



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA

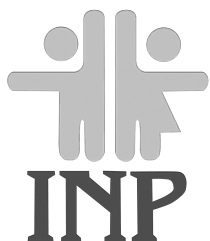
**“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE PACIENTES CON
COMPLEJO DE ESCLEROSIS TUBEROSA MEDIANTE
AMPLIFICACIÓN MÚLTIPLE DEPENDIENTE DE LIGAMIENTO
(MLPA)”**

**TESIS
PARA OBTENER EL TÍTULO DE ESPECIALISTA EN
GENÉTICA MÉDICA**

LORENA LECHUGA BECERRA

**TUTOR DE TESIS:
Dra. Miriam Erandi Reyna Fabián**

**COTUTOR DE TESIS:
Dra. Ariadna Estela González del Ángel**



CIUDAD DE MÉXICO, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



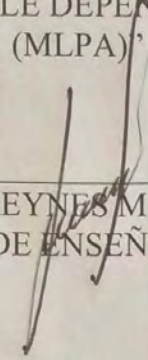
UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

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.

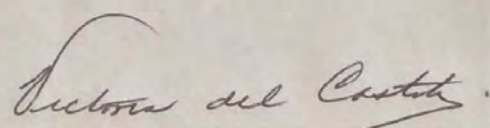
“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE PACIENTES CON
COMPLEJO DE ESCLEROSIS TUBEROSA MEDIANTE
AMPLIFICACIÓN MÚLTIPLE DEPENDIENTE DE LIGAMIENTO
(MLPA)”



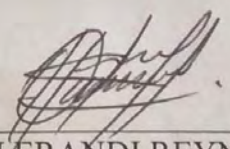
DR. JOSE N. REYNES MANZUR
DIRECTOR DE ENSEÑANZA



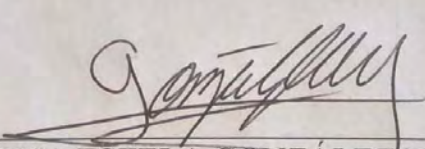
DR. MANUEL ENRIQUE FLORES LANDERO
JEFE DEL DEPARTAMENTO DE PRE Y POSGRADO



DRA. VICTORIA DEL CASTILLO RUIZ
PROFESORA TITULAR DEL CURSO DE GENÉTICA MÉDICA



DRA. MIRIAM ERANDI REYNA FABIÁN
TUTOR DE TESIS



DRA. ARIADNA ESTELA GONZÁLEZ DEL ÁNGEL
PROFESORA ADJUNTA DEL CURSO DE GENÉTICA MÉDICA
COTUTOR DE TESIS

A Pao, por ser mi motor. Eres el mejor ejemplo de perseverancia y siempre estaré agradecida por tener el honor de ser tu hermana.

A mi mamá, no hay mayor ejemplo de entrega, fortaleza y amor que tú. Gracias por creer siempre en mí.

A mi papá, por haber contribuido para poder llegar hasta aquí.

A la Dra. Ariadna González, por despertar mi interés por la biología molecular desde pregrado, por su apoyo incondicional, por las enseñanzas y guía para realizar este trabajo, sin usted no hubiera sido posible. Gracias por contribuir de manera muy importante a mi crecimiento profesional.

Al Dr. Miguel Ángel Alcántara, por invitarme a formar parte de este proyecto, por el apoyo incondicional y contagiarme la pasión por la biología molecular.

A Miriam y Nancy, por toda su paciencia y dedicación en enseñarme, por los consejos y guía, por su invaluable amistad.

A los todos los integrantes del Laboratorio de Biología Molecular: por su hospitalidad para realizar este trabajo, por ser grandes maestros, por la paciencia en enseñarme.

A Luisa, por ser amiga, cómplice y guía, por maravillarnos juntas, por estar ahí siempre. Te quiero mucho.

A Alan, Dennise, Chio, Rey, Sinhué, David: por haber sido el mejor equipo y ser parte de esta gran etapa, los quiero mucho.

A Berna, Ben, Lili, Po, Sandy: Por ser ejemplo a seguir en muchos sentidos, las admiro mucho.

Al Departamento de Genética Humana: al área clínica, integrantes del Laboratorio de Citogenética y Laboratorio de Genética y Cáncer por ser los mejores maestros, por la paciencia en enseñarme y transmitir sus conocimientos, por su cariño y amistad.

A los pacientes: por enseñarme más que cualquier libro, por inspirarme a dar lo mejor de mí, por ser ejemplo de alegría ante la adversidad, por demostrarme que siempre se puede hacer algo más.

La Dra. Lorena Lechuga Becerra agradece a la Fundación Carlos Slim de la Salud por el apoyo económico brindado a través de la Beca Impulso para la Investigación 2016-2018.

Este trabajo forma parte del proyecto 060/2014, el cual recibió apoyo por el financiamiento de investigación del Instituto Nacional de Pediatría, Ciudad de México, México, (Recursos Fiscales del Programa E022), financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México (CONACyT FONSEC SSA/IMSS/ISSSTE, S0008, 2016-2018, Proyecto #261404), Fundación "Miguel Alemán" 2012 y Novartis 2013.

Índice

RESUMEN ESTRUCTURADO	3
ANTECEDENTES Y MARCO TEÓRICO.....	5
Generalidades.....	5
Cuadro clínico	5
Criterios diagnósticos	7
Fisiopatología del CET.....	7
Variantes génicas.....	9
Métodos moleculares de detección de VGP.....	10
Fundamentos de MLPA	11
Correlación genotipo-fenotipo	12
Síndrome de genes contiguos por delección	14
JUSTIFICACIÓN	16
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	16
OBJETIVOS	17
MATERIAL Y MÉTODO	18
Características del estudio.....	18
Población de estudio	18
Criterios de selección.....	18
Tamaño de muestra.....	18
Análisis estadístico.....	18
Descripción general del estudio	19
RESULTADOS	22
Sujetos de estudio	22
Evaluación de las muestras de DNA	24
Análisis por MLPA	24
Caracterización de deleciones por MLPA	25
Caso ET-90	28
Caso ET-104	29
Caso ET-178	29
Casos ET-183 y TSC1	30
Caso ET-254	30
Identificación de los casos únicos y familiares.	31
DISCUSIÓN	34
Sujetos de estudio	34
Caracterización de deleciones por MLPA	34
Caso ET-90	35
Caso ET-104	35
Síndrome de genes contiguos.....	36
Caso ET-254	37
CONCLUSIONES	39
BIBLIOGRAFIA	40

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE PACIENTES CON COMPLEJO DE ESCLEROSIS TUBEROSA MEDIANTE AMPLIFICACIÓN MÚLTIPLE DEPENDIENTE DE LIGAMIENTO (MLPA)

Coautores

- Dra. Miriam Erandi Fabián Reyna.
 - Tutor de tesis
 - Investigador en Ciencias Médicas C, Laboratorio de Biología Molecular.

- Dra. Ariadna Estela González del Ángel.
 - Co-tutor de tesis
 - Investigador en Ciencias Médicas D, Laboratorio de Biología Molecular.

- Dr. Miguel Ángel Alcántara Ortigoza.
 - Investigador en Ciencias Médicas D. Jefe del laboratorio de Biología Molecular.

- M. en C. Nancy Leticia Hernández Martínez.
 - Investigador en Ciencias Médicas C, Laboratorio de Biología Molecular.

- Dra. Lorena Lechuga Becerra.
 - Tesista para obtener el grado de Especialista en Genética Médica.

RESUMEN ESTRUCTURADO

INTRODUCCIÓN El complejo de Esclerosis Tuberosa (CET) es una entidad autosómica dominante causada por variantes patogénicas en los genes *TSC1* y *TSC2*. El diagnóstico está basado en criterios clínicos y se estima que al que cumplir con estos se puede identificar una VGP en el 75-90% de los casos. Por medio de la amplificación múltiple de sondas ligadas (MLPA), se puede detectar deleciones o duplicaciones en 21% de los pacientes a los que previamente se les realizó secuenciación Sanger y no se identificó alguna VGP.

JUSTIFICACIÓN La caracterización de la VGP que permite confirmar el diagnóstico e identificar casos familiares; brindar asesoramiento genético certero y guiar la vigilancia de comorbilidades asociadas. La aplicación de la técnica de MLPA contribuirá a aumentar la identificación de VGP de tipo deleciones o duplicaciones grandes.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Actualmente, existen 23 pacientes con CET atendidos en el INP en quienes no se ha logrado identificar una VGP mediante secuenciación Sanger por lo que se requiere realizar MLPA con lo que se pretende aumentar la detección de VGP de tipo deleciones o duplicaciones.

OBJETIVOS

General: Caracterizar VGP tipo deleciones/duplicaciones en los genes *TSC1* y *TSC2* en pacientes del INP con CET que cuenten con la técnica de secuenciación Sanger negativa.

Específicos: Describir clínicamente los casos en los que se identifique una VGP. Revisar en la literatura si las VGP identificadas han sido descritas previamente y analizar las características fenotípicas de los pacientes reportados con los de este estudio con VGP. Identificar casos únicos y familiares mediante el estudio molecular dirigido en familiares de primer grado de los casos en donde se haya caracterizado el genotipo responsable.

METODOLOGIA Este trabajo deriva del protocolo de investigación número 060/2014. Se buscarán rearrreglos grandes tipo deleción y duplicación en los genes *TSC1* y *TSC2*. Se realizará un análisis descriptivo para definir frecuencias de las VGP tipo deleciones y duplicaciones tanto en casos únicos y familiares y se evaluará si han sido previamente reportadas; asimismo, se detallarán las características clínicas de los casos.

RESULTADOS Se incluyeron a 23 casos de la base de datos de pacientes con CET en quienes no se había identificado una VGP por la metodología de PCR-secuenciación Sanger. El 100% de los casos tuvieron diagnóstico Df. El 73.9% de los casos fueron clasificados como únicos. Se lograron caracterizar deleciones en seis de ellos y no se identificó ninguna duplicación. El gen responsable fue *TSC1* en sólo uno de los pacientes y *TSC2* en los otros cinco. En tres casos se confirmó que se trata de síndrome de genes contiguos (PKDTS) ya que la deleción involucra a *TSC2* y a *PKD1*. Se realizó MLPA en los familiares de los 6 pacientes en quienes se identificó una VGP. En cinco pacientes se corroboró que se tratan de casos únicos y se confirmó un caso familiar al identificar la misma VGP en la hermana y madre.

DISCUSIÓN Los casos captados provienen de hospitales de tercer nivel, lo que explica que todos los pacientes tenían diagnóstico Df de CET. Se identificó un porcentaje mayor (74% vs. 66%) de casos únicos a lo esperado, puede deberse a que la muestra es pequeña y que en cuatro casos no se puede descartar expresión mínima de la patología en los progenitores. No se identificaron duplicaciones, podría explicarse porque se esperaría un fenotipo leve y podría estar subdiagnosticado. Uno de los casos desarrolló SEGA y presenta una deleción en *TSC2* lo cual es acorde a lo publicado. La deleción de mayor extensión presenta involucro renal más leve en comparación con los otros dos casos de PKDTS. Esta diferencia hace suponer que hay genes modificadores del fenotipo y como candidato se encuentra *SSTR5* que codifica para el receptor de somatostatina ya que se ha estudiado como blanco terapéutico en pacientes con poliquistosis renal. En los tres casos de PKDTS, al integrar el diagnóstico se descartaron aneurismas intracraneales, quistes hepáticos y se evaluó la función renal. En la única deleción identificada en *TSC1* se esperaría un fenotipo con mayor afección cutánea y menor afección neurológica sin embargo se desconoce la evolución clínica.

CONCLUSIONES La metodología de MLPA permitió identificar VGP en 26% (6 de 23) de los casos, similar a lo reportado en la literatura. Las deleciones caracterizadas no han sido reportada previamente, lo que corrobora que el CET presenta una amplia heterogeneidad alélica. Acorde a lo publicado se identificaron rearrreglos grandes con mayor frecuencia en *TSC2*. Por medio del ensayo de MLPA se pudo corroborar lo observado por clínica, un caso familiar y cinco casos únicos. No se identificaron familiares de primer grado con fenómeno de expresividad mínima o no penetrancia. El desarrollo de SEGA es más común al involucrar *TSC2*, sin embargo, no se ha descrito que las deleciones se asocien con una mayor frecuencia del tumor. El involucro renal leve, es discrepante a lo descrito en la mayoría de pacientes con PKDTS por lo que se requiere definir la extensión de la deleción mediante microarreglos cromosómicos y establecer si otros genes involucrados podrían estar modificando el fenotipo. El diagnóstico molecular de PKDTS; orienta la vigilancia médica ya que obliga a descartar otras complicaciones como aneurismas cerebrales y quistes hepáticos que de forma rutinaria no se realizaría como seguimiento de CET. En los casos sin VGP identificada se realizará secuenciación de nueva generación para analizar regiones no codificantes y detectar casos de mosaicismo bajo.

ANTECEDENTES Y MARCO TEÓRICO

Generalidades

El complejo de Esclerosis Tuberosa (CET) es una entidad genética del grupo de las genodermatosis. Tiene una herencia autosómica dominante y es ocasionada por variantes génicas patogénicas (VGP) en alguno de los genes *TSC1* o *TSC2*. La prevalencia es 1 de cada 6,000 a 9,000 recién nacidos vivos y se estima que al menos dos millones de personas a nivel mundial presentan la enfermedad (Jr, 2015). Dos tercios de los pacientes con CET se consideran casos únicos dado que no tienen historia familiar del padecimiento (Lam, Nijmeh, & Henske, 2017).

El CET es una enfermedad caracterizada por el desarrollo de hamartomas en múltiples órganos y sistemas; principalmente en cerebro, corazón, pulmón, riñones y piel. Además, se acompaña de diversas manifestaciones neurológicas que condicionan una alta morbilidad como epilepsia, trastorno del espectro autista (TEA) y discapacidad intelectual (Lam et al., 2017). Las manifestaciones clínicas se presentan en diferentes etapas de la vida por lo que existe una amplia variabilidad del fenotipo clínico entre los individuos, incluso dentro de la misma familia (Roach, 2016)

Cuadro clínico

Los hallazgos clínicos en CET presentan una amplia variabilidad y pleiotropismo, en la Tabla 1 se presentan las principales manifestaciones clínicas.

Tabla 1. Cuadro de las principales manifestaciones clínico por órganos, sistemas y frecuencias de la presentación en CET. Tomado de (Dixon, Hulbert, & Bissler, 2011; Henske, Józwiak, Kingswood, Sampson, & Thiele, 2016; Northrup & Krueger, 2013).

Órgano o sistema	Manifestaciones	Porcentaje
Neurológico	• Displasia cortical: es una alteración congénita neuroanatómica por falla en la migración neuronal durante el desarrollo que ocasiona dos lesiones: las líneas de migración radial, las cuales se observan como bandas que atraviesan la sustancia blanca y los tubers, que son un tipo de displasia cortical focal; son múltiples, de tamaño variable y se localizan en la región cortical o subcortical. Pueden observarse desde la 26ª semana de gestación.	90%
	• Nódulos subependimarios: tumoraciones benignas sobre el revestimiento endependimario del tercer ventrículo y ventrículos laterales. Se pueden observar desde el año de vida.	80%
	• Astrocitoma subependimario de células gigantes (SEGA): tumor benigno de crecimiento lento que se propone deriva de los nódulos subependimarios adyacentes al foramen de Monro. Se desarrollan en las primeras dos décadas de la vida.	5-15%
Oftalmológico	• Hamartomas retinianos múltiples: tumoraciones benignas y asintomáticas en retina cerca del polo posterior. Se observan a cualquier edad.	30-50%
	• Parche acrómico: área hipopigmentada en retina. Puede identificarse a cualquier edad.	39%
Dental	• Hoyuelos en el esmalte: son agujeros del tamaño de la cabeza de un alfiler sobre la superficie dental sin un patrón de distribución definido. Se encuentran en el 76% de los pacientes pediátricos y en todos los adultos.	100%
	• Fibromas intraorales: lesiones benignas de epitelio escamoso y estroma fibroso vascularizado. Los más comunes son gingivales, aunque también se han observado en mucosa oral, labios y en lengua. Generalmente, se presentan a	20-50%

Órgano o sistema	Manifestaciones	Porcentaje
	partir de la pubertad.	
Cardiaco	<ul style="list-style-type: none"> • Rabdomiomas: tumores benignos muy raros en población general, con mayor frecuencia se localizan intraventriculares o intramurales. Pueden ser detectados de forma prenatal y la mayoría presentan regresión en el periodo postnatal. 	75-80%
Pulmonar	<ul style="list-style-type: none"> • Linfangioleiomiomatosis (LAM): infiltrado difuso y bilateral de células de músculo liso en el espacio intersticial. En mujeres: aumenta su prevalencia con la edad (80% a los 40 años). Se presenta en 10-12% en varones. 	30-40%
Renal	<ul style="list-style-type: none"> • Angiomiolipomas (AML): tumores compuestos por tejido adiposo, vascular y músculo liso. Se pueden detectar desde la primera década de vida. • Quistes renales: son sacos con contenido líquido formados por una pared delgada dentro de parénquima renal. En pacientes con un fenotipo grave y de presentación muy temprana se asocia con la delección conjunta de los genes <i>TSC2</i> y <i>PKD1</i>, este último es responsable de la poliquistosis renal autosómica dominante. Se presentan desde la infancia. 	80%
	<ul style="list-style-type: none"> • Carcinoma de células renales: Neoplasia del epitelio renal. Es una manifestación rara, cuando se presenta es durante la infancia y adultez temprana. 	2-4%
Dermatológico	<ul style="list-style-type: none"> • Máculas hipomelanóticas: máculas de coloración más clara que el resto de la piel con forma lanceolada >5mm, pueden ser evidentes desde el periodo neonatal. 	90%
	<ul style="list-style-type: none"> • Fibromas ungueales: lesiones nodulares de tejido firme y liso adyacente al lecho ungueal. Típicamente se presentan a partir de la segunda década de la vida. 	80%
	<ul style="list-style-type: none"> • Angiofibromas faciales: pápulas del color de la piel o hiperocrómicas, están conformadas por tejido vascular y conectivo. Se presentan sobre el área malar en distribución de mariposa y comúnmente se observan en la etapa escolar. 	75%
	<ul style="list-style-type: none"> • Lesiones en confeti: máculas hipopigmentadas de 1-3mm. Pueden observarse desde el periodo neonatal 	58%
	<ul style="list-style-type: none"> • Parche de Shagreen: son nevos de tejido conectivo que se agrupan en placas grandes. Tiene forma irregular y de textura en "piel de naranja" sobre la región lumbar, se presenta en la primera década de la vida. 	50%
	<ul style="list-style-type: none"> • Placa cefálica fibrosa: es una lesión elevada constituida por tejido conectivo, de color de la piel o café, de tamaño y forma variable. Se localiza en frente, cara o cuero cabelludo. Puede encontrarse desde la infancia. Es el hallazgo cutáneo más específico de CET. 	25%

Criterios diagnósticos

A partir de las manifestaciones clínicas de CET, Northrup, *et al.* en 2013 propusieron los criterios diagnósticos que se recopilan en la *Tabla 2*. Para establecer un diagnóstico clínico definitivo (Df) se requiere la presencia de al menos dos criterios mayores o uno mayor y dos menores. Mientras que un diagnóstico posible (Ps) requiere un criterio mayor o dos (o más) menores. Se considera que la identificación de una VGP en cualquiera de los dos genes responsables de la enfermedad es un criterio suficiente para establecer un diagnóstico Df (Northrup & Krueger, 2013):

Tabla 2. Criterios diagnósticos para la enfermedad de CET de acuerdo a los criterios de Northrup & Krueger, 2013.

