



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
FACULTAD DE MEDICINA

**"ANÁLISIS DEL GEN *NF1* MEDIANTE MLPA EN PACIENTES CON
NEUROFIBROMATOSIS TIPO1"**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS MÉDICAS

PRESENTA

DR. JUAN MANUEL VALDÉS MIRANDA

TUTOR

DR. SERGIO ALBERTO CUEVAS COVARRUBIAS
SERVICIO DE GENÉTICA HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO

Ciudad de México, Diciembre de 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

ÍNDICE

| | |
|--|-----------|
| I.- SIGLAS Y ABREVIATURAS | 3 |
| II.- RESUMEN | 4 |
| III.- ANTECEDENTES | 6 |
| 1.- Manchas café con leche | 8 |
| 2.- Efélides | 9 |
| 3.- Nevo Anémico | 10 |
| 4.- Neurofibromas cutáneos | 12 |
| 5.- Neurofibroma subcutáneo | 13 |
| 6.- Neurofibromas plexiformes | 14 |
| 7.- Desarrollo de tumores en pacientes con nf1 | 15 |
| 8.- Nódulos de Lisch | 15 |
| 9.- Glioma de la vía óptica | 16 |
| 10.- Manifestaciones esqueléticas | 18 |
| 11.- Gen <i>NF1</i> | 22 |
| IV.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 25 |
| V.- JUSTIFICACIÓN | 26 |
| VI.- HIPÓTESIS | 27 |
| VII.- DISEÑO DEL ESTUDIO | 28 |
| VIII.- OBJETIVOS | 29 |
| IX.- MATERIAL Y MÉTODO | 30 |
| X.- ASPECTOS ÉTICOS Y DE BIOSEGURIDAD | 32 |
| XI.- RESULTADOS | 33 |
| XII.- DISCUSIÓN | 48 |
| XIII.- ANEXOS | 51 |
| XIV.- BIBLIOGRAFÍA | 55 |

I.- SIGLAS Y ABREVIATURAS

NF1: Neurofibromatosis tipo 1

INDELES: Inserciones-deleciones

MLPA: Ligadura Multiplex dependiente de sonda de amplificación

SUZ12P1: SUZ12 Polycomb complejo represivos subunidad 2 pseudogén 1

CRLF3-3: Factor 3 parecido al receptor de citocinas

ATAD5-2: *ATPase family, AAA domain containing 5*

ADAP2-3: ArfGAP with dual PH domains 2

RNF35: tripartite motif containing 40 (TRIM40)

UTP6-14: UTP6, small subunit processome component

LRRC37B: leucine rich repeat containing 37B

REP-A: replication protein A1

REP-C: replication protein C

NAHR: recombinación homóloga no alélica

TRAF4-4: TNF receptor associated factor 4

ADN: Ácido desoxiribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

PCR: Reacción en cadena de polimerasa

RT- PCR: Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

H-Ras: Harvey rat sarcoma virus oncogene

K-Ras: Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog

N-Ras: neuroblastoma RAS viral oncogene homolog

GAP: GTPase-activating protein

kDa: kilodaltones

Kb: kilobases

SALSA: Mezcla de componentes requeridos para el desarrollo del MLPA

II.- RESUMEN

Antecedentes.

La neurofibromatosis tipo I (NF1) presenta una incidencia de 1 en 2500-3500 en recién nacidos. Clínicamente, la neurofibromatosis se caracteriza por manchas cutáneas café con leche, efélides pequeñas en conglomerados primordialmente en párpados superiores, cuello, axilas e ingles.

Los nódulos de Lisch son la manifestación oftalmológica que se encuentra con más frecuencia en la neurofibromatosis, usualmente de color amarillo claro a café se manifiestan como elevaciones bien definidas, de superficie lisa, en domo proyectadas en la superficie del iris(1). Estas lesiones son hamartomas melanocíticos y junto con otras características cutáneas de la neurofibromatosis se originan en las células de la cresta neural (2). El nevo anémico se presenta ocasionalmente, como una mancha cutánea hipocrómica de forma redonda u ovalada con un contorno multilobulado, esta coloración es debida a una disminución de la vascularidad, y una característica de este nevo es que aún después de frotar la zona, permanece pálida, la presentación de estos nevos anémicos es de forma aislada o múltiple principalmente en tórax y abdomen, generalmente entre los 3 a 5 años y antes de que aparezcan los neurofibromas. Los neurofibromas cutáneos que se presentan como lesiones nodulares pueden ser de la piel (neurofibroma cutáneo) o de un nervio periférico. El neurofibroma es un tumor no encapsulado, firme, frecuentemente con degeneración mixoide, que corresponde a una proliferación mixta tanto de células de estirpe neurilemal (vaina de mielina) como fibroblásticas con fibras colágenas. El neurofibroma plexiforme se presenta como un engrosamiento irregular mal delimitado, fusiforme o nodular de los troncos nerviosos mayores. Otra alteración es el glioma de la vía óptica, siendo los subtipos más comunes los de grado I (astrocitomas pilocíticos) y los de grado II (astrocitomas pilomixoide). Los astrocitomas pilocíticos se encuentran más frecuentemente en los pacientes con NF1 y usualmente siguen un curso indolente, mientras que los astrocitomas pilomixoides se observan con menos frecuencia en NF1. (3) Las manifestaciones esqueléticas que se presentan más comúnmente son la escoliosis de diferente grado, displasia del esfenoides y

pseudoartrosis en fracturas que consolidan de forma inadecuada, causando deformaciones usualmente en fémur, tibia y peroné.

La NF1 tiene una herencia autosómica dominante con penetrancia completa. Es causada por defectos moleculares en el cromosoma 17q11.2, en el gen *NF1*, este es un gen grande con 60 exones, presenta un splicing alternativo y se expresa en la mayoría de los tejidos. El gen *NF1* codifica para la proteína neurofibromina 1, una proteína supresora de tumores que participa en la regulación del crecimiento y la proliferación celular. Un gran número de mutaciones se observan en los pacientes con NF1 (mutaciones puntuales, indels y deleciones del gen completo, incluyendo regiones flanqueantes). Las indels y las deleciones completas del gen *NF1* representan el 10% de todas las mutaciones en esta enfermedad.

El MLPA es un método de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) múltiple que permite la detección de alteraciones en el número de copias de hasta 50 secuencias diferentes de ADN o ARN genómico; es capaz de distinguir secuencias que difieren en un solo nucleótido y se realiza en el ADN genómico de los pacientes.

Metodología

El objetivo de este trabajo es determinar la frecuencia de deleciones y duplicaciones en el gen *NF1* mediante la técnica de MLPA (Ligadura Multiplex dependiente de sonda de amplificación) en una muestra de 40 pacientes mexicanos con neurofibromatosis tipo 1.

Resultados:

Se observaron seis deleciones en los 40 pacientes estudiados la mas grande fue una deleción completa del gen *NF1*, y genes flanqueantes (*ZUZ12P1*, *CRLF3-3*, *ATAD5-2*, *ADAP2-3*, *RNF35*, *NF1*, *UTP6-14*) y tres deleciones intragénicas entre las que se ven perdidos los exones (17, 30, 49), (17, 30, 49, 57), (49) (30) y finalmente una deleción en el gen *TRAF4-4*.

III.- ANTECEDENTES

La neurofibromatosis tipo 1 es un padecimiento neurocutáneo progresivo con un patrón de herencia autosómica dominante (50% de los casos son esporádicos y se atribuyen a una mutación de *novo*). Tiene expresividad clínica variable con alta penetrancia, su incidencia se calcula en 1 por 3500. La enfermedad es debida a mutaciones en el gen supresor de tumores NF1, localizado en 17q11.2.

El 95 % de las mutaciones de NF1 que se observan en la neurofibromatosis son mutaciones sin sentido, por sustituciones, mutaciones del sitio de corte y empalme, estas deleciones frecuentemente dan lugar a codones de paro prematuros.

Deleciones del Gen *NF1*

Solo 5% son debidas a deleciones que abarcan el gen *NF1* completo y regiones adyacentes a éste. Se han observado tres subtipos de estas grandes deleciones del gen *NF1*: tipo 1, tipo 2, y atípicos. La más común de estas deleciones es la tipo 1, que se extiende 1.4 Mb, abarcando 14 genes, incluyendo *NF1*(4).

Esta deleción tipo 1 se produce por la recombinación homóloga no alélica (NAHR) entre repeticiones cortas en número de copias que flanquean la región del gen *NF1*, denominadas *NF1-REP A* y *C*. (5). Esta recombinación en las deleciones tipo 1, se producen principalmente durante la meiosis materna (6). La deleción Tipo 2 es la segunda más común de las deleciones grandes del gen *NF1*. Abarca 1.2 Mb, y sus puntos de ruptura se encuentran en el gen *SUZ12* y su pseudogen *SUZ12P*. Por otro lado, *SUZ12* está separada de la región *NF1 REP-C* por 30 kb, mientras que existe un solapamiento de 4 kb entre *SUZ12P* y *NF1 REP-A* (Figura.1).

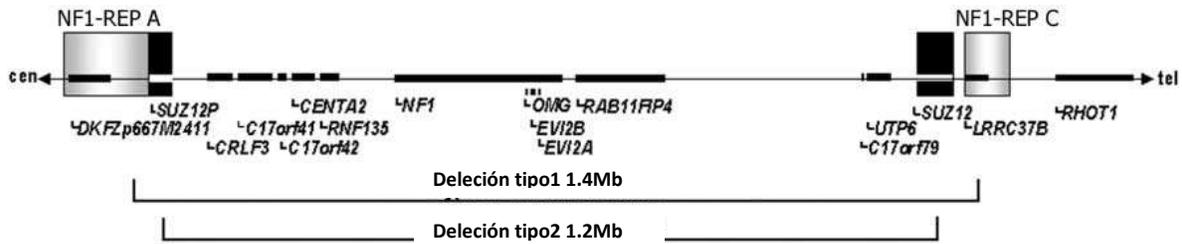


Figura 1. Mapa de la región del gen *NF1* que indica los tamaños relativos y los límites de las deleciones tipo 1, tipo 2. Los loci genéticos se indican como barras oscuras, y las posiciones de la *NF1-REP A* y *C* se indican con rectángulos grises. Las regiones *SUZ12* y *SUZ12P* se destacan en negro. CEN = centrómero; tel= telómero (4)

En las deleciones Tipo 2 se pierden 13 genes; a diferencia de la deleción tipo 1, permanecen el gen funcional *LRRC37B* con la región distal *NF1 REP-C* (7), las deleciones atípicas son las menos frecuentes de las grandes deleciones, con tamaños variables y generalmente tiene diferentes puntos de ruptura, sobrelapándose en algunas ocasiones a la deleción típica 1.(8)

Manifestaciones clínicas

La enfermedad se caracteriza por; a) múltiples manchas café con leche, se observan en los primeros meses de vida y siguen aumentando hasta los 2 años, b) efélides del mismo color que las manchas café con leche, más pequeñas y se distribuyen en conglomerados que se encuentran primordialmente en axilas, ingles, sobre los párpados superiores y alrededor del cuello, algunos pacientes las tienen diseminadas en la cara alrededor de los labios, tronco y parte proximal de las extremidades, en pacientes del sexo femenino pueden encontrarse debajo de las mamas(9), c) los neurofibromas cutáneos son tumores benignos que pueden presentarse en cualquier nervio periférico, existen cuatro tipos: cutáneos discretos, subcutáneos discretos, plexiformes difusos y nodulares. Estos raramente se presentan en los niños, los cutáneos pueden ser pediculados o sésiles, blandos y no dolorosos, los subcutáneos son de consistencia firme dolorosos y con frecuencia se inflaman y crecen lentamente. Los neurofibromas cutáneos se

mueven con la piel, tiene una textura suave y surgen en cualquier lugar del cuerpo. En contraste con los neurofibromas cutáneos y subcutáneos, que son generalmente pequeños, los neurofibromas plexiformes pueden llegar a ser grandes y pueden evolucionar a la malignidad. Los neurofibromas plexiformes difusos son frecuentemente flácidos, pero los neurofibromas nodulares son por lo general firmes. Ambos subtipos de tumores puede ocurrir en cualquier parte del cuerpo y su resección quirúrgica completa es compleja y cuestionada en algunos casos, debido a su alta vascularización y al hecho de que la recaída es un fenómeno común (10-11).

