



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

UNIDAD MÉDICA DE ALTA ESPECIALIDAD

HOSPITAL DE PEDIATRÍA

CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI



TESIS

**CORRELACIÓN DE LA EXPRESIÓN PROTEICA DE RAS-GTP Y
NEUROFIBROMINA EN SANGRE PERIFÉRICA Y LA
EXPRESIVIDAD CLÍNICA EN PACIENTES CON
NEUROFIBROMATOSIS TIPO I**

COMO UNO DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL
DIPLOMA DE ESPECIALISTA EN GENÉTICA MÉDICA

PRESENTA:

Daniela Juárez Melchor

TUTORA: M. en C. Judith Villa Morales¹

CO-TUTORA: Dra. en C. Eunice López Muñoz²

¹Unidad de Investigación Médica de Genética Humana, Hospital de Pediatría Centro Médico Nacional Siglo XXI. Tel. 56276900 EXT 22410, 22409.

²Departamento de Genética, UMAE, Hospital de Gineco Obstetricia núm. 4 Dr. Luis Castelazo Ayala, IMSS



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).

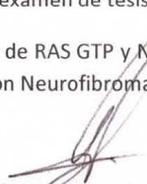
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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

UMAE Hospital de Pediatría Centro Médico Nacional Siglo XXI

El día 22 de Febrero de 2013, la Médico Residente de la especialidad en Genética Médica Daniela Juárez Melchor, presentó su examen de tesis, la cual se titula:

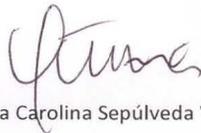
“Correlación de la expresión proteica de RAS GTP y Neurofibromina en sangre periférica y la expresividad clínica en pacientes con Neurofibromatosis tipo I”

Sinodales:



Dra. María Antonieta Araujo Solís

Presidente



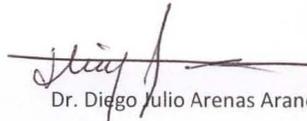
Dra. Ana Carolina Sepúlveda Vildósola

Secretaria



Dr. Juan Carlos Huicochea Montiel

Vocal



Dr. Diego Julio Arenas Aranda

Vocal



Dr. Gerardo Francisco Sánchez Vaca

Vocal



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

DIRECCIÓN DE PRESTACIONES MÉDICAS
Unidad de Educación, Investigación y Políticas de Salud
Coordinación de Investigación en Salud

CARTA COMPROMISO

Dr. Fabio Abdel Salamanca Gómez
Coordinador de Investigación en Salud
Presente

Protocolo: **ASOCIACIÓN DEL TIPO DE MUTACIÓN EN NF1, EXPRESIÓN DE NEUROFIBROMINA, ESTADO DE ACTIVACIÓN DE RAS Y EXPRESIVIDAD CLÍNICA EN PACIENTES CON NEUROFIBROMATOSIS TIPO 1 Y SUS FAMILIARES AFECTADOS**
Número de Registro: **R-2011-3603-34**
Número en el Fondo: **FIS/IMSS/PROT/G12/1114**

Por este conducto me comprometo a:

- Conducir el protocolo de Investigación de manera responsable.
- Respetar las disposiciones institucionales y nacionales en materia de investigación en salud.
- Ejercer los recursos económicos asignados para el desarrollo del protocolo de investigación de acuerdo a la propuesta original y al desglose presupuestal autorizado, con apego a las disposiciones institucionales y nacionales correspondientes.
- Entregar a la Coordinación de Investigación en Salud los informes técnicos y financieros semestrales y extraordinarios del protocolo de investigación hasta su terminación, así como notificar oportunamente sobre las enmiendas autorizadas al protocolo y a la aplicación del presupuesto.
- Entregar a la Coordinación de Investigación en Salud, con cada informe ordinario o extraordinario y cuando se me solicite para su revisión, el sustento documental del desarrollo, la modificación, los avances, la terminación, los productos o la cancelación de la propuesta autorizada.

Atentamente

Dr(a): Judith Villa Morales

Adscripción: Unidad de Investigación Médica en Genética Humana Siglo XXI

Teléfono: 56276900 ext 22410

Correo Electrónico: jusyvm@hotmail.com

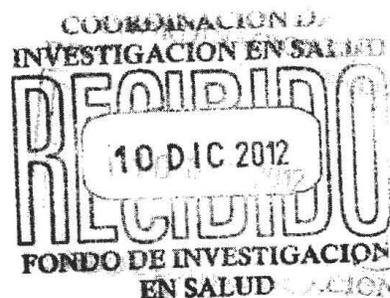

Firma

10-12-2012

Fecha

IMSS

SEGURIDAD Y SOLIDARIDAD SOCIAL



10/12/12

ÍNDICE	Pág.
1.Marco Teórico	5
2.Antecedentes	11
3.Justificación	13
4.Planteamiento del problema	14
5.Objetivos	14
6.Hipótesis	14
7. Material y métodos	15
8. Aspectos éticos	20
9. Resultados	21
10. Discusión	38
11. Conclusiones	43
12. Cronograma	46
13.Bibliografía	47
14. Anexos	52
14.1 Anexo 1 Carta de consentimiento informado	52
14.2 Anexo 2 Hoja de recolección de datos	54

MARCO TEÓRICO

Introducción

Anteriormente se denominó como facomatosis a aquellas condiciones hereditarias neurocutáneas caracterizadas por el desarrollo de hamartomas, siendo las más frecuentes la esclerosis tuberosa (*OMIM #191100*) con una incidencia de 1 en 5 000 a 10 000 recién nacidos, ocupando el segundo lugar y la Neurofibromatosis tipo I o enfermedad de von Recklinghausen¹.

El término neurofibromatosis se utilizó de forma general hasta la década de los 80, para describir dos enfermedades genéticas diferentes. Fue hasta 1882 cuando Friedrich Daniel von Recklinghausen inició el reconocimiento de la Neurofibromatosis tipo I como un desorden distinto. En 1956 Crowe, Schull y Neel detallaron las numerosas manifestaciones de esta enfermedad². La diferencia entre Neurofibromatosis tipo I (*OMIM 162200*) y Neurofibromatosis tipo II (*OMIM 101000*), se propuso hasta 1987 cuando Barker y Seizinger, identificaron los genes responsables de cada enfermedad³.

La Neurofibromatosis tipo I, es una enfermedad con modelo de herencia autosómico dominante, presenta una frecuencia de 1 en 3000 individuos y se produce por una mutación en el gen *NF1* localizado en el brazo largo del cromosoma 17 (q11.2). Es una enfermedad genética que presenta una penetrancia del 100% y expresividad variable dependientes de la edad. Sus manifestaciones clínicas más importantes son el glioma del nervio óptico, manchas cutáneas café con leche, nódulos de Lisch, neurofibromas dérmicos o plexiformes y en menor frecuencia se observan alteraciones óseas como displasia del esfenoides y adelgazamiento de la cortical de huesos largos⁴.

Se sabe que las manchas café con leche (CALS) son frecuentemente el primer signo, ocurriendo dentro del primer año de vida en el 99 % de los pacientes con Neurofibromatosis tipo I. Las efélides inguinales o axilares son hiperpigmentaciones de 1 a 3 mm y constituyen el criterio más específico de los signos cardinales de la enfermedad². El glioma óptico se presenta durante la

primera década de vida en el 15% de pacientes con Neurofibromatosis tipo I y puede producir deterioro rápido de la agudeza visual, además se pueden presentar otro tipo de tumores como el astrocitoma pilocítico de bajo grado, por lo que los pacientes deben ser vigilados con frecuencia⁵.

Los neurofibromas pueden presentarse en cualquier sitio corporal, son tumores benignos que derivan de la vaina del nervio y varían según el tamaño y número, pueden ser dérmicos o cutáneos, subcutáneos y plexiformes. Los cutáneos usualmente llegan a ser aparentes hasta la pubertad y pueden aumentar en tamaño y número a lo largo de la vida adulta, los subcutáneos son firmes y nodulares. El neurofibroma plexiforme crece a lo largo de un nervio periférico. Las células características de los neurofibromas incluyen células de Schwann, fibroblastos, células endoteliales, pericitos, mastocitos, linfocitos y algunas veces células perineurales⁶.

En aproximadamente el 5% de los pacientes con Neurofibromatosis tipo I, los neurofibromas plexiformes se transforman en tumores de tipo maligno que se desarrollan en la vaina de nervios periféricos (MPNSTs), los cuales cubren áreas más extensas⁷. Por otro lado en el 10-20% de los pacientes ocurre desarrollo óseo anormal, resultando en talla baja, escoliosis, arqueamiento y pseudoartrosis congénita de huesos largos. El 5-10 % de estos pacientes pueden presentar fracturas y deformaciones en etapas tempranas⁸. Las lesiones vasculares características en la Neurofibromatosis tipo I son la estenosis y la formación de aneurismas. La estenosis de la arteria renal es la causa más común de hipertensión renovascular en estos pacientes⁹.

Los pacientes con Neurofibromatosis tipo I tienen un mayor riesgo de desarrollar leucemia mielomonocítica juvenil, con una posible progresión a leucemia mieloide aguda¹⁰. En aproximadamente 50 a 60 % de los niños afectados que desarrollan leucemia mieloide, se observa la pérdida de heterocigosidad del alelo *NF1* normal¹¹.

Tabla 1. Frecuencia y edad de inicio de las manifestaciones clínicas mayores de Neurofibromatosis tipo I¹²

Manifestación clínica	Frecuencia (%)	Edad de inicio
Manchas café con leche	>99	Nacimiento a los 12 años
Efélides en pliegues cutáneos	85	3 años a la adolescencia
Nódulos de Lisch	90-95	>3 años
Neurofibromas cutáneos	>99	>7 años (usualmente adolescencia tardía)
Neurofibromas plexiformes	30 (visible)-50 (en imagen)	Nacimiento a 18 años
Neurofibromas plexiformes faciales des figurantes	3-5	Nacimiento a 5 años
Tumor maligno de nervio periférico	2-5 (riesgo de 8-13 % a lo largo de la vida)	5-75 años
Escoliosis	10	Nacimiento a 18 años
Escoliosis que requiere cirugía	5	Nacimiento a 18 años
Pseudoartrosis de la tibia	2	Nacimiento a 3 años
Estenosis de la arteria renal	2	A lo largo de la vida
Feocromocitoma	2	>10 años
Daño cognitivo severo	4-8	Nacimiento
Problemas para el aprendizaje	30-60	Nacimiento
Epilepsia	6-7	A lo largo de la vida
Glioma de la vía óptica	15 (solo 5 % sintomático)	Nacimiento a los 7 años (por arriba de 30 años)
Glioma cerebral	2-3	A lo largo de la vida
Displasia del ala del esfenoides	<1	Congénita
Estenosis del acueducto	1.5	A lo largo de la vida

Ferner RE, 2007.

En 1987, se establecieron siete criterios diagnósticos de Neurofibromatosis tipo I ².

Para realizar el diagnóstico de Neurofibromatosis tipo I se requieren 2 o más de los siguientes criterios:¹³

**Tabla 2. Criterios diagnósticos para Neurofibromatosis tipo I
Instituto Nacional de Salud**

Criterio Clínico	Comentario
6 o más manchas café con leche mayores de 5mm antes de la pubertad, o de 15 mm después de la pubertad	El 10 % de la población tiene una mancha café con leche
Efélides	Axila, cuello, pliegues inguinales e infra mamarios. Altamente específicos para NF1
2 o más neurofibromas o un neurofibroma plexiforme	
2 o más nódulos de Lisch	Requiere examen con lámpara de hendidura
Glioma óptico	
Displasia esquelética	De la órbita o tibial
Un familiar afectado de primer grado	La severidad puede variar ampliamente entre miembros de la familia.

Theos A, 2006

Características del Gen *NF1* y Neurofibromina

En 1990 este gen *NF1* se localizó mediante clonación en el cromosoma 17 en el brazo largo en la región q11.2. Está formado por 60 exones, tiene una longitud aproximada de 350 kb. Produce mRNA de tamaño variable de 9-11 kb y codifica para la proteína Neurofibromina, una proteína formada por 2818 aminoácidos con un peso aproximado de 280 kD que se expresa en diferentes tejidos como cerebro, cordón espinal y sistema nervioso periférico. Se producen diferentes isoformas mediante corte y empalme alternativo ⁵.

La Neurofibromina tiene una región funcional central muy importante, de aproximadamente 360 aminoácidos, la cual muestra homología con el dominio catalítico de la proteína activadora de GTPasa (GAP) que interactúa con RAS ('RAS Sarcoma' virus) y regula la hidrólisis de GTP-RAS(Guanosin trifosfato-RAS) a GDP(Guanosin difosfato), resultando en la inactivación de la proteína RAS. El dominio relacionado a GAP del producto del gen *NF1* (NF1-GRD) presenta 2 isoformas (el tipo I y tipo II) y también estimula la RAS GTPasa, de esta manera mediante la participación de Neurofibromina en la vía de RAS es considerada un regulador negativo de la proliferación y diferenciación celular¹⁴.