Criterio diagnóstico genético	
La identificación de una mutación patogénica en alguno de los genes <i>TSC1</i> o <i>TSC2</i> en el DNA en tejido normal es suficiente para hacer el diagnóstico Df de CET. Una mutación patogénica es definida como: una mutación que claramente inactiva la función de las proteínas <i>TSC1</i> o <i>TSC2</i> (como una delección/inserción que cambie el marco de lectura o una mutación sin sentido); que prevenga la síntesis de las mismas (ejem. una gran delección genómica); o, si es una mutación de sentido erróneo que a través de una valoración funcional se determine que afecta la función proteica (www.lovd.nl/TSC1 , www.lovd.nl/TSC2 y Hoogeveen-Westerveld <i>et al.</i> , 2012 y 2013). Las variantes en la secuencia de <i>TSC1</i> o <i>TSC2</i> que no afecten la función de sus productos proteicos no son suficientes para integrar el diagnóstico de CET.	
Nota: En 10 a 25% de los pacientes con CET no es posible identificar alguna VGP en <i>TSC1</i> o <i>TSC2</i> por medio de estrategias diagnósticas convencionales, por lo que un resultado normal no excluye la enfermedad.	
A. Criterios de diagnóstico clínico	
CRITERIOS MAYORES	CRITERIOS MENORES
<ol style="list-style-type: none">1. Máculas hipomelanóticas (≥ 3, de al menos 5mm de diámetro).2. Angiofibromas (≥ 3) o placa cefálica fibrosa.3. Fibromas ungueales (≥ 2).4. Placa de Shagreen.5. Múltiples hamartomas en retina.6. Displasias corticales (incluye tubers y alteración de la migración radial en la sustancia blanca cerebral).7. Nódulos subependimarios.8. SEGA.9. Rabdomioma cardíaco.10. Linfangioleiomiomatosis. *11. Angiomiolipomas renales (≥ 2).*	<ol style="list-style-type: none">1. Lesiones de piel en confeti.2. Hoyuelos en esmalte dental (>3).3. Fibromas intraorales (≥ 2).4. Parches acrómicos en retina.5. Múltiples quistes renales.6. Hamartomas no renales.

*Una combinación de dos criterios clínicos, LAM y angiomiolipomas, sin otra característica, no es suficiente para concluir un diagnóstico definitivo.

Fisiopatología del CET

El CET es causado por mutaciones en estado heterocigoto de los genes supresores de tumor *TSC1* (MIM#605284) o *TSC2* (MIM#191092) localizados respectivamente en 9q34.13 y 16p13.3 (Jansen *et al.*,

2008). *TSC1* está compuesto por 23 exones y codifica para la proteína hamartina de 130kDa. *TSC2* es un gen de mayor tamaño, está conformado por 42 exones y codifica para la proteína tuberina de 200kDa (Curatolo, Moavero, Roberto, & Graziola, 2015). Estas dos proteínas junto con una tercera llamada TBC1D7 (J. Qin et al., 2016) forman el complejo de Esclerosis Tuberosa cuya función es regular negativamente a la vía del complejo blanco de rapamicina en células de mamífero (mTOR “mammalian Target Of Rapamycin complex”, por sus siglas en inglés). El complejo mTOR es una cinasa de serina/treonina que tiene una función clave en la proliferación y crecimiento celular (Figura 1) (Lam et al., 2017).

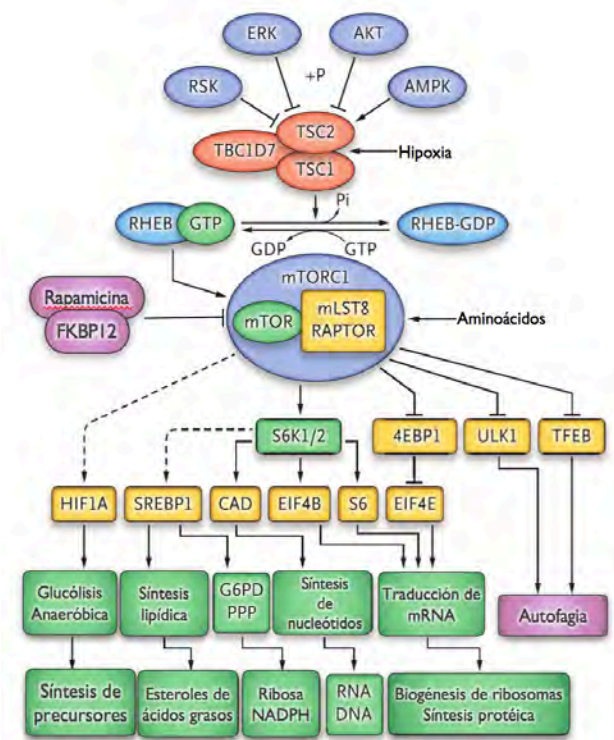


Figura 1. Complejo proteico de CET, mTOR y efectos celulares

CAD carbamil-fosfato sintasa; EIF4E factor de inicio de traducción eucariótica 4E; 4EBP1 proteína 1 de unión al factor de inicio de traducción eucariótica 4E; G6PD glucosa-6-fosfato deshidrogenasa; HIF1A factor inducible por hipoxia 1 α ; PPP vía de las pentosas fosfato; SREBP1 proteína 1 de unión al elemento de respuesta a los esteroides; S6K1/2 cinasas 1 y 6 de proteína ribosomal S6; FKBP12 proteína de unión FK506 de 12 kDa. Tomado y modificado de (Kwiatkowski, Ph, Manning, & Ph, 2014)

Los hamartomas son tumoraciones benignas que se presentan en CET, secundarias a la inactivación de ambos alelos de los genes *TSC1* o *TSC2*, de acuerdo con la hipótesis del “segundo golpe” de Knudson (Rosset, Netto, & Ashton-Prolla, 2017). A nivel celular, los hamartomas presentan una hiperactivación en la vía de señalización mTOR, lo que genera un aumento en la traducción de proteínas, disminución de la autofagia, adaptaciones metabólicas y alteración en la diferenciación y organización celular donde se reemplaza el tejido normal provocando disfunción de los órganos afectados (Lam et al., 2017). Estos hallazgos documentaron que el uso de inhibidores de mTOR, previamente utilizados en pacientes en seguimiento por trasplante renal y con enfermedades oncológicas, son útiles para restablecer la regulación de la vía de señalización (Jozwiak, Jozwiak, & Oldak, 2006). El mecanismo de acción por el cual los inhibidores de mTOR o análogos de rapamicina funcionan es inhibir la fosforilación de S6K1 a través de la formación de un complejo proteico con la proteína de unión FK506 de 12 kDa (FKBP12) el cual actúa como un inhibidor alostérico de mTOR (Figura 1). De esta forma, se evita la propagación de la señal río abajo en la vía y se inhiben los procesos celulares donde participa mTOR (Li, Kim, & Blenis, 2014).

Variantes génicas

En 85 a 90% de los casos que cumplen con los criterios diagnósticos clínicos de CET, se identifica una VGP en alguno de los dos genes. Se estima que 70% de los casos de CET se originan por VGP germinales *de novo*. En los casos familiares, se identifica una VGP en 10 a 30% en *TSC1* (Rosset et al., 2017) y aproximadamente 50% en *TSC2* (Jansen et al., 2008). Previamente, se había estimado una mayor proporción de casos familiares con VGP en *TSC1* sin embargo, por observaciones subsecuentes se concluyó que las VGP en *TSC2* son más frecuentes tanto en los casos familiares como esporádicos (Curatolo et al., 2015). Las VGP de cambio de sentido son más comunes en *TSC2* y las deleciones o duplicaciones grandes son raras en *TSC1* (Kwiatkowski, 2010).

La discrepancia en las frecuencias de variantes observadas en *TSC1* y *TSC2* puede deberse a las siguientes diferencias entre ambos genes:

- 1) La región codificante de *TSC2* (5.4kb) es 1.5 veces más grande que en *TSC1* (3.5kb); *TSC2* tiene casi el doble de exones y de sitios de splicing que pueden ser susceptibles de VGP.
- 2) Características intrínsecas en la secuencia génica de *TSC2*, ya que se ha observado 10 veces mayor frecuencia de variantes consideradas polimórficas (Kwiatkowski, 2010).

En la Tabla 3 se resume el espectro de variantes génicas patogénicas en *TSC1*:

Tabla 3. Espectro de VGP reportadas en el gen *TSC1* y sus porcentajes reportados en la literatura (Kwiatkowski, 2010; Rosset et al., 2017).

Tipo de VGP	Porcentaje
Puntuales:	93%
Deleciones pequeñas	41%
Sin sentido	26.6%
Inserciones pequeñas	18.5%
Sentido erróneo	13.5%
Rearreglos grandes	7%

El exón 15 es el más grande y en este se encuentra el mayor porcentaje de VGP identificadas. Sin embargo, presenta una frecuencia de mutaciones (definida como el porcentaje de VGP por pares de base considerando el tamaño de cada exón) de 9.5%; mientras que el exón 13 es el que presenta la frecuencia de mutaciones más elevada (14.3%) (Rosset et al., 2017).

El espectro de variantes génicas patogénicas en *TSC2* se resume en la Tabla 4:

Tabla 4. Espectro de VGP reportadas en el gen *TSC2* y sus porcentajes reportados en la literatura (Kwiatkowski, 2010; Rosset et al., 2017).

Tipo de VGP	Porcentaje
Puntuales:	82.6%
Deleciones pequeñas	32%
Sentido erróneo	30.9%
Sin sentido	21.1%
Inserciones pequeñas	17%
Rearreglos grandes	17.4%

Las frecuencias de VGP más elevadas son: el exón 37 con 22.9%, exón 38 con 22.8% y exón 33 con 15.45%. Veintisiete de los exones codificantes presentan frecuencias mayores a 9% (Rosset et al., 2017).

Hasta mayo del 2017, en la base de datos Leiden Open Variation Database (LOVD) se habían reportado más de 870 VGP únicas para *TSC1* y más de 2400 para *TSC2* sin observarse puntos calientes ni VGP comunes en ninguno de los dos genes (Ismail et al., 2017). De estas VGP reportadas, hay aproximadamente 100 de tipo deleciones grandes (consideradas a partir de un solo exón) y 5 duplicaciones en *TSC2*; mientras que en *TSC1* hay 2 de tipo duplicación y 21 deleciones. En *TSC2* los exones que están involucrados con mayor frecuencia en las deleciones grandes son el exón 3 en el 38%, exón 4 en el 37% y los exones 7 y 9 en el 36%; mientras que en *TSC1* las deleciones involucran a los exones 10, 11 y 12 en el 50% (<http://www.lovd.nl/3.0/home>). En la base de datos Human Gene Mutation Database (HGMD) se han reportado 1074 VGP para *TSC2* y 279 para *TSC1*. Los rearrreglos grandes corresponden al 14.3% y 7.8% en *TSC2* y *TSC1*, respectivamente. De estos, las deleciones se presentan en el 90-92% en ambos genes (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>).

Para evaluar el posible efecto patogénico de las variantes existen diferentes estrategias como la búsqueda en progenitores sanos, en controles sanos, análisis computacional *in silico* o mediante modelos animales (MacArthur et al., 2014). Sin embargo, en las guías del Colegio Americano de Genética Médica y Genómica (ACMG) ciertos tipos de VGP, como las deleciones de uno o múltiples exones, se consideran como evidencia muy fuerte de patogenicidad ya que generan pérdida de función del gen por una ausencia completa del producto génico (Richards et al., 2015).

Aproximadamente en 10 a 15% de los casos no se logra identificar alguna VGP en alguno de los dos genes de CET. La falla en la detección de VGP puede deberse a diferentes causas (Tyburczy et al., 2015):

- 1) Deficiencia de la técnica de los métodos de detección convencionales.
- 2) Mosaicismo genético.
- 3) Variantes en regiones no codificantes que no se evalúan de forma rutinaria como intrones, que alteren el splicing y que no estén cerca de los exones, en promotores o enhancers.
- 4) La existencia de un tercer gen, aunque para esta última posibilidad actualmente no hay evidencia contundente

Métodos moleculares de detección de VGP

El CET se caracteriza por tener importante heterogeneidad alélica por lo que es necesario utilizar diversas metodologías para lograr una adecuada detección de las VGP.

La secuenciación automatizada tipo Sanger consiste en el análisis génico a nivel de nucleótidos de regiones pequeñas de interés (aproximadamente 1 kb). Se realiza por medio de una reacción de amplificación en la que se utilizan dideoxinucleótidos marcados con un fluorocromo distinto para cada base nitrogenada. Al ser incorporados por la polimerasa no se puede formar el enlace fosfodiéster y se detiene la síntesis *in vitro* de DNA. Posteriormente, mediante electroforesis capilar se detectan los fragmentos generados de diferentes tamaños, por una señal emitida por el fluorocromo y se determina el orden de la secuencia de los nucleótidos (Mahdieh & Rabbani, 2013). Esta metodología permite la caracterización de mutaciones puntuales, así como pequeñas inserciones y deleciones. En CET, se estima una detección del 72.4% de VGP a través de la secuenciación Sanger de los exones (Au et al., 2007).

Utilizando la técnica de amplificación múltiple dependiente de ligamiento (MLPA) se pueden detectar deleciones y duplicaciones génicas grandes por medio de la cuantificación en el número de copias (ganancias o pérdidas) de múltiples regiones en el genoma (hasta 50 en un sólo ensayo) (Kozlowski, Jasinska, & Kwiatkowski, 2008). En CET por medio de esta prueba, se ha reportado la detección de 24% de deleciones o duplicaciones en pacientes a los que previamente se les realizó PCR-secuenciación Sanger y no

se identificó alguna VGP. En *TSC2*, se han observado deleciones en 32% de los pacientes y duplicaciones en 4% de ellos por MLPA (Ramandi, Mohammad, Ghaderian, & Toosi, 2014). Además, reportan detección de 15% de mosaicismo. Se estima que de 6.1 a 8.5% de las mutaciones en pacientes con CET pueden detectarse por esta metodología (Kozlowski et al., 2007; van den Ouweland et al., 2011).

La secuenciación de nueva generación (NGS) ha adquirido gran relevancia como herramienta diagnóstica ya que permite estudiar la variación genética a escala de genoma completo y/o exoma en un sólo ensayo. Consiste en secuenciar en paralelo, millones de fragmentos pequeños de DNA (110 pares de bases) múltiples veces. Posteriormente, se realiza un análisis bioinformático en donde se comparan las lecturas obtenidas con la secuencia del genoma de referencia para determinar si los cambios detectados corresponden a VGP (Van Dijk, Auger, Jaszczyszyn, & Thermes, 2014). Las principales ventajas de esta metodología son la identificación de mosaicismo somático, incluso de baja proporción (<10%) y la identificación de VGP en regiones codificantes, intrónicas y promotoras del gen (W. Qin et al., 2010).