Los plexiformes se presentan en el 25% de los casos antes de los 10 años, en 51% entre los 11 a 20 años y en 89% en los mayores de 21 años, d) Los nódulos de Lisch del iris: son hamartomas melanocíticos en la superficie del iris, con forma de cúpula, sin repercusión en la visión, se presentan en los pacientes desde los 6 años, e) los problemas de aprendizaje están presentes en al menos el 50% de las personas con NF1. Otras manifestaciones menos comunes pero potencialmente más graves incluyen neurofibromas plexiformes, gliomas de la vía óptica y del sistema nervioso central, escoliosis, displasia tibial y vasculopatía así como una mayor predisposición para desarrollar tumores de la vaina de los nervios periféricos. A continuación se presentan las características clínicas más relevantes en la NF1 mediante las cuales se realiza el diagnóstico clínico.

1. MANCHAS CAFÉ CON LECHE

Las manchas café con leche presentan un aumento de melanina en los melanocitos y queratinocitos basales; sin embargo, no muestran un incremento de melanocitos (12). Histológicamente las muestras de piel a las cuales se les suplementa con L-dopa raramente presentan macroglóbulos de melanina en los melanocitos, queratinocitos y melanófagos dérmicos. Los macroglóbulos de melanina aparecen como resultado de la fusión espontánea de melanosomas primarios o de cuerpos residuales secundarios, los cuales no son específicos de las manchas café con leche. (13)

Las manchas café con leche son lesiones hiperpigmentadas que se presentan como uno de los primeros signos que aparecen en la neurofibromatosis, frecuentemente están presentes desde el nacimiento, en un número y tamaños variables, son comunes en la población general y se manifiestan de manera aislada o solitaria en 10 a 28% de la población; la mayoría de los individuos con manchas café con leche no presentan enfermedades asociadas (14). Las manchas menores de 3 cm son redondeadas y bien definidas, mientras que las manchas de mayor tamaño casi siempre están más pigmentadas que la piel que las rodea, además de ser irregulares y se observan con menos frecuencia (15). La localización más frecuente de aparición es en el tronco, en las extremidades y los glúteos. Las lesiones cutáneas pigmentarias y los trastornos del sistema nervioso central se asocian frecuentemente, esto se explica por el hecho de que la piel y el sistema nervioso central comparten el mismo origen ectodérmico. (13, 16, 17).Figura 2



Figura 2 A) manchas café con leche en cara lateral del torso, de forma irregular que miden más de 5mm, B) sujeto con manchas café con leche de menos de 5mm redondeadas con presencia de neurofibromas en espalda

2. EFÉLIDES

Este signo es característico de la neurofibromatosis, se considera casi patognomónico de la enfermedad, en términos de frecuencia son sólo superadas por las manchas café con leche, se relaciona con la edad y generalmente ocurre entre las edades de 3 y 5 años, la mayoría de los adultos tienen las efélides (~

90%)(18).

La definición de efélides se refiere a las manchas pigmentadas de color café o rosado que no sobresalen en la piel, se presentan en las zonas expuestas al sol como la cara, hombros, manos y pecho, sin embargo las manchas que se presentan en la neurofibromatosis son muy similares en cuanto al color a las manchas café con leche, aunque en ocasiones de un tamaño más pequeño y una localización muy particular en zonas de fricción tales como axilas, ingles cuello y debajo de las mamas en el caso de las mujeres, se agrupan en conglomerados con un tamaño de entre 1 y 3 mm., casi siempre redondeadas. La causa de estas lesiones es desconocida y se cree que pueda ser debido al aumento de la fricción y de la temperatura en estas áreas (19) Figura 3.

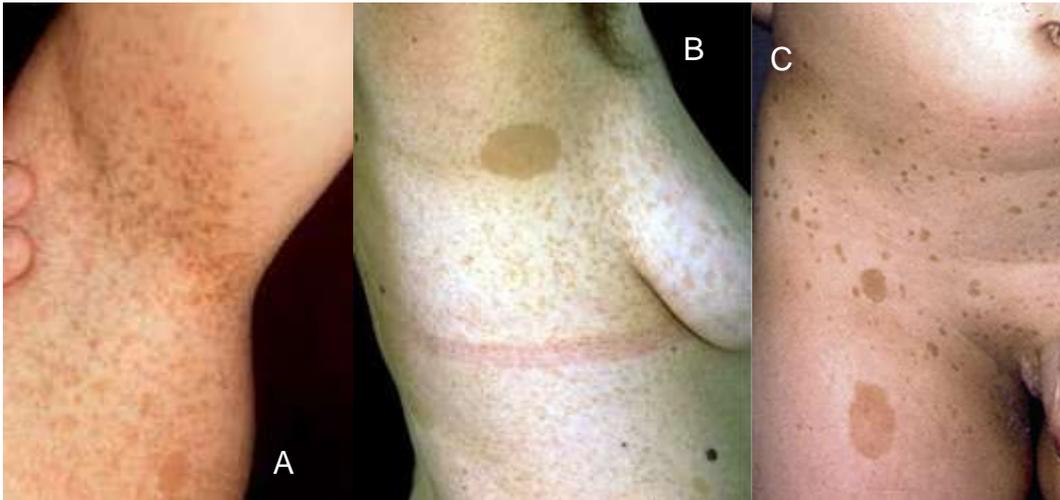


Figura 3 A) efélides axilares y en ingles, manchas café con leche (20), B) efélides en mama y axilares, C) efélides inguinales (21)

3. NEVO ANÉMICO

El nevo anémico se presenta ocasionalmente como una mancha cutánea hipocrómica de forma redonda u ovalada con un contorno multilobulado en la que se aprecia una disminución de la vascularidad este nevo permanece pálido después de frotar la zona, puede aparecer de forma aislada o múltiple. El nevo anémico se observa raramente en la población general, principalmente en la cara anterior del tronco, aunque puede presentarse en otras localizaciones con tamaños variables (21 22n), pero parece tener una prevalencia mucho mayor en

los pacientes con NF1. Una asociación entre la NF1 y el Nevo anémico fue sugerida en 1915, sin embargo no se considera una característica de la NF1, en estudios recientes se ha visto una prevalencia de hasta 50% en estos pacientes con NF1, afectando ambos sexos(23), la edad en la cual aparecen no es clara ya que no se busca intencionadamente o puede no ser aparente hasta que se frota la cara anterior del tórax y en los adultos las manchas café con leche y los neurofibromas pueden ocultar la detección de estas manchas hipocrómicas.

La etiología del nevo anémico en la NF1 se debe probablemente a que la pérdida de la neurofibromina promueve una respuesta proliferativa anormal de músculo liso vascular de las células musculares, lo que representa la formación de neoíntima y enfermedad vascular obstructiva en individuos con NF1.(24)

Figura 4



Figura 4 manchas café con leche y nevus anémico (flechas)

4. NEUROFIBROMAS CUTANEOS

Los neurofibromas, son los responsables de los mayores problemas clínicos y estéticos en la neurofibromatosis tipo 1, además de la estigmatización social de los pacientes, los neurofibromas son tumores benignos complejos de la vaina del nervio periférico compuesto de diferentes tipos de células, tales como células de Schwann, y otros elementos locales de sostén como fibroblastos, células perineurales, vasos sanguíneos y mastocitos. Los neurofibromas se clasifican como cutáneos, subcutáneos y plexiformes, los primeros, aparecen generalmente en la adolescencia temprana y los neurofibromas plexiformes se cree que su aparición puede ser congénita y aumentar progresivamente a lo largo de la vida, al menos el subtipo difuso.

Los neurofibromas son clasificados en diferentes subtipos. Sin embargo, por las implicaciones clínicas y pronósticas, muchos médicos simplemente se refieren a estos tumores como dérmicos o plexiformes. Los neurofibromas dérmicos son exclusivamente en la piel y se manifiestan en casi todos los individuos con NF1. Inicialmente aparecen en la pubertad y aumentan en número con la edad, los neurofibromas plexiformes se desarrollan a lo largo de un plexo nervioso o zonas que impliquen múltiples haces nerviosos y son capaces de formar grandes tumores, aunque son similares a los neurofibromas dérmicos en los niveles celular y ultraestructurales (25).

Los neurofibromas son considerados otro de los signos distintivos de la NF1. En general, los tumores "cutáneos" o "dérmicos" se presentan en forma de cúpula, suave, carnosos, y del color de la piel o ligeramente hiperpigmentados que desaparecen a la presión. Los neurofibromas cutáneos por lo general no se manifiestan hasta la pubertad y puede continuar aumentando en tamaño y número a lo largo de la edad adulta y en el embarazo hay mayor crecimiento. Los neurofibromas son una causa importante de morbilidad en estos pacientes debido al número, la apariencia y el tamaño de estos tumores. (26) Figura 5



Figura 5 presencia de neurofibromas cutáneos (flechas)

5. NEUROFIBROMA SUBCUTANEO

El neurofibroma nodular puede ser de la piel (neurofibroma cutáneo) o de un nervio periférico. Es un tumor no encapsulado, firme, frecuentemente con degeneración mixoide. Corresponde a una proliferación mixta tanto de células de estirpe neurilemal como fibroblástica con fibras de colágena, el neurofibroma nodular puede ser solitario o múltiple, generalmente estos últimos se manifiestan en la neurofibromatosis tipo 1. Un neurofibroma cutáneo solitario no excluye la presencia de esta enfermedad, los neurofibromas nodulares son de comportamiento biológico benigno. Figura 6



Figura 6. Neurofibroma nodulares múltiples en tórax posterior circunscritos y no compresibles. (27)

6. NEUROFIBROMAS PLEXIFORMES

Los neurofibromas plexiformes son originados de las vainas nerviosas periféricas e histológicamente están constituidos por la proliferación de células de Schwann, organizadas en el estroma mixoide. Las lesiones profundas se manifiestan en la edad adulta (28), están comúnmente situados en la cabeza y el cuello, debido a las ricas inervaciones del área, en las extremidades, y tronco en los que siguen el eje de una vía nerviosa (29, 30). Los neurofibromas plexiformes son generalmente grandes, infiltrantes, sin bordes bien definidos, tienen aumento en la pigmentación de la piel, con un aspecto angiomaso e hipertrichosis, produciendo un aspecto nevoideo (29). Tienen dos características principales; hiperextensibilidad con una falta de elasticidad, y a la palpación semeja una bolsa de gusanos (29, 30).

