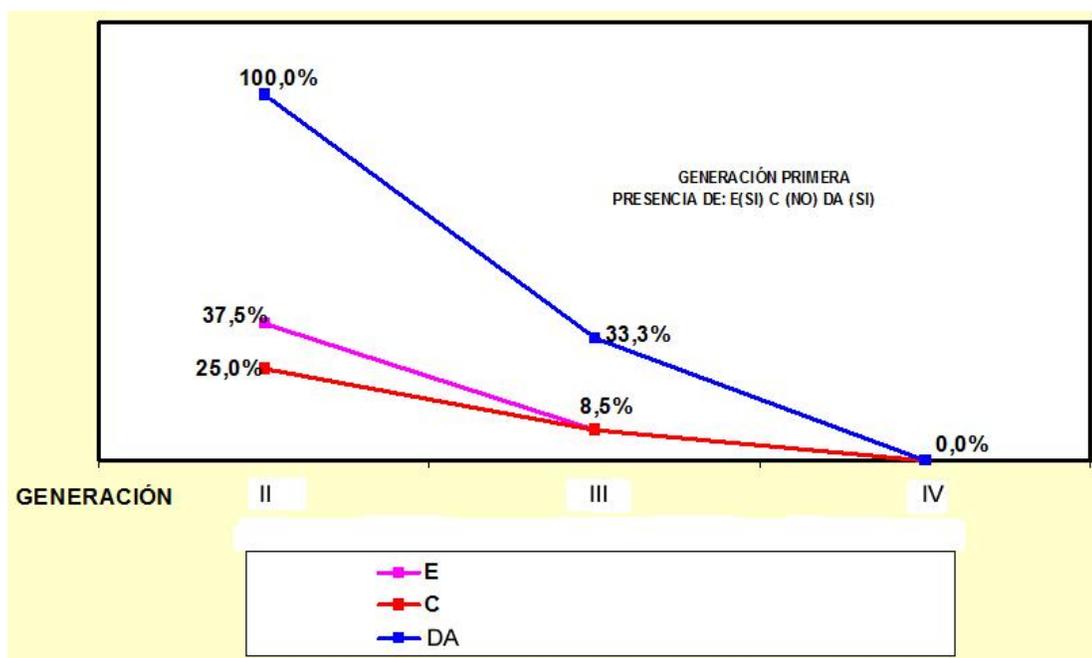


Gráfico 18. Incidencia de Escoliosis (E), Convulsiones (C) y Dificultades de Aprendizaje (DA) en Pacientes (Familia 0885) Expresada Porcentualmente en base al Número de Miembros de cada Generación.

La incidencia de Escoliosis (E), Convulsiones (C) y Dificultades de Aprendizaje (DA) en afectados por NF1 en las familias 0906 y 0912, aparecen reflejadas en las Tablas 12 y 13 respectivamente.

Tabla 12
Incidencia de E, C y DA en Afectados de la Familia 0906 Expresada
Porcentualmente en base al Número de Miembros de cada Generación

Familia	Generación (N)	E (%)	C (%)	DA (%)	Significación Estadística
0906	I	Si	Si	Si	No aplicable
	II (2)	0,0	Si	Si	IDEM

Tabla 13
Incidencia de E, C y DA en Afectados de la Familia 0912 Expresada
Porcentualmente en base al Número de Miembros de cada Generación

Familia	Generación (N)	E (%)	C (%)	DA (%)
0912	I	No	No	Si
	II (4)	50,0	0,0	50,0
	III (2)	50,0	50,0	0,0
Significación Estadística	II vs. III	Z = 0,31 P < 0,759	Z = 0,31 P < 0,759	Z = 0,31 P < 0,759

--	--	--	--	--

No hubo diferencias porcentuales significativas para ninguna de las manifestaciones binarias presentes en la familia 0912.

En cuanto a la incidencia de escoliosis (E), convulsiones (C) y dificultades de aprendizaje (DA) en familias con un solo individuo afectado por generación, su comportamiento fue variable y aleatorio (Tabla 14). Se presentaron en unas generaciones y en otras no; en todo caso, en ninguna de las familias hubo sujetos afectados con convulsiones en las generaciones investigadas.

Tabla 14
Incidencia de E, C y DA en Familias con solo un Miembro Afectado por Generación (G)

(DA)	Escoliosis (E)			Convulsiones (C)			Dificultades de Aprendizaje		
	GI	GII	GIII	GI	GII	GIII	GI	GII	
Familia									
GIII									
0882	Si	Si	No	No	No	No	Si	No	
No									
0891	Si	Si	---	No	No	---	No	Si	--
-									
0895	No	No	---	No	No	---	Si	Si	-
--									
0897	Si	No	---	No	No	---	No	No	-

--									
0917	Si	Si	---	No	No	---	Si	Si	-
--									
0925	No	No	---	No	No	---	No	No	

Valoración Molecular.

Formación del Banco de ADN

Según lo establecido en Material y Métodos (*vidae supra*), muestras de ADN fueron obtenidas, bajo consentimiento informado (Anexos), de pacientes y familiares accesibles, con los cuales se confeccionó un Banco de ADN que se mantiene en congelación a temperatura ultrabaja, en el Laboratorio de Biología Molecular del CIADANA (Facultad de Ciencias de la Salud. UC. Sede Aragua). El Banco de ADN está constituido por 114 muestras, las cuales tienen un promedio de A_{260}/A_{280} nm de 1,87, valor que indica un buen grado de desproteinización. El promedio de concentración fue de 41,0 ng/ μ L, lo cual señala un rendimiento promedio de 8,2 μ g totales. En el Gráfico 19 se presenta el perfil electroforético de nueve de las muestras pertenecientes al Banco, observándose que todas tienen un tamaño superior a 21,2 Kb y todas son bandas netas y sin barrido, lo cual indica que no existen signos de degradación. Para todas las muestras restantes se obtuvo un perfil similar al presentado en este gráfico.

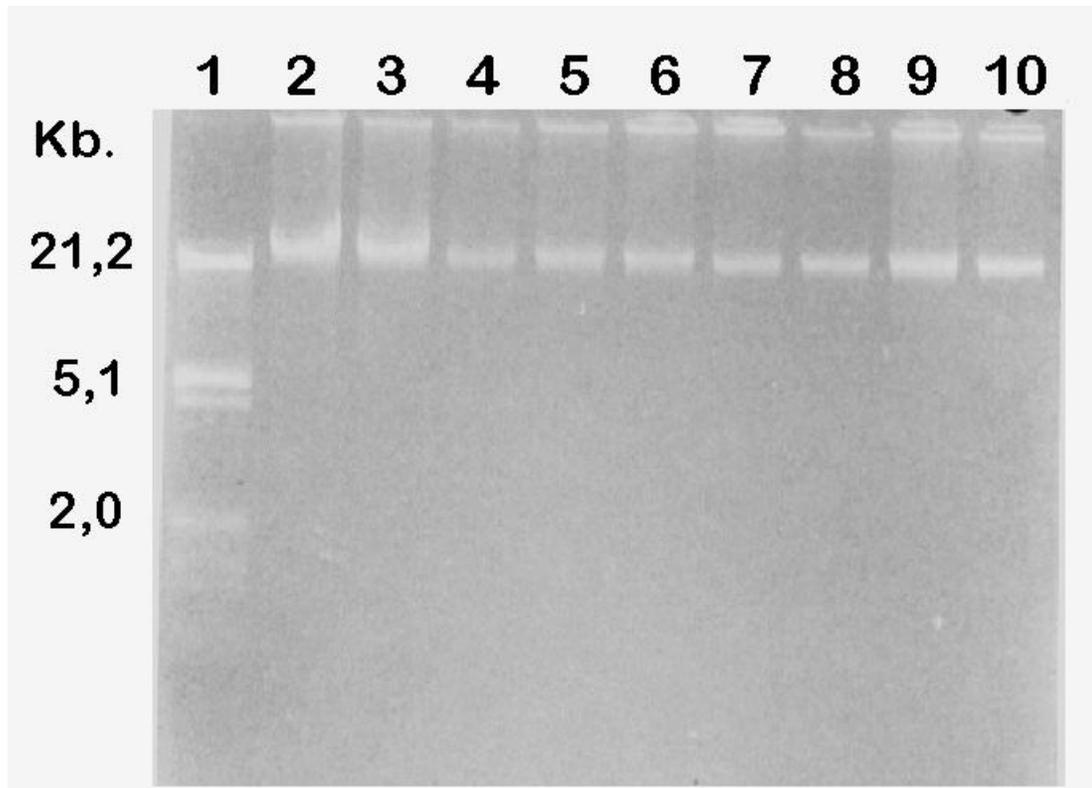


Gráfico 19. Electroforesis de muestras de ADN humano (NF1) en gel de agarosa al 1%

Carril 1 : Marcador Fago Lambda digerido con *EcoRI* + *HindIII*

Carril 2 al 10: Muestras de ADN provenientes de pacientes afectados por NF1

Análisis de los Microsatélites Intragénicos

El estudio se inició con 29 casos índice, pero el método para diferenciar los alelos sólo permitió hacerlo en 23 de los pacientes y en consecuencia, se incluyó en la muestra el mismo número de sujetos sin la enfermedad. En la Tabla 15 se indica el número de alelos encontrados para cada sistema, tanto en los casos índice como en los controles sanos. Se observa que el microsatélite IVS38GT53.0 es más polimórfico que IVS27AC28.4. En ambos marcadores se observó, un mayor número de alelos en

los sujetos sanos que en los afectados por NF1.

Tabla 15
Distribución de los alelos de los marcadores microsatélites IVS27AC28.4 e IVS38GT53.0 en los casos índice y en los controles sanos

Sujetos	IVS27AC28.4 Nº de alelos	IVS38GT53.0 Nº de alelos
Casos índice NF1 (n= 23)	4	8
Sujetos sin la enfermedad (n= 23)	10	12

En el Gráfico 20 se observa un ejemplo de dos de las electroforesis en geles de poliacrilamida al 8 por ciento, donde se muestra la distribución de alelos del microsatélite IVS27AC28.4 en 11 individuos sanos (Gráfico 20A) y en 9 casos índice (Gráfico 20B). El tamaño de los alelos se ubica en un rango comprendido entre 200 y 250pb.

En relación al Gráfico 20A, se evidencia mayor número de alelos diferentes, que los mostrados en el Gráfico 20B de sujetos afectados por NF1.

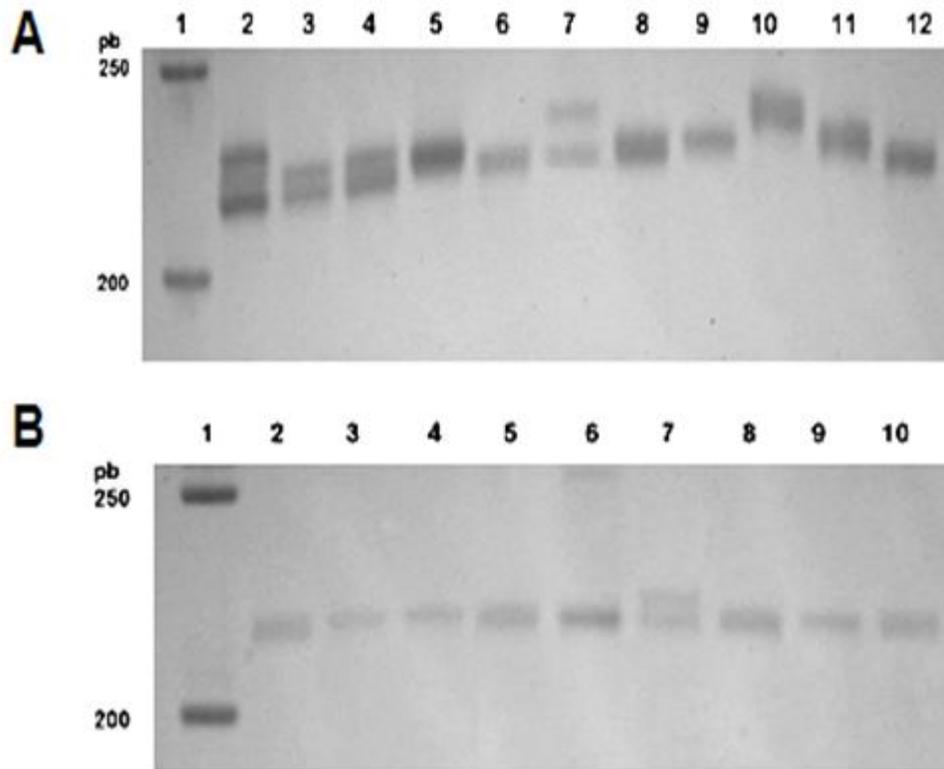


Gráfico 20. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 8% donde se muestra una distribución de alelos del microsatélite IVS27AC28.4 en individuos sanos (A) y Casos Índice (B).

