



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO E INVESTIGACIÓN
SECRETARÍA DE SALUD
INSTITUTO DE PEDIATRÍA

DESCRIPCIÓN CLÍNICA Y ESTUDIO MOLECULAR DE UNA FAMILIA CON ESCLEROSIS TUBEROSA CON EXPRESIVIDAD VARIABLE

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL DIPLOMA DE
ESPECIALISTA EN PEDIATRÍA

PRESENTA:

JORGE MAURICIO CERVANTES BLANCO

TUTOR

BIOL. NANCY HERNÁNDEZ MARTÍNEZ

COTUTOR:

DRA. ARIADNA ESTELA GONZÁLEZ DEL ÁNGEL



MÉXICO, D.F.

MMIX



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA.

A Dios.

A mis padres.

A mi hermano.

A mi Abuelo Jorge.

INDICE

I. Marco teórico	1
I.I Definición	1
I.II Etiología	1
I.III Fisiopatología	1
I.IV Manifestaciones clínicas.....	4
I. V Diagnóstico clínico	7
I. VI Diagnóstico molecular	8
I.VII Correlación genotipo – fenotipo	9
I.VIII Manejo terapéutico	10
II. Justificación	11
III. Objetivos	12
IV. Tipo de estudio	12
V. Material y métodos	12
VI. Resultados	14
VI.I Descripción clínica	14
VI.II Descripción del estudio molecular	17
VII. Discusión	17
VIII. Conclusiones	20
IX. Bibliografía	21
X. Anexos	24

DESCRIPCION CLINICA Y ESTUDIO MOLECULAR DE UNA FAMILIA CON ESCLEROSIS TUBEROSA CON EXPRESIVIDAD VARIABLE.

TESISTA: Dr. Jorge Mauricio Cervantes Blanco¹

TUTOR: Biol. Nancy Hernández Martínez²

CO-TUTOR: Dra. Ariadna Estela González del Ángel³

¹ Residente de tercer año de Pediatría, I.N.P..

² Investigadora en Ciencias Médicas A, adscrita al Laboratorio de Neuroquímica, I.N.P.

³ Jefe del Laboratorio de Biología Molecular y Médico Adscrito al Departamento de Genética Humana, I.N.P.

I. MARCO TEORICO.

I.I Definición.

La Esclerosis Tuberosa (ET) es una enfermedad multisistémica de origen genético, autosómica dominante, de expresividad variable que se caracteriza por la presencia de tumoraciones benignas (hamartomas) en todos los órganos del cuerpo afectando principalmente cerebro, piel, retina, riñón, corazón y pulmón. Fue descrita por primera vez por Friedrich Daniel von Recklinghausen en 1862 y el término de "Esclerosis Tuberosa" se acuñó en 1880 por Bourneville. La incidencia se ha reportado entre 1 en 5,800 y 1 en 10,000; sin embargo, la verdadera incidencia se desconoce debido a la dificultad para realizar el diagnóstico definitivo^{1, 2,3}.

I.II. Etiología.

Se han identificado 2 genes responsables de la ET. El gen *TSC1* (*tuberous sclerosis complex 1*), localizado en el cromosoma 9q34, que codifica para una proteína llamada hamartina y el gen *TSC2*, localizado en el cromosoma 16p13 que codifica para otra proteína, la tuberina. Un tercio de los casos ocurre como casos familiares; dos terceras partes, como mutaciones *de novo*². De los casos familiares se atribuye un 50% a cada gen. De los casos esporádicos se ha relacionado hasta diez veces más al gen *TSC2*⁴. Esto seguramente se debe a que al ser las manifestaciones clínicas causadas por el gen *TSC2* más graves, la supervivencia de los individuos afectados es menor y el potencial de reproducirse, más limitado, por lo que la posibilidad de heredar la mutación y por lo tanto de presentarse como caso familiar se reduce.

I.III Fisiopatología.

La ET es una enfermedad autosómica dominante con expresividad variable ocasionada por mutaciones en alguno de los dos genes ya comentados. Las mutaciones en dichos genes condicionan el desarrollo de hamartomas en diversos órganos, los cuales pueden malignizarse. El gen *TSC1* que es un gen tumor supresor se localiza en la posición 9q34, consta de 23 exones y codifica para una proteína de 1,162 aminoácidos (130 kDa) llamada hamartina, que presenta un solo dominio transmembranal de 127 – 144 aminoácidos y una región de 266 aminoácidos que previene el súper enrollamiento⁵. El gen *TSC2* se encuentra en la posición 16p13.3, consta de 44 kb y está compuesto por 41 exones. El gen *TSC2* codifica para una proteína formada por 1,807 aminoácidos llamada tuberina. Los exones 34 y 38 codifican para una región con homología a proteínas activadoras de GTPasas (GAPs), que son reguladores negativos de la súper familia *ras* e importantes para los procesos de diferenciación celular, modulación de citoesqueleto y transporte de vesículas por lo que se le considera, al igual que al gen *TSC2*, como gen tumor- supresor. Ambas proteínas, la hamartina y la tuberina se unen para lograr dicha función⁶. Este complejo “tuberina-hamartina” activa la actividad GTPasa de una proteína G denominada *homologo de Ras enriquecido en el cerebro* (*Rheb* por sus siglas en inglés). Esta proteína a su vez estimula directamente a otra proteína denominada *blanco en mamíferos de rapamicina* (mTOR por sus siglas en inglés) que previene la estimulación del crecimiento celular^{2,3,4}. Cuando existe mutación en alguno de los genes ya mencionados la actividad del mTOR se altera, provocando la fosforilación de

otras proteínas involucradas en la biogénesis y reclutamiento de ribosomas así como en la activación de la traducción genética³.

De acuerdo a la “teoría de los dos eventos” de Knudson, uno de los alelos de los genes *TSC1* o *TSC2* tiene la mutación desde la línea celular germinal (“primera mutación o evento”), por lo que todas las células del cuerpo llevan una sola copia funcional del gen, lo que probablemente se traduce en la producción de sólo el 50% de los niveles normales de la proteína funcional⁷. El “segundo evento” consiste en una mutación somática en cualquiera de los genes *TSC1* y *TSC2* y que potencia el efecto de la mutación sistémica. Esta teoría fue demostrada por Cavenee en 1983 tomando como ejemplo el retinoblastoma, tumor retiniano de la infancia y ha servido como modelo para entender el posible mecanismo de las enfermedades causadas por alteración en genes supresores de tumores. Es posible que debido a esto exista la expresividad variable característica de la ET. La inactivación de ambos alelos es necesaria para que se desarrollen algunos de los tumores o hamartomas observados en pacientes con ET^{3,7}. Se ha encontrado pérdida de la heterocigocidad (dos alelos mutados en *TSC1* o *TSC2*) frecuentemente en angiomiolipomas renales, menos frecuente en astrocitomas pero no se ha descrito en los túbers corticales o en hamartomas cardíacos. También se ha asociado la ausencia de la pérdida de heterocigocidad en pacientes en quienes no se logra identificar una mutación específica. Debido a lo anterior, Jozwiak menciona la probabilidad de alteración en otra proteína aún desconocida que ocasione algunas de las manifestaciones clínicas en ET a pesar de mantenerse la heterocigocidad, por lo que se postula la presencia de un tercer gen responsable denominado “*TSC3*” pero que a la fecha no existe evidencia del mismo³. Jozwiak propone además que ese mecanismo, aún no claro, podría deberse a una hiperfosforilación en una proteín-cinasa extracelular llamada ERK (*mitogen-activated protein kinase*)³, debido a que encontró una actividad incrementada de la misma en los angiomiolipomas, astrocitomas de células gigantes, linfangiomatosis y túbers corticales de pacientes con ET mientras que su inhibición evocó un decremento en la proliferación celular de un astrocitoma de células gigantes, incluso en un paciente donde sí se encontró una mutación específica. Este fenómeno se encontró en lesiones de la enfermedad que no muestran pérdida de heterocigocidad por lo que se considera un posible mecanismo causante de las lesiones en pacientes en quienes no se detecta la mutación³.

I.IV. Manifestaciones clínicas.

Las manifestaciones clínicas se presentan principalmente en los siguientes órganos: piel, sistema nervioso central, retina, riñón, corazón y pulmón. Debe considerarse de manera muy importante que las manifestaciones clínicas tienen diferente edad de aparición y expresividad variable incluso en familias con varias generaciones afectadas, dificultando así el diagnóstico temprano de la enfermedad⁶.

• **Piel:** Las lesiones hipomelanóticas (manchas de Fitzpatrick) son una de las lesiones más frecuentes y es generalmente el primer signo de la enfermedad, presentándose en 89.6% de los pacientes menores de 2 años y hasta el 100% en mayores de 14⁹. Pueden medir de 1 hasta 12 cm; su número varía de 2 a 3 o hasta 40. Su distribución es asimétrica generalmente sobre tronco y glúteos. Se observan hasta en un 97.2%¹ de los pacientes con ET. Puede ser el único hallazgo a esta edad y el consenso de 1998 considera como sospechoso de ET el encontrar 3 o más lesiones. De encontrarse estas, sumadas a espasmos infantiles, se eleva la sospecha diagnóstica de ET¹⁰.

Las lesiones en confeti son lesiones hipomelanóticas pequeñas (1 – 3 mm de diámetro) que aparecen generalmente en las extremidades de manera simétrica y se presentan entre un 2.8 a 28% de los pacientes, generalmente a partir de la segunda década de la vida¹.