En pacientes con CET en quienes no se logró caracterizar la VGP por las metodologías de secuenciación Sanger y MLPA, Tyburczy et al., utilizaron NGS logrando una detección de 85% (45 de 53 pacientes). La mayoría de las VGP identificadas estaban localizadas en regiones intrónicas; además de mosaicismo en 58% de los casos (Tyburczy et al., 2015). En otro reporte, se identificó por NGS una VGP en 41 de 43 pacientes (95%) sin estudios moleculares previos (Cai, Li, & Zhang, 2017).

Fundamentos de MLPA

La técnica de MLPA (Figura 2) utiliza un conjunto de sondas que hibridan en regiones específicas del DNA que permiten identificar ganancias o pérdidas grandes; incluso desde una sola copia de un exón y permite determinar el estado de heterocigoto, homocigoto o hemicigoto para la VG identificada. Es una metodología altamente sensible, eficiente, rápida que también permite la identificación de mosaicos (Kozlowski et al., 2008). Es una variante de la reacción en cadena de polimerasa (PCR) en la que se realizan amplificaciones simultáneas de diferentes fragmentos de DNA, utilizando un sólo par de cebadores y las mismas condiciones de ciclos de temperatura. Cada secuencia del DNA en estudio es reconocida por una sonda conformada por dos porciones, llamadas oligo de sonda izquierdo (OSI) o extremo 5' y oligo de sonda derecho (OSD) o extremo 3'. Cuando los oligos izquierdo y derecho son complementarios a la región del DNA de estudio se forma un enlace fosfodiéster entre ambas porciones mediante una ligasa. Los extremos de cada sonda tienen una secuencia diseñada artificialmente para ser complementaria a un sólo par de cebadores universales que permiten la amplificación de las diferentes sondas bajo las mismas condiciones de PCR. Los cebadores universales están marcados con una molécula fluorescente en el extremo 5' utilizada para la detección de los amplicones por electroforesis capilar en un equipo de secuenciación automatizada.

La distinción entre los productos de PCR, correspondientes a cada región específica del DNA estudiado, se realiza por el tamaño único de cada sonda ligada y amplificada ya que posee una secuencia artificial llamada *stuffer* en la sonda 3' cuya longitud varía para cada sonda. De tal forma, que cada sonda es específica para una región génica en estudio, con un tamaño determinado y la cual es identificada por electroforesis capilar. Se puede determinar y cuantificar el número de copias de la secuencia en estudio de acuerdo a la altura del pico de fluorescencia emitido por el fragmento al compararlo con el DNA control (Schouten et al., 2002). En una muestra, cuando una secuencia presenta las dos copias normales el valor es 1.0. La disminución o el aumento de la altura del pico de fluorescencia genera valores <0.7 o >1.3 respectivamente, indicando una deleción o duplicación (van Veghel-Plandsoen et al., 2011).

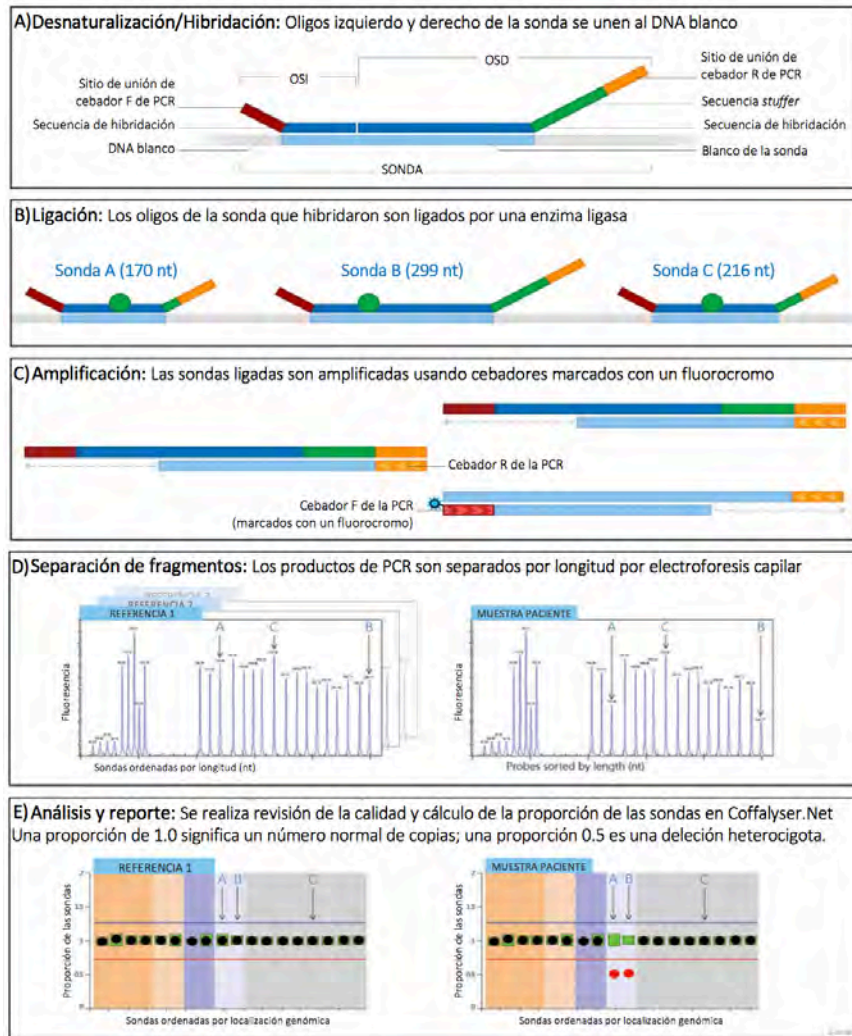


Figura 2. Protocolo de ensayo de MLPA y análisis de resultados.

A, B y C corresponden a las tres principales etapas de la metodología de MLPA. Cada sonda está compuesta por dos mitades: el OSI (oligo de sonda izquierdo) que consiste en una secuencia (azul oscuro) que hibrida con el DNA blanco (azul claro) y el sitio de unión para el cebador F de la PCR (rojo); el OSD (oligo de sonda derecho) que consiste en una secuencia (azul oscuro) que hibrida con el DNA blanco (azul claro), la secuencia *stuffer* (verde) y el sitio de unión para el cebador R de la PCR (amarillo). Las dos mitades de la sonda se unen por ligación (círculo verde). Posterior a la amplificación, los fragmentos son separados por electroforesis de capilar y se registra la fluorescencia emitida por cada amplicón (D). Por medio del programa Coffalyser, se analizan los fragmentos detectados y se compara con la señal emitida por los controles (E).

Tomado y modificado de: (http://www.mlpa.com/WebForms/WebFormDBData.aspx?Tag=_zjCZBtdOUyAt3KF3EwRZhGvpJtUw-IOURKGIIAToek.)

Correlación genotipo-fenotipo

Desde el punto de vista fisiopatológico, se propuso que las mutaciones en *TSC2* generaban una mayor disfunción del complejo ya que la tuberina contiene el dominio relacionado a la proteína activadora de GTP-asa (GAP), provocando menor regulación sobre la vía de mTOR y un fenotipo más grave (Zeng et al., 2011).

En la Tabla 5 se muestra la prevalencia de las manifestaciones neurológicas según el gen involucrado o sin variante identificada en alguno de los dos genes (SVI, "sin variante identificada").

Tabla 5. Correlación genotipo-fenotipo neurológico. (Chu-Shore, et al., 2010; Curatolo et al., 2015)

Manifestación	Correlación
Tubers	TSC2: 91%, TSC1: 76%, SVI: 73%
SEGA	TSC2: 26%, TSC1: 20%, SVI: 11%
Espasmos infantiles	TSC2: 56.1%, TSC1: 10%, SVI: 25%
Alteraciones psiquiátricas y discapacidad intelectual (TAND)	TSC2: 50%, TSC1: 20%

SVI: sin variante identificada

Actualmente, no se ha establecido una correlación clara entre los tubers y la gravedad de la epilepsia y trastornos neuropsiquiátricos asociados, sin embargo aquellos que durante su evolución adquieren características quísticas se asocian con VGP en TSC2 y con una epilepsia más agresiva (Chu-Shore, et al., 2009). De manera general, las VGP en TSC2 se asocian con un fenotipo neurológico más grave. Sin embargo, se ha observado que VGP de sentido erróneo en los exones 23-33 están asociadas con un menor riesgo para presentar espasmos infantiles. Se han reportado algunos casos con un fenotipo más leve, sin epilepsia o de fácil control asociado a las VGP: p.Arg905Glu, p.Gly1556Ser, p.Arg1200Trp y p.Ser1036Pro (Curatolo et al., 2015).

En la Tabla 6 se observa la frecuencia de los principales hallazgos sistémicos de acuerdo al gen involucrado o en los casos SVI:

Tabla 6. Correlación de los hallazgos sistémicos. (Aronow, et al., 2012; Curatolo et al., 2015).

Manifestación	Correlación
Hamartomas retinianos	TSC2: 40% TSC1: 8% SVI: 25%
Rabdomiomas cardiacos	TSC2: 52% TSC1: 41% SVI: 39%
Angiofibromas faciales	TSC2: 76% TSC1: 55% SVI: 69%
Angiomiolipomas renales	TSC2: 58% TSC1: 15% SVI: 43%
Quistes renales	TSC2: 27% TSC1: 15% SVI: 24%

El 10-15% de los casos en quienes no se logra identificar alguna VGP en ninguno de los dos genes (SVI) se ha relacionado con un fenotipo más leve (Tyburczy et al., 2015). Se ha descrito que en este grupo de pacientes hay menor prevalencia de: epilepsia, involucre cutáneo, AML y LAM (Camposano, Greenberg, Kwiatkowski, & Thiele, 2009). En un estudio, por medio de NGS se detectó que este grupo de pacientes corresponde al 7.5% de todos los pacientes con CET. Al comparar el número de sistemas afectados, los pacientes SVI presentaban únicamente 2 órganos involucrados en 87.5% de los casos y 3 órganos en 12.5%, a diferencia de aquellos con VGP en estado heterocigoto o en mosaico con 73% y 65% respectivamente, con 3 o más órganos afectados (Tyburczy et al., 2015).

En cuanto a las deleciones o duplicaciones grandes, en una cohorte se identificaron 54 de 261 muestras (21%) con algún rearrreglo en TSC1 o TSC2. No se encontraron diferencias significativas al comparar las manifestaciones clínicas de los pacientes con deleciones que se extendían hacia 5' de TSC2 y

aquellos con deleciones intragénicas. En los pacientes con deleciones hacia 3' de *TSC2* que involucraban a *PKD1* se observó que la enfermedad quística renal era más común. Todos los pacientes con deleción de *PKD1* presentaban quistes renales, mientras que en los demás casos se presentaban sólo en el 32%; además, aquellos con deleción de *PKD1* presentaban un involucro renal más grave. En este estudio también se detectaron deleciones en mosaico, siendo más frecuente en mujeres y las manifestaciones clínicas fueron más leves (57% presentaron epilepsia en comparación con 91% de los casos sin mosaicismo) (Kozlowski et al., 2007).

Se han identificado pocos casos con duplicaciones, hay 5 de este tipo de variantes en *TSC2* y 2 en *TSC1* registradas en la base de datos LOVD (<http://www.lovd.nl/3.0/home>). En la literatura hay algunos casos publicados como los descritos por Kozlowski et al., quienes reportaron 2 pacientes de 54 con duplicación en *TSC2*, identificadas por técnica de MLPA al analizar ambos genes. Uno de los casos involucraba los exones 40 y 41 y el otro a los exones 9-30 (Kozlowski et al., 2007). En otro estudio, en el que se evaluó únicamente a *TSC2* por MLPA; se identificaron duplicaciones en 3 de 29 casos; de los cuales un caso presentaba duplicación de los exones 27-29, otro del exón 27 y de 5'UTR y el tercero con duplicación sólo del exón 27 (Ramandi et al., 2014). En una cohorte, se caracterizó por MLPA una duplicación de varios exones, sin especificar cuáles, en un sólo paciente de 48 (van den Ouweland et al., 2011). En estos 6 casos encontrados en la literatura, la duplicación ocurrió en el gen *TSC2*. En los 3 reportes mencionados, no se describen las características clínicas de los pacientes ni se discute una posible correlación genotipo-fenotipo.

En otro estudio, Van den Ouweland, *et al.* evaluaron rearrreglos grandes en *TSC1* en 327 pacientes en quienes previamente se había realizado secuenciación de ambos genes y MLPA de *TSC2* sin caracterizar una VGP. Se identificaron deleciones en 8 pacientes (5%): 4 casos con deleción del primer exón no codificante, 2 pacientes con deleción de exones 9-23, un caso con deleción de los exones 2-23 y uno con deleción de la totalidad del gen. Se concluyó que la deleción del exón 1 impide la expresión de *TSC1*, considerándose una VGP patogénica, los 4 pacientes con esta VGP presentaban epilepsia, mientras que únicamente se presentaba en uno de los casos con deleciones de otros exones. Proponen que una posible explicación de la diferencia en el fenotipo de CET es por la expresión de isoformas o proteínas truncas de hamartina que tengan efecto dominante negativo al competir con la proteína silvestre formando un complejo inactivo o por conservar parcialmente su función (van den Ouweland et al., 2011).

Síndrome de genes contiguos por deleción

En pacientes con CET la aparición de múltiples quistes renales o bilaterales detectados desde la infancia permite sospechar un síndrome de genes contiguos por deleción de *TSC2/PKD1* (PKDTS, MIM#600273). Ambos genes se encuentran a 60 pares de bases de distancia uno del otro, en una orientación cola con cola (Boehm, Bacher, & Neumann, 2007). El PKDTS corresponde del dos al tres por ciento de todos los casos con CET (Lim, Tan, Thangaraju, Lai, & Foo, 2014) y tres cuartas partes se presentan en la edad pediátrica (Bisceglia, Galliani, Carosi, Simeone, & Ben-Dor, 2008). En esta entidad se ha observado enfermedad renal crónica de inicio temprano con deterioro de la función renal en la adolescencia (Lim et al., 2014); por lo que se requiere vigilancia de la presión arterial y tratamiento oportuno con inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA) de larga duración y anatógonistas del receptor de angiotensina II (ARA II) con el fin de retrasar la pérdida de la función renal (David Neal Franz, Bissler, & McCormack, 2010). Adicionalmente, hay riesgo elevado de desarrollar complicaciones relacionadas a la enfermedad poliquística renal autosómica dominante (ADPKD, MIM#173900) como quistes en páncreas e hígado o aneurismas intracraneales (Chen, Luo, Hsu, Rodesch, & Lasjaunias, 2001). Se requiere la detección oportuna de los aneurismas ya que se ha reportado mayor riesgo de ruptura en aquellos pacientes con PKDTS que ADPKD. Además, se ha observado un riesgo elevado para desarrollar SEGA en comparación con los pacientes con alguna VGP en *TSC2* que no involucre a *PKD1*,

por ello se recomienda realizar una imagen cerebral desde el nacimiento para descartar esta neoplasia cerebral en aquellos pacientes en quienes se sospecha PKDTS (Kotulska et al., 2014).

Este síndrome de genes contiguos fue descrito por primera vez en 1994 al reportar 6 casos menores de un año de edad con manifestaciones clínicas de CET y a nivel renal, múltiples quistes bilaterales. En dichos casos, se confirmó el diagnóstico por hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) (Greenberg, et al., 1994). A la fecha hay más de 60 casos con PKDTS reportados en la literatura.

JUSTIFICACIÓN

Establecer el diagnóstico de CET puede ser difícil debido a la expresividad variable y a que la presentación de las manifestaciones clínicas es dependiente de la edad. Por medio de PCR-secuenciación Sanger se detecta alrededor del 73% de las VGP. En aquellos pacientes en quienes no se caracterizó una VGP por medio de esta metodología, se espera que con la aplicación de la técnica de MLPA se identifique un 21% adicional. Esto permitirá confirmar el diagnóstico e identificar casos familiares en los pacientes con diagnóstico Ps, establecer pronóstico, brindar asesoramiento genético certero y guiar de forma precisa la vigilancia médica y seguimiento de comorbilidades asociadas a largo plazo.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el Instituto Nacional de Pediatría se ha hecho un esfuerzo importante por genotipificar a los pacientes con CET. Actualmente se tienen 23 pacientes con diagnóstico definitivo de CET en quienes a pesar de la búsqueda de VGP por medio de secuenciación Sanger no se ha logrado identificar la VGP responsable del fenotipo. Por medio de la utilización de la metodología de MLPA en estos pacientes, se pretende aumentar la detección de VGP de tipo deleciones o duplicaciones.

OBJETIVOS

General

Caracterizar VGP tipo deleciones/inserciones en los genes *TSC1* y *TSC2* en pacientes del INP con CET que cuenten con un resultado molecular por la técnica de secuenciación Sanger normal.

Específicos:

- a) Describir clínicamente los casos en los que se identifique una VGP por medio de MLPA.
- b) Revisar en la literatura si las variantes patogénicas identificadas han sido descritas previamente y analizar las características fenotípicas de los pacientes descritos con los de este estudio con VGP.
- c) Identificar casos únicos y familiares mediante el estudio molecular dirigido en familiares de primer grado de los casos en donde se haya caracterizado el genotipo responsable.
- d) Identificar en familiares de primer grado de los casos con genotipo caracterizado expresión mínima de la enfermedad o no penetrancia.