A) Carril 1: Marcador de tamaño, escalera de 50 pb, donde se muestra las bandas correspondientes a 250 y 200 pb.

Carril 2-12: Muestras provenientes de 11 individuos sanos

B) Carril 1: Marcador de tamaño, escalera de 50 pb, donde se muestran las bandas correspondientes a 250 y 200 pb.

Carril 2-10: Muestras provenientes de 9 Casos índice

En el Gráfico 21 se presenta un ejemplo, de dos de las electroforesis en gels de poliacrilamida al 8 por ciento, en las que se aprecia la distribución de alelos del microsatélite IVS38GT53.0 en 9 individuos sanos (Gráfico 21A) y en 10 casos índice

(Gráfico 21B). En ambos grupos los alelos tienen un tamaño cercano a los 200pb y en los individuos sanos hay un caso, donde el alelo tiene un tamaño mayor de 200 pb (carril 5). En el Gráfico 21A (individuos sanos) se aprecia un mayor número de alelos diferentes, mientras que en los afectados (Gráfico 21B) hay una gran homogeneidad en el grupo de alelos.

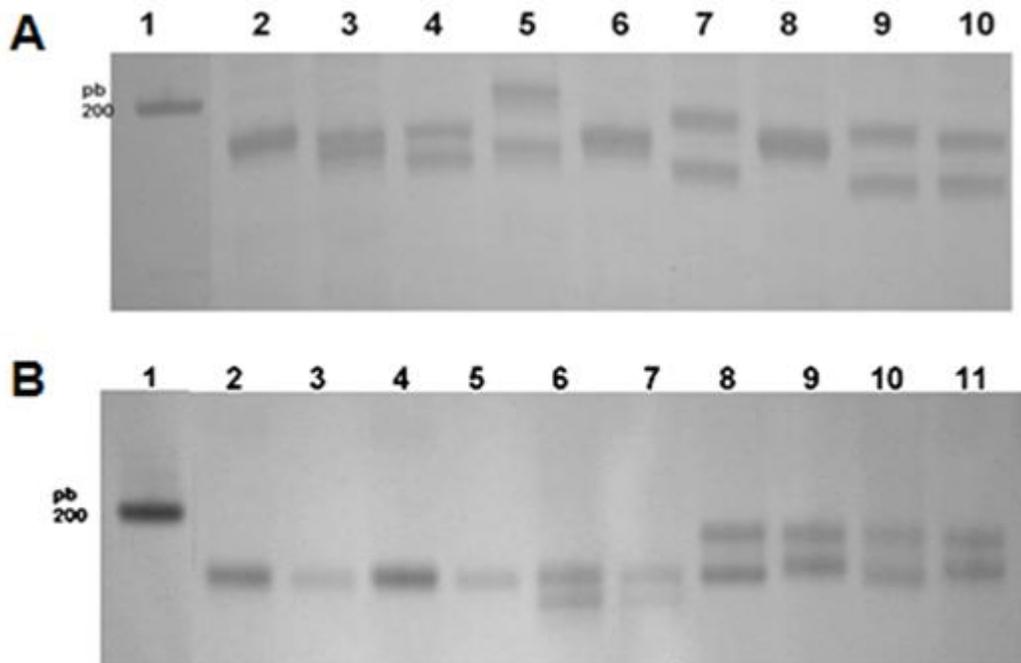


Gráfico 21. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 8% donde se muestra una distribución de alelos del microsatélite IVS38GT53.0 en individuos sanos (A) y Casos Índice (B).

A) Carril 1: Marcador de tamaño, escalera de 100 pb, donde se muestra la banda de 200 pb

Carril 2-10: Muestras provenientes de 9 individuos sanos

B) Carril 1: Marcador de tamaño, escalera de 100 pb, donde se muestran la banda de 200 pb.

Carril 2-11: Muestras provenientes de 10 Casos índice

Amplificación de las secuencias que contienen los exones 7-9 del gen TP53

En el Gráfico 22 se presentan los resultados de uno de los ensayos PCR realizados, con el objeto de amplificar las secuencias que contienen los exones 7-9 del gen TP53. Los productos PCR se caracterizan por presentar un tamaño de 780 pb y no existen bandas inespecíficas. Esto constituye un ejemplo de los productos que fueron utilizados para el ensayo de Polimorfismo de Conformación de Cadena Sencilla (SSCP).

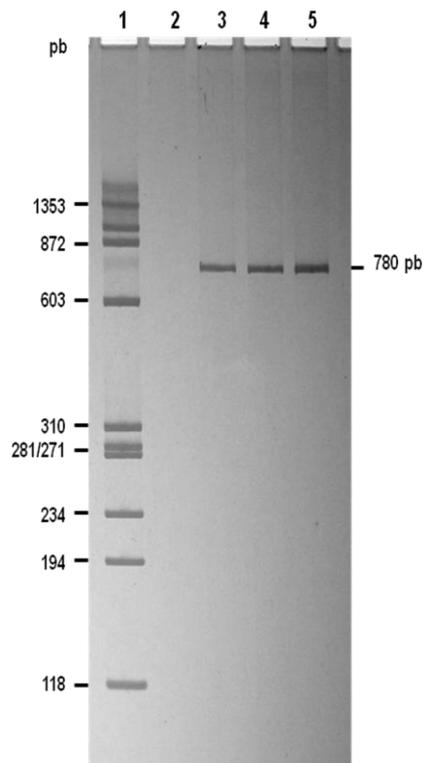


Gráfico 22. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 6 por ciento, donde se

muestra el perfil electroforético de productos amplificados de la secuencia que contiene a los exones 7-9 del gen *TP53*.

Carril 1: Marcador de tamaño PhiX 174 digerido *Hae* III

Carril 2: Control negativo del ensayo PCR

Carril 3 a 5: Muestras de tres pacientes integrantes del estudio

En el Gráfico 23 se muestran los resultados del ensayo PCR-SSCP, en el que se aprecia el comportamiento de los productos PCR de cuatro pacientes y tres familiares afectados en relación con un control sano. Solo uno de los casos índice (carril 5. Paciente 0891) se comporta igual que el control sano.

De los cuatro casos índice analizados por PCR-SSCP (Gráfico 23), en tres de ellos se observa un patrón diferente al control sano (carriles 2,7-8), un resultado similar se encuentra en los familiares de los pacientes (carriles 3,4,6); ello es indicativo de la presencia de al menos una mutación en el gen *TP53*, en el segmento genómico comprendido entre los exones 7-9. Para precisar este aspecto, los productos PCR debieron ser secuenciados con el fin de conocer la localización exacta y el tipo de mutación presente.

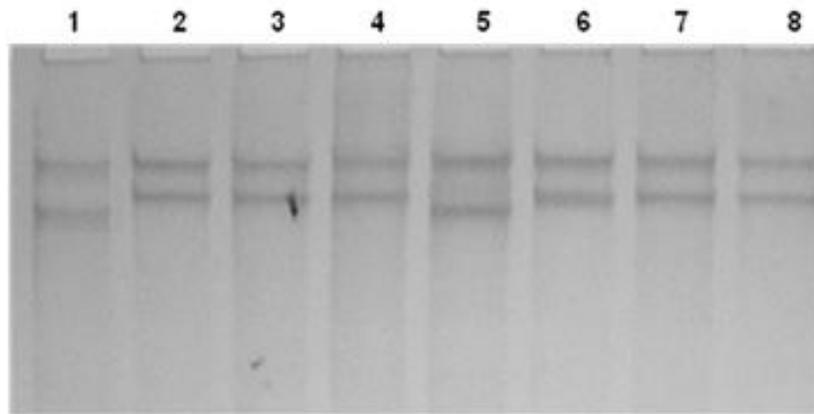


Gráfico 23. Electroforesis en gel de poliacrilamida 8% para evidenciar

el Polimorfismo de Conformación de Cadena Sencilla (SSCP) en secuencias de los exones 7-9 de 4 pacientes con NF1:

Carril 1: Control sano

Carril 2, 5, 7--8 Casos índice con NF1

Carril 3, 4, 6 Familiares de los pacientes

Secuenciación de los productos PCR del gen TP53 (exones 7-9)

En la Tabla 16 se muestra el alineamiento de la secuencia que contiene los exones 7-9 del paciente identificado como 0891 (carril 5. Gráfico 23.), con la secuencia de un control sano y se observa que, no existen diferencias entre ambas. Mientras que, en el alineamiento del mismo tipo de secuencias en el paciente identificado como 0912 (carril 7. Gráfico 23), se aprecia la inserción de una T en la región, hacia el extremo 3' del exón 9, lo cual provoca una alteración del marco de lectura "aguas abajo" del sitio de inserción de la base pirimídica Timina (Tabla 17). En los otros dos pacientes que muestran un patrón de migración anormal en el análisis SSCP (0886 y 0929. Carriles 2 y 8. Gráfico 23), no se encontraron alteraciones, al menos en este segmento genómico (exones 7-9) y tampoco tienen, por ahora, manifestaciones clínicas que hagan sospechar procesos de malignización.

Tabla 16

Alineamiento de la secuencia del exón 7-9 del paciente 0891 con la de un control sano

	Exón 7
891	CACTACATGTGTAACAGTTCTGCATGGGCGGCATGAACCGGAGGCCATCCTCACCATC
Control	CACTACATGTGTAACAGTTCTGCATGGGCGGCATGAACCGGAGGCCATCCTCACCATC *****
891	ATCACACTGGAAGACTCCAGGTCAGGAGCCACTTGCCACCCTGCACACTGGCCTGCTGTG
Control	ATCACACTGGAAGACTCCAGGTCAGGAGCCACTTGCCACCCTGCACACTGGCCTGCTGTG *****
891	CCCCAGCCTCTGCTTGCCCTCTGACCCCTGGGCCACCTCTTACCGATTCTTCCATACTA
Control	CCCCAGCCTCTGCTTGCCCTCTGACCCCTGGGCCACCTCTTACCGATTCTTCCATACTA *****
891	CTACCCATCCACCTCTCATCACATCCCCGGCGGGGAATCTCCTTACTGCTCCCACTCAGT
Control	CTACCCATCCACCTCTCATCACATCCCCGGCGGGGAATCTCCTTACTGCTCCCACTCAGT *****
891	TTTCTTTTCTCTGGCTTTGGGACCTCTTAACCTGTGGCTTCTCCTCCACCTACCTGGAGC
Control	TTTCTTTTCTCTGGCTTTGGGACCTCTTAACCTGTGGCTTCTCCTCCACCTACCTGGAGC *****
891	TGGAGCTTAGGCTCCAGAAAGGACAAGGTTGGTGGGAGTAGATGGAGCTGGTTTTTTTA
Control	TGGAGCTTAGGCTCCAGAAAGGACAAGGTTGGTGGGAGTAGATGGAGCTGGTTTTTTTA *****
891	AATGGGACAGGTAGGACCTGATTTCCCTTACTGCCTCTTGCTTCTCTTTTCCATCCTGAG
Control	AATGGGACAGGTAGGACCTGATTTCCCTTACTGCCTCTTGCTTCTCTTTTCCATCCTGAG *****
	Exón 8
891	TAGTGGTAATCTACTGGGACGGAACAGCTTTGAGGTGCGTGTGTTGTCCTGTCCTGGGAG
Control	TAGTGGTAATCTACTGGGACGGAACAGCTTTGAGGTGCGTGTGTTGTCCTGTCCTGGGAG *****
891	AGACCGGCGCACAGAGGAAGAGAATCTCCGCAAGAAAGGGGAGCCTCACCACGAGCTGCC
Control	AGACCGGCGCACAGAGGAAGAGAATCTCCGCAAGAAAGGGGAGCCTCACCACGAGCTGCC *****
891	CCCAGGGAGCACTAAGCGAGGTAAGCAAGCAGGACAAGAAGCGGTGGAGGAGACCAAGGG
Control	CCCAGGGAGCACTAAGCGAGGTAAGCAAGCAGGACAAGAAGCGGTGGAGGAGACCAAGGG *****
891	TGCAGTTATGCCTCAGATTCACCTTTTATCACCTTTCCCTTGCCCTCTTTCCTAGCACTGCC
Control	TGCAGTTATGCCTCAGATTCACCTTTTATCACCTTTCCCTTGCCCTCTTTCCTAGCACTGCC *****
	Exón 9
891	AACAACACCAGCTCCTCTCCCCAGCCAAAGAAGAAACCACTGGATGGAGAATATTTACC
Control	AACAACACCAGCTCCTCTCCCCAGCCAAAGAAGAAACCACTGGATGGAGAATATTTACC *****
891	CCTTCAG
Control	CCTTCA *****