El riesgo de transformación maligna en neurofibrosarcoma es entre el 2 a 5%, lo que se debe sospechar si la lesión inicial crece de forma rápida y significativa. En muchos casos, la resección quirúrgica es difícil ya que puede afectar a las principales ramas nerviosas, la reaparición después de la resección, depende de la resección total o parcial, la cual se relaciona con la infiltración tumoral (31). Esta transformación maligna puede hacer grandes metástasis las cuales frecuentemente son fatales. Los neurofibromas plexiformes pueden ocurrir en cualquier parte del cuerpo a lo largo de plexo nervioso periférico. De hecho, los neurofibromas de tejidos profundos ocurren en 20-40% de los pacientes adultos con NF1 (32). La mayoría de los neurofibromas plexiformes internos se manifiestan en la región para-espinal por la relación con los ganglios de las raíces dorsales. Sus posibilidades de transformación maligna son mucho más altas en comparación con otras formas de neurofibromas plexiformes y tiene un pronóstico más pobre, en parte debido a que no son evidentes clínicamente en sus etapas tempranas, además debido a su ubicación en los forámenes neurales de la columna vertebral, que pueden incidir en las raíces adventicias y los nervios espinales, estos causan dolor y déficits neurológicos, por lo que los neurofibromas para-espinal representan una grave complicación de la NF1. Figura 7.

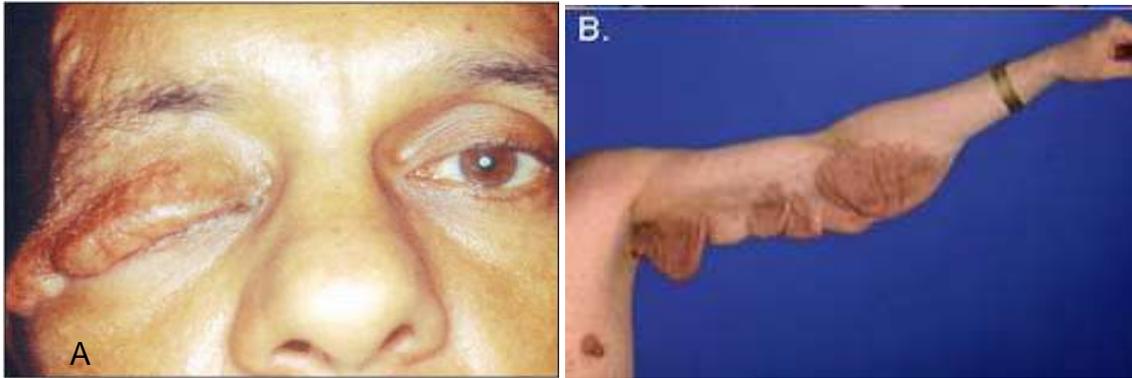


Figura 7 A) Neurofibroma plexiforme en parpado superior. B) plexiforme en brazo izquierdo

7. DESARROLLO DE TUMORES EN PACIENTES CON NF1

En la neurofibromatosis se presenta un mayor riesgo para el desarrollo de neoplasias malignas, tanto en el sistema nervioso y otras localizaciones menos frecuentes que no involucra directamente al sistema nervioso entre los que se incluyen tumores gastrointestinales, tumores carcinoides duodenales, feocromocitomas, así como cáncer de mama y rhabdomiosarcomas. Las neoplasias malignas más comunes son las del sistema nervioso central y periférico. Los tumores malignos del sistema nervioso periférico incluyen tumores malignos de la vaina de los nervios periféricos, la mayoría derivados de neurofibromas plexiformes, y más raramente neuroblastomas (33). La frecuencia estimada para desarrollar tumores malignos de la vaina de los nervios periféricos es de sólo 1-2% de los pacientes con NF1. Sin embargo en un estudio se encontró que esta frecuencia puede ser más alta hasta de 8-13% en pacientes con NF1 y estos tumores por lo general ocurren en la edad adulta (34).

8. NODULOS DE LISCH

Los nódulos de Lisch representan la principal alteración oftalmológica en la NF 1, ya que se presentan en 60% de los pacientes con NF1. Estos nódulos son estructuras hamartomatosas de color amarillo claro a café en la superficie del iris y se observan como elevaciones bien definidas, son de superficie lisa, en forma de domo y se proyectan hacia la superficie. Histológicamente y estructuralmente se

pueden diferenciar tres tipos de líneas celulares principales: células pigmentadas, células similares a fibroblastos y mastocitos. Los nódulos de Lisch se presentan en la primera década de la vida y son el hallazgo más común en pacientes mayores de 20 años con diagnóstico de NF1 (1).Figura 8



Figura 8. Lesiones hamartomatosas color amarillo en el iris (nódulos de Lisch)

9. GLIOMA DE LA VÍA ÓPTICA

Los gliomas de la vía óptica asociados a neurofibromatosis, son típicamente astrocitomas pilocíticos de bajo grado que involucran alguna combinación de los nervios ópticos, quiasma, o tractos ópticos, se observan en aproximadamente el 15% de los niños con NF1 y aparecen más comúnmente en los niños, sobre todo entre los cinco y nueve años de edad (35). La mayoría tienen un curso benigno, tienen un excelente pronóstico después de la resección total, pero se ha asociado con una significativa morbilidad y mortalidad ocasional sin embargo la cirugía no es la primera elección de tratamiento, debido a la inaccesible localización del tumor así como al deterioro neurológico asociado con la resección de los mismos y a su comportamiento relativamente benigno. (35)

En algunas ocasiones, los niños con gliomas de las vías ópticas pueden tener pérdidas de la agudeza visual y mostrar anomalías endocrinas como síndrome diencefálico y pubertad precoz. (36,37).

Al igual que en otros tumores malignos relacionados con NF1, la pérdida de la expresión génica y la expresión de la neurofibromina se ha demostrado en los Astrocitomas Pilocíticos relacionados con la NF1. Esto sugiere el mecanismo de la hipótesis de un segundo evento, en el que se requiere la inactivación somática del

alelo funcional de neurofibromina para la formación de tumor (38,39). La pérdida de la heterocigosidad del gen *NF1* se ha reportado en neurofibromas y neurofibromas plexiformes, en apoyo a la función de tumor supresor de éste gen. Una publicación reciente informó sobre las pérdidas alélicas en estos tumores y sobre la falta de expresión de la neurofibromina en estos tumores, que apoya el papel de la deficiencia de la *NF1* en el desarrollo de gliomas ópticos relacionados con la *NF1*(40). Se sabe que diferentes mecanismos, incluyendo las mutaciones con corrimiento del marco de lectura, la pérdida de heterocigosidad y la metilación son responsables de la inactivación somática del gen *NF1* en astrocitomas pilocíticos (41).

La evaluación oftalmológica de los niños con neurofibromatosis es muy difícil ya que no se quejan de deficiencia de la visión hasta que los padres notan que los niños chocan con los objetos, por lo que es importante realizar exámenes de agudeza visual a una edad de desarrollo de 3 años, la visión al color a los 5 años y los campos visuales a la edad de 8 años. Figura 9

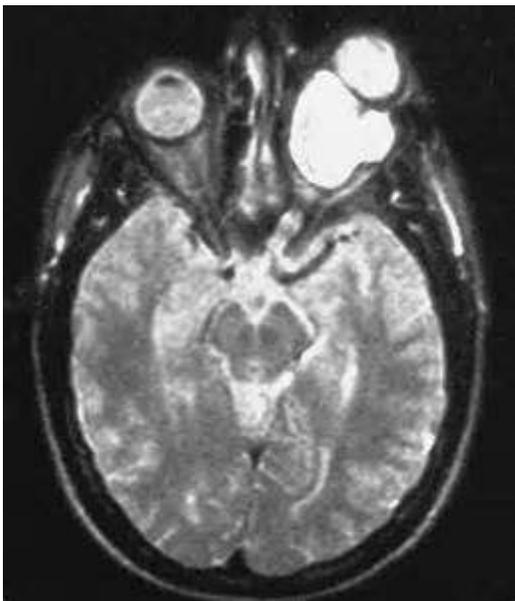


Figura 9 Imagen de resonancia magnética de un tumor retrobulbar de nervio óptico (AFIP Atlas of Tumor Pathology, de acuerdo a la entrada #406908)

10. MANIFESTACIONES ESQUELETICAS

Las manifestaciones esqueléticas observadas en la NF1 se presentan desde la infancia e incluyen talla baja, macrocefalia, escoliosis, displasia de las alas esfenoideas, y pseudoartrosis de tibia, con curvatura de huesos largos que se parece a una articulación falsa, osteopenia y osteoporosis (9,37)

A.- ESCOLIOSIS: Es la alteración ortopédica más comúnmente encontrada, se presenta en 10% de los pacientes con neurofibromatosis a la edad de 10 años. Hay 2 tipos principales de la escoliosis en personas que padecen neurofibromatosis: formas no-distróficas y distróficas. La escoliosis distrófica se presenta con un ángulo muy agudo en su curvatura y es progresiva, tiene un segmento corto con acuñamiento vertebral severo, cuerpos vertebrales apicales con rotación, En general las curvaturas distróficas de menos de 20°, deben de ser observadas a intervalos de 6 meses para evaluar su progresión. En cuanto a los pacientes adolescentes con curvatura distrófica mayor de 20° a 40° de angulación, se recomienda hacer una fusión espinal posterior con instrumentación espinal segmental (42)

Se desconoce su patogénesis aunque recientemente se ha relacionado a la osteopenia con la consecuente displasia de los elementos óseos de la columna vertebral.

El manejo de esta alteración es trabajo de los ortopedistas pediátricos y depende de la severidad de la curvatura, la localización, la velocidad de la progresión y de la edad del paciente. Figura 10



Figura 10. Manchas café con leche. Cicatriz quirúrgica de corrección de escoliosis (43)

B.- DISPLASIA DEL ESFENOIDES

Las teorías sobre la causa de la displasia del ala esfenoidal incluyen, su ocurrencia como anomalía congénita, debido a trastornos del desarrollo de los centros de osificación y un aumento del volumen cerebral global que conduce a cambios óseos y vascularización anormal que contribuyen a la resorción ósea adyacentes a la fisura orbital superior. El esfenoides se forma entre la cuarta y octava semanas del desarrollo y se origina de una interacción entre el mesénquima, las células de las crestas neurales y neuroectodermo. La mala osificación primaria de este hueso se debe a una alteración en el desarrollo de mesodermo, porque generalmente esta displasia es congénita y no debida a la presencia de un tumor que es lo que comúnmente se ve en las valoraciones clínicas y radiológicas.