Los angiofibromas faciales son pápulas o nódulos de color rojizo que aparecen en el área centrofacial. Su presentación varía desde el 74.5% hasta el 83% en los pacientes afectados e inicia entre el segundo y quinto año de vida¹.

Las placas fibrosas frontales son placas amarillentas localizadas en la región frontal; pueden verse a veces desde el nacimiento presentándose hasta en un 20% en pacientes de 14 años⁹. El consenso de 1998 considera a los angiofibromas y las placas fibrosas frontales como un solo criterio diagnóstico¹⁰.

La placa de Shagreen está formada por lesiones planas, amarillentas o rosadas, ligeramente elevadas, que semejan la cáscara de una naranja. Generalmente se presentan en la región lumbosacra y se reportan con una incidencia total de entre 48.1 y 54% y su frecuencia también se incrementa con la edad¹.

Los fibromas periungueales (tumores de Koenen) aparecen generalmente en adolescentes (entre un 20% a 68% de los pacientes afectados) y son lesiones nodulares del mismo color de la piel que nacen del lecho ungueal¹¹. Para considerarse como manifestación de la ET debe ser de origen no traumático.¹

- **Sistema Nervioso Central:** Aproximadamente un 85% de los niños y adolescentes con ET tiene afección del sistema nervioso central incluyendo epilepsia, problemas de comportamiento, deterioro cognitivo y datos de autismo.

Los túbers corticales y los nódulos subependimarios pueden ser detectados incluso en etapa prenatal². Se puede demostrar por tomografía la existencia de nódulos subependimarios en un 82% de los pacientes menores de 2 años y en el 100% de los pacientes mayores de 9⁹. Por estudios de tomografía realizados a diferentes edades, la incidencia de túbers corticales o subcorticales se mantiene entre 24 y 37 % en pacientes menores a 14 años y aparentemente disminuye en mayores de esa edad (7.7%)⁹. Los nódulos subependimarios pueden evolucionar y transformarse en tumores de células gigantes, el tumor más frecuente en la ET, reportándose hasta en 10 a 15% de los casos mayores de 14 años⁹. Otras lesiones encontradas en casos de ET son las líneas de migración radial en la sustancia blanca y son consideradas como un criterio diagnóstico menor.

La epilepsia asociada a la ET generalmente comienza durante el primer año de vida y se presenta hasta en un 90% de los casos generalmente antes de los 2 años^{9,11}. Se caracteriza generalmente por crisis convulsivas focales que preceden o coexisten con espasmos infantiles; sin embargo, se puede presentar todo tipo de crisis convulsivas excepto crisis de ausencia típicas. La ET es la causa de los espasmos infantiles en un 25% de los casos¹¹. En la mayoría de los pacientes con espasmos infantiles existe evidencia radiográfica de un área de displasia cortical o de nódulos subependimarios, por lo que no se consideran como criterios independientes para el diagnóstico de ET¹⁰.

La afección cognitiva muestra una gran variabilidad incluso dentro de casos familiares. Más del 50% de los individuos con ET tiene un IQ mayor al 70 pero están predispuestos a presentar déficit cognitivo, de memoria, atención o realización de actividades complejas. El autismo, también referido como trastorno

pervasivo del desarrollo se presenta hasta en un 50% de los casos y el trastorno por déficit de atención e hiperactividad en 50% de los casos de ET¹¹.

- **Boca:** Las manifestaciones orales son los *pits* (hoyuelos) dentales y fibromas gingivales, con una frecuencia entre 48% y 100%^{1,12} los primeros y de 52% los segundos en pacientes adultos¹². Debido a que la especificidad de los *pits dentales* como criterio diagnóstico de ET se incrementa conforme el paciente es mayor en edad, se considera criterio menor¹⁰.

- **Corazón:** Los rabdomiomas son la manifestación principal a nivel cardíaco. En etapa neonatal pueden ser letales y son la única manifestación que tiende a desaparecer conforme incrementa la edad. Jozwiak reporta una incidencia de 83% en pacientes menores de 2 años y disminuye a un 21% en pacientes entre los 5 y 9 años⁹. Pueden condicionar arritmias, *hydrops fetal* no autoinmune o la muerte.²

- **Riñón:** Es la segunda causa más importante de morbilidad en los pacientes con ET después de las complicaciones en sistema nervioso¹¹ llegando a encontrar angiomiolipomas hasta en un 90% de los adultos con ET^{2,13}. Se puede encontrar también riñones poliquísticos en un 5 a 8% en pacientes entre los 2 y 5 años^{9,11} y hasta en un 30% de los pacientes entre 14 y 18 años⁹. Entre 2 a 3% de los pacientes con E.T. pueden desarrollar carcinoma renal² en la edad adulta y las posibles complicaciones asociadas a los angiomiolipomas pueden ser hemorragia, hematuria o insuficiencia renal.

- **Ojos:** Los hamartomas retinianos se presentan entre 40 a 50% y pueden encontrarse a cualquier edad² sin embargo su detección puede variar debido a la dificultad de realizar la oftalmoscopia en niños pequeños.

- **Pulmón:** La principal manifestación pulmonar es la linfangiomatosis, una proliferación alveolar de músculo liso y destrucción quística del parénquima pulmonar. Predomina en mujeres en edad premenopáusica y es rara en hombres². Su frecuencia no está bien definida. Hay reportes que establecen que aproximadamente 40% de las pacientes con linfangiomatosis pulmonar padece ET¹¹

y en 50% de los casos se asocian a la presencia de angiomiolipomas renales. Otras manifestaciones, menos frecuentes son la hiperplasia micronodular y multifocal de los neumocitos y tumores de células claras¹¹.

I.V. Diagnóstico clínico.

En 1908 Vogt establece la tríada de crisis convulsivas, retraso mental y angiofibromas como datos principales para establecer el diagnóstico de ET, sin embargo, en un estudio posterior se demostró que solamente 29% de estos pacientes estudiados la presentaban y en 6% no se documentó ninguna de estas manifestaciones⁹. En 1992 un primer consenso de expertos, clasificó las manifestaciones clínicas como primarias (patognomónicas), secundarias (frecuentemente asociadas pero no exclusivas de ET) y terciarias (hallazgos frecuentes en población general que aportan pequeña contribución para el diagnóstico)¹⁴. En años posteriores se obtuvo más información acerca de las diferentes manifestaciones clínicas de la ET concluyendo que no existe algún signo totalmente específico de la enfermedad, encontrando por ejemplo que la presencia de angiomiolipomas renales no es exclusiva de pacientes con ET. Se revisó dicha información y en 1998 se publicaron nuevos criterios para el diagnóstico de ET¹⁰. De manera arbitraria se establecieron criterios mayores (signos con alto grado de especificidad en ET) y menores (signos menos específicos o de menor categoría) (Tabla 1).

El *diagnóstico definitivo (Df)* se establece con la presencia de 2 criterios mayores o uno mayor y dos menores; el *diagnóstico probable (Pb)* con uno mayor y uno menor y el *posible (Ps)* con cualquier criterio mayor o dos o más menores. Sin embargo, el caracterizar la alteración en el gen a través del estudio molecular facilitaría hacer el diagnóstico de certeza. Existen limitantes al aplicar estos criterios ya que el diagnóstico clínico se dificulta en niños pequeños, sobre todo en menores de 2 años, debido a que muchos signos aparecen a mayor edad. Debe considerarse también que el estudio molecular no es accesible a la población general pero si se cuenta con este último puede ser sumamente útil para confirmar una sospecha diagnóstica clínica de ET, especialmente en pacientes menores en quienes aún no se han manifestado todos los datos clínicos de la enfermedad. La corroboración del diagnóstico permite dar asesoramiento genético de certeza o incluso la posibilidad de ofrecer un diagnóstico prenatal o tratamiento temprano antes que las manifestaciones clínicas sean aparentes¹⁵.

Tabla 1. Criterios para el diagnóstico de Esclerosis Tuberosa según el consenso de 1998⁵.

Criterios mayores	Criterios menores
1. Angiofibromas faciales o placa en región frontal.	1. Múltiples <i>pits</i> en el esmalte dental.
2. Fibromas periungueales no traumáticos.	2. Pólipos hamartomatosos rectales.
3. Máculas hipomelanóticas (tres o más).	3. Quistes óseos.
4. Placas de Shagreen.	4. Fibromas gingivales.
5. Múltiples hamartomas nodulares en retina.	5. Parches acromáticos de retina.
6. Túbers corticales.	6. Lesiones en confeti en piel.
7. Nódulos subependimarios	7. Múltiples quistes renales
8. Astrocitomas subependimarios de células gigantes.	8. Líneas de migración radial en sustancia blanca cerebral.
9. Rabdomiomas cardíacos (único o múltiples).	9. Hamartomas no renales.
10. Linfangiomiomatosis.	
11. Angiomiolipoma renal.	

I.VI. Diagnóstico molecular.

Hasta octubre del 2008 se habían reportado 307 variantes alélicas en el gen *TSC1* y 1061 en el gen *TSC2*.² En la tabla 2 se resume la frecuencia de los diferentes tipos de mutaciones en dichos genes.

Tabla 2. Frecuencia de mutaciones reportadas en los genes *TSC1* y *TSC2*. (Modificado de Laiden, Open Variation Database¹³).