Tabla 17

Alineamiento de la secuencia del exón 7-9 del paciente 0912 con la de un control sano

Exón 7

912 CACTACATGTGTAACAGTTCCTGCATGGGCGGCATGAACCGGAGGCCATCCTCACCATC
CONTROL CACTACATGTGTAACAGTTCCTGCATGGGCGGCATGAACCGGAGGCCATCCTCACCATC

912 ATCACACTGGAAGACTCCAGGTCAGGAGCCACTTGCCACCCTGCACACTGGCCTGCTGTG
CONTROL ATCACACTGGAAGACTCCAGGTCAGGAGCCACTTGCCACCCTGCACACTGGCCTGCTGTG

912 CCCAGCCTCTGCTTGCCCTCTGACCCCTGGGCCACCTCTTACCGATTCTGCCATACTA
CONTROL CCCAGCCTCTGCTTGCCCTCTGACCCCTGGGCCACCTCTTACCGATTCTGCCATACTA

912 CTACCCATCCACCTCTCATCACATCCCCGGCGGGGAATCTCCTTACTGCTCCCACTCAGT
CONTROL CTACCCATCCACCTCTCATCACATCCCCGGCGGGGAATCTCCTTACTGCTCCCACTCAGT

912 TTTCTTTTCTCTGGCTTTGGGACCTCTTAACCTGTGGCTTCTCCTCCACCTACCTGGAGC
CONTROL TTTCTTTTCTCTGGCTTTGGGACCTCTTAACCTGTGGCTTCTCCTCCACCTACCTGGAGC

912 TGGAGCTTAGGCTCCAGAAAGGACAAGGTTGGTGGGAGTAGATGGAGCTGGTTTTTTA
CONTROL TGGAGCTTAGGCTCCAGAAAGGACAAGGTTGGTGGGAGTAGATGGAGCTGGTTTTTTA

Exón 8

912 TAGTGGTAATCTACTGGGACGGAACAGCTTTGAGGTGCGTGTGTTGTGCCTGTCTGGGAG
CONTROL TAGTGGTAATCTACTGGGACGGAACAGCTTTGAGGTGCGTGTGTTGTGCCTGTCTGGGAG

912 AGACCGGCGCACAGAGGAAGAGAATCTCCGCAAGAAAGGGGAGCCTCACCACGAGCTGCC
CONTROL AGACCGGCGCACAGAGGAAGAGAATCTCCGCAAGAAAGGGGAGCCTCACCACGAGCTGCC

912 CCCAGGGAGCACTAAGCGAGGTAAGCAAGCAGGACAAGAAGCGGTGGAGGAGACCAAGGG
CONTROL CCCAGGGAGCACTAAGCGAGGTAAGCAAGCAGGACAAGAAGCGGTGGAGGAGACCAAGGG

912 TGCAGTTATGCCTCAGATTCACCTTTTATCACCTTTCCCTGCCTCTTTCTAGCACTGCC
CONTROL TGCAGTTATGCCTCAGATTCACCTTTTATCACCTTTCCCTGCCTCTTTCTAGCACTGCC

Exón 9

912 AACAAACCAGCTCCTCTCCCCAGCCAAAGAAGAAACCACTGGATGGAGAATATTTTCAC
CONTROL AACAAACCAGCTCCTCTCCCCAGCCAAAGAAGAAACCACTGGATGGAGAATATT-TCAC

912 CCTTCAG
CONTROL CCTTCAG

codificados por cada codón. Las flechas indican el inicio de los exones 9 y 10. El exón 9 está escrito en color verde.

En la tabla 18 apreciamos que la incorporación de la base nitrogenada Timina (T) en el extremo 3' del exón 9, altera el marco de lectura a partir de este sitio y se crea un codón de parada (tga) en la posición 336, lo cual trae como consecuencia la producción de una proteína truncada. La muestra en consideración corresponde a un paciente de sexo femenino de 24 años de edad (0912), con esfélides en cuello, axilas y regiones inguinales; además de miopía y astigmatismo. Exhibe 40 MCL y abundantes neurofibromas cutáneos, más de 98, incluyendo un neurofibroma plexiforme en pliegue axilar izquierdo. Hasta el momento del estudio, el paciente no presentaba evidencias clínicas de malignización.

Discusión

La variable expresividad fenotípica que apreciamos en pacientes afectados por NF1 en nuestra serie de casos, podría en parte atribuirse a la naturaleza o tipo distinto de las mutaciones que implican al locus NF1 (82). Sin embargo, como se ha mencionado (*vidae supra*), esa variabilidad es observada, tanto en casos interfamiliares como en casos intrafamiliares (segregantes), que se infiere tienen el mismo tipo de mutación.

Otra fuente de variabilidad, aparte de las epigenéticas, pudiera ser la eventual influencia de “genes modificadores”, entendiendo como tal, cualquier gene no ligado al locus NF1, cuyo genotipo se correlaciona con el fenotipo NF1. De ahí que, es posible avanzar en el conocimiento de las fuentes que llegarían a contribuir significativamente, a la variación fenotípica entre diferentes individuos de una misma familia afectada por NF1.

De este modo, si la variación en la expresión obedece solo primariamente, a diferencias en el tipo de mutaciones del locus NF1, el fenotipo para diferentes individuos afectados dentro de una misma familia, debiera estar estrechamente correlacionado. En tal caso, la correlación debería ser la misma, tanto entre familiares cercanos afectados y aquellos más distantes igualmente afectados. En contraste, si la variación esta primariamente determinada por alelos de genes ligados o no a NF1, la correlación variará con lo cercano o distante que sea el grado de relación (parentesco), siendo esta mayor entre familiares cercanos y mucho menor o no existente, entre familiares lejanos del mismo grupo.

Al respecto, por ejemplo, Easton y col. 1993 (29) mostraron, para rasgos cuantitativos de NF1 (MCL^{*}, NF^{**} y circunferencia cefálica^{**}) en seis pares de gemelos monocigóticos, una altísima concordancia (^{*}P< .05) y (^{**}P< .01), que se hace no-significativa en familiares distantes. Igualmente, dicho estudio reporta, para rasgos binarios de NF1 (NFP, Gliomas Ópticos, E, C y DA), también una alta concordancia que disminuye en familiares más distantes. Estos datos son sugestivos de un fuerte componente genético, en el cual sin embargo, hay solo un componente menor por el locus NF1.

Lo planteado es sobre todo demostrativo en nuestro estudio, para el caso de familias segregantes con afectados en más de una generación, la comparación pareada de afectado(s) en una generación vs. afectado(s) de la(s) otra(s) donde se revela, en el caso de la familia R-M (0885), la más llamativa, por el número de afectados y por el número de generaciones (IV en total) que se alcanzó estudiar, que no existen diferencias significativas (P< 0,398) en las MCL con los valores medios, del afectado(a) en la I generación vs. los de la II generación. Pero si hubo diferencias, altamente significativas (P< 0,00001), del promedio de NF en II vs. I. Tampoco hubo

diferencias significativas para las MCL ($P < 0,629$) entre III vs. I generación. Sin embargo, si la hubo ($P < 0,00001$) en los NF, entre III vs. I. En cuanto a la IV generación, los dos afectados exhiben los mismos valores de MCL y NF (3,0 y 0,0), por ello al no tener desviación estándar, no es posible la comparación estadística. En todo caso, esos valores de MCL y NF están muy por debajo de los presentados por la paciente de la generación I (15 y 16 respectivamente) (Tabla 5).

Este comportamiento señala, al menos para los NF, que su expresividad presencial y numérica es edad- dependiente y por ello tienden a no evidenciarse, o si lo hacen es en menor número, en familiares biológicamente más distantes y por tanto mucho más jóvenes que el o los casos de la I generación.

Respecto a las manifestaciones binarias de NF1, los nódulos de Lisch (N), seguidos por las dificultades de aprendizaje (DA) suelen ser las más frecuentes, independiente de la edad del paciente y del grado de relación biológica.

El presente estudio, confirma y documenta el hecho de que los nódulos de Lisch, los neurofibromas cutáneos y las máculas “café con leche”, si forman parte de las manifestaciones clínicas acompañantes de la Variedad Espinal de NF1, al reconocer dos casos: varón (0958) y una niña (0891) afectados por la condición (81). Si bien en el pasado, algunas publicaciones la han considerado como una entidad distinta a la NF1 (Von Diemeling A, et al. 1995). De hecho, otros trabajos han estimado que, los tumores espinales serían más comunes en NF2 (24). Sin embargo, se ha sugerido también que, los tumores espinales asociados a NF1, serían más frecuentes de lo que inicialmente se estimó, ya que en el estudio de Poyhonen y col. 1997 que incluye casos de NF1 explorados con Resonancia Magnética (RM), encontraron que un 36 por ciento de los mismos presentaban tales manifestaciones;

aún cuando, en solo 7 por ciento de los pacientes los tumores estuvieron asociados con síntomas clínicos. La infrecuente detección de neurofibromas espinales en NF1 puede en parte ser explicada, por la ausencia de estudios con RM en estos pacientes (Messiaen L, et al. 2003). A su vez, la falta de detección de los nódulos de Lisch igualmente pudiera ser debida, a la ausencia de estudios gonioscópicos en sujetos con la variedad espinal de NF1 (NFE) (81). También resulta claro que el número de MCL y NF en nuestra serie de casos, en general, está por debajo del número de estas lesiones corrientemente detectado en nuestra serie de casos de NF1.

Polimorfismo en los microsatélites IVS27AC28.4 e IVS38GT53.0

El estudio del polimorfismo en los microsatélites IVS27AC28.4 e IVS38GT53.0 se ha llevado a cabo en varias poblaciones, habiéndose reportado la existencia de 8 alelos del marcador IVS27AC28.4 (40 kb) y 10 alelos en IVS38GT&53.0 (65 kb) (43, 66, 83, 84, 72, 64). Sin embargo, en el presente estudio se muestra una diferencia notable entre ambos marcadores, en los datos obtenidos en los individuos sanos y los afectados, siendo esta data también diferente a la reportada en la literatura. De ahí que, es importante destacar los hechos siguientes:

1. El microsatélite IVS38GT53.0 es el más polimórfico, presentándose con 8 alelos en los enfermos con NF1 y 12 en los sanos. Esta situación se asemeja a lo encontrado en una muestra de población franco-canadiense de Québec (64), en cuanto a los individuos enfermos, en los que se reportan solo 9 alelos, siendo el alelo de mayor tamaño el alelo 1 con 189 pb; mientras que en el presente estudio, se detectó un alelo mayor de 200 pb (Gráfico 21 A. Carril 5), el cual no está reportado en la literatura y cuyo tamaño exacto será determinado una vez que se logre secuenciar el ADN.

2. El microsatélite IVS27AC28.4 muestra menor polimorfismo, en los enfermos se observan solo 4 alelos, lo cual es un número menor al reportado en otras poblaciones

de caucásicos: para españoles (83, 84, 72); para italianos (85); estudios en los cuales, este marcador se presenta con un número de 7, 7 y 6 alelos en las poblaciones señaladas. Por el contrario, en los individuos sanos se observan 10 alelos; en tanto que, para la población de la Provincia de Québec se reportaron 8 alelos (64). Para este estudio la comparación con las otras poblaciones mencionadas (*vidae supra*) (españoles e italianos) no es posible, ya que los autores no publicaron las frecuencias correspondientes a los sujetos sanos.