Las características típicas radiológicas son un defecto total o parcial del ala mayor del esfenoides, una elevación del ala menor medida, la distorsión de la silla turca, y la ampliación de la órbita ipsilateral. La anomalía ósea puede detectarse clínicamente por la presencia de exoftalmos pulsátil, como describió por primera

vez Dandy en 1929 (44). La mitad de los casos de displasia del esfenoides se relacionan con NF1. Los neurofibromas oculares producen cambios óseos casi siempre involucrando la órbita ipsilateral y el párpado (45). La displasia esfenoidal es uno de los 6 criterios diagnósticos de la NF1 a pesar que se presenta con una frecuencia baja entre 1 y 7%, esta anomalía se puede identificar desde la infancia. Aunque las lesiones del ala esfenoidal en la NF1 son generalmente asintomáticas, son fácilmente diagnosticadas mediante radiografías de cráneo o tomografía axial computada. Figura 11

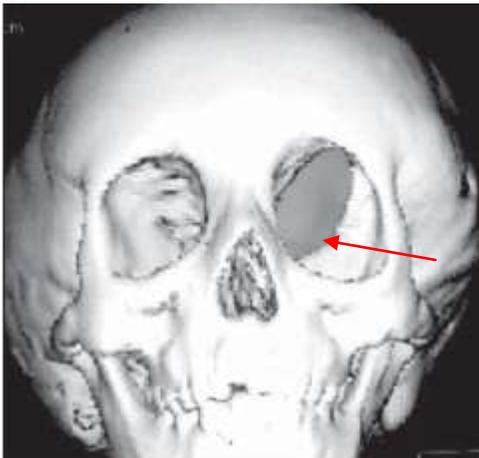


Figura 11. Reconstrucción ósea muestra ausencia de la línea innominada por displasia del ala mayor del esfenoides (flecha) en un paciente de 22 años con neurofibromatosis

C.- PSEUDOARTROSIS TIBIAL

Aunque las lesiones de pseudoartrosis tibial son poco frecuentes y tienen una prevalencia de uno de cada 140 000 en la población general, en pacientes con NF1 la prevalencia es de 1-4% (46) Existe una gran variabilidad clínica entre los huesos largos afectados, siendo las tibias las que con mayor frecuencia se ven involucradas, sin embargo pueden estar afectados el peroné de la misma pierna, el fémur, cubito, radio, húmero y la clavícula, la osteopatía tibial generalmente se presenta como una lesión unilateral y anteroposterior, su diagnóstico frecuentemente se hace en la infancia, en ocasiones aparecen antes de la aparición de las manchas café con leche.

La fractura patológica del hueso afectado con frecuencia se produce en la primera década de la vida y con frecuencia conduce al desarrollo de una pseudoartrosis o falsa articulación (47). Muy pocos pacientes con NF1 presentan la osteopatía tibial y algunos nunca desarrollan la pseudoartrosis. La pseudoartrosis sólo se produce como complicación de una fractura franca con la deformación de los huesos (48). Los rayos X de los huesos largos con osteopatía ósea pueden mostrar lesiones quísticas, esclerosis, y/o adelgazamiento de la cortical, los mecanismos patogénicos implicados en la osteopatía tibial y el posterior desarrollo de pseudoartrosis son poco conocidos. Algunas, aunque no muchas pseudoartrosis tibiales están asociados con la presencia de un neurofibroma intraóseo. Esta observación condujo a la hipótesis de que la participación de los huesos largos no es un defecto óseo primario, sino más bien una respuesta secundaria del tejido óseo a la presión extrínseca (49).Figura 12



Figura 12 Masculino de 5 años de edad, A) Pseudoartrosis tibial B) incurvamiento tibial

11.- EL GEN *NF1*

El gen *NF1* se localiza en el cromosoma 17q11.2, contiene 61 exones distribuidos sobre 350 Kb de ADN genómico, con un transcrito de 11 a 13 Kb de largo y un marco de lectura abierto de 8454 nucleótidos, codifica para una proteína citoplasmática denominada Neurofibromina de 2818 aminoácidos y 370 Kd, que actúa como un gen tumor supresor que regula al protooncogen Ras. Se expresa en neuronas, células de Schwann, oligodendrocitos, astrocitos y leucocitos. Se localiza en el citoplasma y se transporta activamente al núcleo por medio de una señal de localización nuclear. Cuando existe una mutación en el exón 43, la neurofibromina se queda en el citoplasma y no ejerce su función.

La neurofibromina tiene sólo dos dominios funcionales, Ras GAP y SEC 14, hasta el momento se desconoce la función de este último. Sin embargo en 2006 se identificó un dominio homólogo a la pleckstrina-like (like-PH) que actúa de forma bipartita con el Sec14 para la unión de fosfolípidos (50). Figura 13

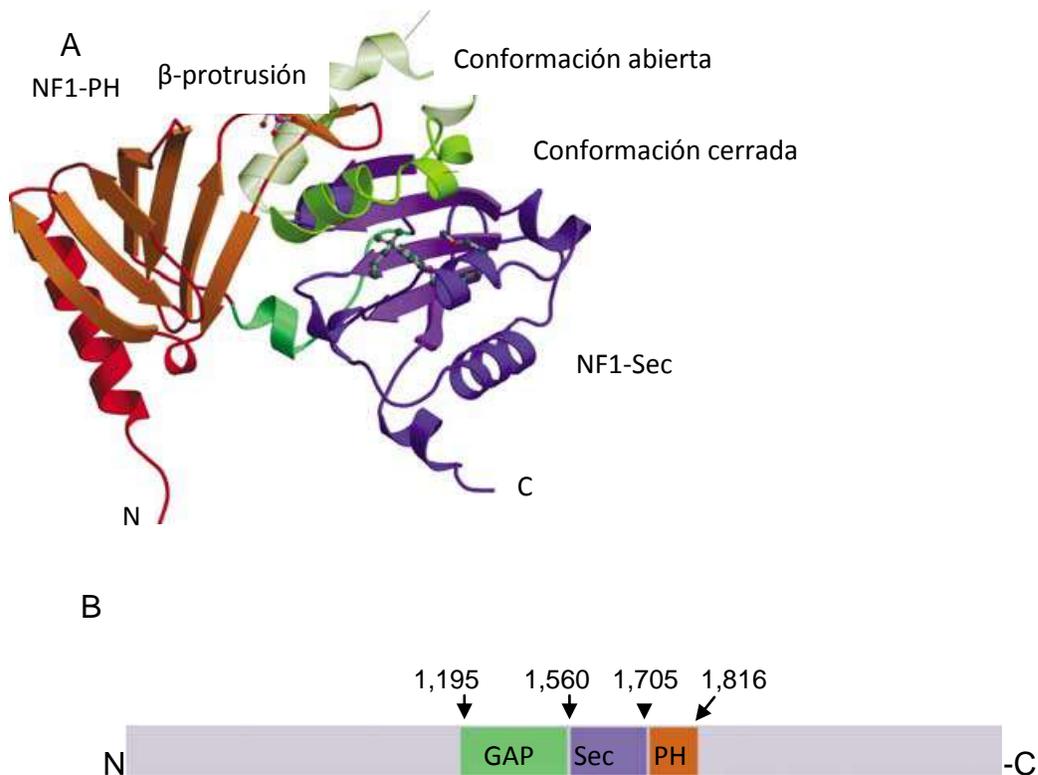


Figura 13. A) diagrama de cintas de NF1-Sec-PH que muestra la conformación superpuesta abierta y la conformación cerrada. Es claramente

visible que la conformación abierta chocaría con el β -saliente, por lo que se tendrían que hacer reordenamientos conformacionales en esta región para permitir el movimiento de la región de tapa-hélice. B) Esquema de los dominios estructurales de la neurofibromina con los límites de dominio (50)

Ras GAP ocupa una pequeña porción del dominio central de la neurofibromina y tiene una secuencia similar a la familia de proteínas activadoras de GTPasas o GAP. Las proteínas GAP aceleran la hidrólisis de Ras-GTP hacia Ras-GDP, desde una forma activa a una inactiva. Las proteínas Ras son miembros de una familia de GTPasas, tienen 21 kDa y son codificadas por los genes H-Ras, K-Ras y N-Ras.

Las proteínas Ras, junto con el gen que lleva el mismo nombre, tienen un rol crucial como un conjunto de interruptores-reguladores moleculares muy importantes en el control de una gran variedad de rutas de transmisión de señales celulares, que controlan diferentes fenómenos como la integridad del citoesqueleto, proliferación celular, diferenciación, adhesión, migración celular y la apoptosis. Esta transmisión de señales se lleva a cabo desde la membrana plasmática al núcleo por medio de cascadas de señalización molecular. Se encuentran unidas covalentemente a la membrana plasmática y ciclan entre su estado activo unido a GTP y el inactivo unido a GDP. Estas proteínas tienen baja actividad GTPasa intrínseca, la cual se incrementa por medio de proteínas GAP5. La neurofibromina, por intermedio de su dominio GAP, incrementa la tasa de hidrólisis de GTP e inactiva a Ras.

Tanto el gen como las proteínas RAS relacionadas, a menudo están alteradas en los tumores malignos, provocando un aumento en la capacidad de invasión y metástasis, y una disminución de la apoptosis. Así, disminuye su actividad y actúa como un supresor tumoral. Figura 14

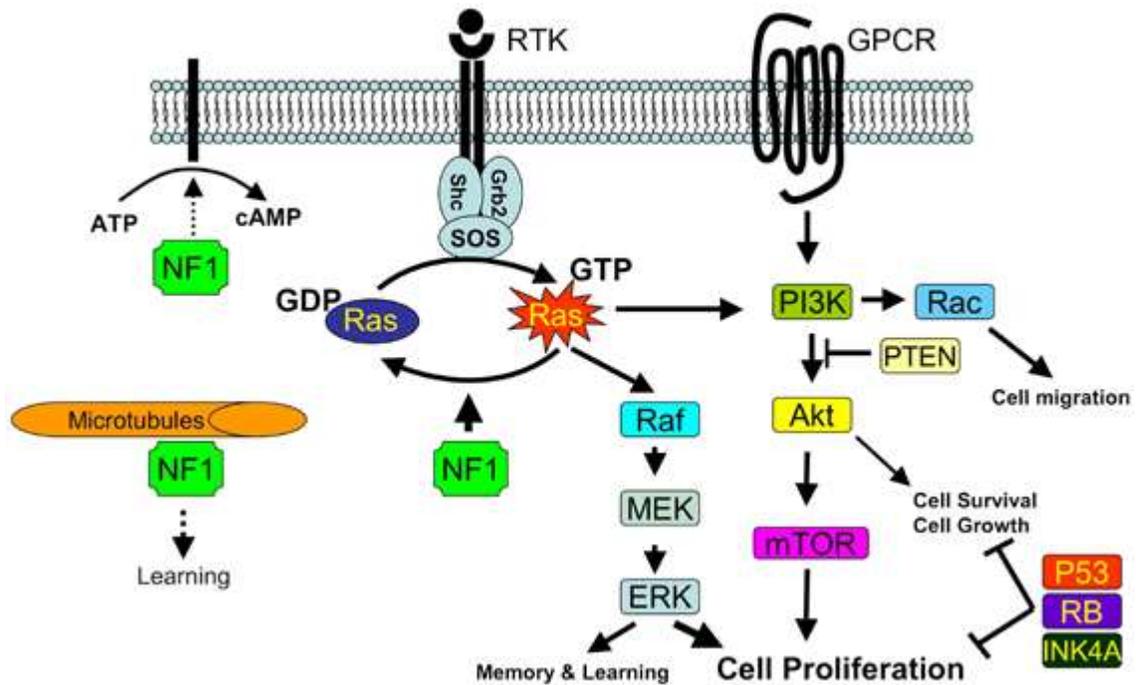


Figura 14. Representación de interacciones de NF1 con las vías ras y PI3K. *NF1* limita la actividad de Ras en la célula normal. Por lo tanto, la pérdida de la expresión de la *NF1* conduce a una actividad elevada de Ras, el crecimiento celular desregulado y la tumorigénesis. *NF1* también puede asociarse con los microtúbulos y modular la vía de señalización cAMP-PKA. (51)