Vía de señalización de NF1

Vías de transducción de señales:

RAS pertenece a una superfamilia de GTPasas (pequeñas proteínas G) y juega un papel de activador/represor molecular en una variedad de procesos celulares incluyendo movimiento celular, reorganización del citoesqueleto, tráfico vesicular y transporte intracelular y neocitoplasmático¹⁵.

Aunque éste solo ocupa una pequeña área de la proteína (360 aminoácidos), el dominio relacionado a la proteína activadora de RAS-GTPasa (GAP) es una región funcional importante de la Neurofibromina, que estimula la GTPasa intrínseca de p21-RAS-GTP para hidrolizar GTP a GDP inactivando p21-RAS. La inactivación de RAS-GTP es la principal función de la Neurofibromina. El incremento de RAS-GTP lleva a un incremento en la señalización a través de Raf cinasa, la cual activa una cascada de cinasas involucrando a MEK (Map/Erk kinase) cinasa y las isoformas Erk1 y Erk2 (Extracellular signal- regulated kinase) de MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) resultando en proliferación celular.

El incremento de RAS-GTP además protege a las células de la apoptosis por activación de mTOR (mammalian target of rapamycin). Evidencia científica confirma que la Neurofibromina regula negativamente la vía de mTOR ya que ocurre pérdida de la expresión de Neurofibromina en líneas celulares de

neurofibromas humanos asociados con altos niveles de activación de mTOR. La vía mTOR se activa constitutivamente en células primarias deficientes de *NF1* y tumores humanos y además de ser dependiente de la activación de RAS y PI3K (Phosphatidylinositol 3-Kinase) su activación es mediada por la fosforilación e inactivación de AKT (V-AKT Murine Thymoma viral oncogene homolog) en la proteína Tuberina codificada por *TSC2* (Tuberous sclerosis 2) (Figura 1).

RAS es un componente clave de la vía de señalización de muchos factores de crecimiento y en ausencia de Neurofibromina ésta es constitutivamente activada, resultando en proliferación e incremento de la supervivencia celular¹⁶.

La vía RAS/MAPK es crítica para el desarrollo normal por participación en la regulación de la proliferación celular, diferenciación, motilidad, crecimiento, apoptosis y senescencia celular. Interesantemente las alteraciones en la vía de RAS se han visto involucradas en múltiples síndromes de desarrollo que favorecen la formación de tumores, siendo referidos como RASopatías o síndromes neuro-cardio-facio-cutáneos. Estas enfermedades incluyen los Síndromes de Noonan, LEOPARD, Costello, malformación capilar- arteriovenosa y Síndrome Cardio-facio-cutáneo. Estos se relacionan con mutaciones germinales (que pueden resultar en incremento de la transducción de señal) en genes que codifican para componentes proteicos de la vía RAS/MAPK.

Cada síndrome exhibe características fenotípicas únicas, sin embargo, hay características clínicas que se sobreponen, incluyendo características faciales, defectos cardiacos, anormalidades de la piel, retraso del desarrollo y el riesgo de malignización.

Hay diversas vías relacionadas a *NF1* que son significativas en la patogénesis de estos síndromes, incluyendo mTOR, la cual contribuye a esclerosis tuberosa¹⁶.

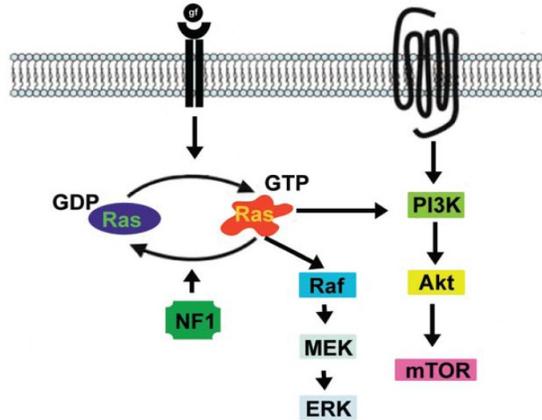


Figura 1. Vía de señalización de Neurofibromina.

(Tomado de Gottfried O N, 2010)

Mutaciones en *NF1*

Dado que el gen *NF1* es muy grande ha sido difícil su estudio en forma completa, sin embargo estudios recientes indican que las mutaciones pueden estar presentes a lo largo de los 60 exones que lo conforman. Las mutaciones reportadas son diversas, el 30-50 % son consideradas *de novo* y pueden corresponder a deleciones del gen completo, inserciones, mutaciones puntuales, rearrreglos cromosómicos, entre otros^{2,17}. Todos los individuos afectados son heterocigotos para una mutación en el gen *NF1* y la pérdida de la heterocigosidad, es decir la pérdida del segundo alelo *NF1* a nivel somático, resulta en ausencia completa de la función de Neurofibromina y riesgo de desarrollar tumores malignos¹⁶.

ANTECEDENTES

La Neurofibromatosis tipo I es una enfermedad que se caracteriza por presentar penetrancia completa dependiente de la edad y alta variabilidad en la expresión clínica. Debido a lo anterior, es sumamente importante establecer los mecanismos que expliquen dicha variabilidad en la expresión clínica¹⁸.

La heterogeneidad alélica de la mutación constitucional de *NF1* puede ser uno de los factores que expliquen la variabilidad fenotípica de la enfermedad¹⁸. En 2007, Upadhyaya y colaboradores reportaron la asociación de la deleción de 3bp

(c.2970-2972 del AAT) en el exón 17 del gen *NF1* con un fenotipo caracterizado por la ausencia de neurofibromas cutáneos¹⁹. Pastmant y colaboradores en el 2010 estudiaron la correlación genotipo-fenotipo en pacientes con delección de toda la extensión de *NF1*, demostrando que éstos pacientes tienen una incidencia significativamente más elevada de alteraciones del aprendizaje y dismorfismo facial que en aquellos pacientes con mutaciones intragénicas²⁰.

Por otro lado, se han realizado estudios con el fin de evaluar la agregación familiar de las características clínicas entre familiares afectados de Neurofibromatosis tipo I. En 2009, Sabbagh y colaboradores examinaron la variación fenotípica entre familiares afectados, mediante el análisis de 12 características clínicas, obteniendo evidencia de la agregación familiar. Además, en este estudio se confirmó que los polimorfismos en el alelo *NF1* normal no participan en la expresividad variable de la enfermedad. Al igual que los hallazgos previos en el 2000 y 2003 por Szudked y colaboradores, encontraron asociación entre el número de neurofibromas plexiformes y el número de neurofibromas cutáneos, el número de neurofibromas subcutáneos y la presencia de máculas rojo-azul y entre el número de manchas café con leche y la presencia de efélides, sugiriendo que algunas características de la Neurofibromatosis tipo I pueden compartir determinantes genéticos comunes¹⁸.

Se han realizado estudios con la finalidad de correlacionar la expresividad clínica y el nivel de expresión de algunas proteínas a nivel sérico. En 2004, Mashour y colaboradores indicaron que el factor de crecimiento epidérmico puede ser un factor que participe en el crecimiento de los neurofibromas²¹. Dasgupta y colaboradores en 2005, en un modelo animal con ratones que presentaban gliomas de la vía óptica y astrocitos deficientes de *Nf1*, demostraron la sobreexpresión de metionina aminopeptidasa 2 (MetAP2). El tratamiento con el inhibidor de MetAP2 redujo significativamente la proliferación celular *in vitro* lo cual refleja la actividad desregulada de K-Ras (V-KI-Ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog)²².

En el 2006 Geller y colaboradores analizaron 25 pacientes con neurofibromas dérmicos, 25 con neurofibromas plexiformes y 25 sin neurofibromas para correlacionar el tamaño de los neurofibromas dérmicos y plexiformes con los niveles séricos de IgE (mediante radioinmunoabsorción), basándose en el hecho de la participación de la IgE, mediante la estimulación de mastocitos (los cuales han sido implicados en el desarrollo tumoral a través del proceso de angiogénesis), en el proceso de tumorigénesis²³.

Wang y colaboradores en un estudio reportado en 2007, identificaron mediante espectrometría de masas y confirmaron mediante Western Blot, un incremento en los niveles de fibrinógeno sérico en los pacientes con Neurofibromatosis tipo I en comparación con muestras de individuos sin la enfermedad. Debido a que el fibrinógeno está asociado con angiogénesis, adhesión, proliferación y migración celular propusieron que los niveles elevados de fibrinógeno podrían estar relacionados con el crecimiento tumoral²⁴.

JUSTIFICACIÓN

El estudio de las enfermedades neoplásicas es considerado un tema prioritario de investigación en salud en nuestro país. Dado que en la Neurofibromatosis existe el riesgo de transformación maligna a través de la activación o inactivación de vías moleculares involucradas en otros tipos de cáncer como las leucemias, mediante el presente estudio pretendemos determinar la correlación entre la expresión de Neurofibromina y RAS con la expresividad clínica, para, en caso de encontrarla, en un estudio posterior, determinar el riesgo de transformación maligna de los neurofibromas o el desarrollo de otras neoplasias en función de la expresión de estas proteínas.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La Neurofibromatosis tipo I (NF1) es una enfermedad que se caracteriza por tener expresividad clínica variable con riesgo de transformación maligna de los neurofibromas en el 5% de los pacientes. Además, los pacientes con Neurofibromatosis tipo I, tienen mayor riesgo de desarrollar leucemia mielomonocítica juvenil (LMMJ), con una posible progresión a leucemia mieloide aguda (LMA).

Dado que RAS y Neurofibromina están directamente involucradas en la patogénesis de la Neurofibromatosis tipo I, existe suficiente evidencia de la participación de RAS en el desarrollo de numerosos cánceres humanos incluyendo leucemias (LMMJ, LMA) y que a la fecha no se han realizado estudios para determinar la correlación de la expresión de estas proteínas con la expresividad clínica de la enfermedad (cada uno de los seis datos clínicos mayores).

Pregunta de investigación

¿Existe correlación entre la expresión proteica de RAS-GTP y Neurofibromina, con la expresividad clínica de pacientes con Neurofibromatosis tipo I?

OBJETIVO GENERAL

Identificar la correlación entre la expresión proteica de RAS-GTP y Neurofibromina con la expresividad clínica de pacientes con Neurofibromatosis tipo I.

HIPÓTESIS

Existe correlación de al menos $Rho=0.5$ estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$) entre la expresión proteica de RAS-GTP y Neurofibromina con la expresividad clínica de pacientes con Neurofibromatosis tipo I.

MATERIAL Y MÉTODO

Diseño del estudio

- Observacional
- Transversal
- Analítico

Universo y muestra

En el universo de estudio se consideraron 29 pacientes registrados en la consulta externa de Genética del Hospital de Pediatría del CMN Siglo XXI de febrero 2010 a noviembre de 2011, que cumplieron con los criterios de selección, a quienes se les invitó a participar en el estudio en el momento de acudir a su consulta de seguimiento o mediante llamada telefónica. De los 29 pacientes registrados, se logró contactar a 19, de los cuales previa explicación de los alcances del proyecto e invitación a participar en el mismo, aceptaron participar 15 de ellos, y 4 no aceptaron participar en el estudio, aquellos que aceptaron participar firmaron carta de consentimiento informado escrito al igual que 8 de sus familiares adultos que también cumplieron con los criterios de selección.

Muestreo

Se realizó un muestreo por conveniencia de casos consecutivos.

Cálculo de tamaño de muestra

Tomando en cuenta un $Rho=0.5$, un alfa de 0.05 y un poder de 0.80, el tamaño de muestra fue de $n=23$, el cual se estableció de acuerdo a los criterios recomendados con el programa Sample Size Calculator Raosqt Inc. 2004 on line²⁵.

Criterios de selección

Criterios de inclusión

Tomando en cuenta que existe haploinsuficiencia del gen *NF1* en todas las células somáticas de pacientes con Neurofibromatosis tipo I y dado que la vía hematogena constituye una vía de fácil acceso, decidimos realizar la determinación de la expresión de las proteínas RAS-GTP y Neurofibromina, así como la evaluación de la expresividad clínica en:

- Pacientes que cumplieron con los criterios clínicos diagnósticos de Neurofibromatosis tipo I, estandarizados y validados a nivel internacional mencionados en el marco teórico.
- Que aceptaron participar mediante firma de consentimiento informado escrito.

Criterios de no inclusión

- Pacientes con Neurofibromatosis tipo I segmentaria, debido a que estos pacientes presentan mosaicismo para la mutación en *NF1*.

Criterios de eliminación

- Pacientes cuya muestra de sangre resultó inadecuada para su estudio por ser insuficiente o por degradación.
- Padres de pacientes o pacientes que solicitaron ser retirados del estudio.