3.- El mayor número de alelos detectados para ambos microsátélites en los individuos sanos puede explicarse, por el proceso de mestizaje que ancestralmente ha operado en la población venezolana, resultante del flujo génico (“gene flow”) entre los distintos grupos étnicos.

Por otra parte, si bien en este trabajo no se identificaron los alelos por el tamaño, ya que para ello todavía se requiere secuenciar todas las formas alélicas detectadas en los productos PCR; no obstante, tanto en la muestra de individuos sanos como en la de enfermos, se observa un contraste muy evidente entre los patrones de migración electroforética de ambos grupos muestrales: para IVS27AC28.4 (Gráficos 20A y 20B) e IVS38GT53.0 (Gráficos 21 A y 21B).

Estos primeros resultados conducen a plantear, una hipótesis sobre la existencia de una asociación preferencial de ciertos alelos con NF1, que de resultar cierta, pudiera llegar a tener implicaciones en la variabilidad de la expresión fenotípica que tiene la condición. Así mismo, esta asociación alélica preferencial sería de gran utilidad para realizar estudios de segregación, que permitirían alcanzar diagnósticos prenatales de la enfermedad, incluyendo diagnósticos genéticos de preimplantación (“*Preimplantation genetic diagnosis*”) en blastómeras obtenidas de

embriones de 3 días (86, 87, 98). De igual modo, haría posible la realización de diagnósticos en niños “presintomáticos”, en situación de riesgo por tener antecedentes familiares de NF1. El trabajo de Oguzkan y col. 2003 (43) es un ejemplo, en el que este tipo de estudios ha sido utilizado con éxito para estos propósitos. Por otra parte, no se estudió la segregación de estos marcadores en las familias con varias generaciones de afectados por razones económicas.

De otro lado, la asociación entre elementos microsatélites y polimorfismos de longitud, causados por las expansiones o contracción de repeticiones en tándem, pueden ser causa de alteraciones recombinantes (apareamientos defectuosos, recombinaciones desiguales o una combinación de ambas), que han sido bien documentadas por diversos investigadores (88, 89, 90,91), para diversas condiciones neurológicas de origen genético-hereditario, entre las cuales cabe mencionar: Enfermedad de Machado-Joseph (repeticiones CAG), Enfermedad de Huntington (repeticiones CAG) y algunas formas del Síndrome de Martín Bell (X frágil) (repeticiones CGG). En tales entidades, las repeticiones ocurren en las secuencias codificantes del gene (92, 93). Para otras condiciones de igual naturaleza, tales como: Ataxia de Fredreich (repeticiones GAA), Distrofia Miotónica (repeticiones CAG) y otras formas del Síndrome del X frágil, la expansión de las repeticiones se ubica en los intrones y en 3' y 5' (UTR) respectivamente (94, 95, 96).

De ahí que, si bien preliminarmente para el presente trabajo, aún no se han secuenciado los productos PCR para determinar el tamaño de los alelos de los microsatélites IVS27AC28.4 e IVS38GT53.0, el evidente contraste observado en los patrones de migración entre individuos sanos y enfermos para estos dos microsatélites intragénicos sugiere que, el polimorfismo de secuencias repetitivas de dinucleótidos: AC y GT respectivamente, en regiones no codificantes del gen NF1

(intron 27b e intron 38), pudieran tener implicaciones en la expresividad fenotípica de la neurofibromatosis Tipo 1 (97), al determinar desequilibrio de ligamiento en segmentos codificantes del gen. (72).

Detección de Secuencias de ADN mutadas en el gen TP53 y Análisis PCR-SSCP

En los exones 7-9 del gen TP53 se han identificado el mayor número de mutaciones (98), por esta razón estos exones fueron los seleccionados para la búsqueda de mutaciones, en pacientes con sospecha de malignización de neurofibromas. En tal sentido, se optó por el análisis mediante SSCP para efectuar el tamizaje de las posibles mutaciones; ya que, este método tiene ventajas sobre los análisis con RFLP pues se pueden detectar polimorfismos de ADN y mutaciones de punto en una variedad de posiciones de fragmentos de ADN (99). De igual modo, los análisis por SSCP tienen mayor sensibilidad que los procedimientos inmunohistoquímicos utilizados para la detección de mutaciones. No obstante, siendo considerado un procedimiento relativamente simple, el análisis por SSCP resulta ineficiente en el estudio de fragmentos con una longitud mayor a 400 bp; como tampoco revela la posición en la que ha ocurrido el cambio en el segmento genómico estudiado, requiriéndose para ello estudios de secuenciación de ADN.

De los cuatro pacientes analizados (Gráfico 23), en tres de ellos se observa un patrón diferente al control sano (carriles 2, 7-8). Un resultado similar se aprecia en los familiares de los pacientes (carriles 3, 4, 6), lo cual indica la presencia de al menos una mutación. En relación a la muestra del paciente presentado en el carril 5, esta se comporta igual que el control sano; ello es indicativo de que, no hay cambios mutacionales en este segmento del gen TP53, al menos en los exones 7-9. Es de señalar que, la muestra en cuestión, corresponde a una niña (0891) de la familia P-R

(Figura 4), con la Variedad Espinal de Neurofibromatosis tipo 1 (Gráfico 9), caracterizada por el bajo número de neurofibromas dérmicos y la presencia llamativa de los mismos en raíces espinales, como localización preferente (81).

Mutaciones tumor-específicas en p53 fueron primeramente identificadas en 1989 y en su mayoría son mutaciones de punto en el gen TP53 (100, 101, 102, 103). Estas mutaciones son excepcionalmente diversas en su naturaleza y posición. El mecanismo generalmente aceptado detrás de la supresión trans-dominante de p53, es la inactivación de p53 normal por causa de su heteromerización con p53 mutada. La p53 forma un tetrámero para realizar su función de supresor tumoral y esta oligomerización es mediada por la región que controla este proceso (residuos 319-360) (104, 105, 106, 107, 108, 109, 110). Pareciera que, la p53 mutada tiene la habilidad de conducir a la p53 funcional, transformándola a mutante o probablemente a una conformación inactiva. Esto es, tales mutaciones no solo resultan en la abolición de la actividad de la p53 normal, sino que la expresión de la p53 mutada tiende a ganar funciones oncogénicas, tal como sería la de interferir con la apoptosis p53-independiente (111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120). Además, la heteromerización de p53 disminuye su habilidad de ligarse o combinarse con específicas secuencias diana o blanco de ADN y de transactivarse aguas abajo con ciertos genes (121-123).

Para dilucidar el tipo de mutación presente en tres de los pacientes, los productos PCR fueron enviados al Centro de Secuenciación y Análisis de Ácidos Nucléicos del IVIC (CeSAAN). Como resultado, en la muestra correspondiente a la paciente identificada con el código 0912 (familia T-R) (Figura 4), el alineamiento de las secuencias del exón 9 evidencia la inserción de una base pirimídica, Timina (T), en el extremo 3' del exón 9 que altera el marco de lectura a partir de este sitio y se

crea un codón de parada (tga) que conduce a la producción de una proteína truncada y por ello inactiva (Tabla 18).

También, es esta inserción de un nucleótido la que determina cambios conformacionales en TP53, evidenciables en los cambios de movilidad observados al realizar el análisis PCR-SSCP (Gráfico 23).

Inserciones de nucleótidos son muy comunes en porciones no-codificantes del genoma, pero más raras en segmentos codificantes (41), donde ellas producen las consecuencias señaladas: una secuencia de aminoácidos completamente diferente a partir del sitio de la inserción, en la cadena peptídica de la correspondiente proteína, en este caso p53; y además truncada, en un punto no muy distante del lugar en donde se realizó la inserción, por la creación de un codón terminal (tga) en el aminoácido 336.

El marco abierto de lectura de la TP53 humana (“open reading frame”) codifica para 393 aminoácidos, que se sitúan en tres principales dominios estructurales: un dominio amino-terminal que contiene una fuerte señal de activación de la transcripción, un dominio que es el centro de ligamiento con ADN (DNA-binding core domain) y un dominio carboxi-terminal, que media en la oligomerización (108, 124, 125). La mayoría de las mutaciones de p53 se concentran en el dominio central (residuos 96-292) y cerca de un 20 por ciento de todas las mutaciones, estarían agrupadas en cinco “puntos calientes” del dominio central: residuos 175, 245, 248, 249 y 273 (102, 112, 113, 114, 125, 126).

En el caso detectado en esta investigación, la alteración de la estructura primaria de la proteína p53, ocurre en el extremo carboxi-terminal, en un segmento

de la molécula (aa: 319-360) responsable de la oligomerización de p53 en tetrámeros, que es la forma bajo la cual la proteína funciona en la célula (106, 107). En consecuencia, la mutación evidenciada en la paciente, tiene inactivados los mecanismos de control TP53-dependientes o algunos de ellos, por estar afectados su estabilidad termodinámica y su estatus de oligomerización. Al respecto, precisos análisis termodinámicos experimentales han evidenciado que, la p53 humana es solo marginalmente estable a la temperatura corporal; de modo que, mutaciones que ayudan a comprometer aún más su estabilidad reduciéndola, tienden *in-vivo* a crear problemas de plegamiento de la molécula afectando su funcionalismo parcial o totalmente (124, 125).

Estudios de la contribución que hace, casi que cada aminoácido, para la estabilidad termodinámica del dominio de tetramerización (oligomerización) en 25 tipos de mutaciones, han revelado que cadenas truncadas de Leu 344 o Leu 348, lleva a la formación de dímeros de moderada estabilidad en lugar de tetrámeros. A su vez, cadenas trunca de Arg 333, o de Asn 345, o de Glu 349, o de Ala 347 o de Thr 329 fueron más desestabilizadoras. En tanto que, substituciones fuertemente desestabilizantes incluyen: Met 340, Phe 328, Arg 337 y Phe 338. Cadenas trunca de cualquiera de estos tres últimos residuos, previenen el plegamiento o solo lo permiten si están presentes altas concentraciones proteicas o bajas temperaturas (125).

Las manifestaciones fenotípicas del paciente 0912 portadora de la mutación en TP53 ya han sido delineadas "*vidae infra*" Solo resta agregar que, durante el estudio quedo embarazada, procreando un varón quien presentó MCL al momento del nacimiento, y el cual aún no ha sido visto en nuestro laboratorio. Los restantes pacientes con alteraciones al análisis PCR-SSCP corresponden a: 0886, una joven de 16 años con MCL congénitas y NF desde los 11 años de edad. Exhibe nódulos de Lisch y no tiene indicios de malignización hasta el momento del estudio. El otro caso

índice es la paciente 0929 de 33 años de edad, con manifestaciones de NF1 desde los dos años de edad. NF: más de 400 y MCL: más de 29. Nódulos de Lisch +, sin signos de malignización hasta el presente.

El estudio desarrollado en esta Tesis ha permitido manejar directamente y de primera mano, todas las etapas y elementos del proceso investigativo, desde el estudio clínico-genético que dio acceso a la Historia Familiar de cada paciente, pasando por su evaluación fenotípica que está documentada fotográficamente, hasta la realización de los estudios moleculares correspondientes. De ahí que, no dejan de ser relevantes los siguientes hechos:

1.- Solo el 27 % de los casos estudiados en la Tesis corresponden a neomutaciones, en contraposición al \pm 50% que suele reportarse en la literatura internacional y que repetimos, corresponden a investigaciones en las que corrientemente se utilizan archivos documentales y genotecas. En el origen de estas neomutaciones no se apreció influencia, ni de la edad materna ni de la paterna, como en ocasiones se ha indistintamente postulado.