IV.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La caracterización molecular de las mutaciones que causan la neurofibromatosis tipo 1, plantean un reto enorme debido al gran tamaño del gen *NF1*, a la falta de puntos calientes, la gran cantidad de posibles mutaciones, y la presencia de pseudogenes, dificultan el diagnóstico a nivel molecular. El 90% de las mutaciones en la neurofibromatosis tipo 1, son mutaciones de una sola base, tales como sustituciones, inserciones o deleciones, aproximadamente entre 5 y 10% son ocasionadas por deleciones de un solo exón o de múltiples exones así como duplicaciones que representan el 2% y finalmente por microdeleciones que abarcan el gen *NF1* completo y genes adyacentes. Todo esto implica un reto enorme en la búsqueda de estudios moleculares rápidos y económicos para el diagnóstico de la enfermedad. La técnica de MLPA nos permite la cuantificación relativa de hasta 50 secuencias diana diferentes en una reacción, Este método está basado en una PCR múltiple que permite la detección de número de copias anormales, por lo que se logran identificar microdeleciones y alteraciones en el número de copias intragénicas, de los exones así como de los intrones.

La realización de este estudio molecular nos permite identificar las deleciones y las duplicaciones en el gen *NF1*, así como de los genes que se encuentran en las proximidades del mismo.

V.- JUSTIFICACIÓN:

Dada la incidencia de la enfermedad y la poca disponibilidad de diagnósticos moleculares, amén de los altos costos que esto genera y la falta de conocimiento del tipo de mutaciones en nuestra población, proponemos el diagnóstico mediante la técnica de MLPA, la cual es capaz de detectar deleciones y duplicaciones del gen *NF1*, a un bajo costo y relativamente rápido, por lo que nos permitirá identificar cual es la frecuencia de este tipo de mutaciones en nuestra población y ser utilizada como una opción viable en el estudio de los pacientes con NF1.

VI.- HIPÓTESIS

Sí la frecuencia de deleciones y duplicaciones del gen *NF1* es de 5 a 10% entonces mediante el estudio de MLPA seremos capaces de identificar un porcentaje de al menos 5% de deleciones y duplicaciones en una muestra de pacientes mexicanos con neurofibromatosis tipo 1.

VII.- DISEÑO DEL ESTUDIO

1.- Tipo de estudio.

Se trata de un estudio observacional, descriptivo, prospectivo y transversal

2.- Universo

Una muestra de 40 pacientes mexicanos con diagnóstico de neurofibromatosis tipo 1.

3.- Criterios de selección:

a) Inclusión

Pacientes con el diagnóstico clínico de neurofibromatosis tipo 1 de cualquier edad.

b) Exclusión:

Pacientes que presenten datos clínicos pero con diagnóstico diferente de NF1.

Pacientes que cumplen con los criterios clínicos de neurofibromatosis pero presentan un parentesco con el caso índice.

4.- Variables del estudio

a) Deleciones del gen *NF1*.

b) Duplicaciones del gen *NF1*.

c) Pacientes con NF1.

VIII.- OBJETIVO

OBJETIVO GENERAL

Establecer la frecuencia de deleciones y duplicaciones del gen *NF1* en una muestra de pacientes con neurofibromatosis tipo 1.

OBJETIVOS PARTICULARES

Demostrar que por este método se pueden visualizar más del 5% de las deleciones en *NF1* que se reportan en la literatura.

Implementar este método como diagnóstico de rutina.

IX. MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó la extracción de ADN (ANEXO 1) de 40 pacientes mexicanos con diagnóstico de neurofibromatosis tipo 1, para la búsqueda de deleciones y duplicaciones en el gen *NF1* mediante la técnica de MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification) que permite identificar microdeleciones y alteraciones en el número de copias intragénicas así como en intrones. Este método de PCR múltiple permite la detección de número de copias anormales, y es capaz de distinguir secuencias que difieren en un solo nucleótido.

La reacción de MLPA se puede dividir en cinco etapas principales: 1) desnaturalización del ADN y la hibridación de sondas de MLPA; 2) reacción de ligación; 3) reacción de PCR; 4) la separación de los productos de amplificación mediante electroforesis y 5) Análisis de datos. Durante la primera etapa, el ADN se desnaturaliza y se incuba durante la noche con una mezcla de sondas de MLPA.

Las sondas de MLPA se componen de dos oligonucleótidos separados, cada uno con una de las secuencias de los cebadores de PCR. Las dos sondas de oligonucleótidos se hibridan a las secuencias blanco, inmediatamente adyacentes. Sólo cuando las dos sondas de oligonucleótidos son hibridadas a sus objetivos adyacentes pueden ser ligadas durante la reacción de ligamiento. Debido a que sólo las sondas ligadas se amplifican exponencialmente durante la subsecuente reacción de PCR, el número de productos de la sonda de ligamiento es una medida para el número de secuencias blanco en la muestra. Los productos de amplificación se separan mediante electroforesis capilar. Las sondas de oligonucleótidos que no se ligan, solamente contiene una secuencia de cebador, como consecuencia, no pueden ser amplificadas exponencialmente y no generar una señal. Por consiguiente, la eliminación de las sondas no unidas es innecesaria en MLPA y hace que el método MLPA sea fácil de realizar.

En este trabajo proponemos un método diagnóstico que podría ser más económico y rápido para la detección de las alteraciones del gen *NF1* utilizando únicamente la técnica de MLPA ya que no sólo tiene la ventaja de ser una técnica

múltiplex, sino también una en la que está dirigida al análisis de pequeñas secuencias (50-70 nt) y es capaz de distinguir secuencias que difieren en un solo nucleótido según describe MCR- Holland.

Las muestras se analizaron utilizando múltiplex sonda de amplificación dependiente de ligado (MLPA) con los kits SALSA MLPA P081 / P082 NF1, para detectar una sola y múltiples deleciones / duplicaciones de exones (contienen una sonda para cada exón, tres sondas para el exón 1, una sonda para el intrón 1 y dos sondas para los exones 15, 23, 51 y 58 del gen *NF1*, dos sondas para el gen *OMG* que está localizado dentro del intrón 36 del gen *NF1*. Además, se incluyen 11 sondas de referencia en probemix P081-C1 y 9 sondas de referencia en probemix P082-C1) y la salsa MLPA P122 NF1 Kit,(dos sondas para los exones 1, 17, 30, 49 y 57 del gen *NF1*) para el tamizaje de deleciones completas en la región cromosómica de *NF1*, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (MRC Holanda, Ámsterdam, Países Bajos). Se añadió el ADN genómico desnaturalizado (100 ng / 150 ng) a la mezcla de MLPA y se incubó durante la noche para hibridar las sondas antes de realizar la reacción de ligación subsiguiente. La amplificación por qPCR se realizó utilizando 6-carboxyfluoresceina marcada con cebadores; los productos se analizaron mediante un secuenciador automático de ADN ABI Prism 3130 (Life Technologies, Saint Aubin, Francia). Las áreas de los picos para cada fragmento separado se midieron mediante el uso de software de Coffalyser.NET (MRC.Holand). Cada producto de MLPA se normalizó dividiendo cada área del pico mediante el área del pico total entre el pico de las sondas de referencia para la muestra, para obtener los valores relativos del área del pico. El cambio de los valores del pico, superior a 0.3 se consideró una duplicación cuando se encontraba por encima de la unidad (un aumento del valor) o una deleción cuando se encontró una disminución en 0.3 con respecto a la unidad (una disminución del valor). Los rangos encontrados con un valor inferior a menos de 0.65 se consideraron como una deleción y rangos superiores a más de 1.35 se consideraron como duplicaciones.

X.- ASPECTOS ÉTICOS Y BIOSEGURIDAD

Todos los procedimientos realizados en el estudio están sujetos a lo estipulado en el reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, en su Título segundo, capítulo 1, artículo 14 fracciones I-VIII. (Anexo 2) así como la carta de consentimiento informado para el presente estudio. (Anexo 3).

XI.- RESULTADOS

Se analizaron 40 muestras de ADN genómico de pacientes mexicanos que acudieron a consulta al Servicio de Genética del Hospital General de México con diagnóstico de neurofibromatosis tipo1, mediante el método de MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification), Las edades de los pacientes oscilan entre los 3 hasta los 48 años. Los resultados del dicho análisis mostraron la presencia de 6 deleciones, cinco de ellas en el gen *NF1* y una más en un gen adyacente al gen *NF1*.

Se reportó una deleción completa del gen *NF1* en la que están involucrados los genes adyacentes; ZUZ12P1, CRLF3-3, ATAD5-2, ADAP2-3, RNF35, UTP6-14 de aproximadamente 1.2 Mb y cuatro deleciones intragénicas que involucran en el primer caso los exones 17, 30 y 49 del gen *NF1*, en el segundo caso la deleción involucra los exones 17,49 y 57 del gen *NF1*, en el tercer caso la deleción involucra el exón 49 del gen *NF1*, el cuarto caso presenta una deleción del exón 30 del gen *NF1*, finalmente una deleción del gen *TRAF4-4*, el cual está alejado del gen *NF1*, en dirección centromérica, llamado factor 4 asociado al receptor de necrosis tumoral, el cual se ha identificado que esta sobre expresado en cáncer de mama, el gen TRAF4 es requerido en la embriogénesis para la formación de la tráquea, el esqueleto axial y el cierre del tubo neural, (52). **Tabla 1**

Tabla1. Características clínicas de 6 pacientes y deleciones encontradas.

| Pacientes | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|---------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Sexo | F | M | F | M | M | M |
| Edad | 20 | 37 | 23 | 18 | 46 | 26 |
| TALLA | 156 | 157 | 158 | 166 | 168 | 167 |
| PESO | 60 | 67 | 59 | 70 | 65 | 66 |
| MCL | +++ | +++ | ++ | ++ | ++ | + |
| Efélides | + | + | + | + | + | + |
| Neurofibromas | ++ | +++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| Plexiformes | 2 | 2 | - | 1 | 1 | - |
| N. de Lisch | + | + | + | + | + | + |

| | | | | | | |
|-------------------|----------|--|----------|-------------------|----------|------------|
| Glioma vía Opt. | - | - | - | - | - | - |
| Miopía | - | - | - | - | - | + |
| Ambliopía | - | - | - | Ojo der. | - | - |
| Esqueléticas | - | - | - | - | Fractura | Escoliosis |
| Tumores | - | - | - | Padre con sarcoma | - | Ca tes |
| Historia familiar | - | - | + | + | - | - |
| Del/dup | del | del | del | del | del | del |
| Exón | 17-30-49 | NF1 completo | 17-49-57 | 49 | 30 | - |
| Otros genes | - | ZUZ12P1, CRLF3-3, ATAD5-2, ADAP2-3, RNF35, UTP6-14 | - | - | - | TRAF4-4 |

MCL: manchas café con leche, Del/dup: deleción/duplicación, Ca tes: cáncer testicular.