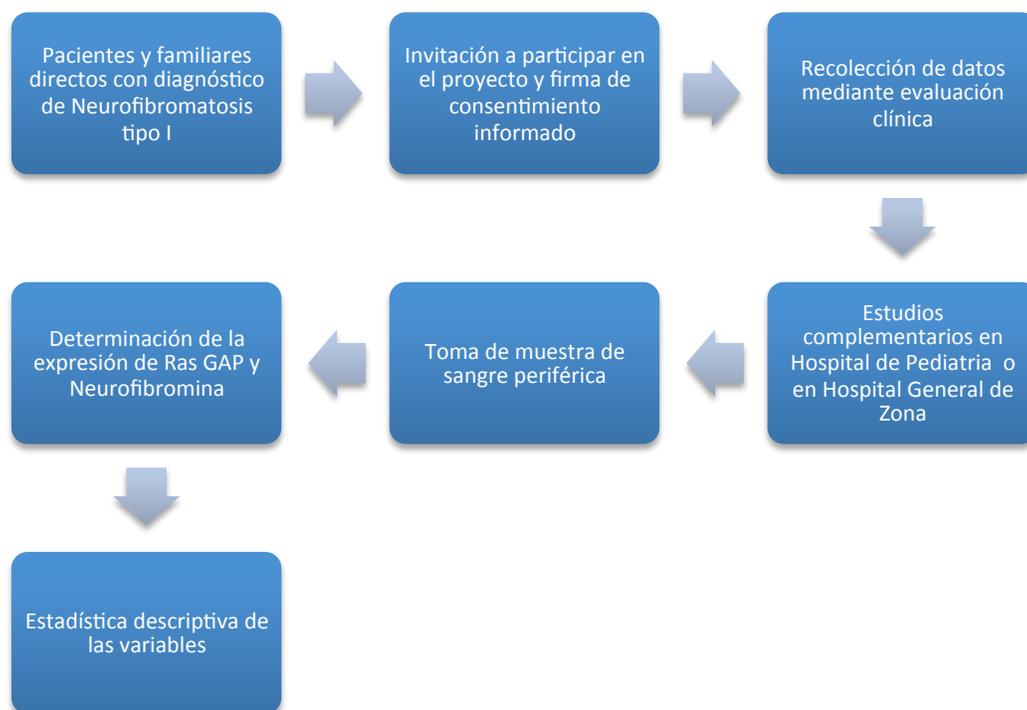
Tabla 3. Definición y clasificación de variables

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Tipo de Variable	Escala de medición	Unidad de medición
Expresión de Neurofibromina	Señal de la proteína Neurofibromina mediante Western Blot en relación a una muestra control	Diferencia en la expresión de la muestra con respecto al control expresado en pixeles	Independiente	Cuantitativa continua	Pixeles
Expresión de RAS-GTP	Señal de la proteína RAS-GTP mediante Western Blot en relación a una muestra control	Diferencia en la expresión de la muestra con respecto al control expresado en pixeles	Independiente	Cuantitativa continua	Pixeles
Manchas café con leche de pequeño tamaño	Máculas bien delimitadas, homogéneas, de bordes suaves, color bronceado a café oscuro de 0.5 – 1.5 cm en su diámetro mayor.	Número de manchas café con leche de pequeño tamaño en toda la superficie corporal.	Dependiente	Cuantitativa discreta	
Manchas café con leche de gran tamaño	Maculas bien delimitadas, homogéneas, de bordes suaves, color bronceado a café oscuro > 1.5 cm en su diámetro mayor	Número de manchas café con leche de gran tamaño en toda la superficie corporal.	Dependiente	Cuantitativa discreta	
Neurofibroma Cutáneo	Tumor benigno de nervio periférico en forma de cúpula, suave, carnoso, del color de la piel o ligeramente hiperpigmentado	Número de neurofibromas cutáneos	Dependiente	Cuantitativa discreta	
Neurofibroma subcutáneo	Tumor benigno de nervio periférico, nodular y firme evidente a la palpación de la piel	Número de neurofibromas subcutáneos	Dependiente	Cuantitativa discreta	
Neurofibroma plexiforme	Tumor difuso que crece a lo largo de un nervio	Número de neurofibromas plexiformes	Dependiente	Cuantitativa discreta	
Eférides	Maculas de 1-3 mm presentes en axilas o ingles	Presencia o ausencia de eférides	Dependiente	Cualitativa Nominal	1=Presente 0=Ausente
Maculas rojo- azul	Tejido neurofibromatoso infiltrado de vasos sanguíneos capilares y vénulas caracterizado por máculas suaves a la palpación, mal definidas, que aparecen principalmente en el tronco	Presencia o ausencia de máculas rojo-azul	Dependiente	Cualitativa Nominal	1=Presente 0=Ausente

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Tipo de Variable	Escala de medición	Unidad de medición
Nódulos de Lisch	Hamartoma melanocítico del iris caracterizado por máculas hiperpigmentadas, pequeñas en forma de cúpula del iris, vistos en el examen con lámpara de hendidura	Presencia o ausencia de nódulos de Lisch	Dependiente	Cualitativa Nominal	1=Presente 0=Ausente
Dismorfismo facial	Forma alterada de las diferentes partes de la cara caracterizada por al menos 2 de las siguientes: Facies tosca, occipucio aplanado/ braquicefalia, asimetría facial, frente prominente, abombamiento frontal, ptosis, fisuras palpebrales dirigidas hacia abajo, eversión lateral del párpado, pliegues epicánticos, puente nasal alto y ancho, punta nasal bulbosa, pabellones auriculares grandes y de implantación baja, hipoplasia malar, filtrum amplio y prominente, micrognatia, mentón pequeño y prominente, y línea capilar posterior baja	Presencia o ausencia de dismorfismo facial	Dependiente	Cualitativa Nominal	1=Presente 0=Ausente
Escoliosis	Curvatura lateral de la columna > 10 °	Presencia o ausencia de escoliosis	Dependiente	Cualitativa Nominal	1=Presente 0=Ausente
Dificultad para el aprendizaje	Dificultad para la asimilación de información caracterizado por repetición de por lo menos un nivel escolar	Presencia o ausencia de dificultad para el aprendizaje	Dependiente	Cualitativa nominal	1=Presente 0=Ausente
Neoplasia	Neoformación de tejido, en el que la multiplicación celular no está totalmente controlada por los sistemas reguladores del organismo y que a veces tiene un carácter progresivo, caracterizado por la presencia de al menos uno de los siguientes: glioma óptico, tumor maligno de sistema nervioso periférico, feocromocitoma, gliomas agresivos, gliomas de bajo grado, leucemia, neuroblastoma u otros.	Presencia o ausencia de neoplasia	Dependiente	Cualitativa nominal	1=Presente 0=Ausente

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Tipo de Variable	Escala de medición	Unidad de medición
Sexo	Condición orgánica que distingue el macho de la hembra	Fenotipo masculino o femenino	Universal	Cualitativa nominal dicotómica	Masculino/ Femenino
Edad	Tiempo que ha vivido un individuo	Tiempo transcurrido desde el nacimiento hasta el momento del estudio	Universal	Cuantitativa continua	Años
Antecedentes familiares de NF1	Afección de un familiar de primer grado con NF1	Presencia o ausencia de un familiar de primer grado con NF1	Universal	Cualitativa nominal	1=Presente 0=Ausente

ALGORITMO DE PROCEDIMIENTOS



CONSIDERACIONES ÉTICAS

El presente proyecto de investigación es de riesgo mínimo, ya que es un estudio que requirió únicamente la toma de muestra de sangre venosa, las cuales fueron etiquetadas mediante un código para la identificación del paciente, este código fue asignado por el grupo de investigación, con las iniciales del paciente así como el número consecutivo de la muestra tomada, con el propósito de respetar la confidencialidad de los datos e identidad del paciente y respetar su individualidad, después de que los tutores firmaron la carta de consentimiento informado, la Médico Residente de Genética Médica Daniela Juárez Melchor, tomó la muestra (5ml) ya que cuenta con la experiencia en el manejo de pacientes durante este proceso. Una vez obtenidas las proteínas, se realizó el estudio de Western Blot, el material sobrante se desechó en contenedores especiales para residuos biológicos. La investigación se ha desarrollado con apego a la Declaración de Helsinki del año 2000 y al Reglamento de la Ley General de Salud en materia de investigación^{26, 27}. Las personas que participan en el proyecto tienen sensibilidad, honestidad y respeto para el paciente, por lo cual evitaron caer en conflictos de intereses durante el desarrollo de dicho estudio. Una vez que este proyecto concluya los pacientes que participaron con nosotros tienen el derecho de acudir para que se les informe sobre los resultados obtenidos, siendo estos positivos o no para su tratamiento o manejo de la enfermedad.

RESULTADOS

La tesista y los médicos adscritos al servicio de Genética del Hospital de Pediatría del CMN Siglo XXI (HP CMN Siglo XXI), captaron a los pacientes que acudieron a la consulta de Genética, algunos de ellos referidos por el servicio de Dermatología, Pediatría y Neurología principalmente, que cumplieron con los criterios clínicos de Neurofibromatosis tipo I. Como parte de la valoración de los pacientes con enfermedades genéticas, se requiere del estudio conjunto de otros miembros de la familia por lo que también se incluyeron en el estudio a los familiares de los pacientes que presentaron la enfermedad y aceptaron participar en el estudio.

Los padres de los pacientes menores de edad o bien los pacientes adultos firmaron carta de consentimiento informado, la evaluación de los criterios clínicos en los 23 pacientes pediátricos y adultos, fue realizada por la Médico residente Daniela Juárez Melchor, quien llenó el anexo 2 que se presenta al final de este escrito, para lo anterior realizó el conteo de manchas café con leche en base a su tamaño, de pequeño y gran tamaño, las mediciones las realizó con una cinta métrica flexible, también contó el número de neurofibromas cutáneos, subcutáneos y plexiformes, el conteo tanto de las manchas como de los neurofibromas fue por área corporal para evitar omitir alguna de estas características y permitir conocer que área era la más afectada. La valoración oftalmológica se realizó por el servicio de oftalmología del HP CMN Siglo XXI en el caso de los pacientes pediátricos, en el caso de los pacientes adultos quienes no contaban con valoración oftalmológica se solicitó a su médico familiar enviar al servicio de oftalmología de su Hospital General de Zona, aquellos pacientes que no fueron valorados en su Hospital correspondiente, fueron acompañados por la tesista al Hospital de Oftalmología del CMN Siglo XXI, en donde una médico residente de la especialidad de Oftalmología de ese hospital apoyó con su evaluación. Para la determinación de la escoliosis se solicitaron radiografías de columna anteroposterior y lateral en los pacientes pediátricos, en el caso de los adultos se pidió a su médico familiar solicitar dicho estudio, una vez que se contó con las radiografías se determinó la presencia de escoliosis mediante el método

de Cobb, con apoyo del servicio de ortopedia del HP CMN Siglo XXI. En el caso de los pacientes a quien se les realizó el diagnóstico de algún tipo de Neoplasia, se les solicitó el reporte de patología o el resumen escrito del servicio que realizó el diagnóstico, en uno de éstos pacientes el diagnóstico se realizó en el Hospital de Oncología del CMN Siglo XXI y en 2 de las pacientes en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. Se solicitó tomografía axial computarizada o Resonancia magnética a aquellos pacientes que por su sintomatología ameritaron la realización de alguna de estas técnicas de imagen, otros pacientes ya contaban con el estudio de imagen solicitado por el servicio de Neurología del HP CMN Siglo XXI o en el caso de los adultos por su médico tratante en su Hospital General de zona, en el caso de los pacientes que presentaron alteración en alguno de estos estudios de imagen se enviaron al servicio correspondiente para su atención y tratamiento especializado. Se realizó la extracción de 5 ml de sangre periférica, por la tesista o la tutora de tesis, quienes realizaron la extracción de proteínas totales y posteriormente el Western Blot para Neurofibromina y Ras GAP, dicha técnica fue realizada en el laboratorio de la Unidad de Investigación en Genética Humana del HP CMN Siglo XXI, se requirió además del apoyo de otros miembros de este laboratorio durante el proceso de estandarización de la técnica. Es importante mencionar que para la determinación de la proteína RAS-GTP es necesario realizar un ensayo de activación de RAS, el cual no fue posible realizar y ya que se tenía disponible el anticuerpo para detectar la proteína Ras GAP, se realizó la determinación de la misma con fines únicamente de estandarización.

Estadística descriptiva

Se realizó la estadística descriptiva de las variables con apoyo de la Co-Tutora de este proyecto la Dra. en C. Eunice López Muñoz.

En el gráfico 1, se observa la distribución de la variable edad de los 23 pacientes incluidos en el estudio, el promedio fue de 23.76 años, con una edad mínima de 2 años y una edad máxima de 71 años. La desviación estándar fue de 21.88 años. 13 pacientes fueron pediátricos y 10 pacientes adultos.