2.- El porcentaje de malignización en el universo muestral estudiado fue de 5,6 %, el cual si esta en correspondencia con lo reportado en publicaciones internacionales, que lo ubican entre 3 – 15 % (12). Sin embargo, en nuestro estudio existe un grupo de pacientes a los que se le practicó con fines predictivos análisis PCR-SSCP del gene TP53 (exones 5-6 y 7-9), el cual esta frecuentemente envuelto en procesos de malignización en pacientes NF1. Estos pacientes muestran, patrones de migración electroforética indicativos de cambios conformacionales en dicho gen, causados por mutaciones. De hecho, en uno de estos pacientes en la que se pudo secuenciar el gen, se logro evidenciar dicha mutación. Obviamente, todo este grupo de pacientes constituye una población a riesgo; aún cuando todavía, no han desarrollado

manifestaciones clínicas indicativas de malignización. Esta circunstancia enfatiza, la utilidad de asociar estos procedimientos de estudio del gen TP53 en pacientes afectados por NF1.

3.- La distribución de alelos de los marcadores microsatélites IVS27AC28.4 e IVS38GT53.0 en 23 pacientes con NF1 y en un número semejante de sujetos sin la enfermedad resulta igualmente relevante. El microsatélite IVS38GT53.0, el más polimórfico, se presenta en las electroforesis de los afectados con 8 alelos y con 12 en los individuos sanos. Ello pudiera reflejar una asociación preferencial de ciertos alelos con NF1, que también pudiera influenciar su variable expresividad fenotípica. De cualquier modo, lo que si queda claro es que, el número de alelos observados en los sujetos sanos y enfermos de nuestro estudio con este marcador, es diferente al de otras poblaciones caucasoides (franco-canadiense). Por otra parte, la distribución de alelos con el microsatélite IVS27AC28.4, el menos polimórfico, se observan tan solo 4 alelos en sujetos afectados por NF1 y 10 en los individuos sanos. Estos resultados también pudieran ameritar comentarios semejantes a los ya realizados para el otro marcador; pero además agregar que, el número de alelos detectados en los enfermos resulta menor que el reportado en población de españoles: 7 y de italianos: 6.

CONCLUSIONES

La investigación realizada comprobó y verificó, clínica y estadísticamente, la

variabilidad fenotípica de la Neurofibromatosis tipo 1 (NF1).

En el universo muestral de 70 casos diagnosticados con NF1, 19 (27%) corresponden a neomutaciones y 51 son casos segregantes. Corrientemente, en la literatura internacional consultada se establece que, los casos de NF1 producto de neomutaciones del locus representan aproximadamente el 50% de los enfermos. Sin embargo, es de hacer notar que usualmente tales publicaciones son derivadas, de equipos de investigadores que trabajan con Bancos de ADN, sin acceso a los pacientes y a sus grupos familiares, como tampoco a las Historias Médicas.

No se encontró preferencia en el origen geográfico (focalización) de ancestros de los pacientes; como tampoco, incremento de las edades parentales (paterna ni materna) en los afectados por neomutaciones, como en el pasado algunas publicaciones lo han planteado.

Para rasgos cuantitativos, existe una relación inversa entre la MCL y los NF. Mientras las MCL pueden estar presentes desde el nacimiento, su número y en ocasiones su tamaño suelen incrementarse en la medida en que la niñez progresa y se alcanza la adultez; para luego, en tanto la adultez avanza, ir reduciendo su número, su tamaño y la intensidad de la pigmentación. En tanto que, los NF suelen manifestarse en la juventud tardía o en la adultez temprana, aumentando en número y en tamaño según esta progresa.

En una misma familia, con afectados en más de una generación y por consiguiente con el mismo tipo de mutación en NF1, no son comparables ni en número ni en tamaño las MCL y los NF que los individuos exhiben. Incluso entre afectados contemporáneos, pertenecientes a una misma generación.

Excepto por la familia D-G, en la que tanto el padre (0917) como el único hijo (0917-1) presentan neurofibromas plexiformes, en el padre mucho más extenso, en el resto de las familias segregantes no se observó agregación familiar de este tipo de manifestaciones; como tampoco para las convulsiones; pero si para las dificultades de aprendizaje.

Los nódulos de Lisch suelen manifestarse después de las MCL y antes que los NF; mientras que, de las manifestaciones binarias acompañantes, las dificultades de aprendizaje y la escoliosis, fueron las más frecuentemente encontradas.

En general, en casos segregantes y por tanto portadores del mismo tipo de mutación para el locus NF1, la correlación resultante de la comparación fenotípica (semejanza) pareada entre afectados de una generación con la(s) siguiente(s), cambia (decrece) en la medida que el parentesco se hace más distante o lejano y por tanto se es más joven en el mismo grupo familiar.

En la investigación realizada, se reconocieron dos casos, uno segregante y el otro no-segregante, con la “rara” variedad Espinal de NF1, los cuales permitieron demostrar, a pesar de algunas publicaciones en contrario, que tanto las MCL como los nódulos de Lisch si son manifestaciones acompañantes de la NF1 y que, tanto los estudios de Resonancia Magnética como la gonioscopia deben realizarse por personal especializado en todo paciente con NF1, sean o no sintomáticos en esta área (81,116, 117).

Cuatro de los pacientes con NF1 desarrollaron durante la investigación o ya se les habían diagnosticado, procesos malignos, ellos incluyen: una con un “tumor

maligno de la membrana de nervios periféricos” (MPNST), también llamado Schwannoma maligno o neurofibrosarcoma, a nivel del plexo braquial derecho. Dicho tumor está muy frecuentemente asociado con NF1. Dos pacientes más desarrollaron carcinomas mamarios y otra un adenocarcinoma del recto. Todo ello representa un 5,6 % de malignización para el universo muestral estudiado.

Se preparó un Banco de ADN con muestras, tanto de pacientes afectados por NF1 como de familiares no afectados, el cual se mantiene en el Laboratorio de Biología Molecular del CIADANA (Facultad de Ciencias de la Salud. UC. Sede Aragua). El Banco de ADN está constituido por 114 muestras, con un promedio de A_{260}/A_{280} nm de 1,87, un promedio de concentración de 41,0 ng/ μ L y un rendimiento promedio de 8,2 μ g totales.

El estudio del polimorfismo en los microsatélites intragénicos IVS27AC28.4 e IVS38GT53.0, evidenció que este último es el más polimórfico; presentó 8 alelos en los enfermos y 12 en los que no padecen la enfermedad. En sujetos sanos se detectó un alelo mayor de 200 pb que no ha sido reportado en la literatura y cuyo tamaño exacto, será determinado una vez que pueda efectuarse la secuenciación de ADN.

El microsatélite IVS27AC28.4 muestra menor polimorfismo. En los enfermos se observan solo 4 alelos; lo cual contrasta con lo reportado en otros grupos étnicos, donde se ha descrito un número entre 6 y 7 alelos. A su vez, en los individuos sanos se observaron 10 alelos.

En los individuos sanos se observó la presencia de un número mayor de alelos en ambos microsatélites en relación con otras poblaciones; esta situación puede explicarse, por el proceso de mestizaje y el consiguiente flujo génico (“gene flow”)

que ha operado entre distintos grupos étnicos de la población venezolana desde su momento fundacional.

Aún cuando no se han identificado los alelos por el tamaño, por cuanto se requiere secuenciar todas las formas alélicas detectadas, tanto en afectados como no afectados por NF1, se observa un contraste muy evidente en los patrones de migración electroforética de ambos grupos de individuos para IVS27AC28.4 e IVS38GT53.0.

Estos resultados sugieren, la existencia de una asociación preferencial de alelos con NF1; que de ser cierta, pudiera tener implicaciones en la variabilidad de la expresión fenotípica que tiene la condición. De ahí que, el uso de marcadores microsatélites intragénicos (IVS27AC28.4, IVS27AC33.1 e IVS38GT53.0) sería de gran utilidad como herramienta de trabajo para el Asesoramiento Genético en casos de Diagnóstico Prenatal (126).

El análisis de los exones 7-9 del gen TP53 realizado por PCR-SSCP mostró que, en tres de los cuatro casos índice seleccionados (0886, 0912, 0929) y en sus respectivos familiares (0886-1, 0886-2, 0912-3), quienes también manifestaban la enfermedad, estos igualmente presentaban cambios en la migración electroforética en relación a un control sano; lo cual es indicativo de la presencia de, al menos, una mutación en el correspondiente segmento genómico. En uno de los pacientes, el análisis por PCR-SSCP arrojó un perfil semejante al del control sano; y en este caso se trató, de la niña (0891) que presenta la variedad Espinal de NF1.

Los productos PCR de los tres pacientes identificados como portadores de al menos una mutación en TP53, fueron enviados para secuenciación al CeSAAN

(IVIC). Ello sólo fue posible en dos de las muestras, de las cuales el alineamiento de secuencias correspondientes a los exones 7-9 del gen TP53 reveló en una (0912), la inserción de una base pirimidica, Timína (T), hacia el extremo 3' del exón 9, que provoca una alteración del marco de lectura a partir de este sitio.

La inserción de T y la alteración consecencial del marco de lectura, lleva a la creación de un codón de parada (tga) en la posición 336, lo cual determina la producción de una proteína (p53) truncada, en un punto no muy distante del lugar donde se realizó la inserción.

La mutación de punto ocurre en este caso, en el dominio que media en la oligomerización de p53 en tetrámeros (residuos 319 – 360), que es la forma en que la proteína funciona en las células. Al afectarse la estabilidad termodinámica del dominio de tetramerización como resultado de la mutación, la p53 mutada pierde sus funciones de supresor tumoral; ya que, la oligomerización parece ser esencial para el cumplimiento de estas tareas.

El resultado obtenido con la otra muestra que pudo ser secuenciada (0891), donde el alineamiento de la secuencia del exón 7-9 del gen TP53 no muestra mutaciones; como tampoco, el análisis por PCR-SSCP evidencia cambios conformacionales solo nos indica que, en este particular segmento del gen no existen mutaciones. Pero pudieran haberlas en uno cualquiera de los otros dos dominios, particularmente en el dominio central (residuos 96-292) donde suele agruparse la mayoría de las mutaciones del gen.

En el grupo de casos índice estudiados para los marcadores microsatélite: IVS27AC28.4 e IVS38GT53.0, encontramos un inicio precoz (congénito) de la enfermedad en un 55,5 por ciento de los pacientes, mediante la aparición de las

“máculas café con leche” desde el momento del nacimiento. En tanto que, si el periodo de inicio a considerar se sitúa entre los 0 a 3 años, el porcentaje alcanza el 72,2 por ciento. Sin embargo, habría que preguntarse, ¿hasta donde el genotipo condicionado por estos marcadores influye en este inicio precoz de la condición?. La respuesta a esta interrogante pudiera aclararse mediante el estudio comparativo de los distintos genotipos, contrastándolos entre el grupo de pacientes con inicio precoz y el grupo de inicio “tardío”. De modo semejante, tal metodología pudiera ser aplicada a otras variables de la enfermedad, tales como: manifestaciones esqueléticas, estatura, defectos de aprendizaje, desarrollo de convulsiones, desarrollo de hipertensión arterial...

Se estima que, por ser las repeticiones cortas en tándem, como los microsatélites, dispersas en el gen NF1 y también en las secuencias flanqueantes del mismo, sitios expuestos a errores de apareamiento capaces de originar un número fluctuante de copias, que a su vez predisponen a deleciones o inserciones de una o más repeticiones, como sitios proclives a desempeñar un papel en el condicionamiento de la variabilidad que en su expresión fenotípica tiene la Neurofibromatosis tipo 1.

Si bien el tamaño de los alelos observados mediante el uso de estos marcadores no fue determinado, los hallazgos de esta Tesis son sugerentes de una asociación preferencial entre ciertas formas alélicas y la condición NF1. Es así como, abonando esta posibilidad, en las electroforesis respectivas se observó, un mayor número de alelos en los sujetos sanos que en los afectados, siendo el microsatélite IVS38GT53.0 más polimórfico que el IVS27AC28.4. De ahí que, si esto resultara cierto, marcadores ligados al locus NF1 serían de gran utilidad en procedimientos de diagnóstico prenatal y de diagnóstico de niños “presintomáticos” en situación de

riesgo, por provenir de familias con miembros afectados por la enfermedad (43, 126).

Las alteraciones detectadas en un segmento del gen TP53, son una muestra de la necesidad de su estudio en estos pacientes, como indicador de predictibilidad para eventualmente anticipar en los pacientes afectados, el riesgo a desarrollar, en un momento cualquiera de su evolución, manifestaciones complicativas (malignización) de la enfermedad (127), permitiendo la aplicación oportuna de estrechas medidas de seguimiento médico preventivo y/o curativo.