Paciente 1: paciente femenino de 20 años, sin antecedentes familiares de neurofibromatosis tipo 1, la cual presenta manchas café con leche desde el nacimiento que han aumentado en número y tamaño, en cara, abdomen y extremidades algunas manchas con estructuras pilosas en tronco, presencia de efélides axilares, nódulos de Lisch, neurofibromas cutáneos y subcutáneos en cara, tronco, abdomen y extremidades, neurofibroma plexiforme en región dorso lumbar y epigastrio, mediante el estudio de MLPA se encontró una delección intragénica de los exones 17, 30 y 49 del gen *NF1*. Se muestran en los gráficos 1, 2 y 3.

| Sample result overview | | Sample report | ratio chart | Electropherograms | | | | | | | |
|------------------------|------------|---------------|-------------|-------------------|--------|----------|-------|-------|----------|-------|----|
| | | Probe | 7NF81 | | | | | | | | |
| | | Height | Area | Intra r. | Pre ra | Final r. | Stdev | SamP | d(nt) | Width | |
| 17p (n=2) | ASPA-6 | 17-003.344 | 6556 | 45802 | 1.1 | 1.05 | 1.08 | 0.11 | Equal | 0.02 | 35 |
| | PMP22-3 | 17-015.103 | 6396 | 45030 | 1 | 0.93 | 1 | 0.08 | Equal | 0 | 43 |
| 17q (n=27) | IRAI-1-2 | 17-024.098 | 7827 | 51255 | 0.93 | 1.1 | 0.96 | 0.07 | Equal | -0.01 | 23 |
| | IRAI-1-4 | 17-024.099 | 3351 | 29864 | 0.93 | 0.79 | 0.98 | 0.10 | Equal | -0.05 | 34 |
| | SSH2-14 | 17-024.987 | 8658 | 61082 | 1.05 | 1.04 | 1.02 | 0.08 | Equal | -0.01 | 39 |
| | SSH2-14 | 17-025.046 | 4233 | 38136 | 0.94 | 0.82 | 1.01 | 0.11 | Equal | -0.01 | 41 |
| | BLMH-9 | 17-025.623 | 3788 | 32064 | 0.96 | 0.81 | 0.99 | 0.11 | Equal | 0 | 40 |
| | BLMH-2 | 17-025.642 | 5020 | 36522 | 0.97 | 1 | 0.96 | 0.08 | Equal | -0.04 | 44 |
| | CPD-12 | 17-025.795 | 7940 | 54539 | 1.01 | 1.01 | 0.99 | 0.08 | Equal | 0.04 | 34 |
| | CPD-21 | 17-025.813 | 7851 | 56094 | 0.99 | 1 | 1.01 | 0.09 | Equal | -0.03 | 48 |
| | SUZ12P-1 | 17-026.082 | 10179 | 70596 | 1.03 | 1.08 | 1.03 | 0.12 | Equal | 0 | 48 |
| | SUZ12P-3 | 17-026.109 | 8247 | 66416 | 0.97 | 0.99 | 0.94 | 0.08 | Equal | -0.01 | 44 |
| | CRLF3-3 | 17-026.148 | 9396 | 63870 | 1 | 1.1 | 1 | 0.07 | Equal | -0.01 | 38 |
| | ATAD5-2 | 17-026.186 | 8372 | 58922 | 1.05 | 1.04 | 1.02 | 0.1 | Equal | 0.06 | 40 |
| | ADAP2-3 | 17-026.277 | 8046 | 60333 | 1.05 | 1 | 1.02 | 0.09 | Equal | -0.01 | 38 |
| | RNF135-2 | 17-026.335 | 8480 | 61166 | 1.05 | 1.04 | 1.02 | 0.08 | Equal | -0.05 | 61 |
| | NF-1-1 | 17-026.445 | 7617 | 51602 | 1.02 | 1.2 | 1.04 | 0.08 | Equal | 0.09 | 60 |
| | NF-17 | 17-026.478 | 2768 | 21793 | 0.97 | 0.62 | 0.95 | 0.08 | Decrease | -0.03 | 32 |
| | NF-1-30 | 17-026.600 | 5593 | 39443 | 0.96 | 0.67 | 0.97 | 0.05 | Decrease | -0.05 | 52 |
| | NF-1-49 | 17-026.700 | 1910 | 14620 | 0.91 | 0.46 | 0.9 | 0.06 | Decrease | -0.01 | 30 |
| | NF-1-57 | 17-026.711 | 7703 | 51361 | 0.97 | 1.1 | 0.98 | | | | |
| | UTP6-14 | 17-027.226 | 6794 | 49518 | 1.02 | 0.98 | 1 | | | | |
| | SUZ12-10 | 17-027.339 | 6529 | 43750 | 0.94 | 1.04 | 0.93 | | | | |
| | LRR3-1B-1 | 17-027.372 | 7930 | 60458 | 1.09 | 1.01 | 1.06 | | | | |
| | ZNF207-9 | 17-027.717 | 4533 | 38597 | 0.99 | 0.9 | 1.02 | | | | |
| | PSMD11-2 | 17-027.798 | 10544 | 70342 | 0.97 | 1.08 | 1.01 | | | | |
| | PSMD11-6 | 17-027.820 | 3704 | 30504 | 1.02 | 0.92 | 1.04 | | | | |
| | MYO1D-7 | 17-028.118 | 2941 | 23394 | 0.97 | 0.87 | 1.02 | | | | |
| | MYO1D-2 | 17-028.131 | 2624 | 21227 | 1.01 | 0.95 | 1.03 | | | | |
| Reference* | 01-011.785 | 4044 | 36042 | 0.98 | 0.88 | 1.02 | | | | | |
| Reference* | 06-132.037 | 9599 | 63292 | 0.9 | 1.09 | 0.94 | | | | | |
| Reference* | 06-031.648 | 4962 | 33841 | 0.92 | 1.1 | 0.95 | | | | | |
| Reference* | 07-180.278 | 7654 | 53477 | 0.98 | 0.98 | 0.97 | | | | | |
| Reference* | 09-129.631 | 8691 | 60494 | 1.02 | 1.06 | 1 | 0.08 | Equal | 0.05 | 37 | |
| Reference* | 10-010.588 | 3107 | 26224 | 1.04 | 0.97 | 1.05 | 0.07 | Equal | -0.02 | 36 | |
| Reference* | 13-047.851 | 4576 | 37009 | 1.03 | 0.97 | 1.01 | 0.07 | Equal | -0.08 | 40 | |
| Reference* | 15-046.516 | 4191 | 31355 | 1 | 0.95 | 0.99 | 0.08 | Equal | -0.04 | 61 | |
| Reference* | 16-009.823 | 10845 | 74407 | 1.01 | 1.18 | 1.02 | 0.09 | Equal | -0.05 | 54 | |

Gráfico 1: Se observa el reporte de las muestras en el que aprecia en color rojo los rangos menores a 0.65 lo que indica una delección en los exones, 17, 30 y 49 del gen *NF1*.

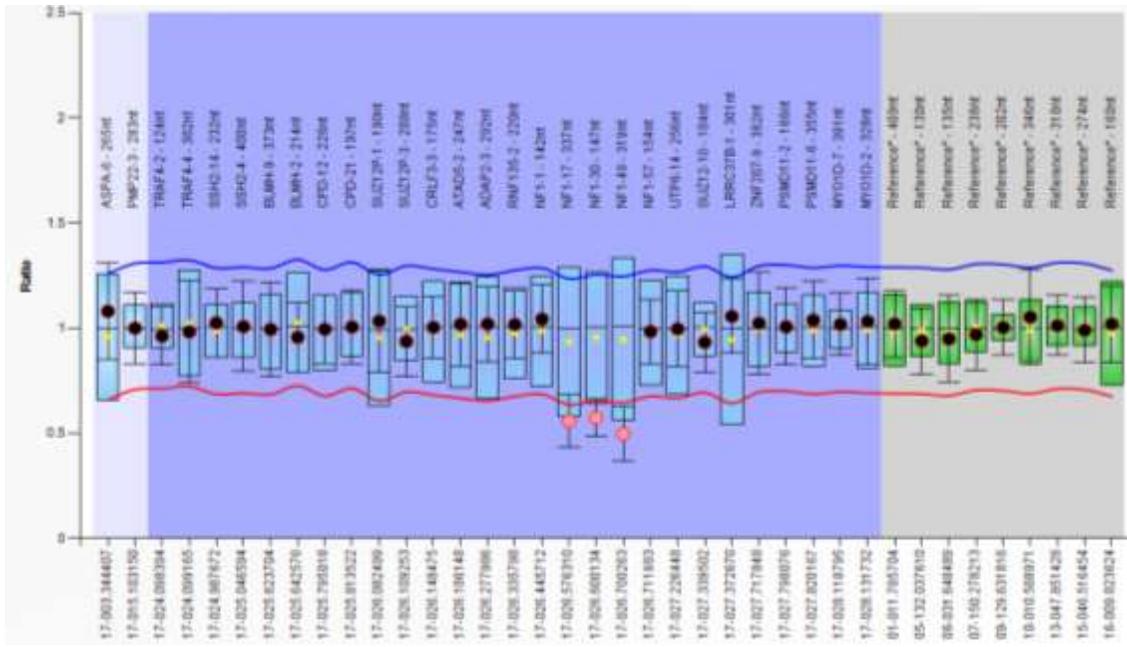


Gráfico 2: En este gráfico de proporciones se puede apreciar como las medias aparecen inferiores a la línea de referencia, mostrando una delección de los exones ya mencionados.