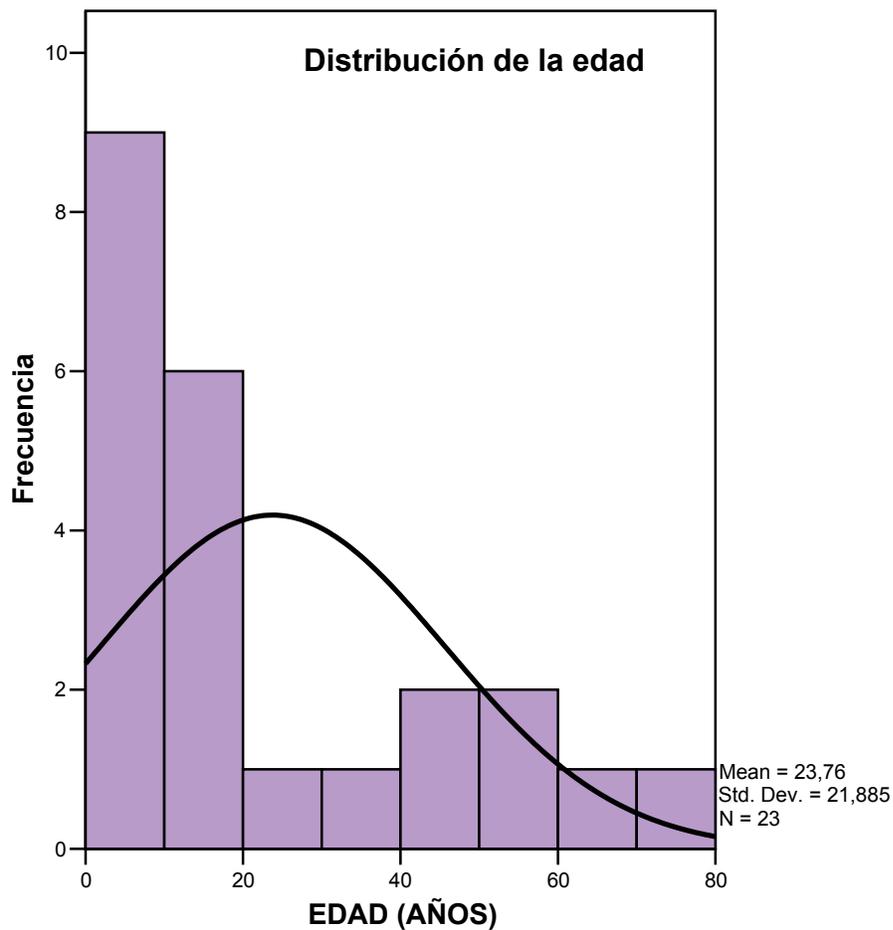


Gráfico 1. Distribución de la variable edad.

El 52% de los pacientes incluidos en el estudio correspondieron al sexo femenino y el 48% al sexo masculino

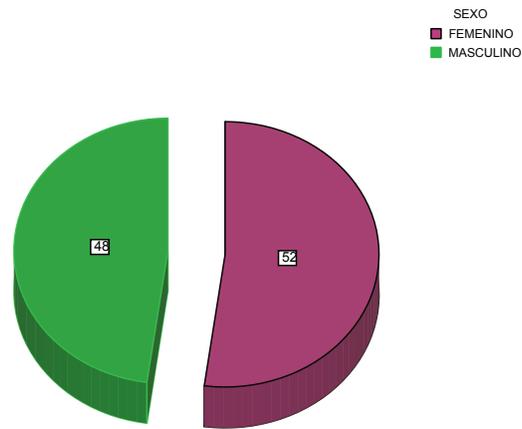


Gráfico 2. Distribución de la variable sexo

El 52% de los pacientes presentaba antecedentes familiares de Neurofibromatosis tipo 1, mientras que el 48% no refirió ningún antecedente relacionado con esta enfermedad.

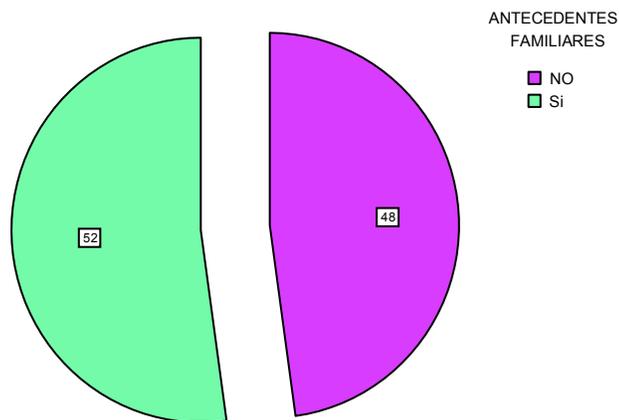


Gráfico 3. Antecedentes familiares

En la tabla 4, se muestran los datos obtenidos en base a la exploración clínica realizada por la Médico Residente Daniela Juárez Melchor quien detectó que las manchas café con leche de 0.5-1.5 cm predominaron en el área del tronco anterior y se observaron en menor cantidad en el área de la cabeza. El número de manchas café con leche mayores de 1.5 cm fue mayor en el área del tronco posterior, y menor en el área de la cabeza. Del total de manchas café con leche predominaron las de menor tamaño, es decir de 0.5-1.5 cm. Los neurofibromas cutáneos se encontraron con mayor frecuencia en el área del tronco anterior y con menor frecuencia en las extremidades inferiores. Se encontró un predominio de neurofibromas subcutáneos a nivel de extremidades inferiores y su menor frecuencia fue en el área del cuello. De los neurofibromas plexiformes, la mayoría se encontraron en el área de las extremidades inferiores, no se encontraron neurofibromas de este tipo a nivel del tronco anterior. Según el tipo de neurofibromas, los cutáneos fueron los más frecuentes, seguidos por los subcutáneos y por último los plexiformes.

Tabla 4. Promedio de Manchas café con leche (CALs) y neurofibromas por área corporal

Área	CALS de 0.5-1.5 cm	CALS > 1.5 cm	Neurofibromas cutáneos	Neurofibromas subcutáneos	Neurofibromas plexiformes
Cabeza	1	0	4	2	0.13
Cuello	2	0	2	1	0.04
Tronco anterior	17	3	24	3	0
Tronco posterior	12	5	19	2	0.08
Pelvis	8	3	1	2	0.08
Extremidades superiores	5	2	6	3	0.13
Extremidades inferiores	7	3	1	5	0.26
Total	52	16	57	18	0.72

Tabla 5. Características clínicas de los 23 pacientes estudiados

Edad	Manchas café con leche	Neurofibromas cutáneos	Neurofibromas subcutáneos	Neurofibromas plexiformes	Eférides	Nódulos de Lisch	Dismorfismo facial	Escoliosis	Dificultad para aprender	Neoplasia
2.4	34	0	3	0	SI	SI	SI	.	NO	SI
3.7	2	0	3	1	NO	NO	NO	SI	NO	NO
3.8	9	0	0	2	SI	NO	NO	NO	NO	NO
4.7	34	0	0	1	SI	SI	SI	NO	NO	NO
5.1	64	0	0	0	SI	NO	SI	NO	NO	NO
5.3	35	0	8	1	SI	SI	SI	NO	NO	NO
7.7	76	0	0	0	SI	SI	SI	.	NO	NO
8.7	28	0	0	0	NO	SI	NO	NO	NO	NO
8.8	47	0	0	0	SI	SI	SI	SI	SI	NO
12.1	70	0	2	2	SI	SI	SI	SI	NO	SI
14.8	74	0	0	1	SI	SI	SI	NO	NO	NO
15.5	70	0	14	1	SI	SI	SI	SI	NO	NO
16.8	55	200	12	1	SI	SI	SI	SI	SI	NO
17	51	2	19	0	SI	SI	SI	SI	SI	NO
19.3	101	17	12	1	SI	SI	NO	NO	NO	NO
25.1	35	159	50	2	SI	SI	SI	NO	NO	NO
36.1	140	25	12	0	SI	SI	SI	.	SI	NO
48.1	45	22	43	1	SI	NO	SI	NO	SI	NO
49	40	165	69	0	SI	SI	SI	SI	SI	NO
52	40	105	28	0	SI	SI	SI	.	SI	SI
52	133	134	53	0	SI	NO	NO	SI	SI	SI
68	7	166	64	3	SI	SI	NO	NO	NO	SI
70.5	356	238	17	0	SI	SI	SI	NO	NO	NO

Nota: En la variable escoliosis el punto indica que no se realizó la radiografía de columna vertebral.

En la tabla 5 se resumen las variables clínicas de estudio, se muestran los pacientes ordenados por edad, ya que se ha observado que la expresión clínica es dependiente de la misma. Se indica el número de manchas café con leche, neurofibromas cutáneos, subcutáneos y plexiformes presentes en cada paciente, así como la presencia o ausencia de las variables clínicas cualitativas. Se observa que los pacientes que presentan un mayor número de manchas café con leche y neurofibromas en sus 3 tipos se ubican principalmente en la parte inferior de la tabla, que corresponde a los pacientes de mayor edad, al igual que 3 de los pacientes que presentaron algún tipo de neoplasia.

Tabla 6. Frecuencia de presentación de las características clínicas

Característica	Frecuencia (%)	Frecuencia reportada (%)
Manchas café con leche	100	>99
Neurofibromas cutáneos y subcutáneos	70	> 99
Neurofibroma plexiforme	52	50
Máculas Rojo-Azul	0	Poco frecuentes
Nódulos de Lisch	78	90-95
Glaucoma congénito	4	Pocos casos
Efélides	91	85
Dismorfismo facial	78	52-78 en microdeleciones
Escoliosis	30	10-25
Dificultad para el aprendizaje	35	30-60
Neoplasia	22	Específica de tipo

En la tabla 6 se muestran las frecuencias encontradas de las diferentes características clínicas en los 23 pacientes estudiados, así como la frecuencia reportada en la literatura.

TIPOS DE NEOPLASIA

En 5 pacientes se identificó la presencia de algún tipo de neoplasia, el más frecuente fue el glioma de nervio óptico el cual se presentó en dos de los pacientes, mientras que los otros tres pacientes presentaron las neoplasias mostradas en el gráfico 15.

Gráfico 4. Tipos de Neoplasias

Neoplasias encontradas

- 2 Gliomas del nervio óptico
- 1 Astrocitoma fibrilar anaplásico
- 1 Liposarcoma de bajo grado en antebrazo izquierdo
- 1 Schwannoma plexiforme en unión toracolumbar más tumor perirrenal

Neoplasias reportadas más frecuentemente en la literatura

- Astrocitoma
- Glioma optico
- Feocromocitoma
- Leucemia mielomonocitica juvenil
- Tumor maligno de vaina de nervio periférico

Gráfico 5. Hallazgos de Tomografía axial computarizada y Resonancia magnética

Tomografía axial computarizada de cráneo	Resonancia magnética de cráneo	Resonancia magnética de columna
<ul style="list-style-type: none">•Total de pacientes= 10•Normal= 6•Lesión quística=1•Erosión basal del temporal en su porción petrosa= 1•Neurofibroma en órbita derecha= 1•Neurofibroma parietal izquierdo= 1	<ul style="list-style-type: none">•Total de pacientes= 6•Normal= 1•Hamartoma en globo pálido derecho= 1•Glioma del nervio óptico= 2•Lesión hiperintensa parietotemporal izquierda en relación a neurofibroma plexiforme= 1•Aracnoidocele pequeño intraselar= 1	<ul style="list-style-type: none">•Total de pacientes= 2•Normal= 0•Schwannoma plexiforme en union toracolumbar mas tumor perirrenal= 1•Neurofibromas a nivel de D11-L5= 1

Técnicas de biología molecular

Extracción de sangre

La tesista y la tutora de tesis realizaron la extracción de 5ml de sangre periférica a los 23 pacientes, mediante punción venosa y se colectaron en un tubo con EDTA. Se separaron los linfocitos mediante buffer de lisis HB y posteriormente se extrajeron las proteínas, los sobrantes del paquete sanguíneo se eliminaron en contenedores especiales para desechos biológicos.

Extracción y cuantificación de proteínas

Para la extracción de proteínas, se utilizaron 100µl de buffer de lisis celular RIPA 1X (500µl RIPA 2X, PMSF 20µl, EDTA 20µl, SDS 0.2 % 20µl, Tritón x100 2 % 20µl, H₂O 380µl) y se le agregó 20µl de una mezcla de inhibidores de proteasas (Thermo Scientific) al botón de leucocitos extraído previamente. La cuantificación de proteínas se realizó mediante el método Bradford.

Western Blot

Las proteínas se separaron mediante electroforesis SDS-PAGE mediante gradiente debido a que el detergente iónico SDS (Sulfato dodecil sodio) desnaturaliza y se une a proteínas que se pueden cargar negativamente y pueden migrar hacia el electrodo positivo, para esto se realizaron geles en gradientes al 5 y 15 %, con un gel separador al 4 %. Se cargaron 20µg de proteínas de cada muestra, previamente desnaturalizadas con el buffer de carga y se realizó corrimiento electroforético a 125 volts durante 60 minutos, posteriormente se transfirió a una membrana para ser detectada mediante Western Blot. Se utilizó una membrana de transferencia PVDF (Thermo Scientific), de 5 x 5 cm, y papel Whatman n°3, la membrana previamente se activó con metanol absoluto por 10 minutos. La cámara de transferencia se preparó en el siguiente orden: negro, fibras, papel filtro, gel, membrana, papel filtro, fibra y blanco, se cerró y se colocó en la cámara de transferencia, la cual se llenó previamente con buffer de transferencia y se agregó un agitador magnético en el fondo, para mantener en

constante movimiento durante la transferencia durante 2 horas a 4°C a 100 volts, en una bandeja con agua y hielo. Posteriormente se retiró la membrana y se agregó leche al 5%, 7 ml para Ras GAP y GAPDH y 10 ml para neurofibromina, dejando reposar durante 2 hrs a temperatura ambiente y en agitación constante, para bloquear todas las superficies que no fueron transferidas y evitar fondo al momento de revelar.