MATERIAL Y MÉTODO

Características del estudio

Estudio observacional, retrospectivo, transversal y descriptivo.

Población de estudio

- *Población objetivo:* Pacientes pediátricos con diagnóstico clínico Df o Ps de CET de acuerdo a los criterios del Northrup et al., (2013) que acuden al servicio de Genética en el Instituto Nacional de Pediatría y a los cuales por PCR-secuenciación Sanger no se les identificó una VGP en las porciones codificantes y bordes exón/intrón de los genes *TSC1* y *TSC2*.
- *Población elegible:* Pacientes pediátricos que acuden al servicio de Consulta Externa de Genética en el Instituto Nacional de Pediatría, así como sus familiares de primer grado (padres y hermanos).

Criterios de selección

Se incluyeron pacientes a los cuales por medio de estudios de gabinete y exploración física realizada por un médico genetista se les estableció un diagnóstico clínico definitivo o posible de CET.

A) Criterios de inclusión:

- Pacientes con diagnóstico clínico Df o Ps de CET sin una VGP caracterizada mediante la técnica de PCR-secuenciación Sanger.
- Pacientes que cuenten con DNA de buena calidad e integridad para el ensayo de MLPA.
- Pacientes de cualquier género.
- De cualquier edad.
- Caso índice y familiares de primer grado (padres y/o hermanos) que autoricen su inclusión mediante firma del consentimiento/asentimiento informado.

B) Criterios de exclusión:

- Pacientes cuya muestra de DNA no cuente con la calidad o cantidad adecuada para el análisis de MLPA y que no aceptaran una segunda toma de muestra.
- Familiares de primer grado no biológicos de los casos índice.
- Pacientes que se hayan transfundido en los últimos 3 meses (criterio de exclusión temporal).

Tamaño de muestra

El tamaño de muestra se obtuvo a conveniencia derivado de la base de datos de pacientes con CET, con la que cuenta el laboratorio de Biología Molecular. En total se incluyeron a 23 pacientes sin un genotipo caracterizado mediante la técnica PCR-secuenciación Sanger.

Análisis estadístico

La frecuencia de las VGP (deleciones o duplicaciones grandes) en *TSC1* y *TSC2* se calculó en porcentaje y se comparó con los datos descritos en la literatura.

Descripción general del estudio

Se realizó una base de datos actualizada de las características clínicas para cada uno de los 23 pacientes y sus familiares de primer grado incluidos en este estudio mediante una revisión de los expedientes clínicos. Se registraron datos de la historia clínica, árbol genealógico y exploración física realizadas por el servicio de Genética; así como los hallazgos identificados por los servicios de Neurología, Oftalmología, Estomatología y estudios de gabinete (ultrasonido renal, ecocardiograma y resonancia magnética cerebral). Para los 23 pacientes que no contaban con una VGP caracterizada por la metodología de PCR-Sanger se procedió a la búsqueda de rearrreglos grandes de tipo delección y duplicación por medio de la técnica de MLPA. Para los casos positivos para delecciones o duplicaciones caracterizadas por MLPA, se realizó una búsqueda en la literatura para determinar si dichos cambios se han reportado previamente o se trataba de variantes nuevas.

En los pacientes en los que se caracterizó una VGP, se compararon las características fenotípicas de CET con las de aquellos casos reportados previamente en la literatura. En un caso (ET-178) al caracterizar la VGP se realizó una resonancia magnética renal para definir con mayor certeza la presencia de quistes renales.

En los casos positivos para una VGP se realizó el estudio de MLPA en los padres para determinar si se trataba de casos únicos o familiares. En los casos familiares, se describieron las características clínicas y hallazgos de estudios de gabinete del progenitor afectado para evaluar expresión mínima de la patología o no penetrancia. El estudio molecular tanto de los casos como de los familiares de primer grado se realizó en el laboratorio de Biología Molecular, Departamento de Genética Humana, INP.

- **Cuantificación del DNA**

Para todas las muestras provenientes del banco de DNA de pacientes con CET del Laboratorio de Biología Molecular se comprobó la pureza e integridad de cada una de ellas por medio de espectrofotometría con la ayuda de un NanoDrop. Debido a que el ensayo de MLPA requiere una concentración de DNA a 20ng/μl se realizaron diluciones con buffer TE (Tris- EDTA) para cada una de las muestras para lograr dicha concentración.

Para el cálculo de la concentración de DNA se aplicó la siguiente fórmula:

$$(D.O)(F)(dil) = (DNA) \text{ ng}/\mu\text{l}$$

donde:

D.O = densidad óptica a 260nm

F = contante equivalente a 0.02 (20ng de DNA)

Dil = volumen de dilución equivalente a 100 μl

- **Integridad del DNA**

La integridad del DNA se evaluó por medio de electroforesis en un gel de agarosa al 1% teñido con GelStar™. Posteriormente, se observó en un transiluminador con luz ultravioleta y la imagen fue capturada en un fotodocumentador de geles.

- **Protocolo general del ensayo de MLPA.**

El ensayo de MLPA se realizó de acuerdo al protocolo general establecido por la marca comercial MRC-Holland y para lo cual se incluyeron 5 muestras de referencia con un número de copias normal, así como un control negativo (muestra sin DNA). Se utilizaron dos kits comerciales de MLPA; el primero incluye 23 sondas para los 23 exones de *TSC1* (Salsa Probemix P124-C1) y el segundo incluye 37 sondas para los 41

exones de *TSC2*. Este último además contiene una sonda para el exón 40 del gen aledaño *PKD1* (Salsa Probemix P337-A2).

A continuación, se resumen las cuatro etapas realizadas para el ensayo de MLPA que se llevaron a cabo en un termociclador de gradiente Axigen®MaxyGene II:

- 1) *Desnaturalización del DNA*: Esta etapa consiste en la desnaturalización de la doble cadena de DNA por medio de calor. Para ello, las muestras se colocaron a una temperatura de 98°C por 5 minutos y se mantuvieron a 25°C hasta la hibridación.
- 2) *Hibridación*: Durante esta fase se agregaron las sondas que hibridan a las regiones específicas del DNA de interés. Las reacciones de temperatura y tiempo de reacción se describen en la
- 3) Tabla 7:

Tabla 7 Reacción de hibridación

Temperatura	Tiempo
95°C	1 minuto
60°C	18 horas
54°C	Pausa

- 3) *Ligación*: En esta etapa se agrega una enzima ligasa para unir las dos mitades de cada sonda que hayan hibridado sobre el DNA blanco. Las condiciones generales de temperatura utilizada se muestran en la

Tabla 8:

Tabla 8. Reacción de ligación

Temperatura	Tiempo
54°C	15 minutos
98°C	5 minutos
20°C	Pausa

- 4) *Reacción de PCR*: En esta última fase se amplifica cada una de las sondas ligadas mediante una reacción de PCR y para lo cual se utilizan: cebadores (un sólo par universal), Taq polimerasa y un medio de elución (agua grado biología molecular) bajo las condiciones de temperatura que se muestran en la Tabla 9:

Tabla 9 Reacción de PCR

Temperatura	Tiempo
35 ciclos:	
95°C	30 segundos
60°C	30 segundos
72°C	60 segundos
72°C	20 minutos
15°C	Pausa

Una vez finalizada la reacción de PCR, los productos se retiraron del termociclador y se almacenaron a 4°C protegidos de la luz.

Los amplicones obtenidos se observaron en un gel de agarosa al 2% teñido con GelStar™ para corroborar su presencia. Posteriormente, los fragmentos de cada una de las muestras fueron separados

mediante electroforesis capilar en un secuenciador automatizado (ABI-3730). Cada una de las muestras se analizó por triplicado para confirmar el resultado.

Los resultados del análisis de fragmentos fueron evaluados con el programa Coffalyzer.net que compara los picos de fluorescencia emitidos por el DNA de los controles y los pacientes analizados para establecer la presencia de ganancias (duplicaciones) o pérdidas (deleciones) del material genómico.

- ***Reporte de las variantes caracterizadas por MLPA***

Las variantes de tipo deleción o duplicación identificadas por medio del ensayo de MLPA se buscaron en la base de datos LOVD (<http://www.lovd.nl/3.0/home>), HGMD (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>) y ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>) y en publicaciones de revistas internacionales indizadas para determinar si han sido reportadas previamente o se trata de variantes nuevas. Para aquellas previamente reportadas, se analizaron las manifestaciones clínicas de dichos pacientes para compararlas con las descritas en los pacientes incluidos en el presente estudio con el fin de establecer si existe una posible correlación fenotipo-genotipo.

- ***Identificación de casos únicos y familiares***

Se realizó el ensayo de MLPA a los familiares de primer grado, de los casos positivos a una VGP, que contaran con muestra de DNA de adecuada calidad y cantidad, para distinguir molecularmente los casos únicos de los casos familiares, así como expresividad mínima o no penetrancia.

- ***Consideraciones éticas***

El presente trabajo es parte del proyecto autorizado por los comités de Ética, Bioseguridad e Investigación del Instituto Nacional de pediatría con número de registro 060/2014.

RESULTADOS

Sujetos de estudio

En el presente estudio se incluyeron a 23 casos de la base de datos de pacientes con CET del Laboratorio de Biología Molecular del Instituto Nacional de Pediatría en quienes no se había identificado una VGP por la metodología de PCR-secuenciación Sanger. En la Figura 3 se muestran las características generales de los casos incluidos en el estudio. De acuerdo a los criterios de diagnóstico clínico establecidos por Northrup, et al., el 100% (23) de los casos tuvieron diagnóstico definitivo. El 61% (14) fueron del género femenino. El promedio de edad al diagnóstico fue de 7.7 años (desviación estándar ± 8.1) en 18 de los 23 casos que se contaba con esta información. Seis casos (26%) fueron pacientes referidos de otros hospitales y los demás fueron pacientes que acudieron al INP (74%).

El 73.9% (17) de los casos fueron clasificados como únicos. En siete de ellos (ET-104, ET-107, ET-178, ET-183, ET-223, ET-226 y TSC1) se contaba con genealogía, exploración física y estudios de gabinete (imagen cerebral y ultrasonido renal (USG)) normales de ambos progenitores por lo que se descartó expresión mínima en ellos. De los otros 10 casos, en seis (ET-122, ET-243, ET-254, ET-255, ET-257 y ET 278) se considera a ambos padres como sanos por datos clínicos únicamente ya que no se cuenta con información sobre estudios de gabinete. Los cuatro pacientes restantes (ET-4, ET-7, ET-32 y ET-44) están capturados exclusivamente como casos únicos en la base de datos y no se especifica si se realizaron estudios y exploración física en los familiares. En dos pacientes no se pudo determinar por datos clínicos y de gabinete si se trata de casos únicos o familiares: dado que en uno (ET-81), la madre tenía diagnóstico posible de CET al cumplir con los criterios clínicos de más de tres hoyuelos en el esmalte dental y más de dos fibromas intraorales; en la tomografía axial computada (TAC) de cráneo y USG renal no se identificaron alteraciones y el padre no estaba disponible para su evaluación. Del paciente ET-61, la madre presentaba lesiones cutáneas pero tiene pendiente la valoración por dermatología para establecer si corresponden a angiofibromas y fibromas ungueales. La TAC de cráneo está reportada con dos calcificaciones periventriculares y el USG renal normal, además en la valoración por oftalmología y estomatología no se identificaron otras alteraciones. Hasta el momento con estas manifestaciones no se cumplen con los criterios para establecer diagnóstico posible ni definitivo de CET. El padre tiene estudios de gabinete sin alteraciones.

De los 23 pacientes, cuatro eran casos familiares; de estos, el paciente ET-264 tenía diagnóstico definitivo de CET al igual que su hija (ET-266), la cual fue diagnosticada a los 6 años y 4 meses ya que presentaba tuberosidades corticales, nódulos subependimarios, placa de Shagreen y antecedente de rabdomioma cardíaco. El caso ET-90 tenía diagnóstico definitivo de CET; así como la hermana (ET-91) y madre (ET-92). En el paciente ET-190 tanto el caso índice como el padre (ET-191) tenían diagnóstico definitivo de CET. El último caso familiar, corresponde al paciente ET-282 con diagnóstico definitivo de la enfermedad, sin embargo, por ser un caso referido de otra institución se sabe que la madre está afectada sin embargo se desconocen manifestaciones clínicas y hallazgos en los estudios de gabinete. En la

Tabla 10 se muestran las características individuales de los 23 casos.

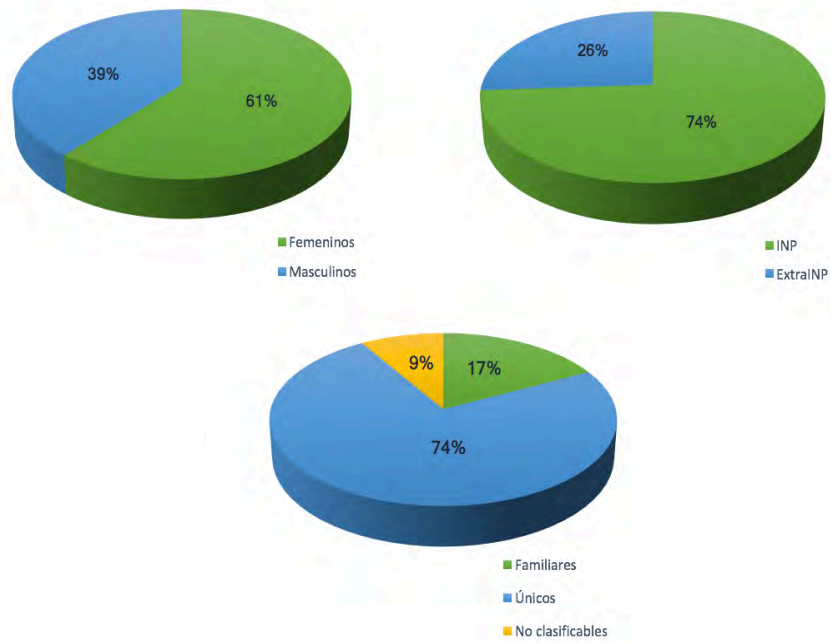


Figura 3. Gráficas de las características generales de los casos incluidos en el estudio

Tabla 10. Características individuales de los casos incluidos en el estudio.

# identificación	Dx Clínico	Fam / único	Género	Edad Dx	Procedencia
ET-4	Df	U	F	6a	INP
ET-7	Df	U	F	-	INP
ET-32	Df	U	F	-	INP
ET-44	Df	U	F	-	INP
ET-61	Df	N/C	M	1a	INP
ET-81	Df	N/C	M	-	INP
ET-90	Df	Fam	F	-	INP
ET-104	Df	U	M	1a	INP
ET-107	Df	U	M	2a	INP
ET-122	Df	U	F	5a	INP
ET-178	Df	U	M	8a	INP
ET-183	Df	U	M	11a	INP
ET-190	Df	Fam	M	4a	INP
ET-223	Df	U	F	11a	INP
ET-226	Df	U	F	2a	ExtraINP
ET-243	Df	U	M	4a	INP
ET-254	Df	U	F	7a	ExtraINP
ET-255	Df	U	F	15a	ExtraINP
ET-257	Df	U	F	35a	ExtraINP
ET-264	Df	Fam	M	16a	ExtraINP
ET-278	Df	U	F	7m	INP
ET-282	Df	Fam	F	1a	ExtraINP
TSC1	Df	U	F	10a	INP

Df: diagnóstico definitivo; Ps: diagnóstico posible; S: sano; U: único; Fam familiar; N/C: no clasificable; F: femenino; M: masculino; a: años; m: meses; -: sin datos

Evaluación de las muestras de DNA

Dado que las muestras de los pacientes provienen de un banco de DNA, se comprobó que todas tuvieran la calidad y cantidad mínima requerida para realizar el estudio de MLPA. Para ello, se evaluó la pureza por medio de espectroscopía; todas las muestras tuvieron una pureza adecuada ya que el índice de absorbancia se encontraba entre 1.8-2.0. Además, se cuantificó cada una de las muestras para evaluar que la concentración de DNA fuera mayor a 20ng/μl, cantidad mínima requerida para realizar el ensayo. Posteriormente, se evaluó la integridad de las muestras por electroforesis en un gel de agarosa al 1%, donde se consideró que la integridad del DNA era adecuada al observar una banda de alto peso molecular, lo que indica que el material genético no se encuentra degradado. Por el contrario, cuando se observó una imagen barrida, correspondía a fragmentos de material genómico de distinto peso molecular, lo que indica que parte del DNA se encuentra degradado. En la Figura 4 se observa que, aunque el DNA del caso ET-4 tiene una parte de material degradado, existe una banda de alto peso molecular por lo que dicha muestra sí se incluyó en el estudio.