Tipo mutación	TSC1 (%)	TSC2 (%)
Substitución	75.72	75.87
Delección	16.53	16.09
Duplicación	6.16	3.94
Inserción	0.93	1.04
Inserción/Duplicación	0.28	0.48
Inversión	0	0
Dos variantes en un alelo	0	0.08
Complejas	0.28	1.12
Desconocidas	0.09	1.39
TOTAL	100	100

Hay autores que reportan una tasa de detección de mutaciones entre 83 y 90% por diversos métodos moleculares, por lo tanto, las mutaciones pueden no identificarse en 10 a 18% de los pacientes². Esta tasa de detección de mutaciones puede deberse entre otras razones a: 1) la sensibilidad del método utilizado; 2) mutaciones en las regiones promotoras o intrones, lo que puede alterar la expresión del gen pero que son regiones que generalmente no son estudiadas por los métodos de tamizaje; 3) dificultad para detectar mutaciones con cualquier método, en pacientes con manifestaciones clínicas de ET debidas a la presencia de mutaciones en mosaico en cualquiera de los dos genes; 4) *loci* adicionales que pudieran estar involucrados, lo cual hasta la fecha no se ha corroborado^{2,3}.

Uno de los métodos más comunes para detectar las mutaciones es el *polimorfismo conformacional de cadena sencilla* (SSCP por sus siglas en inglés) seguido de secuenciación del DNA obtenido de una muestra de sangre periférica del paciente. El SSCP es una prueba que se realiza a manera de tamizaje para identificar la región donde existe un cambio en la secuencia de DNA el cual debe ser corroborado por secuenciación para definir si se trata de un polimorfismo o mutación. El fundamento de SSCP se basa en el plegamiento y formación de estructuras complejas en el DNA estabilizadas por uniones intramoleculares débiles, principalmente puentes de hidrógeno¹⁷. La movilidad electroforética del DNA al adquirir dichas estructuras en un gel no-desnaturalizante dependerá no sólo de la longitud de la cadena sino también de su conformación, que está determinada por la secuencia primaria (bases nitrogenadas) del DNA¹⁷. Para la prueba de SSCP, una región específica del DNA es amplificada mediante la técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa), el amplicón obtenido en la PCR es desnaturalizado y cargado en un gel no-desnaturalizante constituido por una matriz especial denominada MDE para llevar al cabo una electroforesis. Se corren controles para así poder determinar los patrones normales y anormales¹⁷. Las muestras que por SSCP presenten un patrón anormal de corrimiento en la electroforesis, son secuenciadas a partir de los productos de PCR con la finalidad de identificar la mutación presente. Según los hallazgos se brinda el asesoramiento correspondiente. Esta técnica permite detectar la mutación en cualquiera de los dos genes en un 80 a 90% de los casos.

I.VII. Correlación genotipo-fenotipo.

Existen individuos que a pesar de tener el mismo genotipo, el fenotipo clínico es diferente. Se ha comprobado que los pacientes con mutaciones en el gen *TSC2* tienen en general, manifestaciones más severas; específicamente epilepsia más frecuente y grave, retraso mental moderado o severo, túbers corticales, angiomiolipomas renales, hamartomas retinianos y angiofibromas faciales más severos^{2,4}. Se ha descrito, que los pacientes en quienes no se logra encontrar la mutación tienen, en promedio, manifestaciones más leves^{2,4}. Se ha propuesto también que existen genes que modifican la expresividad y gravedad de las manifestaciones de la ET como en el caso de la asociación entre la presencia de variantes polimórficas en el gen que codifica para el interferón gamma y la disminución en la frecuencia de angiomiolipomas renales en pacientes con mutación en el gen *TSC2*².

I.VIII. Manejo terapéutico.

El manejo de esta enfermedad es multidisciplinario, involucrando las disciplinas de genética médica y diferentes ramas de la pediatría; entre ellas, neurología, dermatología, oftalmología, cardiología, oncología y nefrología. El tratamiento es sintomático y tal vez el problema más importante es controlar la epilepsia asociada.

Se requiere tratamiento para las crisis convulsivas, las cuales pueden llegar a ser de difícil control. La vigabatrina es el fármaco que mejor efecto ha tenido sobre los espasmos infantiles, llegando a controlar hasta el 95% de los pacientes de ET que los presentan². Su principal efecto adverso es pérdida gradual del campo visual. También se han utilizado otros como ácido valproico, topiramato, oxcarbazepina o levetiracetam. En casos de resistencia a fármacos se puede recurrir a manejos menos convencionales tales como la estimulación vagal, la dieta cetogénica e incluso, la resección quirúrgica de los túbers o de los focos epileptógenos¹¹. El tratamiento temprano de la epilepsia se ha relacionado con un menor deterioro de las funciones cognitivas.

Es necesaria una vigilancia estrecha del neurodesarrollo para poder intervenir tempranamente en caso de presentarse algunos trastornos del mismo tales como espectro autista o el trastorno por déficit de atención e hiperactividad. Se recomienda realizar evaluaciones en las diferentes etapas del desarrollo (en el paciente lactante, escolar, adolescente y edad adulta) e intervenir tempranamente cuando se detecta una detención en el mismo.

Para los angiofibromas existen opciones como la criocirugía, curetaje, dermoabrasión, "peeling", excisión y terapia con láser sabiendo que probablemente se requiera administrar cualquiera de ellos más de una vez en la vida de estos pacientes¹. En caso de haber afección pulmonar, se manejan medicamentos como medroxiprogesterona ó tamoxifeno e incluso pudiera requerirse realizar ooforectomía ya que son lesiones sensibles a estrógenos y progesterona además de manejo sintomático con broncodilatadores de ser necesario^{11, 18}.

Para los rabdomiomas cardíacos se recomienda el tratamiento médico de las arritmias y optar por la cirugía únicamente en casos que al ser tumores obstructivos comprometan la vida, ya que estos tumores involucionan con el tiempo. El tratamiento de los angiomiolipomas renales puede variar según el tamaño de estos tumores, pudiéndose indicar desde observación, embolización o nefrectomía ya que los tumores grandes pueden ocasionar hemorragias renales¹¹.

Hasta el momento no hay algún fármaco que revierta o controle la progresión del crecimiento de los tumores pero recientemente el descubrimiento de la vía del mTOR ha favorecido la investigación en el uso de la rapamicina con dicho fin¹⁸.

Es de suma importancia mantener al paciente en vigilancia a lo largo de su vida ya que, como hemos comentado, hay manifestaciones que durante la infancia pueden no estar presentes y desarrollarse más tarde, ocasionando importante morbilidad (ej. angiomiolipomas renales). Se recomienda realizar una evaluación del neurodesarrollo, así como valoración oftalmológica, estudios de gabinete como electroencefalograma, electro y ecocardiograma si llegan a presentarse datos clínicos a dichos niveles; ultrasonido renal, al inicio y posteriormente uno cada 1 a 3 años; resonancia magnética cerebral al momento del diagnóstico y posteriormente cada 1 a 3 años². La tomografía de tórax se recomienda en la edad adulta para las mujeres afectadas y/o en caso de presentar datos clínicos de afección pulmonar².

II. JUSTIFICACIÓN:

El diagnóstico definitivo de la ET depende de criterios clínicos, apoyados con estudios de gabinete, pero la expresividad variable de la enfermedad puede condicionar un subdiagnóstico o un diagnóstico tardío y dificultad en su clasificación (en caso definitivo, probable y posible). Esto repercute en no poder brindar a las familias afectadas un asesoramiento genético de certeza.

Este problema se ejemplifica en la familia que en el presente trabajo se describe dado que el diagnóstico en el caso índice se realizó hasta los 11 años de edad y la familia desconocía que la madre y un hermano del paciente tenían datos sugestivos de ET.

Es de interés para el médico poder correlacionar el diagnóstico molecular con el clínico, así como de gran relevancia poder determinar el diagnóstico certero en las personas que son casos probables o posibles para poder dar asesoramiento genético certero y mantener una vigilancia estrecha de las manifestaciones clínicas que sabemos pueden llegar a presentarse.

III. OBJETIVOS.

- 1) Describir las manifestaciones clínicas que presenta un paciente con diagnóstico de Esclerosis Tuberosa (caso índice) y sus familiares que muestran expresividad variable de la ET.
- 2) Describir el análisis molecular en esta familia que permitió identificar la mutación responsable de la Esclerosis Tuberosa para brindar un asesoramiento genético de certeza.

IV. TIPO DE ESTUDIO:

El presente estudio se trata de un reporte de caso.

V. MATERIAL Y METODOS.

El estudio se realizó considerando dos aspectos principales en el abordaje de la ET: la descripción clínica y el estudio molecular en busca de la mutación causal de dicha enfermedad en el paciente índice y sus familiares de primer grado.

Estudio clínico:

En el servicio de Genética se realizó el árbol genealógico así como la exploración física del caso índice y de sus familiares. Se realizaron los estudios de gabinete necesarios de acuerdo al padecimiento de base al caso índice, los cuales se revisaron para describir los hallazgos presentes (ecocardiograma, ultrasonido renal, TAC de cráneo simple, resonancia magnética) y se solicitó la valoración por los servicios de Neurología, Oftalmología, Estomatología y Dermatología.