Se utilizó un anticuerpo monoclonal específico (Neurofibromin (McNFn27b):sc-20016, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) que reconoce Neurofibromina humana, de ratón y de rata en una dilución de 1:500, un anticuerpo monoclonal Ras GAP (D-6): sc-271436, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) que detecta Ras GAP p120 de ratón, rata y humano en dilución 1: 100 y un anticuerpo monoclonal GAPDH en una dilución 1: 1000. Se incubó toda la noche a 4°C en agitación constante. Al día siguiente se lavó la membrana con TBS-t tres veces por 15 minutos, se agregó leche al 5% y posteriormente 1µl de anticuerpo secundario en una dilución de 1: 10 000 para NF1 y GAPDH, y 1: 2500 para Ras GAP. Se lavó posteriormente cuatro veces con 10 ml de TBS-t por 15 minutos.

Para revelar, en un cuarto oscuro se colocó sobre la membrana, sustrato luminiscente y solución de peroxidasa de rábano en una relación 1:1 (*Super Signal West Pico Substrate*), se cubrió con acetato y se expuso una película kodak por 15 minutos, la cual se colocó en solución reveladora y posteriormente en fijadora, finalmente la tesista realizó el análisis densitométrico con el programa Alpha Ease FC.

A continuación se muestran los resultados de los experimentos realizados durante la estandarización de las técnicas.

Expresión de GAPDH en controles

Se utilizaron 5 muestras control sin la enfermedad, de individuos con un rango de edad de 5 a 60 años.

GAPDH (Gliceraldehido-3 fosfato deshidrogenasa) se utilizó como proteína constitutiva, tiene un peso molecular de 37 kD y es utilizada como control ya que se ha observado que su expresión es constante en todos los tejidos y no sufre modificaciones ante diferentes condiciones fisiológicas.

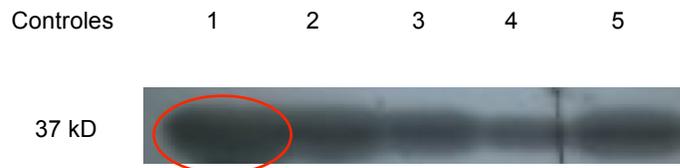


Imagen 1. Western Blot de GAPDH en controles. Cada mancha oscura representa una banda que indica la presencia de la proteína GAPDH, se observa a un nivel de 37 kD con base al marcador de peso molecular que se utilizó. La elipse roja señala la banda correspondiente a la muestra del control uno.

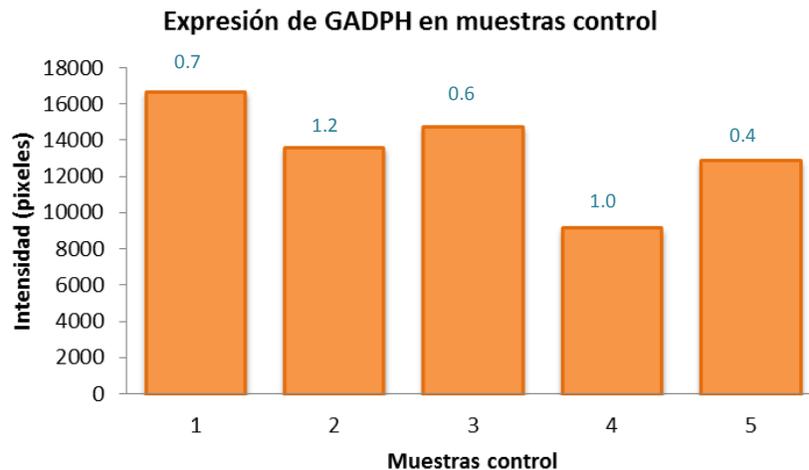


Gráfico 6. Expresión de GAPDH en controles. Se realizó análisis densitométrico con el programa Alpha Ease FC de cada una de las bandas observadas en la imagen 1, mediante el cual obtuvimos el nivel de intensidad de la señal en pixeles, se observa la variación de la expresión de GAPDH en los 5 controles. Los números azules sobre cada barra indican las desviaciones estándar de los 3 experimentos tomados en cuenta en el análisis densitométrico.

Expresión de Neurofibromina en controles

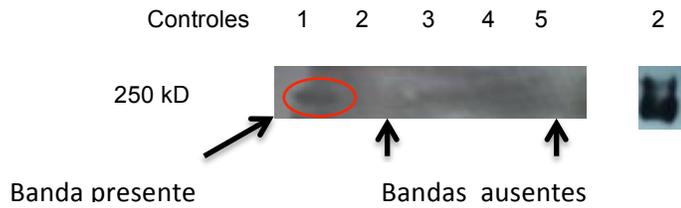


Imagen 2. Western Blot de Neurofibromina en controles. Se observan a un nivel de 250 kD las bandas correspondientes a la presencia de la proteína Neurofibromina de los controles 1, 3 y 4, la banda del control 1 se muestra dentro de la elipse roja. En el caso del control 2 no se observó la banda en el primer Western Blot que se muestra, por lo que se realizó nuevamente el experimento y se logró su detección, se muestra por separado a la derecha de la imagen. En el caso del control 5 no se observó la banda correspondiente.

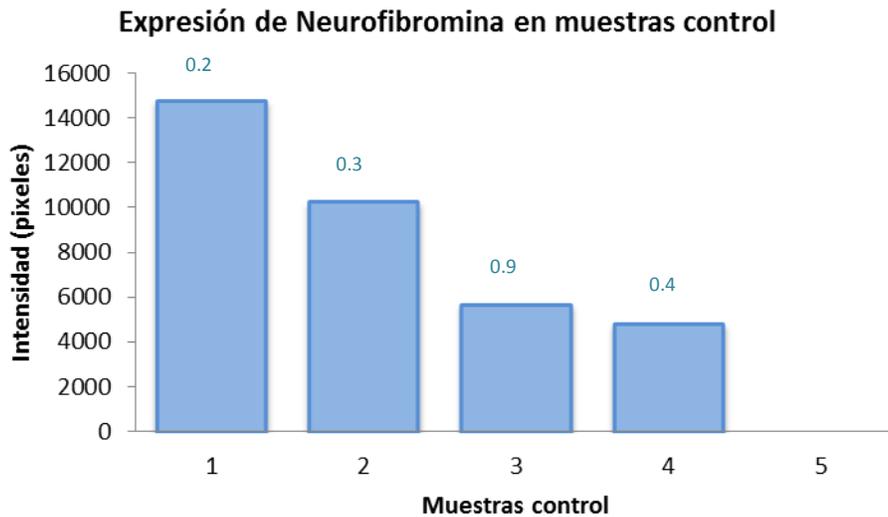


Gráfico 7. Expresión de Neurofibromina en controles. Se realizó análisis densitométrico de las bandas observadas en la imagen 2, se obtuvieron los pixeles que representan la intensidad de la banda. No se detectó la proteína Neurofibromina en el control 5. Los números azules sobre cada barra indican las desviaciones estándar de los 3 experimentos tomados en cuenta en el análisis densitométrico.

Expresión de Ras GAP en controles



Imagen 3. Western Blot de Ras GAP en controles. Se observa en un nivel de peso molecular de 132 kD las bandas correspondientes a la presencia de la proteína Ras GAP en los controles 1, 2 y 4. No se detectó su expresión en los controles 3 y 5.

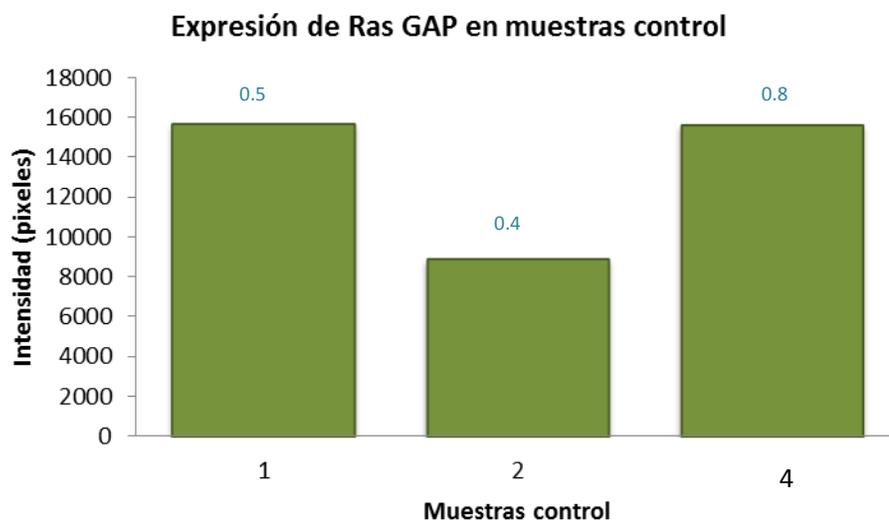


Gráfico 8. Expresión de Ras GAP en controles. Se realizó análisis densitométrico de las bandas observadas en la imagen 3, correspondientes a los controles 1, 2 y 4, obteniendo la intensidad de la expresión de la proteína Ras GAP en pixeles. No se detectó la expresión de la proteína Ras GAP en los controles 3 y 5, por lo que no se muestran en el gráfico. Los números azules sobre cada barra indican las desviaciones estándar de los 3 experimentos tomados en cuenta en el análisis densitométrico.

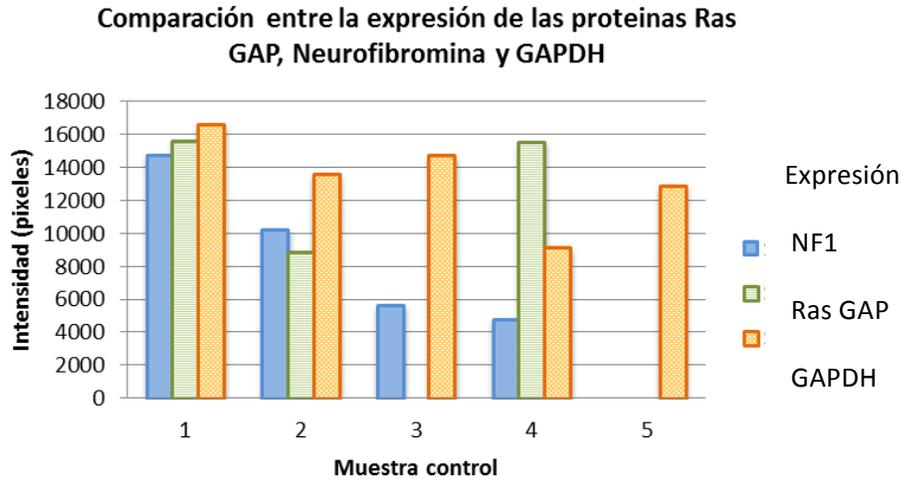


Gráfico 9. Comparación entre la expresión de Ras GAP, Neurofibromina y GAPDH en muestras control. Se observa la variación de la expresión entre las 3 proteínas analizadas, en el caso de la proteína constitutiva GAPDH, se observa su expresión en los 5 controles, por el contrario Neurofibromina no se expresó en el control 5 y Ras GAP no se expresó en los controles 3 y 5.

En los experimentos de los controles se intentó realizar un pull con 5 controles sin la enfermedad, de edad variable (5, 28, 32, 40 y 60 años) en ese orden se encuentran en las gráficas correspondientes, con la finalidad de eliminar el sesgo por edad, y contar con un nivel de referencia que pudiera considerarse como normal y así poder ser comparado con los valores de los pacientes en cada una de las proteínas. En la imagen 1 se puede observar que todos los controles expresaron la proteína GAPDH, lo cual indica que el experimento se realizó de forma adecuada, sin embargo en el gráfico 20 se observa que existe variabilidad en el nivel de expresión de cada una de las muestras, sin considerar esta variabilidad ampliamente significativa. Por otro lado al observar las proteínas Neurofibromina y Ras GAP si se observó una diferencia importante en la expresión entre los diferentes controles, como se ve en las gráficas 7 y 8. Para Neurofibromina llama la atención que el nivel de expresión es inversamente proporcional a la edad del control. En el caso de la expresión de Ras GAP observamos rangos amplios, con 2 controles en los que no se detectó su expresión. Por lo anterior, no se consideró confiable realizar un pull y obtener un valor normal de referencia.

Se realizó Western Blot a los 23 pacientes para las proteínas Neurofibromina, Ras GAP y GAPDH, esta última como proteína constitutiva.