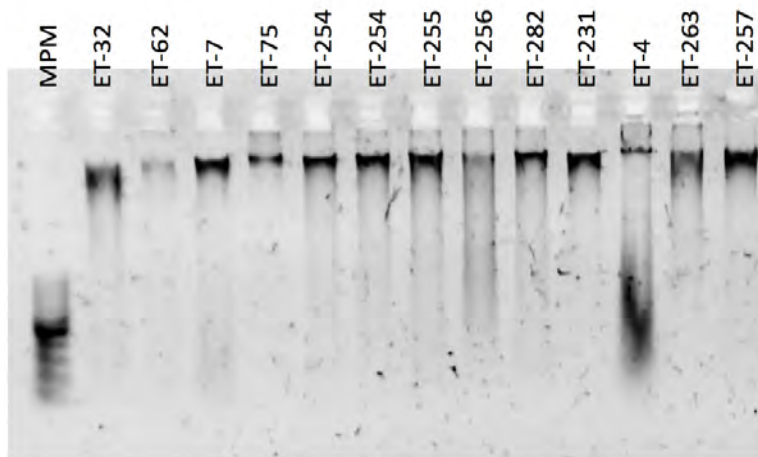


Figura 4. Integridad de muestras de DNA. Gel de agarosa al 1% de las muestras de DNA provenientes del banco de pacientes con CET. Se visualiza el material genómico íntegro como una banda de 23Kb. En el caso ET-4 se observa tanto material degradado como íntegro. MPM: marcador de peso molecular.

Análisis por MLPA

Se realizó el ensayo de MLPA según el protocolo establecido por la marca comercial MRC-Holland y se corroboró que en todos los casos se hubiera llevado a cabo adecuadamente la amplificación de las sondas ligadas por medio de un gel de agarosa al 2%. En la Figura 5 se pueden observar los amplicones obtenidos de peso molecular entre 100 y 500 pares de bases.

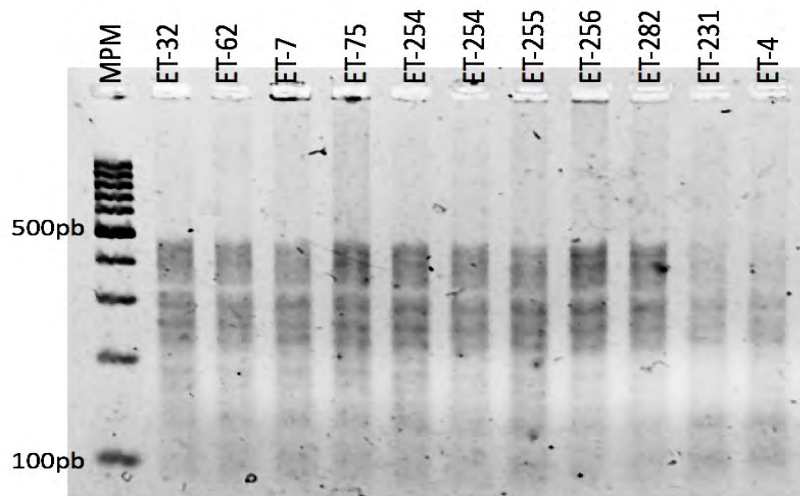


Figura 5. Amplicones obtenidos del ensayo de MLPA. Gel de agarosa al 2% donde se visualizan múltiples bandas de peso molecular variable entre 100-500 pb de los fragmentos obtenidos por la ligación y amplificación del ensayo. MPM: marcador de peso molecular; pb pares de bases.

Posteriormente, se realizó la separación de los fragmentos mediante electroforesis capilar en un secuenciador automatizado (ABI-3730). El análisis de los amplicones se realizó con el programa Coffalyser con el cual se visualizaron y compararon las señales de fluorescencia emitidas entre las muestras de los casos y los controles, además se verificó que el ensayo fuera adecuado por medio de controles de calidad internos. Se consideró que la disminución o el aumento de la altura del pico de fluorescencia con valores <0.7 o >1.3 , indican una deleción o duplicación de la región analizada, respectivamente.

Caracterización de deleciones por MLPA

De los 23 pacientes estudiados por MLPA, se lograron caracterizar VGP de tipo deleción en seis de ellos (26%) y no se identificó ninguna duplicación. De acuerdo con la base de datos del Laboratorio de Biología Molecular, los seis casos tenían diagnóstico clínico definitivo de CET (Tabla 11). El gen responsable fue *TSC1* en sólo uno de los pacientes (ET-254) y *TSC2* en los otros cinco (ET-90, ET-104, ET-178, ET-183 y TSC1). De estos, tres deleciones en *TSC2* se extendían hacia 3' involucrando al gen aledaño *PKD1* (ET-104, ET-178, ET-183). Debido a que la orientación de *PKD1* y *TSC2* es "cola con cola", al detectar la ausencia del exón 40 de *PKD1* se asume que la deleción involucra los últimos seis exones de este gen.

En la Figura 6 se observan los resultados del ensayo de MLPA de los casos en los que se identificó una VGP y dos controles con el número de copias normal. En la Figura 7 se observa la extensión de las deleciones identificadas por el ensayo de MLPA, así como los dominios afectados por las VGP caracterizadas. De las VGP identificadas en *TSC2*, sólo en un caso se delimitó con exactitud la deleción (ET-90) que afecta los exones 17-36. La deleción más grande corresponde al caso ET-178 ya que abarca la totalidad de *TSC2* y por lo menos los últimos 6 exones de *PKD1*; sin definir con precisión el tamaño de la deleción hacia las regiones 5' y 3'. En los casos ET-183 y TSC1, ambas afectan los exones 31-42 de *TSC2* y se extiende al menos del exón 40 hasta el 46 de *PKD1*. En el caso ET-104 la deleción afecta desde el primer exón hasta el 15 de *TSC2* sin poder delimitar la extensión hacia la región 5'. La deleción identificada en *TSC1*, corresponde al caso ET-254, inicia en el exón 15 y se extiende hacia 3' involucrando al menos el exón terminal 23.

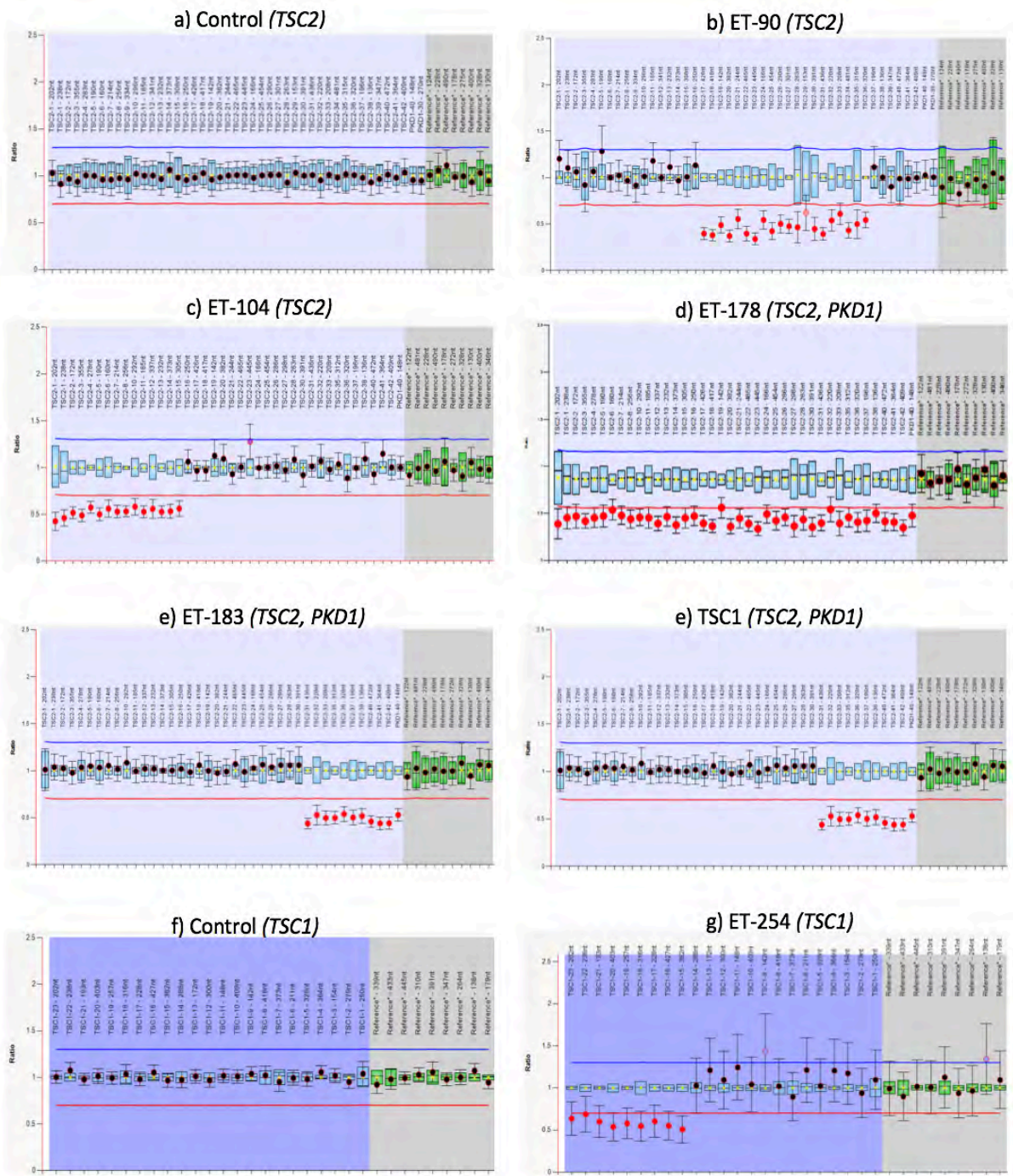


Figura 6. Gráficas del ensayo de MLPA.

Representación esquemática de las regiones analizadas por la metodología de MLPA. Los rectángulos azules corresponden a los exones del gen *TSC1* o *TSC2* según sea el caso. En el análisis de *TSC2* se incluye un exón de *PKD1*, los rectángulos verdes son regiones de referencia que corresponden a controles de calidad del estudio. Para establecer una ganancia de material la señal de fluorescencia (círculos) debe cruzar la línea azul y para determinar una pérdida la señal debe estar por debajo de la línea roja. Se indica el número de caso en la parte superior de cada gráfica. **a)** Control de *TSC2*, no se observan ganancias o pérdidas ya que la señal de fluorescencia se encuentra dentro del rango de normalidad. **b)** Deleción de los exones 17-36 de *TSC2*. **c)** Deleción de los exones 1-15 de *TSC2*, hacia la región 5' no se puede delimitar la extensión. **d)** Deleción de los exones 1-41 de *TSC2* y 40-46 de *PKD1*, sin definir el límite hacia las regiones 5' y 3'. **e)** En dos casos la deleción involucra los exones 31-41 de *TSC2* y 40-46 de *PKD1*, hacia la región 3' no se puede delimitar la extensión. **f)** Control de *TSC1*, no se observan ganancias o pérdidas ya que la señal de fluorescencia se encuentra dentro del rango de normalidad. **g)** Deleción de los exones 15-23 de *TSC1*, sin poder definir el extremo 3'.

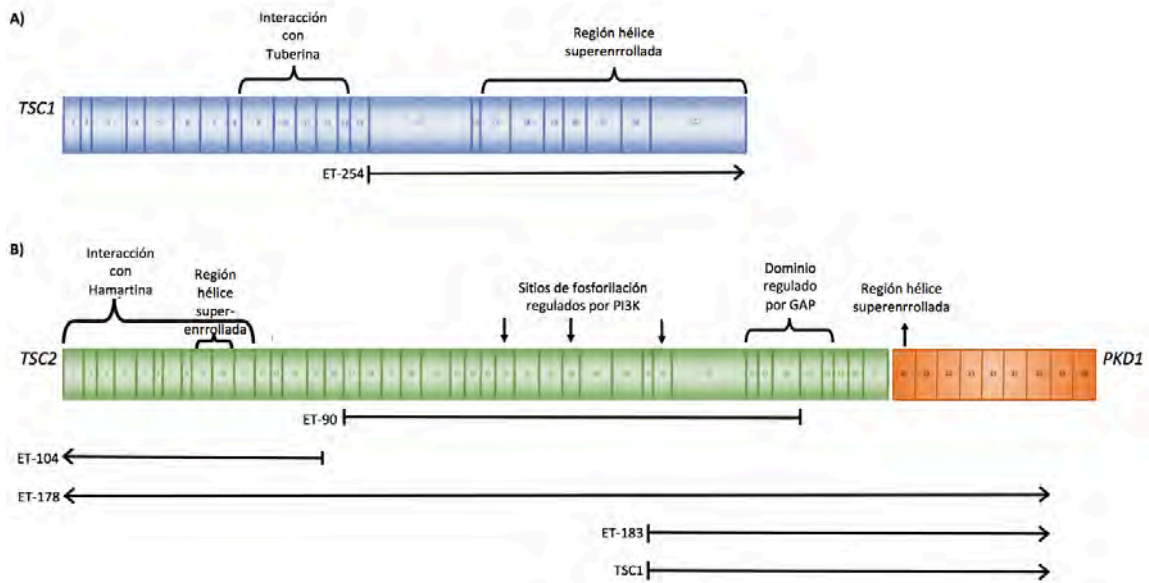


Figura 7. Estructura y dominios de los genes *TSC1*, *TSC2* y *PKD1* y distribución de las deleciones identificadas por MLPA.

A) Representación esquemática de los exones del gen *TSC1* y los dominios de interacción con Tuberina y región hélice superenrollada. Se representa la extensión de la deleción del caso ET-254 que incluye los exones 15-23 sin establecer con certeza el extremo 3' por la cobertura de las sondas utilizadas en el ensayo de MLPA.

B) Representación esquemática de los exones del gen *TSC2* y los últimos 8 exones del gen *PKD1* del 40 a 46, los dominios de interacción con Hamartina, región hélice superenrollada, los sitios de fosforilación dependientes de fosfoinositol 3-cinasa (PI3K) y el dominio regulado por la proteína activadora de GTPasa (GAP). Se representa la extensión de la deleción de los casos: ET-90 de los exones 17-36. ET-104 de los exones 1-15, hacia la región 5' no se puede delimitar la extensión. ET-178 de los exones 1-41 de *TSC2* y 40-46 de *PKD1*, se extiende hacia las regiones 5' y 3' más allá de la cobertura de las sondas. ET-183 y TSC1 de los exones 31-41 de *TSC2* y 40-46 de *PKD1*, hacia la región 3' no se puede delimitar la extensión. En los casos en los que no se puede delimitar con exactitud los extremos 5' y/o 3' de la deleción se ejemplifica con una punta de flecha. Tomado y modificado de (Choi, et al., 2006; Rosset et al., 2017)

Tabla 11. Manifestaciones clínicas de los casos con VGP identificados por MLPA.

# identificación	ET-90	ET-104	ET-178	ET-183	ET-254	TSC1
<i>Edad al diagnóstico</i>	S/D	1a	8a	11a	7a	10a
<i>Sexo</i>	F	M	M	M	F	F
<i>Procedencia</i>	INP	INP	INP	INP	ExtraINP	INP
CRITERIOS MAYORES						
<i>Máculas hipomelanóticas (≥3, ≥5mm diámetro)</i>	S/D	+	+	+	+	+
<i>Angiofibroma (≥3) o placa cefálica</i>	S/D	+	+	+	+	+
<i>Fibromas ungueales (≥2)</i>	S/D	-	-	-	-	-
<i>Placa de Shagreen</i>	S/D	-	+	+	-	+
<i>Múltiples hamartomas retinianos</i>	S/D	+	-	-	-	+
<i>Displasia cortical</i>	S/D	+	+	+	-	+
<i>Nódulos subependimarios</i>	S/D	+	+	+	-	+
<i>Astrocitoma subependimario de células gigantes (SEGA)</i>	S/D	+	-	-	-	-
<i>Rabdomioma cardíaco</i>	S/D	+	-	-	-	-
<i>Linfangioleiomiomatosis pulmonar</i>	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D
<i>Angiomiolipomas renales (≥2)</i>	S/D	-	-	-	-	-
CRITERIOS MENORES						
<i>Lesiones cutáneas “en confeti”</i>	S/D	-	-	-	-	-
<i>Hoyuelos dentales (≥3)</i>	S/D	-	-	+	-	-
<i>Fibromas intraorales (≥2)</i>	S/D	-	-	-	-	-
<i>Parche acrómico retiniano</i>	S/D	-	-	-	-	S/D
<i>Quistes renales múltiples</i>	S/D	-	+	+	-	+
<i>Hamartomas no-renales</i>	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D
<i>Diagnóstico clínico</i>	Df	Df	Df	Df	Df	Df
<i>Variante identificada por MLPA</i>	NG_005895.1:g.(26119_26142)_(40891_40914)del	NG_005895.1:g.(?_3708)_(19967_19990)del	NC_000016.10:g.(?_2098012)_(2142131_?)del	NC_000016.10:g.(2131791-2131814)_(2142131_?)del	NG_012386.1:g.(43701_43724)_(52933_?)del	NC_000016.10:g.(2131791-2131814)_(2142131_?)del
<i>Previamente reportada</i>	No	Si (considerando sólo los exones involucrados)	No	No	No	No

S/D sin datos; + presente, - ausente, F femenino, M masculino, a años, Df definitivo

Caso ET-90

Es un caso familiar donde el caso índice, la madre y una hermana tienen diagnóstico definitivo de CET. No se cuenta con la información detallada sobre las manifestaciones clínicas con las que se estableció el diagnóstico ya que, al cumplir mayoría de edad, se depura el expediente clínico en el INP. La delección identificada en este caso no ha sido reportada previamente y es la única que se delimitó con exactitud, involucra a los exones 17-36 de *TSC2* y afecta los sitios de fosforilación regulados por PI3K y el dominio regulado por GAP (Figura 7).