Sería muy interesante, armar haplotipos con los microsatélites estudiados y ver su segregación en familias con varias generaciones de afectados, con fines de constatar si un haplotipo determinado segrega con la enfermedad, de manera que sea posible suministrar diagnósticos “presintomáticos”. Publicaciones al respecto (43), han demostrado el valor de los análisis de segregación de alelos con marcadores intragénicos para NF1, iguales a los utilizados en nuestro estudio (IVS38GT53.0), como herramienta para el análisis genético. Las familias estudiadas han sido más informativas con el uso de microsatélites intragénicos, que con el uso de microsatélites RFLP como marcadores extragénicos. Por lo demás, estos análisis suelen utilizar microsatélites intragénicos que cubren cerca de 50 kb del gen; así como también, marcadores extragénicos para ambos extremos flanqueantes del gen, a fin de chequear la posibilidad de eventos recombinatorios en esos niveles.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1.- Crowe FW. Axillary freckling as a diagnostic aid in Neurofibromatosis. *Ann Intern Med* 1964. 61:1142-1143.
- 2.- Crowe FW, Schull WJ, Neel JV. A clinical, pathological and genetic study of Multiple Neurofibromatosis 1956. Charles C Thomas. Springfield, III.
- 3.- Huson SM, Clark P, Compston DAS, Harper PS. A genetic study of von Recklinghausen Neurofibromatosis in South East Wales. I: prevalence, fitness, mutation rate and effect of parenteral transmission on severity. *J Med Genet* 1989. 26: 704-711.
- 4.- North KN. Clinical aspects of neurofibromatosis 1. *Eur J Pediatr Neurol* 1998. 2: 223-231.
- 5.- Huson SM, Rosser EM. The Phakomatoses. En: *Principle and Practice of Medical Genetic* 1997. Third Edition. Vol: II. Chapter 106. p. 2269-2277. Edited by: David Rimoin, J Michael Connor, Reed E Pyeritz. Churchill Livingstone. NY. London. San Francisco. Melbourne.
- 6.- Rasmussen SA and Friedman JM. NF1 gene and Neurofibromatosis Type 1. *Am J Epidemiol* 2000. 151(1): 33-40.
- 7.- Sergeyev AS. On the mutation rate of Neurofibromatosis. *Hum Genet* 1975. 28: 129-138.
- 8.- Buning GR, Needle M, Riccardi VM. Paternal age and sporadic neurofibromatosis 1: a case-control study and consideration of the methodologic issues. *Genet Epidemiol* 1977. 14: 507-516.
- 9.- Grant WM, Walton DS. Distinctive Gonioscopic findings in Glaucoma due to Neurofibromatosis. *Arch Opthal* 1968. 79: 127-134.
- 10.- Zehavi C, Romano A, Goodman RM. Iris (Lisch) nodules in Neurofibromatosis. *Clin Genet* 1986. 29: 51-55.

- 11.- Otsuka F, Kawashima T, Imakado T, y col. Lish nodules and skin manifestations in neurofibromatosis type 1. Arch Derm 2001. 137: 232-233.
- 12.- Knight WA, Murphy WK, Gottlieb JA. Neurofibromatosis associated with malignant neurofibromas. Arch Derm 1973. 107: 747-750.
- 13.- Korf BR. Malignancy in Neurofibromatosis Type 1. The Oncologist 2000. 5: 477-485.
- 14.- Colman SD, Williams CA, Wallace MR. Beningn neurofibromas in type 1 neurofibromatosis (NF1) show somatic deletions of the NF1 gene. Nat Genet 1995. 11: 90-92.
- 15.- D'Agostino AN, Soule EH, Miller RH. Sarcomas of the peripheral nerves and somatic soft tissues associated with multiple neurofibromatosis (von Recklinghausen disease). Cancer 1963. 16: 1015-1027.
- 16.- Skuse GR, Cappione AJ, Sowden M, y col. The neurofibromatosis type 1 messenger RNA undergoes base-modification RNA editing. Nucleic Acids Res 1996. 24: 478-485.
- 17.- Vogel KS, Klesse LJ, Velasco-Miguel S, y col. Mouse tumor model for neurofibromatosis type 1. Science 1999. 286: 2176: 2179.
- 18.- Legius E, Dierick H, Wu R, y col. TP53 mutations are frequent in malignant NF1 tumors. Gene Chromosome Cancer 1994. 10: 250-255.
- 19.- Gutmann DH. The neurofibromatoses: when less is more. Hum Mol Genet 2001. 10(7): 747-755.
- 20.- Kalff V, Shapiro B, Lloyd R, y col. The spectrum of pheochromocytoma in hypertensive patients with neurofibromatosis. Arch Intern Med 1982. 142: 2092-2098.
- 21.- Fitzpatrick AP, Emanuel RW. Familial Neurofibromatosis and hypertrophic cardiomyopathy. Brit Heart J 1988. 60: 247-251.
- 22.- Tibbles J and Cohen MM. The Proteus syndrome: the Elephant Man diagnosed. Brit Med J 1986. 293: 683-5.
- 23.- Vargas-Arenas J. Proteus syndrome in a Venezuelan family. Memorias VI

Congreso de Investigación. Universidad de Carabobo. Valencia-Venezuela. Tomo I. p. 353-357. 2009. ISBN: 978-980-233-482-7.

- 24.- Ars E, Kruyer H, Gaona A, y col. A clinical variant of Neurofibromatosis type 1: Familial Spinal Neurofibromatosis with a frameshift mutation in NF1 gene. *Am J Genet* 1998. 62: 834-841.
- 25.- Miller M, Hall JG. Possible maternal effect on severity of Neurofibromatosis. *Lancet*. 1978. 2: 1071-1073.
- 26.- Carey JC, Laub JM, Hall BD. Penetrance and variability of neurofibromatosis: A genetic study of 60 families. *Birth Defects* 1979. 15: 271-281.
- 27.- Riccardi VM, Wald JS. Discounting an adverse maternal effect on severity of Neurofibromatosis. *Pediatrics* 1987. 79: 386-393.
- 28.- Vargas-Arenas J, Moreno N, Martinez JA, Pulido N. Parametric and nonparametric analysis of variation in expression of neurofibromatosis Type 1 (NF1) in a large venezuelan family. *Resumos do 52^o Congresso Brasileiro de Genética*. 3 a 6 de setembro de 2006. p. 403. Foz do Iguazu. Paraná-Brasil. www.sbg.org.br – ISBN 978-85-89109-06-2.
- 29.- Easton DF, Ponder MA, Huson SM, y col. An analysis of variation in expression of neurofibromatosis (NF) type 1 (NF1). Evidence for modifying genes. *Am J Hum Genet* 1993. 53: 305-313.
- 30.- Atlas SW, Zimmermann RA, Bruce D, y col. Neurofibromatosis and agenesis of the corpus callosum in identical twins: MR diagnosis. *Am J Neuroradiol* 1998. 9: 298-601.
- 31.- Upadhyaya M, Roberts SH, Maynard J, y col. A cytogenetic deletion del(17)(q11,22;22q21.1) in a patient with sporadic neurofibromatosis type 1 (NF1) associated with dysmorphism and developmental delay. *J Med Genet* 1996. 33: 148-152.
- 32.- Streubel B, Latta E, Kehrer-Sawatzki H, y col. Somatic mosaicism of a greater than 1.7-Mb deletion of genomic DNA involving the entire NF1 gene as verified by FISH: further evidence for a contiguous gene syndrome. *Am J Med Genet* 1999. 87: 12-16.
- 33.- Tonsgard JH, Yelavarthi KK, Cushner S, y col. Do NF1 gene deletions result in a characteristic phenotype?. *Am J Med Genet* 1997.

- 34.- Wu BL, Boles RG, Yaari H, y col. Somatic mosaicism for deletion of the entire NF1 gene identified by FISH. Hum Genet 1997. 99: 209 - 213.
- 35.- Gervasini C, Bentivegna A, Venturin M, y col. Tadem duplication of the NF1 gene detected by high-resolution FISH in the 17q11.2 region. Hum Genet 2002. 110: 314-321.
- 36.- Kehrer-Sawatzki H, Assum G, Hameister H. Molecular characterization of t(17;22)(q11.2) is not consistent with NF1 duplication. Hum Genet 2002. 111: 465-467.
- 37.- Barker DE, Wright K, Nguyen L, y col. Gene for von Recklinghausen Neurofibromatosis is in the pericentromeric region of chromosome 17. Science 1987. 236: 1100-1101.
- 38.- Ledbetter DH, Rich DC, O'Connell P, y col. Precise localization of NF1 to 17q11.2 by balanced translocation. Am J Hum Genet 1989. 44: 20-24.
- 39.- Cawthon RM, Weiss R, Xu G. A major segment of the neurofibromatosis type 1 gene: DNA sequence, genomic structure and point mutation. Cell 1990. 62: 193-201.
- 40.- Viskolchil D, Buchberg AM, Xu G. Deletion and translocation interrupt a clone gene at the Neurofibromatosis type 1 locus. Cell 1990. 62: 187-192.
- 41.- Strachan T and Read A. Organization and Expression of the Human Genome. En: Human Molecular Genetics 1996. Chapter 7. p. 147-182. Wiley-Liss BIOS Scientific Publishers Ltd. Oxford. UK.
- 42.- Shen MH, Harper PS, Upadyaya M. Molecular genetics of Neurofibromatosis type 1 (NF1). J Med Genet 1996. 33: 2-17.
- 43.- Oguzkan S, Cinbis M, Ayter S, y col. Molecular analysis of neurofibromatosis type 1 in Turkish families using polymorphic markers. Turkish J Pediatrics 2003. 43: 192-197.
- 44.- Scheffzek K, Reza Ahmadian M, Wiesmuller L, y col. Structural analysis of the GAP-related domain from neurofibromin and its implications. The EMBO Journal 1998. 17(15): 4313-4327.

- 45.- Ponder BAJ. Inherited predisposition to cancer. *Trends Genet* 1990. 6: 213-218.
- 46.- Feldkamp MM, Angelov L, Guha A. Neurofibromatosis Type 1. Peripheral nerve tumors: aberrant activation of the Ras pathway. *Surg Neurol* 1998. 51(2): 211-218.
- 47.- Yumoue S, Tokuo H, Fukunaga K, y col. Neurofibromatosis type 1 tumor suppressor neurofibromin regulates neuronal differentiation via its GTPase-Activating protein function toward Ras. *J Biol Chem* 2003. 278(29): 26978-69.
- 48.- Jacks T, Shih TS, Scmitt EM. Tumour predisposition to mice heterozygous for a targeted mutation in NF1. *Nature Genet* 1994. 7: 353-361.
- 49.- Guo II-F. The I, Hannau F, y col. Requirement of *Drosophila* NF1 for activation of adenyl cyclase by PACAP38-like neuropeptides. *Science* 1997. 276: 795-798.
- 50.- Kim ILA, Ling B and Ratner N. NF1-deficient mouse Schwann cells are angiogenic and invasive and can be induce to hyperproliferate reversion of some phenotype by an inhibitor of farsenyl protein transferase. *Mol Cell Biol* 1997. 17: 862-872.
- 51.- Gutmann DH, Andersen LB, Cole JL, y col. An alternatively spliced mRNA in the carboxy terminus of the Neurofibromatosis Type 1 (NF1) gene is expressed in muscle. *Hum Mol Genet* 1993. 2: 989-992.
- 52.- Gutmann XH, Zhang Y and Hirbe A. Developmental regulation of neuro-specific neurofibromatosis 1 isoform. *Ann Neurol* 1999. 45: 777-782.
- 53.- Gregory PE, Gutmann DH, Mitchell A, y col. Neurofibromatosis type 1 gene product (Neurofibromin) associates with microtubules. *Somat Cell Mol Genet* 1993. 19: 265-274.
- 54.- Bollag G, McCormick F and Clark R. Characterization of full-length neurofibromin: tubulin inhibits ras Gap activity. *The EMBO Journal* 1993. 12: 1923-1927.
- 55.- Hollstein M, Sindransky D, Vogelstein B and Harris CC. p53 mutation in human cancers. *Science* 1991. 253: 49-53.