Estudio molecular:

1. Obtención de DNA.

Se realizó el estudio molecular del paciente y sus familiares a partir de la extracción de DNA de una muestra de sangre periférica mediante el método de precipitación salina. Se tomó la muestra de sangre periférica (5ml) en tubos con EDTA 15%. Para la extracción de DNA se utilizó el kit de purificación comercial marca Gentra donde se realizó el siguiente proceso. Se centrifugó la sangre total a 3000rpm por 20min, para obtener el botón de leucocitos. Este botón se lavó con 10ml de amortiguador de lisis de eritrocitos (RCLB, por sus siglas en inglés Red Cell Lysis Buffer) agitando por 2min, se centrifugaron a 3000rpm por 10min y se eliminó el sobrenadante y se repitió el proceso. El botón se resuspendió con 500ul de RCLB y se agregó 3ml de amortiguador de lisis de leucocitos (WLCB por sus siglas en inglés White Lysis Cells Buffer) y 1ml de solución precipitadora de proteínas. Centrifugando a 3500rpm por 5min, se obtuvo el sobrenadante y se agregó isopropanol al 100% en una proporción 1:1 y se agitó suavemente. Las hebras de ADN se obtuvieron con una pipeta de punta en gancho, se lavaron en 1 ml de etanol al 70% sumergiendo y secando a temperatura ambiente. Finalmente, se resuspendieron para su almacenamiento en 200ul de solución Tris-EDTA (TE) y se almacenaron a 4°C.

2. Amplificación de productos.

Con el ADN del caso índice se realizó la amplificación de cada exón codificante a proteína a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés Polymerase Chain Reaction). La amplificación por PCR de secuencias exón específicas de todos los exones de los genes *TSC1* y *TSC2* se realizó con oligonucleótidos que funcionan como cebadores mediante ciclos repetidos de desnaturalización, alineación y extensión en un termociclador (Perkin Elmer; Gene Amp 9600) siguiendo un programa de 30 ciclos, donde las temperaturas dependieron de la secuencia de los oligonucleótidos empleados. La secuencia de los primers se obtuvo de www.cardiffroterdamdatabase.com (anexo 2). En general, la mezcla de reacción estuvo compuesta por 1ul de primers, 0.2ul de Taq polimerasa, 1.5ul de amortiguador, 1.5ul de MgCl₂, 1ul de dNTP's y 3ul de DNA (dilución 1:10) obtenido del paciente.

3. Búsqueda de mutaciones.

A todos los exones codificantes a proteína de los genes *TSC1* y del *TSC2*, previamente amplificados por PCR se buscó la mutación que condiciona la enfermedad a través de la técnica de SSCP donde se agregaron 5ul del producto PCR en 9ul del acarreador con urea 1X y se desnaturalizó por 10 min a 94°C. La electroforesis se llevó a cabo por 5 horas a 50w en cuarto frío en geles verticales no desnaturalizantes preparados con 20ml de MDE, 4ml de TBE 10X y 0.3 ml de persulfato de amonio + 15ul de TEMED como catalizadores; se analizaron con tinción de plata con el kit comercial marca Biorad. Posteriormente se realizó la secuenciación por el método de Sanger con la finalidad de identificar la mutación en el caso índice. En los familiares se realizó SSCP del exón que en el caso índice mostró patrón de migración anormal y posteriormente secuenciación. Las muestras se procesaron en el secuenciador 3100 (Applied Biosystem, Foster City, Ca) con el kit Big Dye V3.1 (Foster City, Ca).

VI. RESULTADOS.

VI. I. Descripción clínica.

Se trata de un paciente masculino de 15 años de edad, que es referido a la consulta de Genética a los 11 años por presentar desde los 9 años crisis convulsivas tónico clónico generalizadas, inicialmente con una frecuencia de una vez a la semana, que progresivamente aumentan así como por la presencia de lesiones en piel que sugieren Esclerosis Tuberosa.

Es el menor de 3 hermanos (ver árbol genealógico, figura 1) y al interrogatorio inicial se refieren los siguientes antecedentes heredofamiliares relevantes: la madre y el padre se refieren sanos, sin embargo, al realizar una exploración física detallada en la primera, se observó que a los 37 años de edad presenta las siguientes manifestaciones: angiofibromas faciales, pits dentales en incisivos y caninos superiores e incisivos inferiores, placa de Shagreen y fibromas ungueales en pies y manos. Se refiere que la abuela materna presenta lesiones que posiblemente sean angiofibromas faciales y placa de Shagreen pero no aceptó acudir a la consulta para su revisión. El hermano mayor (III.1) presenta placa de Shagreen en región lumbar y a los 19 años presentó una primera crisis convulsiva mientras

que el otro hermano (III.2) se refiere asintomático. Estos hermanos no han asistido a consulta para su revisión clínica.

Entre los antecedentes prenatales y neonatales del caso índice, se menciona que es producto del tercer embarazo, obtenido por cesárea a las 40 semanas de gestación, recibiendo control prenatal regular, realizándose un ultrasonido en el 7º mes de embarazo que se reportó como normal. Se obtuvo producto en presentación cefálica, con peso al nacer de 2300g, que lloró y respiró al nacer. La madre no recuerda la talla al nacimiento ni la calificación de Apgar.

Se refiere desarrollo psicomotor con seguimiento visual y sonrisa social a los tres meses, sostén cefálico a los 4 meses, sedestación a los 6 meses, gateó a los 9 meses, bipedestación a los 10 meses y deambulación al año 6 meses. Pronunció mono y bisílabos al año 4 meses, asistió a escuela primaria regular con promedio de 8, actualmente acude a secundaria regular con adecuado aprovechamiento aunque al interrogatorio se refiere dificultad para memorizar.

A la exploración física se observa peso de 40.5 kg, talla de 136.5 cm, ubicándose el peso entre percentilas 50 y 75 y la talla en percentila 5 para la edad, según las tablas del C.D.C. del 2002²⁰. A nivel facial presenta discreta microsomía hemifacial izquierda, narinas discretamente hipoplásicas, escasos y pequeños angiofibromas faciales en región centrofacial mientras que en el dorso se observó la presencia de una placa de Shagreen en la región lumbar derecha e izquierda (Fig. 2).

A los 11 años de edad se valora por Oftalmología quien determina que no hay alteraciones oculares. En el servicio de estomatología observaron “pits” dentales en el incisivo lateral superior derecho e incisivo central y lateral inferiores derechos.

Recibió manejo por Neurología, para la epilepsia, la cual se controló adecuadamente con ácido valproico. El electroencefalograma (EEG) realizado a la edad de 12 años se reporta sin alteración. Se retira el anticonvulsivante a los 13 años de edad y desde entonces se ha mantenido libre de crisis convulsivas. La tomografía computada de cráneo simple (TAC) muestra una lesión hiperdensa

compatible con un nódulo calcificado intraventricular, probablemente subependimaria en el ventrículo lateral izquierdo, (Fig. 3) mientras que la resonancia magnética de cráneo (RM) mostró una zona hipointensa en T1 e hiperintensa en T2 correspondiente probablemente a zonas de encefalomalacia localizadas en región paracentral izquierda en el giro del cíngulo, adyacente al cuerpo caloso, pequeñas, sin gliosis circundante. No se evidenció presencia de túbers corticales (Fig. 4).

Por parte del servicio de Cardiología, teniendo el paciente 11 años de edad se realiza ecocardiograma donde no se encuentran tumoraciones.

La valoración de Dermatología realizada a los 11 años de edad del paciente confirma la presencia de angiofibromas pequeños en cara y placa de Shagreen. Se inician retinoides y protector solar como manejo para los angiofibromas faciales.

Se realizaron ultrasonido renal (Fig. 5) y urografía excretora que muestran dilatación discreta de pélvices de manera bilateral sin hallazgos compatibles con angiomiolipoma.

En el servicio de Genética, de acuerdo a los hallazgos clínicos y estudios de gabinete se determina que el paciente cumple con 3 criterios mayores, de acuerdo a los criterios de ET (angiofibromas faciales, placa de Shagreen y nódulo subependimario) y uno menor ("pits" dentales) por lo que se establece el diagnóstico definitivo (Df) de ET a los 11 años de edad. La madre cumple 3 criterios mayores (angiofibromas faciales, placa de Shagreen y fibromas ungueales) y uno menor (*pits* dentales) por lo que también se establece el diagnóstico definitivo (Df) de ET, sin embargo no ha aceptado realizarse ultrasonido renal ni TAC cerebral.

Por interrogatorio sabíamos que el hermano mayor (III.1) cumplía con 1 criterio mayor (placa de Shagreen) por lo que se mantuvo con diagnóstico posible (Ps) de ET hasta 4 años después cuando presentó una crisis convulsiva aceptando entonces la realización de una TAC cerebral (Fig 6). En dicho estudio se observa la presencia de un nódulo subependimario calcificado en el ventrículo lateral izquierdo por lo que ahora cumple con dos criterios mayores, pudiendo determinarse diagnóstico

definitivo de ET. Además, cuenta con un ultrasonido renal normal. Está pendiente realizar la exploración física completa, sin embargo, cuando se tomó muestra para extracción de DNA se corroboró en él la presencia de una placa de Shagreen.

VI. II. Descripción del estudio molecular.

De la amplificación exón específica mediante PCR del gen *TSC1* se obtuvieron productos cuyos pesos moleculares van entre 170 y 312 pb. Posteriormente se realizó la técnica de SSCP encontrando en el exón 3 del gen *TSC1* un patrón anormal (Fig. 7, 8 y 9). Al analizar el electroferograma de la secuenciación se identificó una delección de 14pb que involucra las bases nitrogenadas 89 a 102, al final de este exón lo que condiciona un codón de paro un aminoácido después del cambio (.89-102delAAGAGAACCTCAAT p.Lys30IleFsX1). La delección observada sugiere que en la proteína se presenta un cambio en el aminoácido 30 de lisina por una isoleucina y que el producto final fuera una proteína de menor tamaño o trunca. Posteriormente se realizó la técnica de SSCP y secuenciación del mismo exón en los padres y ambos hermanos, encontrando que la madre (II.9) y ambos hermanos (III.1 y III.2) portan la misma mutación (Fig. 10).