Caso ET-104

Se trata de un paciente masculino, caso único con diagnóstico definitivo de CET al año de edad. Cumple con siete criterios clínicos mayores y uno menor (Tabla 11). Además, presenta crisis convulsivas, dificultad en el aprendizaje y alteraciones conductuales. La deleción identificada involucra a los exones 1-15 de *TSC2* y afecta el dominio de interacción con Hamartina y la región hélice superenrollada (Figura 7). En (Jang et al., 2012; Longa et al., 2001; Priya & Dalal, 2012) describen casos en quienes se caracterizó una deleción que involucra los mismos exones (1-15 de *TSC2*), sin embargo, se desconoce si tienen la misma extensión hacia la región 5' que ET-104. En la Tabla 12 se muestran las características de los pacientes reportados por Jang et al., Priya et al. y del caso del presente estudio.

Tabla 12. Características de los casos con deleción de los exones 1-15 de *TSC2* identificados por MLPA.

	ET-104	Priya et al.	Jang et al.
Método detección	MLPA	MLPA	MLPA
Sexo	M	M	M
Edad al diagnóstico	1 año	3 años	5 años
CRITERIOS MAYORES			
<i>Máculas hipomelanóticas (≥3, ≥5mm diámetro)</i>	+	+	S/D
<i>Angiofibroma (≥3) o placa cefálica</i>	+	+	S/D
<i>Fibromas ungueales (≥2)</i>	-	-	S/D
<i>Placa de Shagreen</i>	-	-	S/D
<i>Múltiples hamartomas retinianos</i>	+	-	S/D
<i>Displasia cortical</i>	+	-	+
<i>Nódulos subependimarios</i>	+	+	+
<i>Astrocitoma subependimario de células gigantes (SEGA)</i>	+	-	S/D
<i>Rabdomioma cardíaco</i>	+	-	S/D
<i>Linfangioleiomiomatosis pulmonar</i>	S/D	-	S/D
<i>Angiomiolipomas renales (≥2)</i>	-	-	S/D
CRITERIOS MENORES			
<i>Lesiones cutáneas "en confeti"</i>	-	-	S/D
<i>Hoyuelos dentales (≥3)</i>	-	-	S/D
<i>Fibromas intraorales (≥2)</i>	-	-	S/D
<i>Parche acrómico retiniano</i>	-	-	S/D
<i>Quistes renales múltiples</i>	-	-	S/D
<i>Hamartomas no-renales</i>	S/D	-	S/D
<i>Diagnóstico clínico</i>	Df	Df	Df

S/D sin datos; + presente, - ausente, F femenino, M masculino, a años, Df definitivo

Caso ET-178

Se trata de un masculino con diagnóstico definitivo a los 8 años de edad al cumplir con cuatro criterios clínicos mayores y como criterio menor (Tabla 11), un sólo quiste renal identificado por USG. Además, presenta discapacidad intelectual, crisis convulsivas, dificultades en el aprendizaje y alteraciones conductuales como comorbilidades neurológicas. Al realizar el análisis molecular se identificó una deleción que involucra los 42 exones del gen *TSC2* y por lo menos los exones 40-46 de *PKD1*. La extensión hacia 5' y 3' de esta VGP no se puede delimitar ya que sobrepasa la cobertura de las sondas utilizadas en el ensayo de MLPA. La deleción caracterizada es tan extensa que afecta el dominio de interacción con hamartina, la región hélice superenrollada, los sitios de fosforilación regulados por PI3K, el dominio regulado por GAP y la región hélice superenrollada de *PKD1* (**Error! Reference source not found.**). Al identificar esta VGP se

requirió evaluar con mayor profundidad el involucro renal por lo que se solicitó una resonancia magnética; la cual reveló más de 25 quistes pequeños de tamaño variable (promedio 9mm) en ambos riñones. Esta delección no ha sido reportada previamente, sin embargo, Kacervoska et al., reportaron un paciente con una delección que involucra dominios similares al del presente estudio (Figura 8).

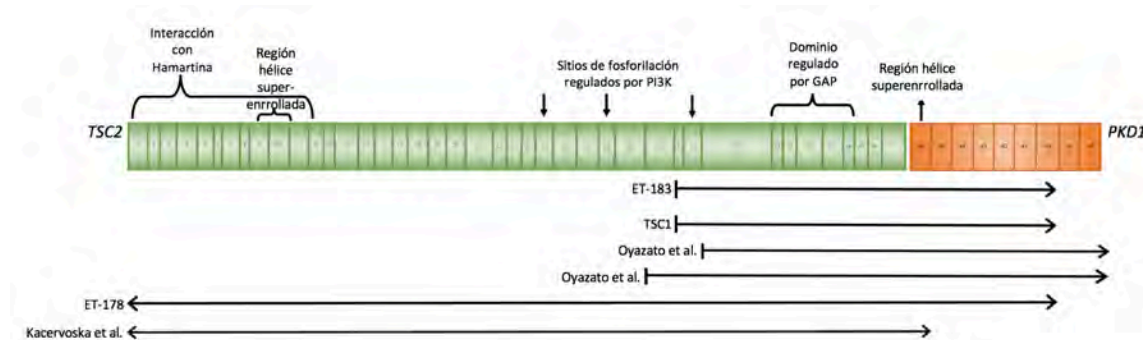


Figura 8. Delecciones en el gen *TSC2* y los dominios afectados.

Representación esquemática del gen *TSC2*. ET-183 y TSC1: delección de los exones 31-42 de *TSC2* y por lo menos exones 40-46 de *PKD1*, en los dos casos no se puede delimitar con certeza el extremo 3'. Dos casos descritos por Oyazato et al.: uno con delección de los exones 30-42 de *TSC2* y los 46 exones de *PKD1* y otro caso con delección de los exones 31-42 de *TSC2* y los 46 exones de *PKD1*. ET-178: delección de los exones 1-42 de *TSC2* y por lo menos exones 40-46 de *PKD1*. Kacervoska et al.: delección de los exones 1-42 de *TSC2* y por lo menos el exón 46 de *PKD1*, en los dos casos no se puede delimitar la extensión hacia 5' y 3'. Tomado y modificado de (Kacervoska et al., 2009; Oyazato et al., 2011; Rosset et al., 2017)

Casos ET-183 y TSC1

En estos dos casos se caracterizó la misma delección. Abarca del exón 31-42 de *TSC2* y por lo menos los últimos 6 exones de *PKD1*; no se puede precisar la extensión de la delección hacia 3' ya que las sondas utilizadas en el estudio únicamente evalúan hasta el exón 40 de *PKD1*. Esta VGP afecta un sitio de fosforilación regulado por PI3K, el dominio regulado por GAP y la región hélice superenrollada de *PKD1* (Figura 7). Esta VGP no ha sido reportada previamente, sin embargo, Oyazato et al., describieron dos pacientes con una delección que involucra dominios similares a los casos del presente estudio (Figura 8).

El paciente ET-183 es un masculino que presenta cinco criterios clínicos mayores y dos menores, estableciéndose el diagnóstico definitivo de CET a los 11 años de edad. El caso de TSC1 corresponde a una paciente que cumple con siete criterios mayores y dos menores a los 10 años de edad (Tabla 11). Ambos casos presentan quistes renales múltiples y bilaterales y además, discapacidad intelectual, crisis convulsivas, dificultades en el aprendizaje y alteraciones conductuales.

Caso ET-254

Se trata de una paciente que presenta dos criterios mayores como manifestaciones clínicas, se estableció el diagnóstico a los siete años de edad (Tabla 11). Como comorbilidades neurológicas presenta discapacidad intelectual, crisis convulsivas y alteraciones en el aprendizaje. Este caso es el único de los seis en quien se identificó una delección en *TSC1* que involucra los exones 15-23 sin poder establecer la extensión específica hacia 3'; afecta la región hélice superenrollada (Figura 7). Esta VGP no ha sido reportada previamente, sin embargo, van den Ouweland et al., reportaron tres pacientes con una delección que involucra dominios similares al caso del presente estudio (Figura 9).

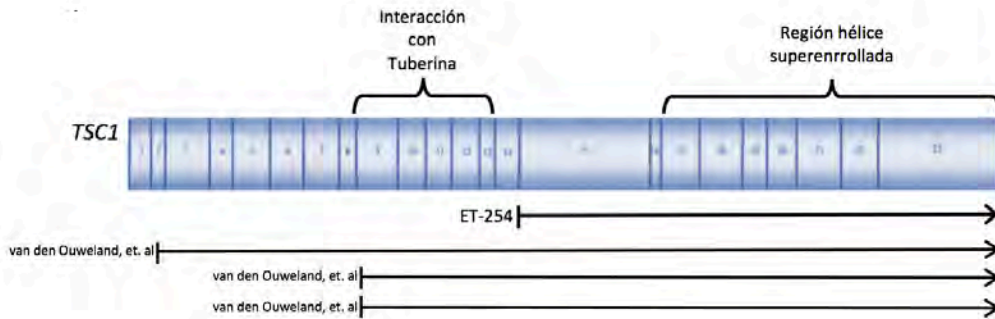


Figura 9. Deleciones en el gen TSC1 que involucran la región hélice superenrollada.

Representación esquemática del gen TSC1. ET-254: deleción de los exones 15-23 (presente estudio); caso 31457: deleción de los exones 2-23 y caso 29445 y 28121: deleción de los exones 9-23. En los cuatro casos no se puede delimitar con certeza el extremo 3'. Tomado y modificado de (Rosset et al., 2017; van den Ouweland et al., 2011)

Identificación de los casos únicos y familiares.

Se realizó el ensayo de MLPA en los familiares de los 6 pacientes disponibles en quienes se identificó una VGP para corroborar que fueran casos únicos o familiares (

Tabla 13). En cuatro pacientes (ET-104, ET-178, ET-254 y TSC1) se corroboró que se tratan de casos únicos al no identificar una VGP en los progenitores previamente considerados como sanos, por exploración física y estudios de gabinete (ET-104, ET-178 y TSC1) o únicamente por clínica (ET-254) (

Tabla 13). El paciente ET-183 se considera como único a pesar de que sólo se realizó estudio molecular en la madre previamente considerada como sana ya que el padre no estaba disponible; sin embargo, fue considerado como sano por datos clínicos y estudios de gabinete. Finalmente, se confirmó como caso familiar a la paciente ET-90 al identificar la misma VGP (Figura 10) en la hermana (ET-91) y madre (ET-92), las cuales se consideraron afectadas por árbol genealógico y criterios clínicos.

Tabla 13. Resultados del estudio por MLPA de los familiares de primer grado de aquellos casos con delección caracterizada.

# identificación	Dx clínico	TSC1	TSC2	Tipo de caso
ET-90	Df	NL	Exones 17-36 NG_005895.1:g.(26119_26142)_(40891_40914)del	Fam
ET-91 (Hermana)	Df		Exones 17-36 NG_005895.1:g.(26119_26142)_(40891_40914)del	
ET-92 (Madre)	Df		Exones 17-36 NG_005895.1:g.(26119_26142)_(40891_40914)del	
ET-104	Df	NL	Exones 1-15 NG_005895.1:g.(?_3708)_(19967_19990)del	de novo
ET-105 (Madre)	S		NL	
ET-106 (Padre)	S		NL	
ET-178	Df	NL	Exones 1-42 y 40-46 de PKD1 NC_000016.10:g.(?_2098012)_(2142131_?)del	de novo
ET180 (Madre)	S		NL	
ET-179 (Padre)	S		NL	
ET-183	Df	NL	Exones 31-42 y 40-46 de PKD1 NC_000016.10:g.(2131791-2131814)_(2142131_?)del	de novo
ET-184 (Madre)	S		NL	
ET-254	Df	Exones 15-23 NG_012386.1: g.(43701_43724)_(529 33_?)del	NL	de novo
ET-272 (Madre)	S	NL		
ET-271 (Padre)	S	NL		
TSC1	Df	NL	Exones 31-42 y 40-46 de PKD1 NC_000016.10:g.(2131791-2131814)_(2142131_?)del	de novo
TSC2 (Madre)	S		NL	
TSC7 (Padre)	S		NL	

Dx: diagnóstico; NL: normal sin cambios; S: Sano, Df: Definitivo, Fam: familiar

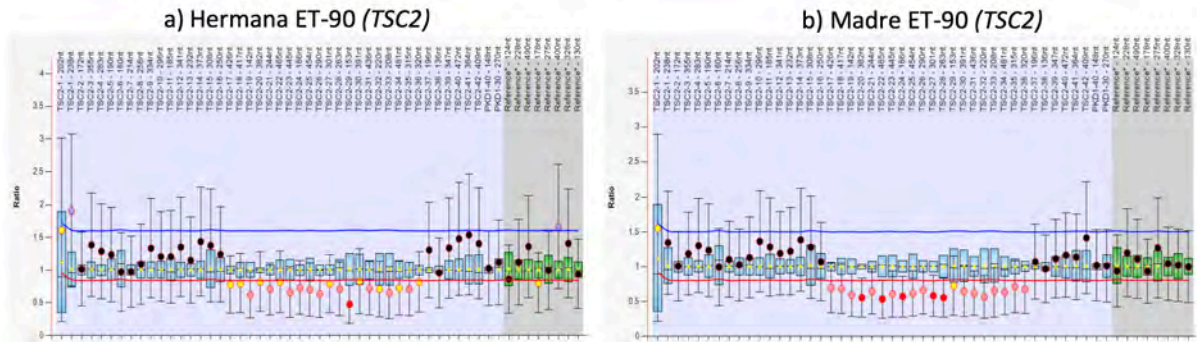


Figura 10. Gráfica del ensayo de MLPA del caso familiar de ET-90. Representación esquemática de las regiones genómicas analizadas por la metodología de MLPA. Se observa la misma delección en la hermana a) y madre b), de los exones 17-36 en TSC2 que en el caso (b)) ya que la señal de fluorescencia (círculos) se encuentra por debajo de la línea roja.

DISCUSIÓN

El complejo esclerosis tuberosa es una entidad genética y hereditaria con expresividad variable en el fenotipo y amplia heterogeneidad en el espectro de las variantes génicas patogénicas. Es causada por VGP en alguno de los genes *TSC1* o *TSC2*; a la fecha se han reportado todos los tipos de variantes en ambos genes por lo que detectarlas es un reto (Ismail et al., 2017). En el presente estudio se incluyeron a 23 casos en los que no se había identificado una VGP por medio de secuenciación Sanger para analizar deleciones y duplicaciones grandes por medio del ensayo de MLPA.

Sujetos de estudio

Los casos captados provienen de hospitales de tercer nivel donde es más frecuente que acudan pacientes con patologías más graves, lo que explica que el 100% de pacientes tenían diagnóstico definitivo de CET.

El 61% de los pacientes fueron femeninos, esta proporción es distinta a lo reportado en la literatura donde se ha establecido que no hay predominio por algún género entre los afectados con CET en general (Leung, Uk, Robson, & Glasg, 2007), esta discrepancia es muy probable que se deba a que el tamaño de la muestra en este trabajo es pequeña.

El estudio se realizó en una institución de atención pediátrica por lo que la mayoría de los casos (74%) corresponden a este grupo poblacional y explica que el promedio de edad al diagnóstico sea de 7.7 años con una desviación estándar de 8.1. El 26% de los pacientes fueron referidos de otras instituciones pero sólo un caso (ET-257) era mayor de edad.

Por historia familiar y estudio clínico se observó que el 74% de los sujetos correspondían a casos únicos, lo cual es mayor a lo reportado ya que se considera que en dos tercios (66%) de los pacientes no hay antecedentes familiares de la enfermedad (Lam et al., 2017). Esta discrepancia puede deberse a que la muestra es pequeña y que en cuatro casos (ET-4, ET-7, ET-32 y ET-44) no se contaba con los datos de los estudios de gabinete y exploración física de alguno de los progenitores por lo que no se puede descartar que presenten datos de expresión mínima de la patología y por lo tanto se traten de casos familiares.

En los dos casos en los que no se pudo establecer si se trataban de únicos o familiares (ET-61 y ET-81), no se identificó alguna VGP por el ensayo de MLPA por lo que se consideran candidatos a un tercer estudio molecular, utilizando la metodología de NGS para poder confirmar el diagnóstico y realizar el análisis genético en los progenitores con el fin de brindar asesoramiento genético certero.

Caracterización de deleciones por MLPA

Se caracterizaron deleciones en seis de 23 pacientes (26%) por medio del estudio molecular de MLPA en quienes previamente no se había identificado alguna VGP por medio de PCR-secuenciación Sanger, lo cual es similar al 21-24% reportado en la literatura (Kozlowski et al., 2007, 2008) al utilizar el mismo abordaje molecular.