- 56.- Malkin D, Li FP, Strong LC, y col. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas and other neoplasm. *Science* 1990. 250: 1233-1238.
- 57.- Griffiths AJF, Gelbart WM, Miller JH, y col. Regulación del número celular: Células Normales y Células Cancerosas. En: *Modern Genetic Analysis* 1999. Chapter 15. p. 465-489. W.H. Freeman Co.
- 58.- Rodenhiser DI, Andrews JD, Mancini DN, y col. Homonucleotide tracts, short repeats and C_p G/C_p N_p G motifs are frequent sites for heterogeneous mutations in the neurofibromine type 1 tumor-suppressor gene. *Mut Res* 1997. 373: 185-195.
- 59.- Wallace MR, Andersen LB, Saulino AM, y col. A de novo Alu insertion results in neurofibromatosis type 1. *Nature* 1991. 353: 864-866.
- 60.- Wu R, López-Correa C, Rutkowski JL, y col. Germline mutations in NF1 patients with malignancies. *Genes Chrom Cancer* 1999. 26: 376-380.
- 61.- Ottini L, Esposito DL, Richetta A, y col. Alterations of microsatellites in neurofibromas of von Recklinghausen's disease. *Cancer Res* 1995. 55: 5677-5680.
- 62.- Wallace MR and MacCollin. Genetics of NF1 and NF2. En: *Molecular Genetics of Cancer* 2001. Chapter 5. p. 95-113. Ed: J.K. Cowell. Second Edition. BIOS Scientific Publisher Ltd. Oxford. UK.
- 63.- Li M, Lee DJ, Tockman MS, y col. Microsatellite alterations as clonal markers for the detection of human cancer. *Proc Natl Acad Sci* 1994. 91: 9871-9875.
- 64.- Fang L, Chalhoub N, Li W, y col. Genotype analysis of the Nf1 gene in the French Canadians from the Quebec population. *Am J Med Genet* 2001. 104(3): 189-98.
- 65.- Peters H, Luder A, Harder A, y col. Mutation screening of neurofibromatosis type 1 (NF1) exons 28 and 29 with single strand conformation polymorphism (SSCP): five novel mutations, one recurrent transition and two polymorphisms in a panel of 118 unrelated NF1 patients. *Hum Mut* 1999. 13(3): 258.
- 66.- Messiaem LM, Callens T, Mortier G, y col. Exhaustive mutation analysis of the

NF1 gene allows identification of 95% of mutations and reveal a high-frequency of unusual splicing defect. *Hum Mut* 2000. 18(6): 549-550.

- 67.- Lepping K, Kaplan P, Viskochil D, y col. Familial Neurofibromatosis 1 gene deletions: cosegregation with distinctive facial features and early onset of cutaneous neurofibromatosis. *Am J Med Genet* 1997. 73: 197-204.
- 68.- Dorschner MO, Sybert VP, Weaver M, y col. NF1 microdeletions breakpoints are clustered at flanking repetitive sequences. *Hum Mol Genet* 2000. 9: 35-46.
- 69.- Mulvihill JJ, Parry DM, Sherman JL, y col. NIH Conference: Neurofibromatosis 1. (Recklinghausen disease) and neurofibromatosis 2 (bilateral acoustic neurofibromatosis). An update. *Ann Intern Med* 1990. 113: 39-52.
- 70.- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extraction DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988, 16(3): 1215
- 71.- Kirby L. Specimens: DNA Extraction Finger Printing 1992W Freeman and Co. New York.
- 72.- Valero MC, Velasco E, Valero A, Moreno F. Linkage disequilibrium between four intragenic polymorphic microsatellites of the NF1 gene and its implications for genetic counselling. *J Med Genet* 1996. 33: 590-593.
- 73.- Genome Database: <http://www.gdb.org/gdb-bin/genera/hgd/ampliment> .
- 74.- Saiki RK. Amplification of Genomic DNA. En: PCR protocols. A guide to methods and amplifications 1990. P. 13-20. Edited by: MA Innis, DH Gelfand, JJ Sminky, FJ White. Academic Press. San Diego.
- 75.- Flores-Angulo C. Optimización de un ensayo de Reacción en Cadena de la Polimerasa para amplificar los exones 5-9 del gen TP53. Trabajo de Grado presentado en la Escuela de Medicina “Dr. José Witremundo Torrealba” de la Universidad de Carabobo Sede Aragua, como uno de los requisitos para obtener el título de Médico - Cirujano. Octubre 2008.
- 76.- American Society of Clinical Oncology. American Society of Clinical Oncology policy statement update: genetic testing for cancer susceptibility. *J Clin Onc* 2003;21: 2397-406.

- 77.- Grunenwald H. Optimization of Polymerase Chain Reactions. En: Bartlett JMS, Stirling D, editors. PCR Protocols. 2003. p. 89-99. Humana Press. New Jersey.
- 78.- Hung K, Ping S. Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) Analysis. En: Walker J, Rapley R. Molecular Biomethods Handbook. 2nd Edition 2008. p. 117- 31. Humana Press. USA.
- 79.- Liechti-Gallati S, Schneider V, Neeser D, Kraemer R. Two buffer PAGE system-base SScp/HD analysis: a general protocol for general and sensitive mutation screening in cystic fibrosis and any other human genetic disease. Eur J Hum Genet 1999. 7(5): 590-8.
- 80.- <http://www.ebi.ac.uk/t-coffee> (Consultado Noviembre 2009).
- 81.- Vargas-Arenas J y Suárez Morgade M. Nódulos de Lisch en la Variedad Espinal de Neurofibromatosis Periférica (NF1). Latin Am J of Dysmorphology (LAJD) 2009. 2: 21-29.
- 82.-Riccardi VM and Lewis RA. Penetrance of von Recklinghausen Neurofibromatosis: A distinction between Predecessor and Descendants. Am J Hum Genet 1988. 42: 284-289.
- 83.- Lázaro C, Gaona A, Ganfeng X, y col. A highly informative CA/GT repeat polymorphism in intron 38 of the human neurofibromatosis type 1 (NF1) gene. Hum Genet 1993. 92: 429-430.
- 84.- Lázaro C, Gaona A and Estivill X. Two CA/GT repeat polymorphisms in intron 27 of the human neurofibromatosis (NF1) gene. Hum Genet 1994. 93: 351-352.
- 85.- Natacci F, Colaprieto P, Riva P, y col. Distribution and high frequency of novel alleles at NF1 polymorphic markers in the italian population. Mol Cell Probes 1999. 13(6): 415-20.
- 86.- Sermon K, Van Steirteghem A and Liebaers I. Preimplantation genetics diagnosis. Lancet 2004. 363: 1633-1641.
- 87.- Spits C, De Rycke M, Van Rans N, y col. Preimplantation genetic diagnosis for neurofibromatosis type 1. Mol Hum Reproduction 2005. 11(5): 381-387.

- 88.- Jeffreys AJ, Royle NJ, Wilson V, y col. Spontaneous mutation rates to new length alleles at tandem repetitive hypervariable loci in human DNA. *Nature* 1988. 332: 278-281.
- 89.- Zuliani G, Hobbs HH. A high frequency of length polymorphisms in repeated sequences adjacent to Alu sequences. *Am J Hum Genet* 1990. 46: 963-969.
- 90.- Jakupciak JP, Wells RD. Genetic instabilities in (CTG, CAG) repeats occur by recombination. *J Biol Chem* 1999. 274: 23468-23479.
- 91.- Karthikeyan G, Chary KV, Rao BJ. Fold-back structures at the distal end influence DNA slippage at the proximal end during mononucleotide repeat expansions. *Nucleic Acids Res* 1999. 27: 3851-3858.
- 92.- Verkerk AJ, Pieretti M, Sutcliffe JS, y col. Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell* 1991. 65: 905-914.
- 93.- Kawaguchi Y, Okamoto T, Taniwaki M, y col. CAG expansions in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1. *Nat Genet* 1994. 8: 221-228.
- 94.- Smits AP, Dreesen JC, Post JG, y col. The fragile X syndrome: no evidence for any recent mutations. *J Med Genet* 1993. 30: 94-96.
- 95.- Jansen G, Willems P, Coerwinkel M, y col. Gonosomal mosaicism in myotonic dystrophy patients: involvement of mitotic events in (CTG)_n repeat variation and selection against extreme expansion in sperm. *Am J Hum Genet* 1994. 54: 575-585.
- 96.- Bidichandani SI, Ashizawa T, Patel PI. The GAA triplet-repeat expansion in Friedreich ataxia interferes with transcription and may be associated with an unusual DNA structure. *Am J Hum Genet* 1998. 62: 111-121.
- 97.- Vargas-Arenas J, Martinez JA, Pulido N, Oropeza T, Moreno N. Análisis de los microsatélites intragénicos IVS27AC28.4 e IVS38GT53.0 en un grupo de pacientes con Neurofibromatosis tipo 1 (NF1): Resultados preliminares. VII Congreso Nacional y I Congreso Internacional de Investigación. Universidad de Carabobo. VALENCIA-VENEZUELA. 1-3 Diciembre 2

- 98.- Lazaro C, Gaona A, Ravella A, Volpini V, Estivil X. Prenatal diagnosis of neurofibromatosis type 1: From flanking rflps to intragenic microsatellite markers. En: Prenatal Diagnosis 1995. Volume 15. Pp: 129-134. John Wiley and Sons. Ltd. USA.
- 99.- Petitjean A, Mathe E, Kato S y col. Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutations patterns and tumor phenotype: lessons from recent development in the IARC TP53 database. Hum Mutat 2007. 28(6): 622-9.
- 100.- Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, y col. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. Proc Natl Acad Sci USA 1989. 86(8): 2776-70.
- 101.- Komarova EA, Chernov MV, Franks R y col. Transgenic mice with TP53-responsive IacZ: TP53 activity varies dramatically during normal development and determines radiation and drug sensitivity in vivo. EMBO J 1997. 16: 1391-1400.
- 102.- Komarova EA, Chumakov PM, Gudkov AV. TP53 in cancer origin and treatment. En: Molecular Genetics of Cancer second edition 2001. Chapter 9. p: 195-231. BIOS Scientific Ltd, Oxford.
- 103.- Miller C, Mohandas T, Wolf D y col. Human TP53 gene localized to short arm of chromosome 17. Nature 1986. 319: 783-784.
- 104.- Ko LJ and Prives C. TP53: puzzle and paradigm. Genes Dev 1996. 10: 1054-1072.
- 105.- Cho Y, Gorina S, Jeffrey PD and Pavletich NP. Crystal structure of a TP53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. Science 1994. 265: 346-355.
- 106.- Kussie PH, Gorina S, Marechal V y col. Structure of the MDM2 oncoprotein bound to the TP53 tumor suppressor transactivation domain (comment). Science 1996. 274: 948-953.
- 107.- McLure KG and Lee PW. How TP53 binds DNA as a tetramer. EMBO J 1998. 17: 3342-3350.
- 108.- Bakalkin G, Selivanova G, Yakovleva T y col. TP53 binds single- stranded DNA ends through the C-terminal domain and internal DNA segments via the

middle domain. *Nucleic Acids Res* 1995. 23: 362-369.