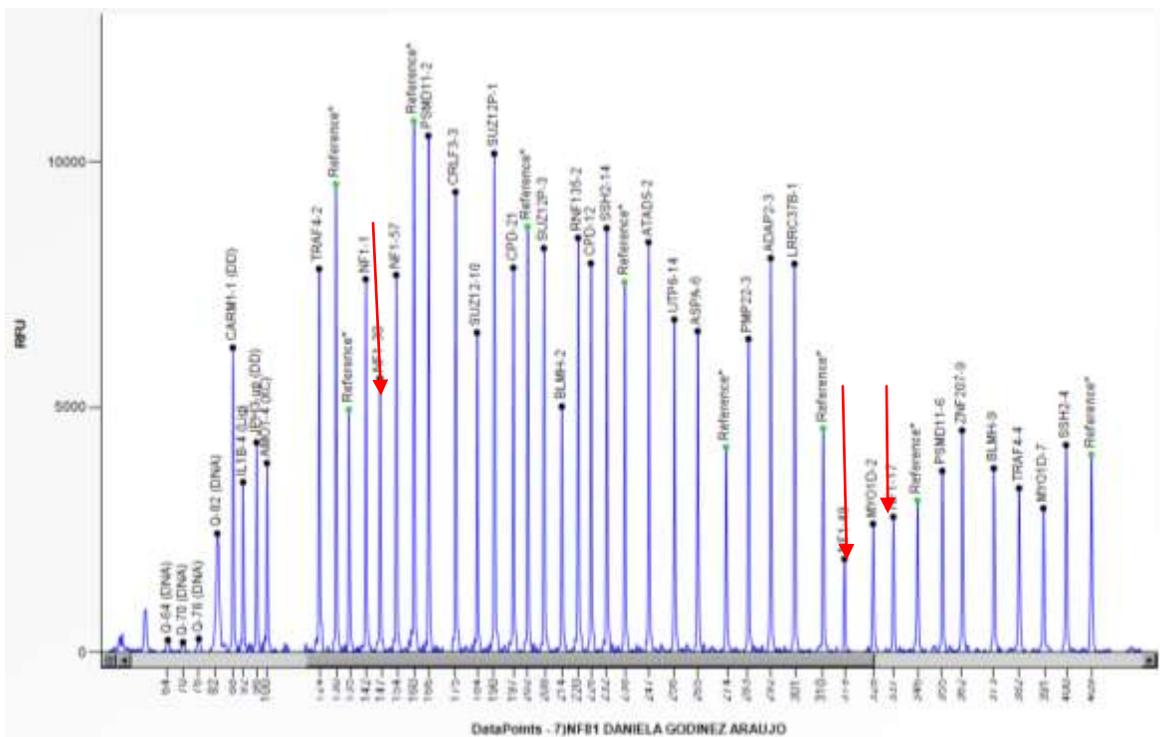


Gráfico 3: El electroferograma muestra picos en NF1-17,30 y 49 por debajo de 0.65(flechas).

Paciente 2: Paciente masculino de 37 años, talla de 167 cm peso 67 Kgs, presentó manchas café con leche desde los 4 años y que han aumentado en número desde los 17 años. A la exploración física presentaba manchas café con leche diseminadas en cara, cuello, tronco, abdomen y extremidades, efélides axilares e inguinales, neurofibromas cutáneos y subcutáneos en cara, tronco, abdomen y extremidades, neurofibromas plexiforme en nuca y abdomen, nódulos de Lisch, no presentaba alteraciones esqueléticas, alteraciones psiquiátricas como probable automutilación, se realizó tomografía axial computada la cual se reportó como normal, no presenta alteraciones cognitivas o neurológicas. Mediante el estudio de MLPA presentó una delección completa del gen *NF1* y de genes que se encuentran adyacentes a este y son 17q *ZUZ12P1*,*CRLF3-3*, *ATAD5-2*, *ADAP2-3*, *RNF35*, *NF1*, *UTP6-14*, (Gráficos 4,5,6).

| Probe target info | | | Height | Area | Intra r. | Pre r. | Final r. | Stdev | SamP | d(nt) | Width |
|-------------------|---------------|---------------|--------|--------|----------|--------|----------|-------|----------|-------|-------|
| 17p (n=2) | ASPA-6 | 17-003 344407 | 16576 | 130003 | 1.07 | 1.15 | 1.04 | 0.07 | Equal | 0.06 | 44 |
| | PMP-2-3 | 17-015 103150 | 17540 | 147977 | 1.01 | 1.03 | 0.99 | 0.08 | Equal | 0.08 | 49 |
| | TRAF-4-2 | 17-024 088294 | 19550 | 131299 | 0.99 | 0.98 | 1 | 0.06 | Equal | 0.07 | 67 |
| | TRAF-4-4 | 17-024 089165 | 17612 | 109093 | 0.99 | 1.11 | 1.02 | 0.05 | Equal | 0.07 | 54 |
| | SSH2-14 | 17-024 387672 | 21081 | 72159 | 1.04 | 1.00 | 1.01 | 0.00 | Equal | 0.75 | 64 |
| | SSH2-4 | 17-025 046594 | 17325 | 111105 | 0.91 | 1.00 | 0.94 | 0.00 | Equal | 0.24 | 61 |
| | BLMH-9 | 17-025 523704 | 12267 | 14425 | 0.97 | 1.00 | 0.99 | 0.01 | Equal | -0.01 | 36 |
| | BLMH-2 | 17-025 542076 | 12800 | 109750 | 1.05 | 1.05 | 1.00 | 0.08 | Equal | 0.13 | 60 |
| | CPD-12 | 17-025 795018 | 17441 | 134585 | 0.91 | 0.94 | 0.98 | 0.07 | Equal | 0.12 | 36 |
| | CPD-21 | 17-025 813522 | 18185 | 139656 | 1 | 0.99 | 0.99 | 0.05 | Equal | 0.04 | 41 |
| | SUZ12P-1 | 17-025 002499 | 11148 | 95457 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.04 | Decrease | -0.12 | 41 |
| | SUZ12P-3 | 17-025 109253 | 20599 | 155893 | 1.03 | 1.00 | 0.99 | 0.06 | Equal | 0.7 | 41 |
| | CRLF3-3 | 17-025 148475 | 17145 | 139002 | 0.55 | 0.59 | 0.59 | 0.04 | Decrease | 0.01 | 43 |
| | ATAD5-2 | 17-025 186148 | 18337 | 109340 | 0.54 | 0.6 | 0.55 | 0.04 | Decrease | 0.07 | 48 |
| | ADAP2-3 | 17-025 277596 | 17576 | 97989 | 0.51 | 0.62 | 0.56 | 0.04 | Decrease | 0.07 | 48 |
| | RNF35-2 | 17-025 316798 | 12218 | 96351 | 0.63 | 0.64 | 0.61 | 0.04 | Decrease | 0.11 | 29 |
| | NF1-1 | 17-025 448712 | 8723 | 69133 | 0.57 | 0.57 | 0.57 | 0.04 | Decrease | -0.02 | 59 |
| | NF1-17 | 17-025 576310 | 3669 | 75974 | 0.59 | 0.67 | 0.59 | 0.07 | Decrease | -0.02 | 37 |
| | NF1-30 | 17-025 600134 | 12032 | 88041 | 0.58 | 0.59 | 0.59 | 0.04 | Decrease | -0.05 | 30 |
| | NF1-49 | 17-025 700263 | 5197 | 23505 | 0.57 | 0.61 | 0.56 | 0.00 | Decrease | -0.02 | 48 |
| | NF1-57 | 17-025 711901 | 3116 | 34335 | 0.55 | 0.54 | 0.55 | 0.04 | Decrease | -0.02 | 52 |
| | UTP6-14 | 17-027 206448 | 3394 | 69524 | 0.55 | 0.57 | 0.57 | 0.04 | Decrease | 0.01 | 48 |
| | SUZ12-10 | 17-027 335503 | 16504 | 120341 | 1 | 1.01 | 0.99 | 0.08 | Equal | 0.04 | 36 |
| | LHN-2-8-1 | 17-027 372670 | 21721 | 187025 | 1.06 | 1.17 | 1.02 | 0.1 | Equal | 0.58 | 62 |
| | RNF307-9 | 17-027 773948 | 13345 | 122705 | 0.93 | 1.07 | 0.95 | 0.11 | Equal | -0.03 | 56 |
| | PSMD11-2 | 17-027 798076 | 22948 | 160906 | 0.97 | 0.96 | 0.99 | 0.1 | Equal | 0.07 | 29 |
| | PSMD11-4 | 17-027 820187 | 10477 | 93063 | 0.93 | 1.05 | 0.96 | 0.11 | Equal | -0.01 | 41 |
| MYO1D-7 | 17-028 118795 | 3658 | 37117 | 0.96 | 1.19 | 1.00 | 0.07 | Equal | 0.03 | 36 | |
| MYO1D-2 | 17-028 131192 | 9511 | 86398 | 0.5 | 1.04 | 0.5 | 0.06 | Equal | -0.01 | 25 | |
| Reference | 05-111 785194 | 14117 | 14163 | 1 | 1.26 | 1.04 | 0.29 | Equal | 0.04 | 62 | |
| Reference | 05-133 003570 | 20810 | 160536 | 0.97 | 0.98 | 1 | 0.09 | Equal | 0 | 44 | |
| Reference | 05-071 548489 | 11285 | 7658 | 1.01 | 1 | 1.01 | 0.01 | Equal | 0 | 44 | |
| Reference | 05-150 278233 | 19625 | 154387 | 1.05 | 1.07 | 1.00 | 0.07 | Equal | 0.1 | 68 | |
| Reference | 05-129 511713 | 21099 | 164813 | 1.06 | 1.07 | 1.05 | 0.06 | Equal | 0.12 | 68 | |
| Reference | 10-010 508974 | 7996 | 47651 | 0.98 | 1.03 | 0.99 | 0.06 | Equal | -0.05 | 62 | |
| Reference | 10-019 851149 | 10411 | 105203 | 0.98 | 1.03 | 0.99 | 0.06 | Equal | 0.01 | 61 | |
| Reference | 14-019 876102 | 10411 | 89103 | 0.93 | 0.98 | 0.91 | 0.08 | Equal | 0.04 | 61 | |
| Reference | 16-029 823502 | 22385 | 177076 | 0.98 | 1.01 | 0.99 | 0.1 | Equal | -0.03 | 40 | |

Gráfico 4: Reporte de las muestras en el que aprecia en color rojo los rangos menores a 0.65 lo que indica una delección del gen completo de *NF1* y los genes *ZUZ12P1*,*CRLF3-3*,*ATAD5-2*,*ADAP2-3*,*RNF35*,*UTP6-14*.

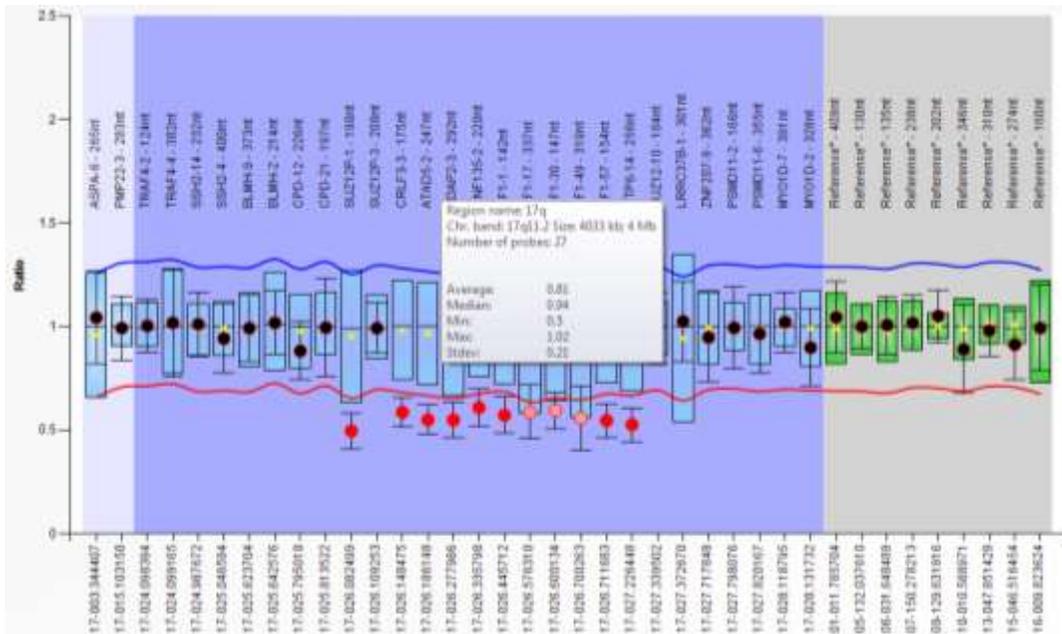


Gráfico 5: En este gráfico de proporciones se puede apreciar como las medias aparecen inferiores a la línea de referencia, mostrando una delección completa del gen NF1 y ZUZ12P1, CRLF3-3, ATAD5-2, ADAP2-3, RNF35, UTP6-14.