Las seis VGP identificadas fueron de tipo deleción sin encontrar duplicaciones; a la fecha en las bases de datos y en la literatura el 92-95% de los rearrreglos grandes corresponden a deleciones considerando ambos genes (<http://www.lovd.nl/3.0/home>, <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/all.php>). Las deleciones grandes se consideran como evidencia muy fuerte de patogenicidad ya que provoca la ausencia completa de la proteína (Richards et al., 2015); mientras que en una duplicación, la proteína que se

produce puede ser parcialmente funcional, haciéndola menos deletérea que la ausencia completa de la misma. Lo anterior, podría ocasionar un cuadro clínico leve que pase desapercibido y subdiagnosticado lo que podría explicar que no se detectaran duplicaciones en los individuos incluidos en este trabajo ya que los casos analizados presentaban diagnóstico clínico definitivo de la enfermedad con manifestaciones clínicas que condicionaron acudir a una Institución de tercer nivel, en donde es frecuente atender patologías severas.

Se ha reportado que *TSC1* está involucrado en aproximadamente el 7% de los rearrreglos grandes (Kwiatkowski, 2010; Rosset et al., 2017), en el presente estudio se identificó únicamente en un caso que correspondería al 4.3%. En el gen *TSC2* es más frecuente encontrar deleciones grandes (17.4%) (Kwiatkowski, 2010; Rosset et al., 2017) y de forma concordante a lo reportado, se identificó este tipo de VGP en cinco de los seis casos analizados (21%). En (Kozlowski et al., 2007) se reporta 11.4% de deleciones que incluyen al gen adyacente *PKD1*, similar al presente estudio en donde se identificaron 3 casos (13%). Estos porcentajes engloban a pacientes con CET con VGP identificada por distintas técnicas moleculares (PCR-secuenciación Sanger, MLPA, *Southern blot* y FISH) y abarcan VGP pequeñas y grandes.

Caso ET-90

En esta paciente la deleción involucra a los exones 17-36 de *TSC2* y afecta los sitios de fosforilación regulados por PI3K y el dominio regulado por GAP; mediante el estudio molecular se corroboró que es un caso familiar con los tres miembros afectados con diagnóstico definitivo de CET (caso índice, madre y la hermana). En esta familia se puede brindar asesoramiento de certeza e incluso ofrecer diagnóstico prenatal; sin embargo, no se pudo definir si presentan expresividad variable ya que dejaron de acudir al INP y no se cuenta con una descripción detallada de las manifestaciones clínicas ni se puede establecer una correlación genotipo-fenotipo dado que es una deleción previamente no reportada. En (Kozlowski et al., 2007) reportan un caso con una deleción que involucra los exones 17-41 de *TSC2* que afecta los mismos dominios sin embargo no describen las manifestaciones clínicas que presentaba por lo que no se puede concluir si esta región se asocia con un fenotipo leve o grave de CET. Se estima que se puede identificar una VGP en el 75-90% de los casos con diagnóstico definitivo de CET (Northrup & Krueger, 2013); por lo que este caso ejemplifica que los criterios clínicos tienen adecuada sensibilidad ya que se logró corroborar el diagnóstico por el estudio molecular.

Caso ET-104

En este paciente no se tiene delimitada la extensión de la deleción hacia la región 5' pero considerando sólo el involucro de los exones 1 a 15 de *TSC2*, en literatura se han reportado casos que afectan esos mismos exones en tres publicaciones (Jang et al., 2012; Longa et al., 2001; Priya & Dalal, 2012) y están registrados en las bases de datos LOVD y HGMD. En Longa et al., reportan tres casos únicos con deleción de los exones 1-15 identificada por la metodología de *Southern blot* y PCR extensa (LR-PCR, "long range PCR" por sus siglas en inglés). Tenían diagnóstico de CET de acuerdo a los criterios previos de Gomez; sin embargo, no describen las manifestaciones que presentaban los pacientes. En la Tabla 12 se comparan los otros dos casos donde describen el fenotipo (Jang et al. y Priya et al.) con los datos de nuestro paciente y se observa que el único criterio mayor presente en los tres pacientes son los nódulos subependimarios así como la presencia de epilepsia, esto último acorde a literatura, dado que la afección neurológica se ha asociado con mayor frecuencia al presentar VGP en *TSC2* (Curatolo et al., 2015).

Cabe resaltar que ET-104 desarrolló SEGA, el cual fue diagnosticado por presentar hidrocefalia incipiente sin afectar estructuras adyacentes. Requirió resección quirúrgica del tumor a los nueve años de edad sin complicaciones postquirúrgicas; desde entonces no ha presentado recurrencia del tumor y las crisis convulsivas han permanecido controladas. El desarrollo del SEGA en CET ocurre en las primeras dos

décadas de vida y se presenta en el 15-20% de los pacientes, está descrito que ocurre con mayor frecuencia en pacientes con VGP en *TSC2* (David N. Franz et al., 2015; Henske et al., 2016) lo que es acorde a nuestro paciente; sin embargo, no se ha establecido en la literatura que se asocie a un tipo de VGP específico o que dependa del dominio de la proteína que se afecte (DJ et al., 2015). Los pacientes con SEGA implican un interés especial ya que se consideran candidatos al tratamiento médico con inhibidores de mTOR. Actualmente, estos fármacos se han implementado como primera línea de tratamiento para el tumor ya que se ha demostrado una reducción significativa del tamaño del SEGA durante los primeros seis meses de tratamiento ($p < 0.001$), una disminución en la frecuencia de las crisis convulsivas y mejoría en otras lesiones como angiofibromas faciales, angiomiolipomas y linfangioleiomiomatosis (David N. Franz et al., 2015), por lo que sería una alternativa de manejo en nuestro paciente en caso de presentar una recurrencia del SEGA.

Los beneficios de contar con un diagnóstico molecular en el caso de ET-104 son que permitió corroborar que se trata de un caso único al descartar en los padres la VGP y brindar asesoramiento certero. Así como, ofrecer diagnóstico prenatal en el paciente dependiendo de la evolución neurológica ya que actualmente presenta discapacidad intelectual moderada, requiere apoyo escolar para el aprendizaje, pero es autosuficiente en casa por lo que en el futuro se valorará su coeficiente intelectual y capacidad de toma de decisiones sobre su pronóstico reproductivo.

Síndrome de genes contiguos

En tres de los seis casos (ET-178, ET-183 y *TSC1*) en quienes se identificó una VGP, se confirmó que se trata de síndrome de genes contiguos (PKDTS) ya que la delección involucra a *TSC2* y al gen adyacente *PKD1*. Establecer este diagnóstico de certeza es de suma importancia ya que permite: definir el pronóstico renal de forma más precisa, debido a que en PKDTS la enfermedad renal crónica es de inicio temprano con deterioro en la adolescencia (Lim et al., 2014); dirigir la vigilancia con adecuado monitoreo de la presión arterial e inicio farmacológico oportuno con el fin de retrasar la pérdida de la función renal con el uso de medicamentos (David Neal Franz et al., 2010) y descartar otras complicaciones propias de esta entidad que de manera habitual no forman parte del seguimiento en CET como quistes en páncreas e hígado o aneurismas intracraneales (Chen et al., 2001).

En el caso de ET-178, actualmente de 14 años y 9 meses de edad, llama la atención que a diferencia de la mayoría de los pacientes con PKDTS donde se espera identificar múltiples quistes a edades tempranas, sólo se identificó por USG renal un quiste (< 10 mm) en el riñón derecho a los cuatro años de edad y permaneció sin cambios en los ultrasonidos de control posteriores hasta los 13 años y 7 meses de edad. Al integrarse el diagnóstico de PKDTS se realizó una resonancia magnética para evaluar con mayor precisión el involucro renal; este estudio reveló más de 25 quistes pequeños de tamaño variable (promedio 9mm) en ambos riñones. Adicionalmente, se descartaron quistes hepáticos y aneurismas intracraneales a la edad de 13 años y 7 meses; sin embargo, se requiere mantener en vigilancia con estudios de imagen cada tres a cinco años ya que pueden presentar posteriormente (Pirson, Chauveau, & Torres, 2002).

Cabe resaltar que en ET-178, la delección caracterizada es la de mayor extensión de los seis casos del presente estudio, abarca todos los exones de *TSC2* y por lo menos los últimos seis de *PKD1*, como ya se mencionó el fenotipo renal es leve dado que presenta múltiples quistes pequeños de forma bilateral, detectables únicamente por resonancia magnética, lo cual difiere de la mayoría de los casos de PKDTS donde se describe múltiples quistes de gran tamaño que pueden detectarse por USG durante la infancia (Back, Andronikou, Kilborn, Kaplan, & Darge, 2015). Se ha propuesto que en los casos de PKDTS con involucro renal más leve puede deberse a mosaicismo o genes modificadores que contrarresten el efecto de la delección de *TSC2/PKD1* (Consugar et al., 2008). En este caso, se descartó el mosaicismo ya que en los resultados del ensayo de MLPA se observó una reducción de 0.5 de los valores de la señal de fluorescencia en todas las sondas.

La variabilidad en la progresión de la enfermedad renal entre los pacientes con PKDTS no se ha definido que se deba por la VGP dado que no se ha podido establecer una clara correlación genotipo-fenotipo. La fisiopatología implicada en la formación de quistes en la poliquistosis renal es muy compleja y puede involucrar otros factores genéticos y/o ambientales no relacionados con el genotipo (Yan et al., 2006). Una posibilidad son los genes modificadores los cuales se han descrito en otras enfermedades monogénicas, como ejemplo de ello es lo descrito por (Artuso et al., 2012) quienes por estudio de microarreglos identificaron al gen *CROCC* como modificador del síndrome de Rett, al observar en dos hermanas con la misma VGP en *MECP2* una variante en el número de copias (CNV) en *CROCC*; en donde la paciente con un fenotipo leve presentaba una duplicación; mientras que la otra hermana con el cuadro clásico de Rett presentaba una delección. Un candidato como gen modificador de PKDTS es *SSTR5* que codifica para el receptor de somatostatina, el cual se localiza en 16p13.3, al igual que *TSC2* y porque se ha estudiado como blanco terapéutico para pacientes con poliquistosis renal ya que los agonistas de somatostatina han demostrado que inhiben el crecimiento de los quistes hepáticos y renales (Cramer & Guay-Woodford, 2015). La delección caracterizada en ET-178 no se ha delimitado con exactitud hacia los extremos 5' y 3', por lo que consideramos necesario realizar microarreglos cromosómicos de alta resolución para definir que otros genes están involucrados y que pudieran explicar el fenotipo renal leve que presenta.

Con respecto a ET-183 y *TSC1*, se sospechó en esta entidad desde su ingreso al INP ya que se identificaron múltiples quistes renales de gran tamaño y bilaterales por USG, el cual fue solicitado como parte del seguimiento de CET (Krueger & Northrup, 2014). Ambos pacientes presentan el fenotipo clásico de PKDTS caracterizado por múltiples quistes de gran tamaño a una edad temprana y no se identificaron angiomiolipomas. Una vez integrado el diagnóstico, se descartaron aneurismas intracraneales en ambos casos, se evaluó la función renal la cual permanece en rangos normales a la edad actual de 17 años 9 meses y 17 años 6 meses, respectivamente y descartaron quistes hepáticos a la edad de 7 meses en ET-183 y de 15 años 5 meses en *TSC1*. La VGP identificada en ambos, no ha sido reportada previamente, sin embargo (Oyazato et al., 2011) describe dos pacientes con deleciones similares identificadas por MLPA que afectan un sitio de fosforilación regulado por PI3K, el dominio regulado por GAP y la región hélice superenrollada de *PKD1* (**Error! Reference source not found.**). Cabe resaltar que los pacientes reportados por Oyazato et al., a la edad de 3 y 7 años presentaban enfermedad renal crónica y se describe que la delección involucraba a todo el gen *PKD1*; a diferencia de los pacientes del presente estudio que tienen la función renal conservada en la adolescencia pero sin tener delimitada completamente la extensión de la VGP, aunque por el ensayo de MLPA conocemos que abarca por lo menos los últimos seis exones de *PKD1*. Por lo anterior, consideramos que en nuestros casos será de utilidad definir la extensión de la delección por estudio de microarreglos cromosómicos para tratar de establecer si existe una correlación de la evolución de la afección renal dependiendo del tamaño de la VGP en el gen *PKD1*.

Dentro de las utilidades que tiene el diagnóstico molecular en estos tres casos (ET-178, ET-183 y *TSC1*), es que permitió establecer un diagnóstico de certeza de PKDTS, el cual en el caso de ET-178 podría haberse retrasado dado el fenotipo renal leve; sin embargo, dada la VGP identificada permitirá que los pacientes tengan un seguimiento clínico nefrológico más estrecho. En ET-178 y *TSC1* se pudo confirmar que se tratan de casos únicos al descartar la VGP en los progenitores; mientras que ET-183 también se considera como único, a pesar de que sólo se confirmó que la madre es sana por estudio molecular dado que el padre se consideraba sano por datos clínicos y estudios de gabinete en los cuales se había descartado expresividad mínima del padecimiento.

Caso ET-254

Esta paciente es el único caso en el que se identificó una VGP que involucraba al gen *TSC1*, la cual corresponde a una delección que abarca por lo menos de los exones 15 a 23 ya que el extremo 3' no se pudo delimitar. Esta variante no ha sido reportada previamente. A los 7 años se realizó diagnóstico definitivo de CET con epilepsia, discapacidad intelectual y dificultades en el aprendizaje; se desconoce la evolución

clínica debido a que es paciente referida de otra institución, por lo que no es posible hacer una correlación fenotipo/genotipo; sin embargo, se esperaría, de acuerdo a lo descrito en literatura, una evolución con mayor afección cutánea y menor afección neurológica al tener una VGP en *TSC1* comparado con pacientes con afección de *TSC2* (Au et al., 2007; Chu-Shore et al., 2010).

Previo al ensayo de MLPA, únicamente se sabía por datos clínicos que los progenitores eran considerados sanos pero no se tenía información sobre los estudios de gabinete por lo que no se había descartado expresión mínima en ellos. Una vez realizado el análisis molecular, se descartó que alguno de los padres presentara la misma VGP con la posibilidad de brindar un asesoramiento de certeza como caso *de novo*.

En el presente estudio, se logró caracterizar deleciones en seis de los 23 pacientes incluidos. Actualmente, 17 de ellos persisten sin identificación de una VGP por las metodologías de PCR-Secuenciación Sanger y MLPA. Se propone que los pacientes sin variante génica identificada se debe a que presentan un mosaicismo genético, que la VGP se encuentre en regiones no codificantes que no se evalúan de forma rutinaria como intrones, que alteren el splicing pero que se localicen lejos de los bordes con los exones, en promotores o enhancers; entre otras posibles causas. Se tiene planeado realizar en los casos en donde no identificamos VGP el estudio de *TSC1* y *TSC2* mediante secuenciación de nueva generación con lo que se estima lograr una detección de VGP en el 85% e identificación de mosaicismo en el 58% (Tyburczy et al., 2015). La utilidad clínica de caracterizar una VGP en los pacientes con CET es muy amplia: permite confirmar el diagnóstico en aquellos pacientes que se consideren con diagnóstico posible por criterios clínicos, se puede distinguir los casos únicos de los casos familiares en donde los progenitores presenten fenómeno de no penetrancia, se puede dirigir la vigilancia y manejo de forma específica de acuerdo con la VGP caracterizada como en el caso de PKDTS, permite brindar asesoramiento genético de certeza e incluso ofrecer diagnóstico prenatal.

CONCLUSIONES

- La metodología de MLPA permitió identificar VGP en 26% (6 de 23) de los casos, similar a lo reportado en la literatura.
- Las VGP identificadas por el ensayo de MLPA son deleciones que no han sido reportada previamente en la literatura, lo que corrobora que el CET presenta una amplia heterogeneidad alélica.
- De las VGP identificadas no se detectaron duplicaciones, las cuales se refiere que podrían ocasionar un cuadro clínico leve y condicionar que los pacientes con este tipo de VGP no acudan a un Instituto de tercer nivel de atención médica como el nuestro.
- Se identificaron cinco deleciones en *TSC2* y una en *TSC1*, lo cual es acorde a lo publicado ya que *TSC2* se asocia con mayor frecuencia a rearrreglos grandes.
- Por medio del ensayo de MLPA se pudo corroborar lo observado por clínica con relación a la clasificación de un caso familiar (ET-90) y cinco casos únicos (ET-104, ET-178, ET-183, ET-254 y TSC1).
- No se identificaron familiares de primer grado con fenómeno de expresividad mínima o no penetrancia.
- El desarrollo de SEGA en el paciente ET-104 está acorde a la literatura dado que se menciona que es más frecuente en pacientes que tienen una VGP en *TSC2*, sin embargo, no se puede establecer que este dependa del tipo de VGP ya que no se ha descrito que las deleciones se asocien con una mayor frecuencia del tumor.
- El involucro renal leve, con múltiples quistes pequeños, en el caso ET-178, es discrepante a lo descrito en la literatura en la mayoría de pacientes con síndrome de genes contiguos en quienes se espera observar múltiples quistes de gran tamaño detectables desde la infancia. Dado que se sugiere que otros factores genéticos y/o ambientales podrían ser los causales de esta diferencia, en nuestro paciente se propone definir la extensión de la deleción mediante microarreglos cromosómicos y de acuerdo a ello establecer si otros genes involucrados podrían estar modificando el fenotipo en el desarrollo de quistes renales.
- En los pacientes ET-178, ET-183 y TSC1 el diagnóstico molecular de PKDTS; es de gran utilidad clínica para su vigilancia y tratamiento específico a nivel renal así como para descartar otras complicaciones como aneurismas cerebrales y quistes hepáticos que de forma rutinaria no se realizaría como seguimiento de CET.
- En los casos sin VGP identificada se realizará secuenciación de nueva generación para tratar de identificarlas en regiones no codificantes o bien establecer si son casos de CET con una VGP con mosaicismo bajo.