Expresión de GAPDH en pacientes

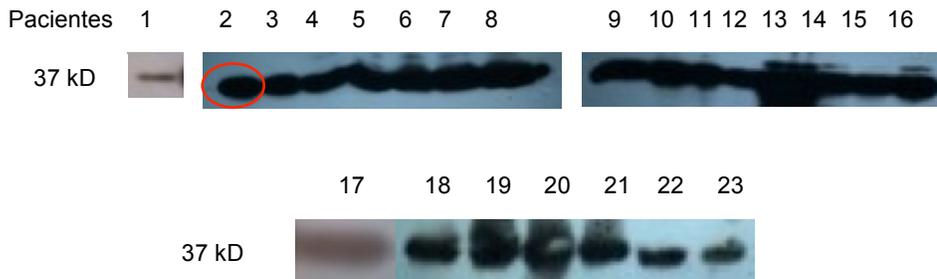


Imagen 4. Western Blot de GAPDH en pacientes. Cada mancha equivale a una banda, la cual representa la presencia de la proteína GAPDH en cada uno de los pacientes, las bandas se observaron a un nivel de 37kD que corresponde al peso molecular de la proteína GAPDH. Se muestra en círculo rojo la banda del paciente 2. En los pacientes 1 y 17 se observó la expresión de la proteína solo en un segundo experimento de Western Blot, por lo que se muestran las bandas correspondientes por separado.

Expresión de GAPDH en pacientes

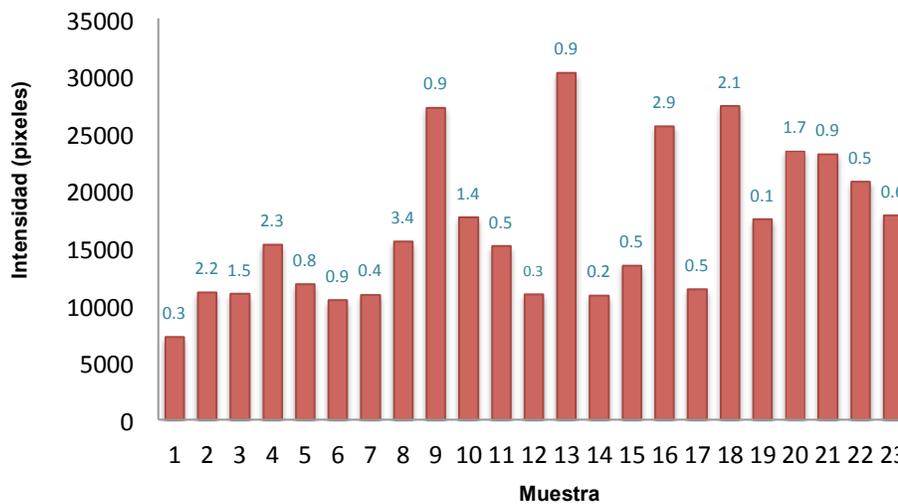


Gráfico 10. Expresión de GAPDH en pacientes. Se realizó análisis densitométrico de las bandas observadas en la imagen 4. Se muestra el nivel de expresión en pixeles de la proteína GAPDH, para los 23 pacientes estudiados. Los números azules sobre cada barra indican las desviaciones estándar de los 3 experimentos que se tomaron en cuenta para el análisis densitométrico.

Expresión de Neurofibromina en pacientes

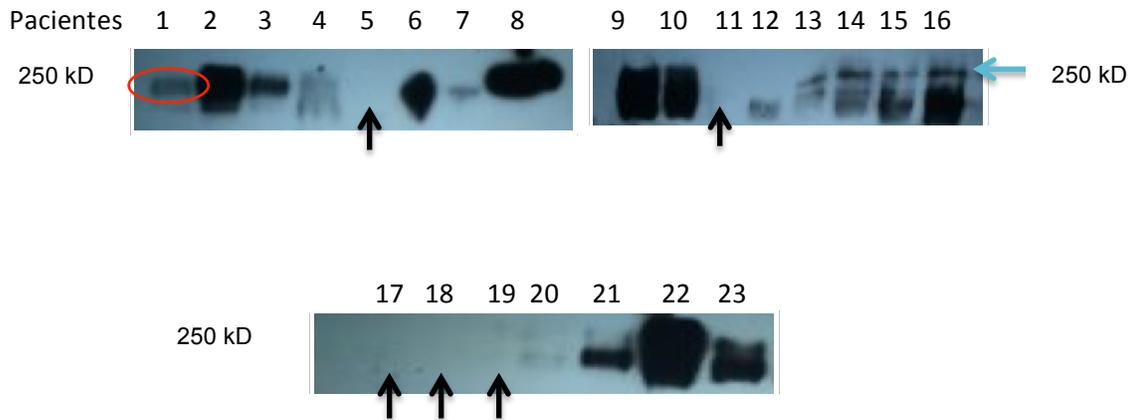


Imagen 5. Western Blot de Neurofibromina en pacientes. Se observa a un nivel de 250 kD las bandas que representan la presencia de la proteína Neurofibromina en 17 de los pacientes, existe ausencia de las bandas y por lo tanto de la expresión de Neurofibromina en los pacientes 5, 11, 17, 18 y 19, los cuales se muestran con flechas negras. La elipse roja muestra la banda del paciente 1. La flecha azul señala la banda superior a nivel de un peso molecular de 250 kD, las bandas que se observan en la parte inferior pueden corresponder a isoformas de la proteína con un menor peso molecular.

Expresión de Neurofibromina en pacientes

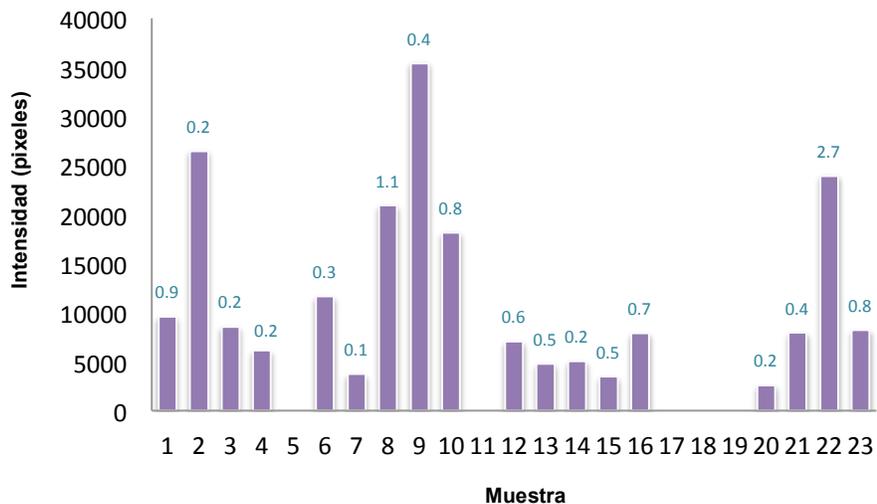


Gráfico 11. Expresión de Neurofibromina en pacientes. Se realizó análisis densitométrico de las bandas observadas en la imagen 5, mostrando amplia variabilidad en la expresión de Neurofibromina entre los pacientes, con ausencia de la proteína en los pacientes 5, 11, 17, 18 y 19, los cuales presentaron respectivamente Astrocitoma fibrilar anaplásico, Neurofibroma plexiforme y glaucoma, Aracnoidocele pequeño intraselar, Schwannoma plexiforme y tumor perirrenal. Los números azules sobre cada barra indican las desviaciones estándar de los 3 experimentos que se tomaron en cuenta para el análisis densitométrico.

Expresión de Ras GAP en pacientes

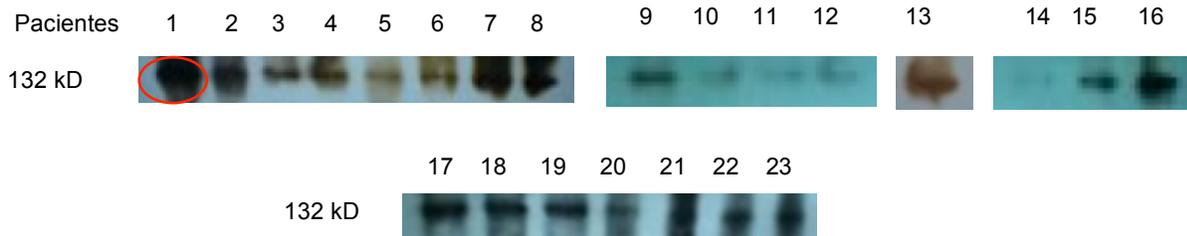


Imagen 6. Western Blot de Ras GAP en pacientes. Se observan las bandas a un nivel de 132 kD, correspondientes a la presencia de la proteína Ras GAP en cada uno de los pacientes.

Expresión de Ras GAP en pacientes

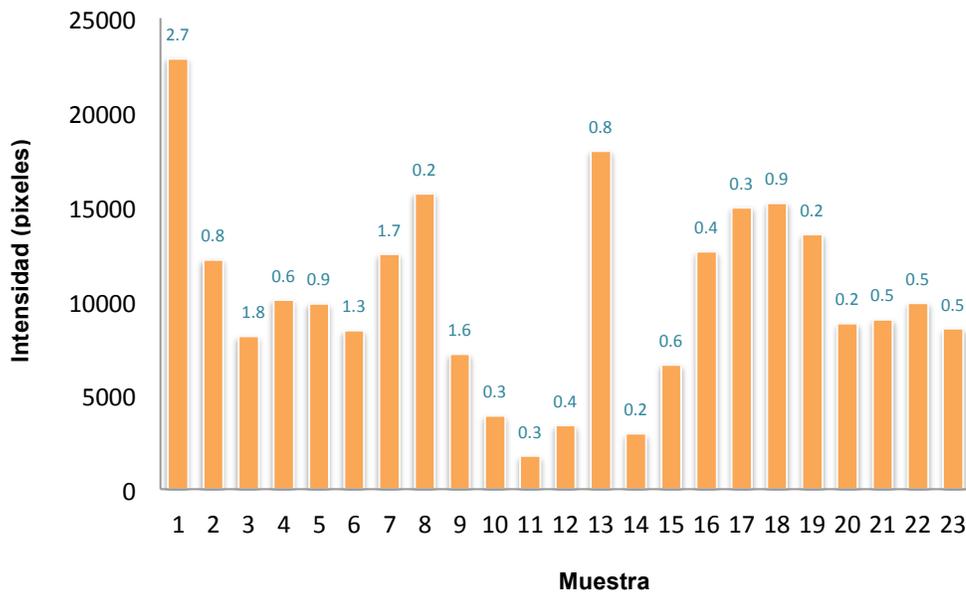


Gráfico 12. Expresión de Ras GAP en pacientes. Se realizó análisis densitométrico de las bandas observadas en la imagen 6, mostrando la variación en la intensidad de la expresión de la proteína Ras GAP entre los 23 pacientes. Los números azules sobre cada barra indican las desviaciones estándar de los 3 experimentos que se tomaron en cuenta para el análisis densitométrico.

DISCUSIÓN

Se estudiaron 23 pacientes con Neurofibromatosis tipo I, 10 adultos y 13 en edad pediátrica, el promedio de edad fue de 23.76 años, con una edad mínima de 2 años y una máxima de 71 años. La desviación estándar fue de 21.88 años. El 52% de los pacientes incluidos en el estudio correspondieron al sexo femenino y el 48% al sexo masculino. De los pacientes estudiados el 52.2% contaba con antecedentes familiares de Neurofibromatosis tipo I, mientras que el 48% fueron casos nuevos, similar a lo reportado en la literatura en donde se ha encontrado que aproximadamente 50 % de los casos son heredados de un padre y el restante 50 % de los casos son debido a una mutación de novo en el probando, esto se piensa que es debido en parte al tamaño grande del gen *NF1*, lo que lo hace más susceptible a sufrir mutaciones²⁸.

En cuanto a las características clínicas de los pacientes se observó que las manchas café con leche de pequeño tamaño fueron las más frecuentes predominando en el área del tronco anterior, mientras que las manchas café con leche de gran tamaño se encontraron más frecuentemente en el tronco posterior y ambas se observaron en menor número en el área de la cara. Como se observa en la tabla 5, todos los pacientes presentaron manchas café con leche, siendo en número de 2 para el que presentó la menor cantidad y 356 para el paciente con mayor cantidad de las mismas, de 3.7 y 70.5 años de edad respectivamente, lo que apoya los datos reportados en la literatura en donde se ha observado que las manchas café con leche son usualmente la manifestación clínica inicial, que se presenta en más del 99 % de los pacientes, tienden a incrementar en número y tamaño a través de la infancia, pero se desvanecen en la vida adulta².

Los neurofibromas cutáneos se encontraron con mayor frecuencia en el área del tronco anterior y con menor frecuencia en las extremidades inferiores. Los neurofibromas subcutáneos y los plexiformes predominaron en las extremidades inferiores. Según el tipo de neurofibromas, los cutáneos fueron los más frecuentes, seguidos por los subcutáneos y por último los plexiformes, se ha reportado que los

neurofibromas cutáneos y subcutáneos se encuentran en más del 99 % de los individuos con Neurofibromatosis tipo I y que los neurofibromas plexiformes se han encontrado hasta en el 50 % de los casos²⁹, semejante a lo encontrado en nuestro estudio en el que el 53 % de pacientes presentó éste tipo de neurofibromas. Ningún paciente presentó máculas rojo azul.