VII. DISCUSION.

El presente estudio parte de contar con un diagnóstico clínico definitivo de Esclerosis Tuberosa en un paciente de 11 años y bajo la premisa de que siendo una enfermedad autosómica dominante, con expresividad variable, debe revisarse clínicamente a los familiares en primer grado. Mediante la revisión clínica se determina que la madre (II.9) cuenta con diagnóstico clínico *definitivo* de ET y por el interrogatorio, uno de los dos hermanos con diagnóstico *posible* (III.1), permaneciendo el otro hermano aparentemente sano (III.2). Se realizó entonces el estudio molecular tanto del caso índice como de la madre y los dos hermanos en donde se estableció que todos ellos tienen una mutación en el gen *TSC1*. Como ya sabemos, las manifestaciones clínicas de la enfermedad son más evidentes conforme la edad del paciente es mayor. En este caso, a los 11 años de edad el paciente cuenta con 3 manifestaciones de ET que se consideran criterios diagnósticos, cuatro mayores (angiofibromas faciales, placa de Shagreen, nódulo subependimario) y uno menor (*pits* dentales), sin observarse lesiones a nivel

cardíaco. A la edad actual, de 15 años, no se evidenció afección renal, retiniana o fibromas periungueales; no obstante, éstas pueden presentarse en años posteriores.

Es notorio también que siendo las lesiones hipomelanóticas las más constantes en los casos de ET no se observan en ninguno de los 4 miembros de esta familia.

Llama la atención que la epilepsia inició tardíamente (9 años de edad) en el caso índice, siendo lo más frecuente el inicio durante el primer año de vida y que no se reportó alteración cognitiva importante. El inicio de la epilepsia fue aún más tardía en el hermano mayor (III.1), a los 19 años de edad. Estos hechos se pueden atribuir a que la mutación se encontró en el gen *TSC1*, que por lo general se asocia a manifestaciones que no causan una importante afectación funcional y corroborándose así lo reportado hasta ahora acerca de la correlación genotipo-fenotipo en la literatura mundial^{2,4}.

Se corroboró en el caso índice (III.3) y en el hermano mayor (III.1) por tomografía computada la presencia de un nódulo subependimario. Debido a que la resonancia magnética no es un método útil para ver calcio, en la realizada al caso índice no se ve el nódulo subependimario ya calcificado. La imagen considerada por Radiología como encefalomalacia es un hallazgo que no se considera criterio diagnóstico de E.T. En el momento de la realización de los estudios de imagen no se observaron túbers corticales, lesiones tumorales sugestivas de astrocitomas subependimarios o líneas de migración radial en sustancia blanca. Sin embargo, dentro del seguimiento del paciente debe considerarse realizar estudios de imagen (TAC o RM) periódicos para vigilar la formación de dichas lesiones.

Se realizó el estudio molecular con la técnica previamente comentada. Debido a que las manifestaciones clínicas del caso índice se consideraron leves (con crisis convulsivas bien controladas y sin afección de funciones cognitivas) así como las de la madre (que a la edad de 37 años no tenía afección neurológica o discapacidad) se consideró probable que la mutación se localizara en el gen *TSC1*. Mediante la técnica de SSCP se logró identificar tanto en el caso índice como en la madre y hermanos la delección de 14 pares de bases en el exón 3 del gen *TSC1* que ocasiona la producción de una proteína trunca de 30 aminoácidos, probablemente inestable o disfuncional. En este gen, las

mutaciones tipo delección ocurren en el 16% de los casos, según lo reportado en bases de datos mundiales, siendo el segundo tipo de mutación más frecuente. En estos cuatro casos, el estudio molecular permite establecer el diagnóstico definitivo de ET a pesar de que uno de ellos (III.2) se mantiene asintomático. Comparamos el resultado del estudio molecular con la base de datos existente en el Portal de Leiden Open Variation Database (del Centro Médico de la Universidad de Leiden, Holanda)¹³ y encontramos que la mutación que nosotros identificamos no ha sido registrada antes a nivel mundial, siendo esta la segunda mutación reportada para el exón 3 del gen *TSC1* lo que indica que no es un exón que comúnmente presente mutaciones en ET.

A partir de estos hallazgos consideramos muy útil poder complementar en la madre el estudio de ET mediante los siguientes estudios de extensión: TAC o RM de cráneo, ultrasonido renal e incluso tomografía de tórax considerando que aunque poco común, la linfangiomatosis pulmonar es más frecuente en mujeres, por lo que en el asesoramiento genético se le ha comentado la utilidad de realizarlos, pero aún no lo ha aceptado. En el caso de los hermanos (III.1 y III.2), es indispensable contar con un abordaje integral, solicitando valoración neuropsicológica y resonancia magnética; además una tomografía de cráneo en el hermano asintomático (III.2) y mantener tratamiento anticonvulsivante adecuado en el hermano mayor (III.3) lo cual ya se realiza en otra institución.

A pesar de no contar con más datos clínicos en los dos hermanos afectados (III.1, III.2), pero al tener el estudio molecular, podemos comprobar la expresividad variable de la ET en esta familia, la cual, como ya hemos comentado ampliamente puede repercutir en un diagnóstico tardío tal como sucedió en la familia presentada. Debe aclararse que inicialmente la familia se encontraba renuente al abordaje clínico de la madre y los hermanos del caso índice, incluso a pesar de que el hermano mayor (III.1) presentaba lesiones cutáneas que sugerían el diagnóstico. Al inicio, permitieron únicamente el estudio clínico del caso índice y se realizó solamente estudio molecular del mismo y de sus padres. No fue sino hasta 4 años después, cuando el hijo mayor (III.1) debutó con crisis convulsivas que él y sus padres acceden a realizarle el estudio de TAC y ultrasonido renal. Así también, acceden a realizar el estudio molecular de dicho hermano (III.1) y del hermano asintomático (III.2); aunque está pendiente su exploración física y brindarles asesoramiento genético debido a que no han asistido a consulta para ello.

Lo anterior, también demuestra lo importante que es el apoyo psicológico en enfermedades genéticas como la ET, para que haya una aceptación de la enfermedad, lo cual permitiría contar con la cooperación de los afectados para su manejo, sobre todo debido a que la ET es una entidad crónica y progresiva, que como ya se ha mencionado requiere una vigilancia médica periódica para la identificación temprana de complicaciones e inicio oportuno de tratamiento o incluso la opción de realizar medidas de prevención como el diagnóstico prenatal.

VIII. CONCLUSIONES.

Debido a la expresividad variable de la Esclerosis Tuberosa, el diagnóstico puede realizarse tardíamente o no realizarse nunca en pacientes afectados con expresión mínima. Es común que, como en el presente caso, alguno de los progenitores de muchos pacientes se encuentren afectados con manifestaciones leves de la enfermedad, por lo que el progenitor se considera sano, lo que condiciona que el diagnóstico se realice tardíamente o no se lleva a cabo, repercutiendo en no poder brindar un asesoramiento genético oportuno ni un seguimiento médico adecuado. El estudio molecular es útil para establecer el diagnóstico definitivo en pacientes que clínicamente cuenten con diagnóstico posible o probable y en sus familiares aunque estén asintomáticos, permitiendo así realizar un abordaje temprano y una vigilancia estrecha sabiendo que hay manifestaciones clínicas de la ET que pueden ocasionar importante morbilidad. Incluso, de sospecharse clínicamente el diagnóstico de ET en alguno de los progenitores y al identificarse la mutación puede ofrecerse la posibilidad de realizar el diagnóstico prenatal en los embarazos posteriores, dado que al ser una entidad autosómica dominante, el riesgo de recurrencia es del 50%. También es útil, como se comprueba en este caso, que al documentar el tipo de mutación presente, se incrementa el conocimiento de la fisiopatología de esta enfermedad así como de la correlación fenotipo-genotipo.

IX. BIBLIOGRAFIA

- 1) Schwartz R.A., Fernández G, Kotulska K, Józwiak S; Tuberous Sclerosis Complex: Advances in Diagnosis, Genetics, and Management. *J Am Acad Dermatol* 2007; 57: 189-202.
- 2) Curatolo R, Bombardieri R, Józwiak S; Tuberous sclerosis; *Lancet* 2008; 372: 657-68.
- 3) Jozwiak J, Jozwiak S, Wlodarski P; Possible mechanisms of disease development in tuberous sclerosis; *Lancet Oncol* 2008; 9: 73-79.
- 4) Sancak O, Nellis M, Goedbloed M, Elfferich P, Wouters C, Maat-Kievit A, Zonnenberg B, Verhoef S, Halley D, van den Ouweland A; Mutational Analysis of the TSC1 and TSC2 genes in a diagnostic setting: genotype – phenotype correlations and comparison of diagnostic DNA techniques in Tuberous Sclerosis Complex; *European Journal of Human Genetics* 2005 (13): 731-741.
- 5) Sampson J. Tuberous Sclerosis. *in* Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (Eds). *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, McGraw Hill, New York, 2001 (IV): 5957-5873.
- 6) Jones A, Shyamsundar M, Thomas M, Maynard J, Idziaszczyk S, Tomkins S, Sampson J, Cheadle J. Comprehensive Mutation Analysis of TSC1 and TSC2 and Phenotypic Correlations in 150 Families with Tuberous Sclerosis. *Am J Hum. Genet* 1999; 64: 1305-1315.
- 7) Narayanan V. Tuberous sclerosis complex: Genetics to pathogenesis. *Pediatr Neurol* 2003; 29:404-409.
- 8) Kandt R. S.. Tuberous sclerosis complex and neurofibromatosis type 1: the two most common neurocutaneous diseases. *Neurol Clin N Am* 2003; 20: 983-1004.