BIBLIOGRAFIA

- Aronow, M. E., Nakagawa, J. A., Gupta, A., Traboulsi, E. I., & Singh, A. D. (2012). Tuberous sclerosis complex: Genotype/phenotype correlation of retinal findings. *Ophthalmology*, *119*(9), 1917–1923. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2012.03.020>
- Artuso, R., Papa, F. T., Grillo, E., Mucciolo, M., Yasui, D. H., Dunaway, K. W., ... Ariani, F. (2012). Investigation of modifier genes within copy number variations in Rett syndrome, *57*(5), 342–344. <https://doi.org/10.1038/jhg.2012.30>
- Au, K. S., Williams, A. T., Roach, E. S., Batchelor, L., Sparagana, S. P., Delgado, M. R., ... Northrup, H. (2007). Genotype/phenotype correlation in 325 individuals referred for a diagnosis of tuberous sclerosis complex in the United States. *Genetics in Medicine*, *9*(2), 88–100. <https://doi.org/10.1097/GIM.0b013e31803068c7>
- Back, S. J., Andronikou, S., Kilborn, T., Kaplan, B. S., & Darge, K. (2015). Imaging features of tuberous sclerosis complex with autosomal-dominant polycystic kidney disease: a contiguous gene syndrome. *Pediatric Radiology*, *45*(3), 386–395. <https://doi.org/10.1007/s00247-014-3147-1>
- Bisceglia, M., Galliani, C., Carosi, I., Simeone, A., & Ben-Dor, D. (2008). Tuberous sclerosis complex with polycystic kidney disease of the adult type: the TSC2/ADPKD1 contiguous gene syndrome. *Int J Surg Pathol*, *16*(4), 375–385. <https://doi.org/10.1177/1066896908319578>
- Boehm, D., Bacher, J., & Neumann, H. P. H. (2007). Gross Genomic Rearrangement Involving the TSC2-PKD1 Contiguous Deletion Syndrome: Characterization of the Deletion Event by Quantitative Polymerase Chain Reaction Deletion Assay. *American Journal of Kidney Diseases*, *49*(1). <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2006.10.024>
- Cai, Y., Li, H., & Zhang, Y. (2017). Assessment of Tuberous Sclerosis Complex Associated With Renal Lesions by Targeted Next-generation Sequencing in Mainland China. *Urology*, *101*, 170.e1-170.e7. <https://doi.org/10.1016/j.urology.2016.10.056>
- Camposano, S. E., Greenberg, E., Kwiatkowski, D. J., & Thiele, E. A. (2009). Distinct clinical characteristics of Tuberous Sclerosis with no mutation identified, 141–146. <https://doi.org/10.1111/j.1469-1809.2008.00496.x>
- Chen, Y. L., Luo, C. B., Hsu, S. W., Rodesch, G., & Lasjaunias, P. (2001). Tuberous sclerosis complex with an unruptured intracranial aneurysm: manifestations of contiguous gene syndrome. *Interventional Neuroradiology: Journal of Peritherapeutic Neuroradiology, Surgical Procedures and Related Neurosciences*, *7*(4), 337–41. <https://doi.org/10.1177/10522817010070040337> [pii]
- Choi, J. E., Chae, J. H., Hwang, Y. S., & Kim, K. J. (2006). Mutational analysis of TSC1 and TSC2 in Korean patients with tuberous sclerosis complex. *Brain and Development*, *28*(7), 440–446. <https://doi.org/10.1016/j.braindev.2006.01.006>
- Chu-Shore, C. J., Major, P., Camposano, S., Muzykewicz, D., & Thiele, E. A. (2010). The natural history of epilepsy in tuberous sclerosis complex. *Epilepsia*, *51*(7), 1236–1241. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2009.02474.x>
- Chu-Shore, C. J., Major, P., Montenegro, M., & Thiele, E. (2009). Cyst-like tubers are associated with TSC2 and epilepsy in tuberous sclerosis complex. *Neurology*, *72*(13), 1165–1169. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000345365.92821.86>
- Consugar, M. B., Wong, W. C., Lundquist, P. A., Rossetti, S., Kubly, V. J., Walker, D. L., ... Harris, P. C. (2008). Characterization of large rearrangements in autosomal dominant polycystic kidney disease and the PKD1/TSC2 contiguous gene syndrome. *Kidney International*, *74*(11), 1468–79. <https://doi.org/10.1038/ki.2008.485>
- Cramer, M. T., & Guay-Woodford, L. M. (2015). Cystic Kidney Disease: A Primer. *Advances in Chronic Kidney Disease*, *22*(4), 297–305. <https://doi.org/10.1053/j.ackd.2015.04.001>
- Curatolo, P., Moavero, R., Roberto, D., & Graziola, F. (2015). Genotype/Phenotype Correlations in Tuberous Sclerosis Complex. *Seminars in Pediatric Neurology*, *22*(4), 259–273. <https://doi.org/10.1016/j.spen.2015.10.002>
- Dixon, B. P., Hulbert, J. C., & Bissler, J. J. (2011). Tuberous sclerosis complex renal disease. *Nephron*.

- Experimental Nephrology*, 118(1), e15-20. <https://doi.org/10.1159/000320891>
- DJ, K., MR, P., Jozwiak, S., Bissler, J., Franz, D., Segal, S., ... JR, S. (2015). - Response to everolimus is seen in TSC-associated SEGAs and angiomyolipomas independent of mutation type and site in TSC1 and TSC2. LID - 10.1038/ejhg.2015.47 [doi]. *Eur J Hum Genet*, 23(October 2014), 47. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2015.47>
- Franz, D. N., Agricola, K., Mays, M., Tudor, C., Care, M. M., Holland-Bouley, K., ... Krueger, D. A. (2015). Everolimus for subependymal giant cell astrocytoma: 5-year final analysis. *Annals of Neurology*, 78(6), 929–938. <https://doi.org/10.1002/ana.24523>
- Franz, D. N., Bissler, J. J., & McCormack, F. X. (2010). Tuberous Sclerosis Complex: Neurological, Renal and Pulmonary Manifestations. *Neuropediatrics*, 41(5), 199–208. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1269906>
- Greenberg, D. S., Sunada, Y., Campbell, K. P., Yaffe, D., & Nudel, U. (1994). © 1994 Nature Publishing Group <http://www.nature.com/naturegenetics>. *Nature*, 8(4), 340–344. <https://doi.org/10.1038/ng1294-340>
- Henske, E. P., Józwiak, S., Kingswood, J. C., Sampson, J. R., & Thiele, E. A. (2016). Tuberous sclerosis complex. *Nature Reviews Disease Primers*, 2(May), 16035. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.35>
- Ismail, N. F. D., Rani, A. Q., Nik Abdul Malik, N. M. A., Boon Hock, C., Mohd Azlan, S. N., Abdul Razak, S., ... Zabidi-Hussin, Z. A. M. H. (2017). Combination of Multiple Ligation-Dependent Probe Amplification and Illumina MiSeq Amplicon Sequencing for TSC1/TSC2 Gene Analyses in Patients with Tuberous Sclerosis Complex. *Journal of Molecular Diagnostics*, 19(2), 265–276. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2016.10.009>
- Jang, M., Bong, S., Hun, J., Hyang, M., Pyo, M., Shin, H., ... Ki, C. (2012). Identification of TSC1 and TSC2 Mutations in Korean Patients With Tuberous Sclerosis Complex. *Pediatric Neurology*, 46(4), 222–224. <https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2012.02.002>
- Jansen, F. E., Braams, O., Vincken, K. L., Algra, A., Anbeek, P., Jennekens-Schinkel, A., ... Nellist, M. (2008). Overlapping neurologic and cognitive phenotypes in patients with TSC1 or TSC2 mutations. *Neurology*, 70(12), 908–915. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000280578.99900.96>
- Jozwiak, J., Jozwiak, S., & Oldak, M. (2006). Molecular activity of sirolimus and its possible application in tuberous sclerosis treatment. *Medicinal Research Reviews*, 26(2), 160–180. <https://doi.org/10.1002/med.20049>
- Jr, F. J. D. (2015). Tu b e ro u s S c l e ro s i s Complex, 62, 633–648.
- Kacerovska, D., Vrtel, R., Michal, M., Vanecek, T., Vodicka, R., Kreuzberg, B., ... Kazakov, D. V. (2009). TSC2/PKD1 Contiguous Gene Syndrome: A Report of 2 Cases With Emphasis on Dermatopathologic Findings. *American Journal of Dermatopathology*, 31(6), 532–541. <https://doi.org/10.1097/DAD.0b013e3181970e44>
- Kotulska, K., Borkowska, J., Mandera, M., Roszkowski, M., Jurkiewicz, E., Grajkowska, W., ... Józwiak, S. (2014). Congenital subependymal giant cell astrocytomas in patients with tuberous sclerosis complex. *Child's Nervous System*, 30(12), 2037–2042. <https://doi.org/10.1007/s00381-014-2555-8>
- Kozlowski, P., Jasinska, A. J., & Kwiatkowski, D. J. (2008). New applications and developments in the use of multiplex ligation-dependent probe amplification. *Electrophoresis*, 29(23), 4627–4636. <https://doi.org/10.1002/elps.200800126>
- Kozlowski, P., Roberts, P., Dabora, S., Franz, D., Bissler, J., Northrup, H., ... Kwiatkowski, D. J. (2007). Identification of 54 large deletions/duplications in TSC1 and TSC2 using MLPA, and genotype-phenotype correlations. *Human Genetics*, 121(3–4), 389–400. <https://doi.org/10.1007/s00439-006-0308-9>
- Krueger, D., & Northrup, H. (2014). Tuberous Sclerosis Complex Surveillance and Management: Recommendations of the 2012 International Tuberous Sclerosis Complex Consensus Conference. *Pediatr Neurol*, 49, 255–265. <https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2013.08.002>
- Kwiatkowski, D. J. (2010). *Part II Genetics Genetics of Tuberous Sclerosis Complex*.
- Kwiatkowski, D. J., Ph, D., Manning, B. D., & Ph, D. (2014). clinical implications of basic research Molecular Basis of Giant Cells in Tuberous Sclerosis Complex, 1, 778–780.
- Lam, H. C., Nijmeh, J., & Henske, E. P. (2017). *New developments in the genetics and pathogenesis of tumours in tuberous sclerosis complex*. *Journal of Pathology*. <https://doi.org/10.1002/path.4827>
- Leung, A. K. C., Uk, F., Robson, W. L. M., & Glasg, F. (2007). Tuberous Sclerosis Complex : A Review, 21(2).

- <https://doi.org/10.1016/j.pedhc.2006.05.004>
- Li, J., Kim, S. G., & Blenis, J. (2014). Rapamycin: One drug, many effects. *Cell Metabolism*, *19*(3), 373–379. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.01.001>
- Lim, C. C., Tan, H., Thangaraju, S., Lai, A. H. M., & Foo, M. W. Y. (2014). End-stage renal disease in tuberous sclerosis complex-polycystic kidney disease contiguous gene syndrome: epidemiology, clinical manifestations and implications for transplantation. *International Urology and Nephrology*, *46*(9), 1869–1870. <https://doi.org/10.1007/s11255-014-0735-9>
- Longa, L., Saluto, A., Brusco, A., Polidoro, S., Padovan, S., Allavena, A., ... Migone, N. (2001). TSC1 and TSC2 deletions differ in size, preference for recombinatorial sequences, and location within the gene. *Human Genetics*, *108*(2), 156–166. <https://doi.org/10.1007/s004390100460>
- MacArthur, D. G., Manolio, T. A., Dimmock, D. P., Rehm, H. L., Shendure, J., Abecasis, G. R., ... Gunter, C. (2014). Guidelines for investigating causality of sequence variants in human disease. *Nature*, *508*(7497), 469–476. <https://doi.org/10.1038/nature13127>
- Mahdieh, N., & Rabbani, B. (2013). An overview of mutation detection methods in genetic disorders. *Iranian Journal of Pediatrics*, *23*(4), 375–388.
- Northrup, H., & Krueger, D. A. (2013). Tuberous sclerosis complex diagnostic criteria update: recommendations of the 2012 International Tuberous Sclerosis Complex Consensus Conference. *Pediatric Neurology*, *49*, 243–54. <https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2013.08.001>
- Oyazato, Y., Iijima, K., Emi, M., Sekine, T., Kamei, K., Takanashi, J., ... Nozu, K. (2011). Molecular Analysis of TSC2 / PKD1 Contiguous Gene Deletion Syndrome, *57*(1).
- Pirson, Y., Chauveau, D., & Torres, V. (2002). Management of cerebral aneurysms in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, *13*(1), 269–276. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11752048>
- Priya, T. P., & Dalal, A. B. (2012). Tuberous Sclerosis : Diagnosis and Prenatal Diagnosis by MLPA. *The Indian Journal of Pediatrics*, *79*(October), 1366–1369. <https://doi.org/10.1007/s12098-011-0408-y>
- Qin, J., Wang, Z., Hoogeveen-Westerveld, M., Shen, G., Gong, W., Nellist, M., & Xu, W. (2016). Structural basis of the interaction between tuberous sclerosis complex 1 (TSC1) and tre2-bub2-cdc16 domain family member 7 (TBC1D7). *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.701870>
- Qin, W., Kozlowski, P., Taillon, B. E., Bouffard, P., Holmes, A. J., Janne, P., ... Kwiatkowski, D. J. (2010). Ultra deep sequencing detects a low rate of mosaic mutations in tuberous sclerosis complex. *Human Genetics*, *127*(5), 573–582. <https://doi.org/10.1007/s00439-010-0801-z>
- Ramandi, H., Mohammad, S., Ghaderian, H., & Toosi, P. (2014). TSC2 Deletions and Duplications : A Descriptive Study in Iranian Patients Affected with Tuberous Sclerosis, (July), 163–167.
- Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., ... Rehm, H. L. (2015). Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in Medicine*, *17*(5), 405–423. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>
- Roach, E. S. (2016). Applying the Lessons of Tuberous Sclerosis: The 2015 Hower Award Lecture. *Pediatric Neurology*, *63*, 6–22. <https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2016.07.003>
- Rosset, C., Netto, C. B. O., & Ashton-Prolla, P. (2017). TSC1 and TSC2 gene mutations and their implications for treatment in Tuberous Sclerosis Complex: a review. *Genetics and Molecular Biology*, *79*, 0. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2015-0321>
- Schouten, J. P., McElgunn, C. J., Waaijer, R., Zwijnenburg, D., Diepvens, F., & Pals, G. (2002). Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Research*, *30*(12), e57. <https://doi.org/10.1093/nar/gnf056>
- Tyburczy, M. E., Dies, K. A., Glass, J., Camposano, S., Chekaluk, Y., Thorner, A. R., ... Kwiatkowski, D. J. (2015). Mosaic and Intronic Mutations in TSC1/TSC2 Explain the Majority of TSC Patients with No Mutation Identified by Conventional Testing. *PLoS Genetics*, *11*(11), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005637>
- van den Ouweland, A. M. W., Elfferich, P., Zonnenberg, B. a, Arts, W. F., Kleefstra, T., Nellist, M. D., ... Halley, D. J. J. (2011). Characterisation of TSC1 promoter deletions in tuberous sclerosis complex patients. *European Journal of Human Genetics : EJHG*, *19*(2), 157–63.

<https://doi.org/10.1038/ejhg.2010.156>

- Van Dijk, E. L., Auger, H., Jaszczyszyn, Y., & Thermes, C. (2014). Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends in Genetics*, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2014.07.001>
- van Veghel-Plandsoen, M. M., Wouters, C. H., Kromosoeto, J. N. R., den Ridder-Klünne, M. C., Halley, D. J. J., & van den Ouweland, A. M. W. (2011). Multiplex ligation-dependent probe amplification is not suitable for detection of low-grade mosaicism. *European Journal of Human Genetics*, 19(9), 1009–1012. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2011.60>
- Yan, D., Ke, X., Blanton, S. H., Ouyang, X. M., Pandya, a, Du, L. L., ... Liu, X. Z. (2006). A novel locus for autosomal dominant non-syndromic deafness, DFNA53, maps to chromosome 14q11.2-q12. *Journal of Medical Genetics*, 43(2), 170–4. <https://doi.org/10.1136/jmg.2005.034710>
- Zeng, L. H., Rensing, N. R., Zhang, B., Gutmann, D. H., Gambello, M. J., & Wong, M. (2011). Tsc2 gene inactivation causes a more severe epilepsy phenotype than Tsc1 inactivation in a mouse model of Tuberous Sclerosis Complex. *Human Molecular Genetics*, 20(3), 445–454. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq491>

Páginas web:

Leiden Open Variation Database (http://chromium.lovd.nl/LOVD2/TSC/home.php?select_db=TSC2). Último acceso el 04 Agosto, 2017.

The Human Gene Mutation Database. (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>). Último acceso el 04 Agosto, 2017.