Está reportado que los nódulos de Lisch se encuentran en el 90-95 % de los pacientes, nosotros los encontramos en el 78% de los casos con una edad mínima de presentación de 2.4 años, lo que representa un porcentaje de presentación menor al reportado y una edad de inicio también menor, ya que se ha visto que aparecen aproximadamente a partir de los 3 años¹². El 4 % fue diagnosticado de glaucoma congénito, éste dato clínico se ha reportado en pocos casos en la literatura, se presenta de forma unilateral y se asocia al origen embriológico del neuroectodermo del ángulo iridocorneal³⁰. El 91 % presentó efélides, dato mayor al reportado que es igual al 85 %¹². El 78 % de los pacientes del estudio presentó dismorfismo facial, principalmente por asimetría facial, frente prominente, fisuras palpebrales dirigidas hacia abajo, pliegues epicánticos, ptosis, puente nasal alto y ancho, punta nasal bulbosa y pabellones auriculares grandes y de implantación baja, el dismorfismo facial junto con la dificultad para el aprendizaje fueron 2 características clínicas que en otros estudios mostraron una asociación significativa con microdeleciones del gen *NF1*, y se ha encontrado del 52- 78 % de los pacientes con éste tipo de mutación²⁰. El 35 % de los pacientes presentó dificultad para el aprendizaje, siendo lo reportado en la literatura del 30- 60 %¹², esta característica se consideró en aquellos pacientes que presentaron el antecedente de haber repetido por lo menos un año escolar, ya que no se contó con la determinación del coeficiente intelectual de la mayoría de los pacientes, lo que nos hubiera proporcionado información más valiosa acerca de ésta característica. Se contó con radiografía de columna del 83 % de los pacientes, detectando escoliosis en el 30 % de los casos, esta alteración es el hallazgo esquelético más común en la Neurofibromatosis tipo I, con una frecuencia estimada del 10- 25 % en la literatura mundial²⁸, por lo que en nuestro grupo de estudio, se encontró una frecuencia mayor a la esperada. El 22 % de los pacientes

presentó algún tipo de neoplasia, en 2 pacientes se reportó glioma óptico, equivalente al 8.6 % del total, se considera por varios autores una frecuencia de hasta el 15 %, siendo detectados principalmente en la infancia y sintomáticos en aproximadamente el 5 % de los casos de Neurofibromatosis tipo I, recientemente se han realizado estudios que muestran que es posible que el genotipo sea un determinante del riesgo de desarrollar este tipo de tumor, de los 2 pacientes en nuestro estudio en uno se diagnosticó al año y en otro a los 35 años de edad. En un paciente se diagnosticó astrocitoma fibrilar anaplásico a los 35 años de edad, representando el 4.3 % de los casos. Otros tumores reportados en los pacientes con Neurofibromatosis tipo I son los tumores de vaina de nervio periférico, tumores del estroma gastrointestinal, leucemia mielomonocítica juvenil, tumor glomus, y feocromocitoma³², no se encontró en los casos estudiados alguna de éstas neoplasias, sin embargo se diagnosticó en un paciente de 68 años de edad un liposarcoma de bajo grado en antebrazo izquierdo y en un paciente de 12 años un tumor perirrenal mas schwannoma plexiforme en unión toracolumbar, los primeros 2 tumores no se encontraron reportados en la literatura previamente.

Diez pacientes contaron con estudio de TAC de cráneo, reportándose en 4 de ellos alguna alteración, uno con lesión quística que ocupa el lóbulo frontal y porción dorsal del parietal ipsilateral, esta lesión correspondió por estudio de patología a un astrocitoma fibrilar anaplásico; otros 3 casos con erosión del hueso temporal en su porción petrosa, neurofibroma en órbita derecha y neurofibroma en parietal izquierdo respectivamente. A 6 de los 23 pacientes se les realizó Resonancia magnética de cráneo, de los cuales 5 presentaron anomalía en la misma por el reporte de hamartoma en globo pálido derecho en un caso, glioma del nervio óptico en 2 casos, neurofibroma plexiforme en un caso y aracnoidocele pequeño intraselar en otro de los casos. El Instituto Nacional de Salud (NIH) no recomienda realizar estudios de tomografía computarizada o resonancia magnética en pacientes asintomáticos con Neurofibromatosis tipo I, por otro lado se recomienda que los estudios de imagen del cerebro deberían indicarse en aquellos pacientes en los que una delección del gen entero y DNA flanqueante sea encontrada, recordando que los individuos afectados por este tipo de mutación

presentan un fenotipo distintivo incluyendo dismorfismo facial, un gran número de neurofibromas, alteración cognitiva grave y frecuentemente, evidencia de alteraciones cerebrales estructurales³³. A diferencia del estudio de tomografía computarizada, la resonancia magnética permite detectar áreas focales de alta intensidad de señal en T2, conocidas como objetos brillantes no identificados, los cuales no ejercen efecto de masa, a menudo se resuelven con el tiempo y rara vez son vistos en pacientes mayores de 20 años, se ha sugerido que tengan una relación con un IQ más bajo, las habilidades del lenguaje, la función visuoespacial y el desempeño académico²⁸. Los pacientes en estudio presentaron sintomatología que ameritó la realización de estudio de imagen, lo que permitió la identificación y el tratamiento de las lesiones antes mencionadas. 2 pacientes presentaron datos clínicos de neuropatía a nivel de extremidades inferiores, se les realizó resonancia magnética de columna la cual detectó un schwannoma plexiforme en la unión toracolumbar y tumor perirrenal en un paciente y neurofibromas a nivel de D11- L5 en otro paciente, se ha reportado que los pacientes con tumores de las raíces nerviosas tienen un riesgo alto de desarrollar tumores de la vaina del nervio periférico, por lo que su detección oportuna ha permitido una adecuada vigilancia de los mismos³⁴.

Durante la determinación de la expresión de las 3 proteínas en muestras control observamos discreta variación en la expresión de GAPDH, la cual no consideramos significativa. En el caso de Neurofibromina no se observó su expresión en el control 5 y en el caso de Ras GAP no se observó en los controles 3 y 5, se realizaron varios experimentos con la finalidad de descartar que esta variabilidad fuera causada por algún error durante la técnica, sin embargo se observó el mismo resultado en cada uno de ellos, por lo que será necesario aumentar el número de controles sanos para obtener un valor normal de referencia de los niveles de éstas proteínas.

La determinación de los niveles de expresión de Neurofibromina mostró una diferencia mayor entre los pacientes, con ausencia de la misma en 5 de los casos, correspondiendo en el primer caso a un paciente con Astrocitoma fibrilar

anaplásico, el segundo caso presenta neurofibroma plexiforme de párpado y región malar derecha, así como glaucoma en ojo derecho que ameritó enucleación, en el tercer caso corresponde a paciente con aracnoidocele pequeño intraselar y neurofibroma plexiforme a nivel de cuello, el cuarto caso a paciente con tumor perirrenal y schwannoma plexiforme en la unión toracolumbar, es decir que en 4 de éstos 5 pacientes en los que no se presentó la expresión de Neurofibromina, se observó una expresión clínica grave, asociada a tumores y neurofibromas plexiformes principalmente. Los 5 pacientes con falta de expresión de Neurofibromina presentaron además efélides, nódulos de Lisch y dismorfismo facial, en promedio presentaron 53 manchas café con leche y solo uno presentó neurofibromas cutáneos, 3 presentaron neurofibromas subcutáneos y plexiformes. Por otro lado, aquellos pacientes que si presentaron expresión de la proteína Neurofibromina pero en niveles bajos también mostraron datos clínicos relevantes, como es el caso del paciente 3 quien presentó más de 200 neurofibromas cutáneos, un neurofibroma plexiforme en párpado, hamartoma de globo pálido derecho y neurofibromas a nivel de columna de D11 a L5. El paciente 7 presentó neurofibroma plexiforme en pelvis y erosión basal del temporal en su porción petrosa, los pacientes 14 y 15 desarrollaron neurofibromas plexiformes, el paciente 20 presentó glioma óptico y el paciente 23 mostró el mayor número de manchas café con leche y neurofibromas cutáneos. Observamos en la imagen 5, que los pacientes 13 al 16 presentan en el estudio de Western Blot 2 o 3 bandas, que representan la presencia de la proteína Neurofibromina, siendo la que se observa en la parte superior la que se ubica en un nivel de 250 kD, es posible que las bandas de la parte inferior correspondan a isoformas o a una proteína trunca, se ha reportado que mediante corte y empalme alternativo se generan 4 isoformas proteicas, los 2 transcritos mejor caracterizados difieren por la inclusión o exclusión de 63 pares de bases en el exón 23a¹⁰. En el gráfico 12 se muestra la expresión de Ras GAP en los 23 pacientes, el paciente 11 quien presentó la expresión más leve de Ras GAP presentó como dato relevante un neurofibroma en mano derecha que ameritó resección quirúrgica.

CONCLUSIONES

- En el presente estudio se analizó la expresión clínica de 23 pacientes con Neurofibromatosis tipo I, la cual se caracteriza por su amplia variabilidad. Encontramos datos similares a los reportados en la literatura en cuanto a la frecuencia de presentación de las principales manifestaciones clínicas de la enfermedad, así como a la edad de presentación de las mismas y el porcentaje de casos nuevos.
- El objetivo del estudio fue correlacionar el nivel de expresión de las proteínas RAS GTP y Neurofibromina en sangre periférica con la expresión clínica de cada paciente, para determinar un nivel de expresión normal se analizaron 5 controles sanos con un rango de edad entre 5 y 60 años, sin embargo se encontraron diferencias importantes entre la expresión proteica de los mismos, por lo que consideramos necesario que antes de realizar la correlación se debe determinar el valor normal de expresión de las proteínas en un número mayor de individuos sanos.
- Encontramos diferencias importantes en los niveles de expresión de Neurofibromina en los 23 pacientes, siendo de relevancia la falta de expresión de esta proteína en 5 pacientes, de los cuales 4 presentaron algún tipo de neoplasia o neurofibroma plexiforme.
- Los pacientes con niveles de expresión bajos de Neurofibromina también se caracterizaron por presentar neurofibromas plexiformes, neoplasias y un mayor número de manchas café con leche y neurofibromas cutáneos.
- Los hallazgos clínicos en los pacientes con niveles ausentes o bajos de expresión de Neurofibromina, pudiera sugerir que éstos pacientes presentan un tipo de mutación que causa disminución importante o ausencia de los niveles de Neurofibromina en sangre periférica, lo que condicionaría un cuadro clínico más grave, presentando con más frecuencia neurofibromas plexiformes y neoplasias.
- En base a los datos encontrados, es posible que los niveles proteicos de Neurofibromina en sangre periférica pudieran servir como un marcador que nos indique un mayor riesgo de presentar algún tipo de neoplasia, siendo

más factible realizar este tipo de estudio en comparación a un estudio de búsqueda de mutaciones el cual es difícil de realizar por la diversidad de las mismas y el tamaño grande del gen *NF1*.

- Es importante continuar con la estandarización de la técnica y ampliar el número de controles sanos con el fin de determinar el nivel de expresión normal de Neurofibromina.
- Es importante también realizar el ensayo de activación de RAS, para determinar los niveles de RAS GTP.
- Una vez realizada la extensión de este estudio será posible emitir resultados definitivos y confiables que pudieran colaborar al entendimiento de los mecanismos que determinan la expresividad variable de la Neurofibromatosis tipo I.

Observaciones

No se cuenta con reportes en la literatura de estudios que midan los niveles de expresión de Neurofibromina y RAS GTP en sangre periférica de pacientes y controles sanos, por lo que con los datos obtenidos se tiene un acercamiento al conocimiento de esta información y la posible asociación que pudiera existir con la expresividad variable de la Neurofibromatosis tipo I.

Las limitaciones que se presentaron durante el estudio fueron principalmente para la estandarización de Western Blot para Neurofibromina, por factores como las características propias de la proteína, su alto peso molecular y la inespecificidad de los anticuerpos disponibles ya reportada por otros autores³⁵. Por otro lado no se logró la evaluación completa de todos los pacientes, principalmente aquellos estudios de imagen que fueron solicitados a los pacientes adultos para realizarse en su Hospital General de Zona, como es la radiografía de columna vertebral. El hecho de encontrar amplia variabilidad en la expresión de la proteína Neurofibromina en los controles nos limita para poder determinar un nivel de expresión normal y así poder comparar con los pacientes, sumado a la dificultad de la estandarización, por lo que será necesario estudiar un mayor número de controles y tratar de establecer primero si existe variabilidad en los niveles de

expresión en individuos sanos. Por otro lado, no fue posible realizar el ensayo de activación de RAS GTP, y aun cuando en base a los niveles de expresión de 2 de las principales proteínas que regulan el paso de RAS GTP a RAS GDP, que son Neurofibromina y Ras GAP, podemos de forma indirecta saber si RAS GTP se encuentra en niveles altos o bajos, es necesario realizar el ensayo de activación de RAS, el cual permitirá de forma directa conocer los niveles de expresión de RAS activo.