- 9) Jozwiak S, Schwartz R, Janniger C, Cymerman J. Usefulness of Diagnostic Criteria of Tuberous Sclerosis Complex in Pediatric Patients. *J Child Neurol* 2000; 15: 652 – 659.
- 10) Roach E. S., Gómez R, Northrup H. Tuberous Sclerosis Complex Consensus Conference: Revised Clinical Diagnostic Criteria. *J Child Neurol* 1998; 13: 624-628.
- 11) Maria BL; McCann KD; Roach S; Gutmann DH; Tuberous Sclerosis Complex: Pathogenesis, Diagnosis, Strategies, Therapies and Future Research Directions; *Journal of Child Neurology* 2004; 19(9): 632-642.
- 12) Sparling JD, Hong CH, Brahim JS, Moss J, Darling TN; Oral findings in 58 adults with tuberous sclerosis complex; *J Am Acad Dermatol* 2007; 56: 786-90.
- 13) Roach ES; Sparagana SP; Diagnosis of Tuberous Sclerosis Complex; *Journal of Child Neurology* 2004; 19(9): 643-649.
- 14) Roach E, Smith M, Huttenlocher P, Bhat M, Alcorn D, Hawley L. Report of Diagnostic Criteria Committee of the National Tuberous Sclerosis Association. *J Child Neurol* 1992; 7: 221-224.
- 15) Vail EA, Rakowski SK, Numis AL, Thiele EA; Role of mutational analysis in diagnosis of tuberous sclerosis complex; *Clinical Genetics* 2009; 75: 282-285.
- 16) Portal de Leiden Open Variation Database, del Centro Médico de la Universidad de Leiden, Holanda ([http://chromium.liacs.nl/LOVD2/TSC/ variants_statistics.php](http://chromium.liacs.nl/LOVD2/TSC/variants_statistics.php)).
- 17) STRACHAN T, Read AP; Human Molecular Genetics; 2ª edición; Editorial Wiley – Liss; 1999, Bath, Reino Unido. Pp 410-411.

18) Osborne JP, Merrifield J, O'Callaghan FJK.; Tuberous sclerosis – what's new?; Arch Dis Child 2008; 93(9): 728-731.

19) Ali J, Sepp T, Ward S, Green A, Yates J. Mutations in the TSC1 gene account for a minority of patients with Tuberous Sclerosis, J Med Gen 1998; 35: 969-975.

20) Tablas de talla / edad y peso / edad, elaboradas por el Centro Nacional para Estadísticas de Salud en Colaboración con el Centro Nacional para Prevenir Enfermedades Crónicas y Promoción de la Salud (2000), E.U.A. (<http://www.cdc.gov/growthcharts>)

X. ANEXO 1. FOTOGRAFÍAS Y FIGURAS.

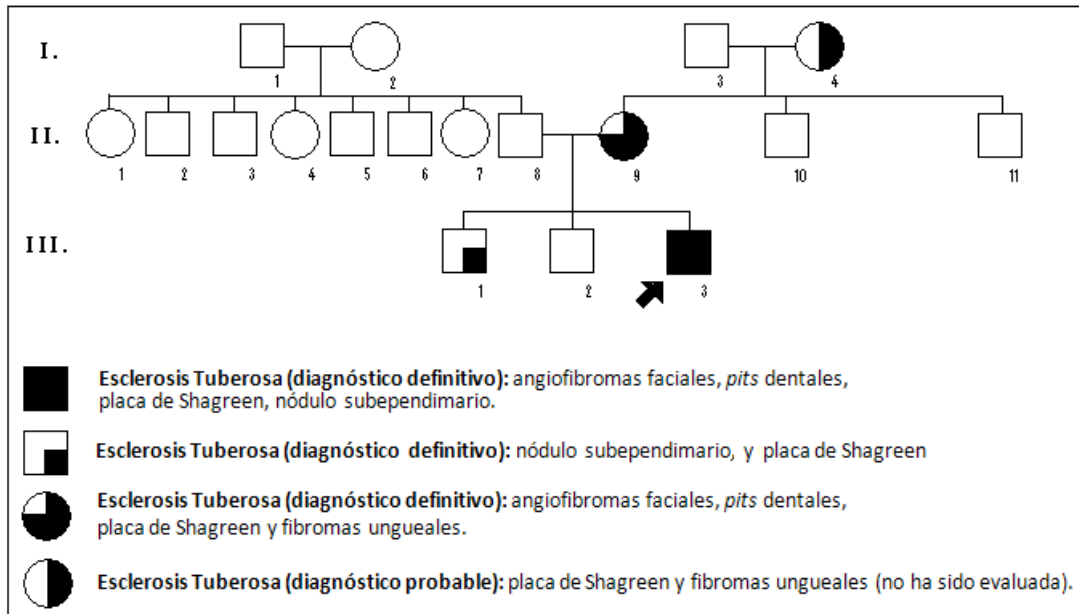


Figura 1. Árbol genealógico del paciente índice y su familia. Se observan antecedentes familiares de datos clínicos sugestivos de Esclerosis Tuberosa.





Figura 3. Tomografía computada simple cerebral (caso índice) donde se observa la presencia de una imagen hiperdensa en el ventrículo lateral izquierdo compatible con un nódulo subependimario calcificado.

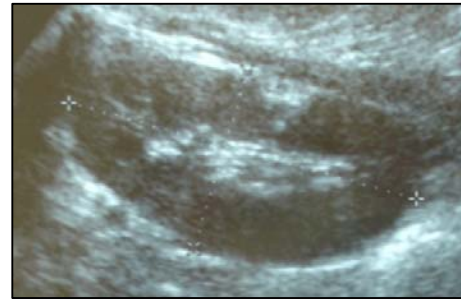


Fig. 5. Ultrasonido renal donde no se observan lesiones compatibles con angiomiolipomas, en riñón izquierdo (arriba) o riñón derecho. (abajo).

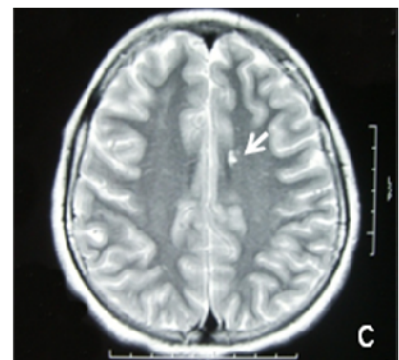
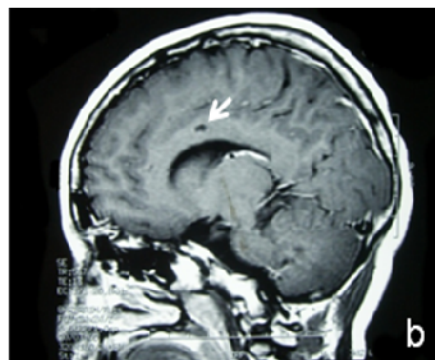
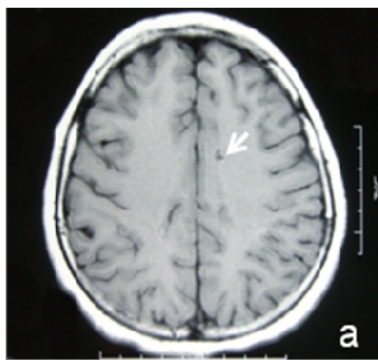


Figura 4. Resonancia magnética cerebral del caso índice con secuencia T1 en corte axial (a) y sagital (b) y T2 en corte axial (c) donde se observa área de probable leucomalacia en sustancia blanca aislada a nivel de circunvolución del cíngulo (flecha). No hay evidencia de nódulos subependimarios o túbers corticales.

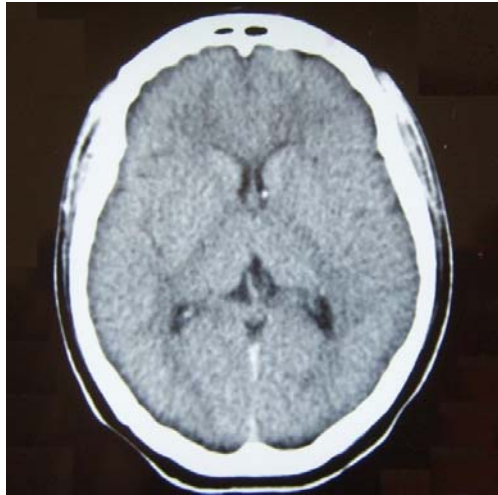


Figura 6. Tomografía computada simple cerebral (hermano mayor, III.1) donde se observa la presencia de una imagen hiperdensa en el ventrículo lateral izquierdo compatible con un nódulo subependimario calcificado.