- 109.- Clarke AR, Purdie CA, Harrison DJ y col. Thymocyte apoptosis induced by TP53-dependent and independent pathways. *Nature* 1993. 362: 849-852.
- 110.- Casey G, López ME, Ramos JC y col. DNA sequence analysis of exon 2 through 11 and immunohistochemical staining are required to detect all known p53 alterations in human malignancies. *Oncogene* 1991. 13: 1971-1981.
- 111.- Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M y col. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 1994. 54: 4885-4878.
- 112.- Soussi T, Dehouche K and Beroud C. TP53 website and analysis of TP53 gene mutations in human cancer: forging a link between epidemiology and carcinogenesis. *Hum Mutat* 2000. 15: 105-113.
- 113.- Hansen R and Oren M. TP53; from inductive signal to cellular effect. *Curr Opin Genet Dev* 1994. 7: 46-51.
- 114.- Levine AJ. TP53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 1997. 88: 323-331.
- 115.- Von Deimling A, Krone W, Menon AG. Neurofibromatosis type 1: pathology, clinical features and molecular genetics. *Brain Pathol* 1995; 5: 153-162.
- 116.- Poyhonen M, Leisti EL, Kytölä S, Leisti J. Hereditary spinal neurofibromatosis: a rare form of NF1?. *J Med Genet* 1997; 34: 184-187.
- 117.- Messiaen L, Riccardi V, Peltonen J y col. Independent NF1 mutations in two large families with spinal neurofibromatosis. *J Med Genet* 2003; 40(2): 122-126.
- 118.- Anselmo NP, Rey JA, Almeida LO, Custódio AC y col. 2009. Concurrent sequence variation of TP53 and TP73 genes in anaplastic astrocytoma. *Genet Mol Res* 2009. 8(4): 1257-63.
- 119.- Armstrong AB, Wang M, Eble JN, MacLennan GT y col. TP53 mutational analysis supports monoclonal origin of biphasic sarcomatoid urothelial

- carcinoma (carcinosarcoma) of the urinary bladder. *Mod Pathol* 2009. 22(1): 113-8.
- 120.- Karim S, Ali A. Correlation of p53 over-expression and alteration in p53 gene detected by polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism in adenocarcinoma of gastric cancer from India. *World J Gastroenterol* 2009. 15(11): 1381-7.
- 121.- Olivier M, Langerod A, Carrieri P, Bergh J y col. The clinical value of somatic TP53 gene mutations in 1,794 patients with breast cancer. *Clin Cancer Res* 2006. 12(4): 1157- 67.
- 122.- Sigal A, Rotter V. Mutations of the p53 Tumor Suppressor: The Demons of the Guardian of the Genome. *Cancer Res* 2000. 60: 6788.
- 123.- Martin AC, Facchiano AM, Cuff AL, Hernández-Boussard T, y col. Integrating mutation data and structural analysis of the TP53 tumor-suppressor protein. *Hum Mutat* 2002. 19: 149-64.
- 124.- Ho WC, Fitzgerald MX and Marmorstein R. Structure of p53 Core Domain Dimer Bound to DNA. *J Biol Chemistry* 2006. 281: 20494-20502.
- 125.- Mateu MG and Fersht AL. Nine hydrophobic side chains are key determinants of the thermodynamic stability and oligomerization status of tumour suppressor p53 tetramerization domain. *The EMBO J* 1998. 17: 2748 – 2758.
- 126.-Lazaro C, Gaona A, Ravella A, Volpini V, Estivill X. Prenatal Diagnosis. Article first published online 14 Dec 2005. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pd.1970150204/abstract?systemMessage=Due...>
- 127.- Liu DP, Song H and Xu Y. A common gain of function of p53 cancer mutants in inducing genetic instability. *Oncogene* 2010. 949:956

ANEXOS

MODELO DE CONSENTIMIENTO PREVIA INFORMACIÓN (CPI) (CONSENTIMIENTO INFORMADO)

1.- Título de la Investigación :

"Neurofibromatosis tipo 1. Variabilidad Fenotípica e Introducción al Análisis de Polimorfismos de Longitud de ADN en el Gen NF1"

2.- Introducción :

La Neurofibromatosis Periférica (NF1) es una enfermedad genético-hereditaria, causada por la alteración de un segmento de material genético (ADN). Esta alteración, al estar presente en las células sexuales de la madre (óvulo) o del padre (espermatozoide), puede pasar a los hijos (hembras o varones) resultando el portador afectado. Las manifestaciones clínicas principales de la enfermedad son: la presencia de manchas "café con leche" en la piel y el desarrollo de lesiones tumorales nodulares (neurofibromas); otras manifestaciones incluyen: desviaciones de la columna vertebral (escoliosis), degeneración de las articulaciones (artrosis), convulsiones, dificultades de aprendizaje, hipertensión arterial..y el riesgo de transformación maligna de las tumoraciones. Sin embargo, la presencia de estas manifestaciones varía grandemente de persona a persona, tanto en su número como en severidad.

3.- Propósitos de la Investigación :

El proyecto de investigación busca, comprender y explicar las causas o mecanismos por los cuales, las manifestaciones clínicas (fenotípicas) suelen variar en NF1 de paciente a paciente; así como, entender y predecir en lo posible, factores de riesgo a la malignización que tienen las lesiones tumorales (neurofibromas) en algunos individuos afectados.

4.- Procedimiento a seguir :

Sobre bases totalmente voluntarias y a petición del individuo afectado o su representante legal y de sus familiares cercanos a riesgo referidos por especialistas, los pacientes serán informados de las características y expectativas del proyecto de investigación . Una vez obtenido su consentimiento, se cumplirán dos fases de análisis:

4.1.- Elaboración de Historia Clínica , con énfasis en antecedentes médicos relevantes y entre ellos se incluyen los de familiares cercanos. Seguidamente, se cumplirá el examen clínico (fenotípico), con miras a establecer y verificar el diagnóstico firme de la condición . Este procedimiento se realizará en la Unidad de Genética Médica y Citogenética del Dpto. de Ciencias Fisiológicas . Escuela de Medicina. Universidad de Carabobo. Valencia y será llevado a cabo, bajo la

confidencialidad del secreto médico, por el investigador responsable del proyecto, Prof. Jorge Vargas Arenas, médico especialista en Genética Médica.

4.2.- Toma de muestras para estudio del material genético (ADN) de células sanguíneas y células tumorales, con fines de analizar variaciones (polimorfismos) en la composición química del segmento de ADN (gene) donde se localiza la alteración que causa la enfermedad. El procedimiento de análisis molecular se cumplirá en el Laboratorio de Biología Molecular del CIADANA. F.C.S.. Universidad de Carabobo. Maracay, con la participación del personal laboratorial, que coordina la Dra. Nancy Moreno de Martínez.

5.- Molestias y Riesgos:

Las incomodidades que eventualmente experimentaría la participación del paciente en el proyecto, estarían referidas a las tomas muestrales y serían las propias de la extracción de sangre venosa (3cc) y las que ocasione la anestesia local, en casos de remoción de tejido tumoral dérmico (neurofibromas), cuando ello esté indicado, bien por razones médicas (dolor, compresión ..) o a petición del paciente por razones cosméticas. Este último procedimiento se realizará en ambiente hospitalario (CHET) por especialistas en Dermatología. El riesgo de complicaciones o de lesiones derivadas es, por tanto, despreciable.

6.-Inclusión / Exclusión :

Todo paciente que reúna los criterios diagnósticos internacionalmente establecidos y voluntariamente lo consienta, será incluido en el proyecto de investigación. Tanto la incorporación (participación) como su retiro, son totalmente voluntarios.

7.- Beneficios Esperados :

El proyecto de investigación no tiene ni persigue fines de lucro para el investigador responsable, su costo de ejecución se hará mediante subvenciones aprobadas por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la U.C y con el equipamiento de las dependencias universitarias: UGMC y CIADANA.

A su vez, los pacientes podrán esperar:

7.1.- Un diagnóstico preciso de la enfermedad y la identificación de otros familiares a riesgo de ser portadores del gene mutante.

7.2.- El suministro de Asesoramiento Genético que, entre otros aspectos, dé información acerca del Riesgo Genético de Recurrencia en la descendencia de casos afectados.

7.3.- La posibilidad de obtener un diagnóstico predictivo, que señale la predisposición a desarrollar o no, lesiones tumorales malignas.

8.- Confidencialidad :

Su preservación y aseguramiento será lograda por las siguientes vías:

8.1.- La información y datos relativa al paciente y sus familiares será clasificada en base a códigos, que identifican al paciente y sus muestras.

8.2.- El examen del individuo será cumplido por personal médico especialista en este tipo de enfermedades, por tanto la información pertinente pasa a ser parte del Secreto Médico. En tanto que, los especímenes muestrales (sangre, tejido tumoral) serán procesados por personal profesional y técnico (médicos, biólogos, bioanalistas) que adquieren ese deber.

8.3.- Documentación fotográfica de casos afectados se realizará previo consentimiento y formará parte de la Historia Clínica. Ilustraciones fotográficas de lesiones y / o manifestaciones clínicas relevantes serán identificadas por códigos.

8.4.- Publicación y / o presentación de resultados se hará en lenguaje científico y en ambientes y audiencias académico-profesionales.

9.- Presentación :

El Consentimiento Informado se presentará al paciente para su conocimiento, discernimiento y firma, hechas las aclaratorias y explicaciones a las que hubiera lugar, y en presencia de dos testigos que testimoniarán también con su firma el procedimiento. Uno de estos será el investigador responsable, el cual dará a conocer un número telefónico para su localización. Una copia del documento será entregada al paciente o a su representante.

10.- Bases Legales y Normativas :

La estructuración del Consentimiento Informado y los lineamientos contemplados en su presente elaboración, se ajustan a lo establecido en la Ley de Ciencia y Tecnología, Ley de Ejercicio de la Medicina y en las Normas Operativas de la Sub-Comisión de Bioética y Bioseguridad del Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad de Carabobo (CDCH-UC).

Jorge Vargas Arenas

Investigador Responsable



Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC)
Centro de Microbiología y Biología Celular (CMBC)
Centro de Secuenciación y Análisis de Ácidos Nucleicos (CeSAAN)
Carretera Panamericana, Km.11 - Altos de Pipe. Estado Miranda
Apartado Postal: 21827 - Caracas 1020A
Venezuela

Teléfono: +58-2 504.1529
Fax: +58-2 504 1382
e-mail: cesaan@pasteur.ivic.ve

4. Las muestras pueden entregarse hidratadas (SOLAMENTE en agua bidestilada esterilizada. No utilizar Tris-EDTA.) o deshidratadas. Los materiales biológicos hidratados deben llegar al laboratorio en condiciones de almacenamiento adecuadas (máximo 4°C).
5. Anexe una fotografía (o fotocopia) de la electroforesis en gel de agarosa del ADN a secuenciar.
6. Las muestras no deben purificarse por métodos que utilicen extracción fenólica.
7. En la planilla de solicitud del servicio cada columna significa :
 - Nombre de la muestra: el nombre con que el usuario identifica su muestra.
 - Tipo del ADN templado : si el ADN es un producto de PCR, plásmido, M13, cósmido, cromosoma artificial de levadura, ADN genómico de bacteria, ect.
 - Método de Purificación : método que se utilizó para purificar las muestras, por ejemplo Wizard (Promega), Concert GIBCO), QIAGEN o Centricon.
 - Tamaño del ADN templado: tamaño del fragmento de PCR o del segmento clonado en vectores.
 - Nombre del Primer: nombre del primer que se está enviando junto con la muestra.
 - Temperatura de Anneling del primer (Optimizada para PCR) : la temperatura del primer que se está enviando junto con la muestra. Se recomienda colocar la temperatura de anneling que se haya utilizado en PCR.

8. Las muestras deben entregarse en las siguientes condiciones:

Templado	<i>Terminadores tipo BigDye</i>		
	Volumen Total a entregar (ul)	Cantidad Optima de primer (pmoles)	Cantidad Total de ADN (ng)
Producto de PCR:			
100 – 200 pb	27	7.2	2.50 - 6.50
200 – 500 pb	27	7.2	6.50 - 22.50
500 – 1000 pb	27	7.2	11.50 - 45.00
1000 – 2000 pb	27	7.2	22.50 - 90.00
> 2000 pb	27	7.2	90.00 - 225.00

Templado	<i>Terminadores tipo BigDye</i>		
	Volumen Total a entregar (ul)	Cantidad Optima de primer (pmoles)	Cantidad Total de ADN (ng)
Simple Cadena	27	7.2	112.5 - 225

Templado	<i>Terminadores tipo BigDye</i>		
	Volumen Total a entregar (ul)	Cantidad Optima de primer (pmoles)	Cantidad Total de ADN (ng)
Plásmidos.	27	7.2	450 - 1125

Templados	<i>Terminadores tipo BigDye</i>		
	Volumen Total a entregar (ul)	Cantidad Optima de primer (pmoles)	Cantidad Total de ADN (ng)

Cósmidos, BACs, YACs	55	19	1125 - 2250
ADN Genómico de Bacterias	55	19	4500 - 6750