Cronograma de actividades

Delimitación del tema a estudiar	Septiembre 2010
Revisión de bibliografía	Octubre- Diciembre 2010
Elaboración de protocolo	Diciembre 2010- Julio 2011
Revisión por el comité local de investigación	Agosto- Noviembre 2011
Recolección de la información	Noviembre 2011- Diciembre 2012
Análisis de los resultados	Diciembre 2012
Redacción del informe final	Enero 2012- Febrero 2013
Examen de especialidad	Febrero 2013

BIBLIOGRAFÍA

1. Lodish MB and Stratakis CA. Endocrine tumours in neurofibromatosis type 1, tuberous sclerosis and related syndromes. *Best Practice & Research. Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2010;24(3):439–449.
2. Boyd K, Korf BR and Theos A. Neurofibromatosis type 1. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2009;61(1):1-16.
3. Neurofibromatosis Type I; NF1 (OMIM #162200). Consultado en <http://omim.org/entry/162200> el 14 de agosto de 2011.
4. Rasmussen SA, Friedman JM. *NF1* Gene and Neurofibromatosis 1. *American Journal of Epidemiology*. 2000;151(1):33-39.
5. Gutmann DH. Neurofibromin in the Brain. *Journal of Child Neurology*. 2002;17(8):592-601.
6. Riccardi VM. Neurofibromatosis Type 1 is a Disorder of Dysplasia: The importance of Distinguishing Features, Consequences, and Complications. *Birth Defects Research*. 2010;88(1):9-14.
7. Kraniak JM, Sun D, Mattingly R, Reiners Jr. J, Tainsky M. The role of neurofibromin in N-Ras mediated AP-1 regulation in malignant peripheral nerve sheath tumors. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2010;344(1-2):267-276.
8. Yu X, Chen S, Potter OL, Murthy SM, Li J, Pulcini JM, et. al. Neurofibromin and its inactivation of Ras are prerequisites for osteoblast functioning. *Bone*. 2005;36(5):793-802.
9. Han M, Criado E. Renal artery stenosis and aneurysms associated with neurofibromatosis. *Journal of Vascular Surgery*. 2005;41(3):539-543.

-
10. Larizza L, Gervasini C, Natacci F, Riva P. Developmental Abnormalities and Cancer Predisposition in Neurofibromatosis Type 1. *Current Molecular Medicine*. 2009;9(5):634-653.
 11. Koenigsmann J, Rodolph C, Sander S, Kershaw O, Gruber A, Bullinger L, et al. Nf1 haploinsufficiency and Icsbp deficiency synergize in the development of leukemias. *Blood*. 2009;113(19):4690-4701.
 12. Ferner RE, Huson SM, Thomas N, Moss C, Willshaw H, Evans DG, et al. Guidelines for the diagnosis and management of individuals with Neurofibromatosis 1 (NF1). *Journal of Medical Genetics*. 2007;44(2):81-88.
 13. Theos A, Korf BR. Pathophysiology of Neurofibromatosis Type 1. *Annals of Internal Medicine*. 2006;144(11):842-849.
 14. Yunoue S, Tokuo H, Fukunaga K, Feng L, Ozawa T, Nishi T, et al. Neurofibromatosis Type I Tumor Suppressor Neurofibromin Regulates Neuronal Differentiation via Its GTPase-activating Protein Function toward Ras. *The Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(29):26958-26969.
 15. Iwashita Shintaro, Song Si-Young. RasGAPs: a crucial regulator of extracellular stimuli for homeostasis of cellular functions. *Molecular BioSystems*. 2008;4(3):213-222.
 16. Gottfried ON, Viskochil DH, Couldwell WT. Neurofibromatosis Type 1 and tumorigenesis: molecular mechanisms and therapeutic implications. *Neurosurgical Focus*. 2010;28(1):1-8.

-
17. Mumoli N, Cei M, Bartolomei C, Pirillo V. A patient with loss of vision in the right eye and neurofibromatosis type 1. *Canadian Medical Association Journal*. 2009;180(2):203-206.
18. Sabbagh A, Pasmant E, Laurendeau I, Parfait B, Barbarot S, Guillot B, et al. Unravelling the genetic basis of variable clinical expression in neurofibromatosis 1. *Human Molecular Genetics*. 2009;18(15):2768-2778.
19. Upadhyaya M, Huson SM, Davies M, Thomas N, Chuzhanova N, Giovannini S, et al. An absence of cutaneous neurofibromas associated with a 3-bp inframe deletion in exon 17 of the NF1 gene (c.2970-2972 del AAT): evidence of a clinically significant NF1 genotype-phenotype correlation. *American Journal of Human Genetics*. 2007;80(1):140-151.
20. Pasmant E, Sabbagh A, Spurlock G, Laurendeau I, Grillo E, Hamel MJ, et al. NF1 Microdeletions in Neurofibromatosis Type 1: From Genotype to Phenotype. *Human Mutation*. 2010;31(6):1506-1516.
21. Mashour GA, Driever PH, Hartmann M, Drissel SN, Zhang T, Scharf B, et al. Circulating growth factor levels are associated with tumorigenesis in neurofibromatosis type 1. *Clinical Cancer Research*. 2004;10(17):5677-83.
22. Dasgupta B, Yi Y, Hegedus B, Weber JD, Gutmann DH. Cerebrospinal fluid proteómica análisis reveals dysregulation of methionine aminopeptidase-2 expression in human and Mouse neurofibromatosis 1-associated glioma. *Cancer Research*. 2005;65(21):9843-50.
23. Geller M, Ribeiro MG, Araujo AP, de Oliveira LJB, Nunes FP. Serum IgE levels in Neurofibromatosis 1. *International Journal of Immunogenetics*. 2006; 33(2):111-115.

24. Wang PW, Pan TL, Lin CH, Shen JJ, Chen YR. Characterization of plasma protein profiles from patients with neurofibromatosis 1. *Clinica Chimica Acta*. 2007;380(1-2):139-144.

25. Sample Size Calculator Raosqt Inc. 2004 on line
<http://www.raosoft.com/samplesize.html>, consultado el 25 de agosto de 2011.

26. Declaración de Helsinki 2000.
http://www.inb.unam.mx/bioetica/documentos/declaracion_helsinki.pdf
Consultado el 25 de agosto de 2011.

27. Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud.
<http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/compi/rlgsmis.html>
Consultado el 25 de agosto de 2011.

28. Radtke HB, Sebold CD, Allison C, Haidle JL, Schneider G. Neurofibromatosis Type 1 in Genetic Counseling Practice: Recommendations of the National Society of Genetic Counselors. *Journal of Genetic Counseling*. 2007;16(4):387-407.

29. Mautner VF, Asuagbor FA, Dombi E, Fünsterer C, Kluwe L, Wenzel R, et al. Assessment of benign tumor burden by whole-body MRI in patients with neurofibromatosis 1. *Neuro Oncology*. 2008;10(4):593-598.

30. Quaranta L, Semeraro F, Turano R, Gandolfo E. Gonioscopic Findings in Patients with Type 1 Neurofibromatosis (Von Recklinghausen Disease). *Journal of Glaucoma*. 2004;13(2):90-95.

31. Evans G, Sharif S, Ferner R. A molecular analysis of individuals with Neurofibromatosis type 1 (NF1) and optic pathway gliomas (OPGs), and an assessment of genotype-phenotype correlations. *Journal of Medical Genetics*. 2011;48(4):256-260.

32. Spyk SL, Thomas N, Cooper DN, Upadhyaya M. Neurofibromatosis type I-associated tumours: Their somatic mutational spectrum and pathogenesis. *Human Genomics*. 2011;5(6):623-690.

33. Hersh JH and Committee on Genetics. Health Supervision for Children With Neurofibromatosis. *Pediatrics*. 2008;121(3):633-642.

34. Drouet A, Wolkenstein P, Lefaucheur JP, Pinson S, Combemale P, Gherardi RK, et al. Neurofibromatosis 1-associated neuropathies: a reappraisal. *Brain*. 2004;127(Pt 9):1993-2009.

35. Trovó-Marqui AB, Tajara EH. Neurofibromin: a general outlook. *Clinical Genetics*. 2006;70(1):1-13.

ANEXO 1



CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

PACIENTE CON NF1

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

“CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI”

“CORRELACIÓN DE LA EXPRESIÓN PROTEICA DE RAS-GTP Y NEUROFIBROMINA EN SANGRE PERIFÉRICA Y LA EXPRESIVIDAD CLÍNICA EN PACIENTES CON NEUROFIBROMATOSIS TIPO 1”

Se me ha informado que la UIM de Genética Humana del Hospital de Pediatría, realizará el proyecto de investigación antes mencionado y se invita a participar a mi(s) hijo (s) (as), porque tiene (n) el diagnóstico de Neurofibromatosis tipo 1.

El interés del estudio consiste en conocer el nivel de expresión de las proteínas RAS-GTP y Neurofibromina y su correlación con las características clínicas que estos niveles pueden producir en mi hijo (s) (as), a través de un estudio especial, que no se realiza rutinariamente en los pacientes.

Beneficios

Me informan que los responsables de este estudio de investigación son la Médico residente de la especialidad en Genética Médica Daniela Juárez Melchor, la M. en C. Judith Villa Morales y la Dra. Eunice López Muñoz. Este estudio por el momento no aportará ningún beneficio al paciente. La prueba necesita una muestra de sangre que servirá para separar las proteínas RAS y Neurofibromina, que será desechado una vez que se realice la técnica especial.

Riesgos

Al ser un estudio de laboratorio que requiere la extracción de una muestra de sangre, se tomarán 5 mililitros de sangre (1 cucharadita) de una vena utilizando jeringa y aguja estériles para cada paciente, se informa que pueden presentarse molestias secundarias al piquete de la aguja, puede ser necesario más de un intento en la toma de muestra y puede aparecer un moretón que desaparecerá por sí solo.

Confidencialidad

El estudio sobre correlación de la expresión proteica de RAS-GTP y Neurofibromina en sangre periférica y la expresividad clínica en pacientes con Neurofibromatosis tipo 1, incluyendo registros clínicos y/o del hospital

serán manejados en forma confidencial, se podrán presentar en congresos y revistas estrictamente de interés médico y no será revelada la identidad del paciente y su familia a ninguna

persona sin su consentimiento, cada muestra será codificada con una sigla “Mn” o “Ma”(muestra niño o adulto) y un número consecutivo, evitando así que se revele la identidad del paciente.

Participación / suspensión

La participación de mi hijo(a) en este estudio es voluntaria. Tengo la libertad de retirar a mi hijo(a) en cualquier momento que él o yo decida no seguir en el estudio. La decisión de rehusarme a participar no afectará la calidad ni la disponibilidad de la atención médica.

Consentimiento

Al otorgar mi consentimiento, acepto que la Dra. Daniela Juárez Melchor, me explicó personalmente la información y que me quedó bien entendida, además de que contestó todas las preguntas que surgieron. Si tengo alguna duda puedo comunicarme al Hospital de Pediatría de Centro Medico SXXI en horario de labores y de lunes a viernes al teléfono 56 27 69 00 extensión 26945 o a la UIM de Genética Humana (22409).

Al firmar este documento, usted accede voluntariamente a participar en este estudio.

México, D.F. a _____ de _____ de 201_.

Nombre del paciente:

Nombre y firma del padre:

Nombre y firma de la madre:

Nombre y firma del testigo 1:

Relación del testigo con el paciente y su familia:

Nombre y firma del testigo 2:

Relación del testigo con el paciente y su familia:

Nombre y firma del Médico Responsable:

ANEXO 2

HOJA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Fecha: _____

Nombre del paciente: _____

Número de afiliación: _____

Edad: _____

Sexo: _____

Nivel de expresión de Neurofibromina	Pixeles=
Nivel de expresión de RAS-GTP	Pixeles=
Manchas café con leche de pequeño tamaño(0.5-1.5 cm)	Nº
Manchas café con leche de gran tamaño(> 1.5 cm)	Nº
Neurofibroma Cutáneo	Nº
Neurofibroma subcutáneo	Nº
Neurofibroma plexiforme	Nº
Eférides	Presente=1 Ausente=0
Maculas rojo- azul	Nº
Nódulos de Lisch	Presente= 1 Ausente=0
Dismorfismo facial	Presente=1 Ausente=0
Escoliosis	Presente=1 Ausente=0
Dificultad para el aprendizaje	Presente=1 Ausente=0
Neoplasia	Presente=1 Ausente=0

	Cráneo	Cuello	Tórax anterior	Tórax posterior	Pelvis	E. superiores	E. inferiores	Total
Manchas .5-1.5 cm								
Manchas >1.5 cm								
Neurofibromas Cutaneos								
Neurofibromas Subcutaneos								
Neurofibromas plexiformes								