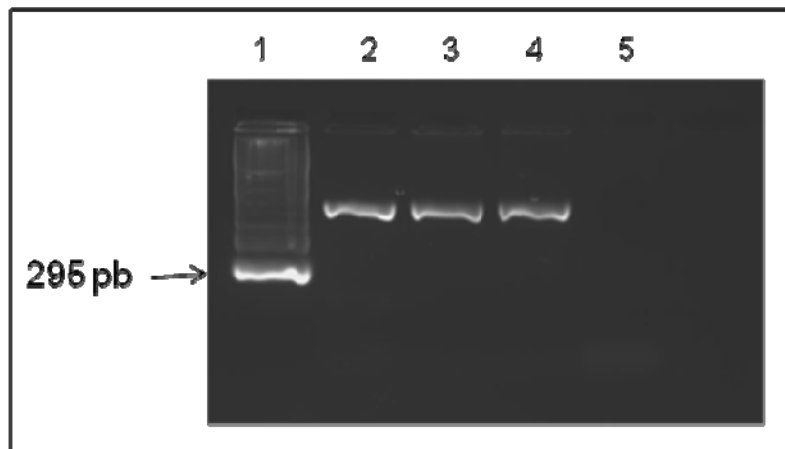


Figura 7. Productos de exón 3 (295pb) amplificados por PCR, realizada con controles normales para su estandarización. Primer carril, marcador de peso molecular (MPM); 2o a 4o carriles corresponden a DNA de paciente, madre y padre respectivamente; el 5º carril corresponde al control negativo.

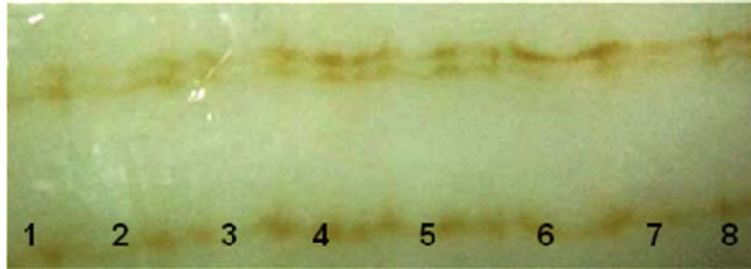


Fig. 8. Patrón normal del exón 3 del gen *TSC1* en gel al realizar SSCP. Cada número corresponde a un paciente diferente con Esclerosis Tuberosa.

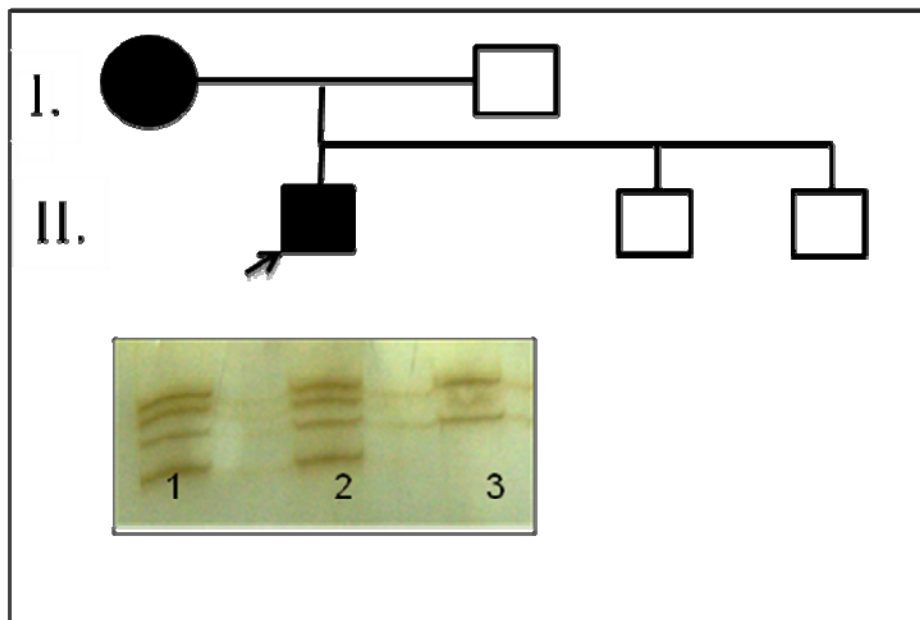


Figura 9. Gel de electroforesis al realizar SSCP observándose el patrón de migración anormal en carriles No. 1 y 2 que corresponden a la madre y caso índice respectivamente. El carril 3 corresponde a la muestra del padre y se observa un patrón de migración normal.

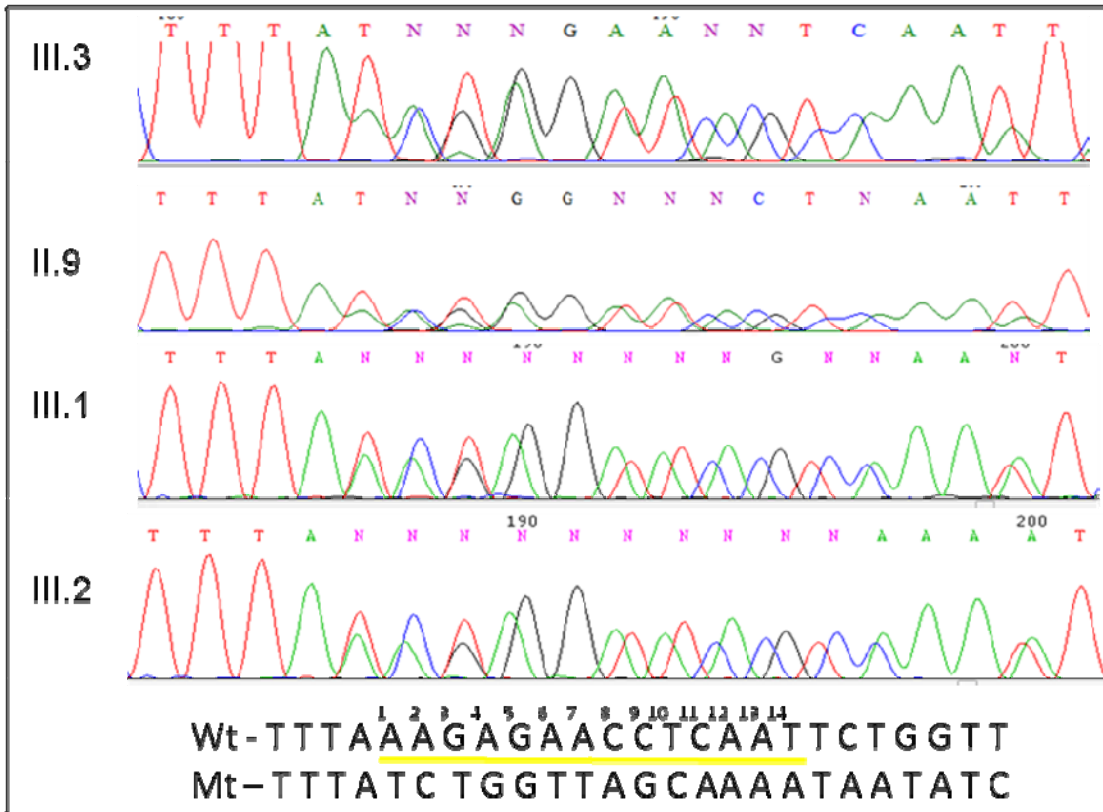


Figura 10. Electroferograma de caso índice (III.3), de la madre (II.9), hermano afectado (III.1) y hermano asintomático (III.2) donde se observa la superposición de los picos. Se puede distinguir la delección de 14 pares de bases en todos los casos (flecha indica inicio de la delección), dando como resultado la mutación denominada como c.89-102delAAGAGAACCTCAATp.Lys30IleFsX1 (subrayada con línea amarilla en Wt en los cuatro casos). *Wt*= cadena silvestre; *Mt*= cadena mutada.

ANEXO 2. PRIMERS Y CONDICIONES DE LA TÉCNICA DE PCR.

TSC1: primers y condiciones de PCR.

Exón	Primer	Secuencia	Temperatura de alineamiento (°C)	Longitud (pb)
3	AJ63	5'-GGGGCCATTTAGTGACTGT-3'	55	295
	AJ62	5'- CAGGATTCTAGTGGCTCTAA-3'		
4	AJ61	5'-AGGATGTTAAGGGGAATAAGT-3'	55	241
	AJ60	5'- TCAGGACAAGTTGCACAGT-3'		
5	AJ59	5'-CTTCATACATTCATGTGAGGACT-3'	56	276
	AJ58	5'-CCTTGCTTTAAGTTGCCTAAA-3'		
6	AJ57	5'-CAGTGTTTAGAGCCTCTTCAT-3'	56	283
	AJ56	5'-AAAGCATTACCTCACAGG-3'		
7	AJ55	5'-GCTGTTTTGCACTCCTCAAT-3'	56	307
	AJ54	5'-CCCTGTCTGCCGTTAAATAC-3'		
8	AJ53	5'-CACAAACATTCAGCCCTTTAT-3'	56	197
	AJ52	5'-CTCAACAGGGATTACCTCCTA-3'		
9	AJ32	5'-TGGCACTGAGTTGCACTCT-3'	58	315
	AJ31	5'-CAAATAATGTTTTCCAGAGACA-3'		
10	AJ30	5'-CACACTAACCCCTGTGTTC-3'	57	238
	AJ29	5'-TTCCCAACCACATACTAAATCT-3'		
11	AJ28	5'-AACCTCGTGGATGACTTAGC-3'	55	268
	AJ27	5'-AACAGCAAGTGGTCCCTTAG-3'		
12	AJ26	5'-AATAGTTGGGCTCAGTGTCAT-3'	55	281
	AJ25	5'-CCCATTGCATTTTAGGTCAG-3'		
13	AJ24	5'-CAACATTTTTCTGTGA-3'	54	170
	AJ23	5'-ACATATAACCCAATTAGAAGAGG-3'		
14	AJ22	5'-TGTCCAGCCTTCTCTGTTC-3'	54	278
	AJ21	5'-GAGCGAGGGTCAGGTTTTAT-3'		
15	AJ6	5'-GAATACCGACTGCCATTTCT-3'	57	303
	AJ5	5'-AGGGCTTTCATCAGCACTG-3'		
	AJ4	5'-GCAAGCCTTTACTCCCATAG-3'		
	AJ3	5'-GGCACACCATCTTCCTCTG-3'		
	AJ2	5'-CAGCCCATCATTTTGTGATC-3'		
16	AJ20	5'-TTTTGACCACAAGGAAGTGAT-3'	55	217
	AJ19	5'-GGACAGAAAGGGCAACAAG-3'		
17	AJ18	5'-GGCTTGATTGAACCATCTGTA-3'	55	312
	AJ17	5'-CTCGGCTGCTGTGCTTTAT-3'		
18	AJ16	5'-CCTGTGTTGGAAGACAGCTAA-3'	55	283

	AJ15	5'-ACTGCTCTCCGGCATTCTC-3'		
19	AJ14	5'-GCCTGTTGGTGTTCCTCAA-3'	56	210
	AJ13	5'-AATGTTAGCAAATGGTGTTC-3'		
20	AJ12	5'-GCTGATTCCCTGTTAATGAC-3'	55	276
	AJ11	5'-GCCATGTGGGAGACATACTG-3'		
21	AJ39	5'-TTCAGGAAGTAGAAATGATGA-3'	55	265
	AJ9	5'-AGATACAGACCAGCCAGAAT-3'		
22	AJ8	5'-TCAAACCTCCAGGCAAGGTAA-3'	52	296
	AJ7	5'-CAGCTTAGTCCCAAGGTCAT-3'		
23	AJ38	5'-CCTCCGAATGTGGACAGTC-3'	57	298
	AJ37	5'-CAGACGCTTCTCCCATAGTC-3'		
	AJ36	5'-GGCAGTAGTGGAAAGCAGAGG-3'	57	295
	AJ35	5'-CCAAGTCTTGCCAGTTCT-3'		
	AJ34	5'-CATGACCAGTAGCCTTCTGA-3'	57	234
	AJ33	5'-GCATTCACACCTCCTGTTCT-3'		

TSC2: primers y condiciones de PCR.

Exón	Primer	Secuencia	Temperatura de alineamiento (°C)	Longitud (pb)
1	MP1	5'-CAGAGGTGTTGCTCAGATGTCCC-3'	60	253
	MP2	5'-ATTCCCTCTAGCCTAGCAAAGA-3'		
2	2F	5'-TGGAAAATGCAGTGGGAGTCTTTA-3'	60	296
	2R	5'-GCAAACCAGATCATCGGCAGTCAG-3'		
3	MP11	5'-GCCAGGGTTCTTGGAGAGCAC-3'	57	255
	MP83	5'-ACCGAGGCAGGAGTCCAAAC-3'		
4	MP3	5'-CGACGCTGAGTCAGGCTCTGCTGAT-3'	60	255
	MP84	5'-CTTCCCATCCAGTTACTACT-3'		
5	MT5F	5'-GGAGGTGAGTGGGAGATGTAG-3'	52	292
	MT5R	5'-GGCGTCAGAGCCATTGTG-3'		
6	2449	5'-GACGTCATAGAGTGACTAGAC-3'	55	248
	MT6R	5'-CAGCTTGCCAGGCTACACAG-3'		
7	MP85	5'-CCATGGCAGCGGGGAGAGGT-3'	60	305
	MP86	5'-GGCCCTGTCCCATCCATGT-3'		
8	MT8F	5'-CCGGACCTGGGTGCTATA-3'	52	260
	MT8R	5'-TGTGCGTTGGTAAGGGACAC-3'		
9	MP7	5'-GGGACAGGCCCTGCTCACATT-3'	60	212
	MP8	5'-CGTTCCTGCCAGCTCACTGCA-3'		
10	M2453	5'-TGCTGGCCGGGCTCGTGT-3'	65	226
	MP23	5'-GGCCGAGCCTGCCTGTCTG-3'		

11	11F	5'-CCAAGTCCATGTGGGGAGTG-3'	57	279
	11R	5'-GAGGCTCAGAAAGCTGCACTTC-3'		
12	MP9	5'-GAGGGGCAACACCGGCTCTTC-3'	60	187
	MP10	5'-AGGGCCAGGCTCCAGGTGCCA-3'		
13	13F	5'-GGGCTGTGGCGGGCACTC-3'	57	253
	13R	5'-AGAGGTCCGGCAGACCGAAGTC-3'		
14	MP44	5'-TTGCGGGTCGGTTCCTGAG-3'	57	291
	2460	5'-GAGCTCTGGCACGCTAGCC-3'		
15	MT15F	5'-GTTCTCACGGCTGCTGACTC-3'	55	260
	MT15R	5'-ACTCCAACACAACGCAGATG-3'		
16	16F	5'-AAGGGTGCTGTCTTAGGACTGC-3'	55	255
	16R	5'-ACCTGCCGAGATGGGATAACC-3'		
17	2488	5'-CTGCACGAGCTTGGCTCTG-3'	55	192
	2489	5'-TGACGCCCTGAGCCTCAT-3'		
18	MT18F	5'-GTGGCGCTGTTTGCATGTC-3'	55	321
	MT18R	5'-GGTGGCAGCTCCCTGTCC-3'		
19	MP6	5'-GCAGAGCCTCAGATGCTAGCTT-3'	55	235
	2673	5'-ACCCAGGCCGGCATGGT-3'		
20	20F	5'-CCTCTGGCTACCCCGTGAC-3'	54	236
	3050	5'-GGAACCACCATCAAGCTCGC-3'		
21	2674	5'-GGCCTGAGGTGTCCTGTCT-3'	62	239
	2675	5'-AGTGCTGCAGGGCGGGGAC-3'		
22	2676	5'-TGACCACCTCTCCATTACCG-3'	55	260
	22R	5'-CTGGCAGCAGGGAACATC-3'		
23	23F	5'-CTTCATGCCCTGGGGATGT-3'	54	193
	2677	5'-ACACAGCCTTACCCGCCCT-3'		
24	24F	5'-CCATTGCCACCCCTCACT-3'	55	246
	24R	5'-ACAGGACCCATTCCACTCAC-3'		
25	25F	5'-CCCTCCACTGGCTTGTCTCC-3'	57	304
	25R	5'-CGGGCAAGACGATGAGGTCAT-3'		
26	26F	5'-GAGCTTTGGCCCTTGGTGATA-3'	55	339
	26R	5'-CTCGCCACAGGAGACCTAGA-3'		
27	27F	5'-ACGGGCAAGCTGGGTTTC-3'	57	245
	27R	5'-CTCGGGACAGCCGGTGTC-3'		
28	MP5	5'-CTGGGGACTAAGTCACCCTGTGC-3'	62	216
	1532S	5'-GGACCAGCAGCAACTGAGG-3'		
29	MP35	5'-CGGGGAGCATTACGCTTGA-3'	62	333
	MP18	5'-AAGATGGCGCTCAGGCCAG-3'		
30	MP56	5'-CTGGGGCAGAGATGGGTAA-3'	62	363
	MP57	5'-GGGCGCCCTCAGCAGAGAG-3'		
31	31F	5'-CACGGGGCCTGTGCTCTCTG-3'	57	259

	31R2	5'-CAATGGAGGCAGACGGACCAT-3'		
32	32F	5'-GCTGCTGTCCCTCTGGTCAG-3'	55	250
	32R	5'-AGCAGGGTCCAGGCTCTGAG-3'		
33	33AF	5'-TGCCTGCTGACAGGGGTTTC-3'	57	240
	33AR	5'-CAGGGTCCCCGAGGATGTC-3'		
	33BF	5'-GCAGCCCCTGAGCAAGTC-3'	55	263
	33BR	5'-CCGAGTCGGAGATGGTGTA-3'		
	33CF	5'-GGCCTCGGGCGAAGACAG-3'	57	276
	33CR	5'-CGGCCTGGGGCAAGTGAG-3'		
34	34F	5'-CTGCCAGGCCCTCACCTG-3'	58	173
	34R	5'-TTCACCCGAGCCACACAGC-3'		
35	MP64	5'-GGGGCTCAGGCAGGGCTCT-3'	62	232
	MP71	5'-CCCGGCAGTGTGAGCTCTG-3'		
36	MP76	5'-GGCACCCCCACCCTCTGCGG-3'	62	341
	MP27	5'-CAGGGCGTGGGGTAGCAG-3'		
37	MP46	5'-CGTGTCCCGCAGCCCCAGAG-3'	60	276
	MP43	5'-GGCCAGCCTCACTGACGG-3'		
38	MP72	5'-CAGGTGTCTAGCAGTGCAAC-3'	62	208
	MP67	5'-GGCCCTACCTTTCTGCACTG-3'		
39	MP68	5'-CCCTGGGCCTGGCGTGACC-3'	62	200
	MP73	5'-GCAGGGGTGAGCTCACTATC-3'		
40	40F	5'-AGGCGTGACGTGGTGGGACAG-3'	57	279
	40R	5'-CAGAGGCGGCTTGGGCAGTAA-3'		
41	41F	5'-GCCAGCCTCCAGACTTACTG-3'	57	313
	41R	5'-GACTGCAATCTGTGCCTATGT-3'		