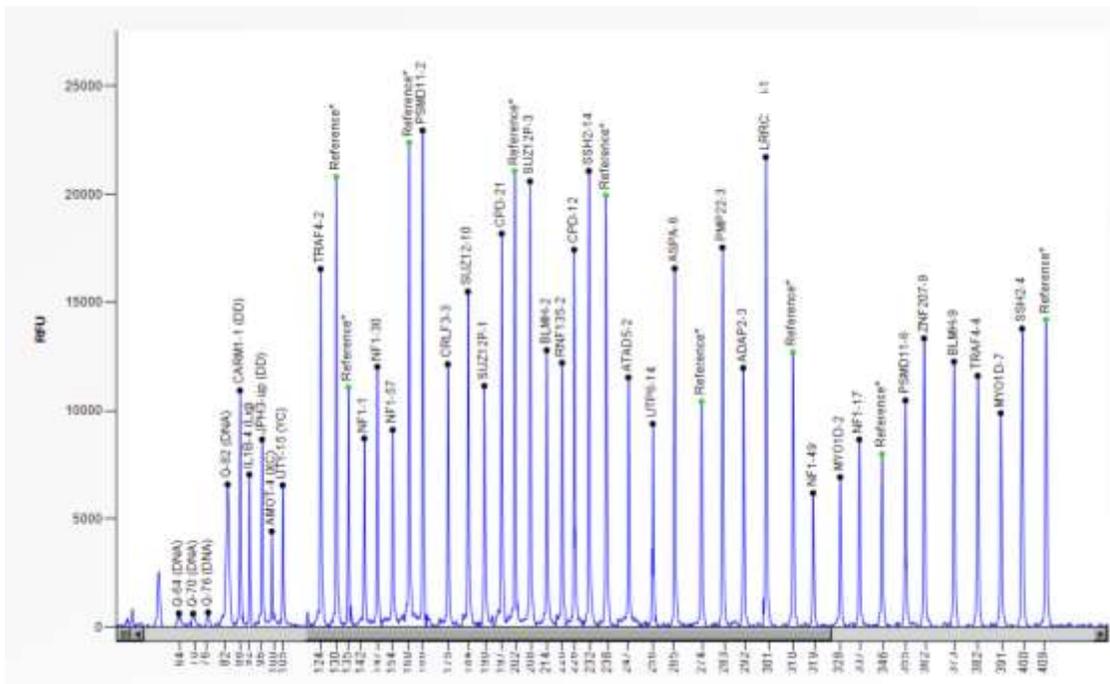


Gráfico 6: El electroferograma muestra picos en los genes ZUZ12P1, CRLF3-3, ATAD5-2, ADAP2-3, RNF35, NF1, UTP6-14, NF1, por debajo de 0.65 (flechas)

Paciente 3: Paciente femenino de 23 años con antecedente de madre con neurofibromatosis tipo 1, a la exploración física presenta manchas café con leche de diferentes tamaños en cara, cuello, tórax, abdomen y extremidades, efélides axilares, neurofibromas cutáneos y subcutáneos en todo el cuerpo, nódulos de Lisch desde los 12 años, sin alteraciones esqueléticas, ni neurológicas, el gen resultado de MLPA muestra delección intragénica de los exones 17, 30,49 y 57 del gen *NF1*. (Gráficos 7,8,9)

| Sample result overview | | Sample report | ratio chart | Electropherograms | | | | | | | |
|------------------------|------------|---------------|-------------------|-------------------|------------|-----------|------------|-------|-----------|-------|-------|
| | | | 6)NF68 | | | | | | | | |
| | | | Probe target info | | | | | | | | |
| | | | Height | Area | Intra r... | Pre ra... | Final r... | Stdev | SamP ... | d(nt) | Width |
| 17p (n=2) | ASPA-6 | 17-003.344407 | 8385 | 59794 | 0.98 | 0.98 | 0.95 | 0.1 | Equal | -0.02 | 39 |
| | PMP22-3 | 17-015.103150 | 9766 | 76022 | 0.92 | 0.9 | 0.9 | 0.07 | Equal | 0.03 | 44 |
| | TRAF4-2 | 17-024.098394 | 18142 | 124604 | 0.93 | 1.2 | 1.02 | 0.07 | Equal | 0.22 | 58 |
| | TRAF4-4 | 17-024.099165 | 4448 | 37046 | 0.73 | 0.73 | 0.78 | 0.11 | Equal | -0.01 | 38 |
| | SSH2-14 | 17-024.987672 | 15414 | 102561 | 1.16 | 1.25 | 1.13 | 0.09 | Equal | 0.02 | 46 |
| | SSH2-4 | 17-025.046594 | 6511 | 56922 | 0.79 | 0.78 | 0.89 | 0.11 | Equal | 0.08 | 55 |
| | BLMH-9 | 17-025.623704 | 5753 | 47051 | 0.88 | 0.89 | 0.96 | 0.09 | Equal | 0.03 | 46 |
| | BLMH-2 | 17-025.642576 | 9662 | 64633 | 1.05 | 1.13 | 1.01 | 0.1 | Equal | -0.03 | 40 |
| | CPD-12 | 17-025.795018 | 13079 | 86574 | 1.03 | 1.1 | 1 | 0.1 | Equal | -0.01 | 29 |
| | CPD-21 | 17-025.813522 | 13177 | 86420 | 0.99 | 1.09 | 0.97 | 0.12 | Equal | 0.03 | 34 |
| | SUZ12P-1 | 17-026.082499 | 16889 | 111598 | 0.97 | 1.09 | 1 | 0.09 | Equal | -0.25 | 59 |
| | SUZ12P-3 | 17-026.109253 | 11821 | 78500 | 0.83 | 0.94 | 0.8 | 0.12 | Equal | -0.03 | 46 |
| | CRLF3-3 | 17-026.148475 | 18343 | 121440 | 1.07 | 1.23 | 1.07 | 0.08 | Equal | 0 | 46 |
| | ATAD5-2 | 17-026.186148 | 12780 | 86397 | 1 | 1.02 | 0.98 | 0.07 | Equal | 0 | 46 |
| | ADAP2-3 | 17-026.277986 | 11074 | 83288 | 1 | 0.97 | 0.97 | 0.07 | Equal | -0.06 | 63 |
| | RNF135-2 | 17-026.335798 | 13860 | 95244 | 0.99 | 1.09 | 0.99 | 0.06 | Equal | -0.04 | 40 |
| | NF1-1 | 17-026.445712 | 16446 | 106603 | 0.97 | 1.22 | 1.07 | 0.1 | Equal | -0.37 | 41 |
| | NF1-17 | 17-026.576310 | 3654 | 28993 | 0.48 | 0.45 | 0.5 | 0.04 | Decreases | 0 | 46 |
| | NF1-30 | 17-026.600134 | 11637 | 78743 | 0.54 | 0.7 | 0.56 | 0.04 | Decreases | -0.44 | 46 |
| | NF1-49 | 17-026.700263 | 3063 | 22611 | 0.53 | 0.51 | 0.52 | 0.05 | Decreases | 0.03 | 29 |
| | NF1-57 | 17-026.711683 | 7881 | 56070 | 0.53 | 0.66 | 0.53 | 0.05 | Decreases | -0.63 | 42 |
| | UTP6-14 | 17-027.226448 | 10357 | 73471 | 0.9 | 0.94 | 0.88 | 0.09 | Equal | 0.01 | 68 |
| | SUZ12-10 | 17-027.339502 | 11438 | 74983 | 0.97 | 1.11 | 1 | 0.06 | Equal | -0.01 | 39 |
| | LRRC37B-1 | 17-027.372670 | 12234 | 86589 | 1.04 | 1.01 | 1 | 0.1 | Equal | -0.02 | 37 |
| | ZNF207-9 | 17-027.717848 | 6841 | 54804 | 0.92 | 0.89 | 0.99 | 0.11 | Equal | 0 | 42 |
| | PSMD11-2 | 17-027.798076 | 22935 | 143193 | 1.12 | 1.29 | 1.14 | 0.08 | Equal | 0.02 | 37 |
| | PSMD11-6 | 17-027.820167 | 4867 | 38999 | 0.9 | 0.89 | 0.95 | 0.09 | Equal | 0 | 33 |
| | MYO1D-7 | 17-028.118795 | 4797 | 40308 | 0.92 | 0.91 | 1.04 | 0.09 | Equal | 0 | 35 |
| | MYO1D-2 | 17-028.131732 | 3888 | 31837 | 0.96 | 0.89 | 0.97 | 0.08 | Equal | -0.04 | 42 |
| | Reference* | 01-011.785704 | 6424 | 56702 | 0.86 | 0.85 | 1 | 0.11 | Equal | 0.04 | 51 |
| | Reference* | 05-132.037610 | 19449 | 119950 | 0.84 | 1.14 | 0.87 | 0.14 | Equal | 0.57 | 47 |
| | Reference* | 06-031.648489 | 9272 | 65446 | 0.84 | 1.17 | 0.92 | 0.13 | Equal | -0.25 | 49 |
| | Reference* | 07-150.278213 | 11673 | 79752 | 0.94 | 0.98 | 0.9 | 0.11 | Equal | -0.01 | 39 |
| | Reference* | 09-129.631816 | 14924 | 99004 | 1.01 | 1.11 | 1 | 0.07 | Equal | -0.02 | 53 |
| | Reference* | 10-010.588971 | 5053 | 42522 | 1.14 | 1.04 | 1.14 | 0.13 | Equal | 0 | 46 |
| | Reference* | 13-047.851428 | 7096 | 53963 | 1.01 | 0.97 | 1 | 0.06 | Equal | -0.07 | 51 |
| | Reference* | 15-046.516454 | 6912 | 50318 | 1.02 | 1 | 1 | 0.07 | Equal | 0 | 52 |
| | Reference* | 16-009.823624 | 19493 | 125392 | 1 | 1.21 | 1.01 | 0.07 | Equal | -0.87 | 39 |

Gráfico 7: Este gráfico de reporte de las muestras se observa en color rojo los rangos menores a 0.65, lo que indica una delección de los exones 17, 30,49 y 57 del gen *NF1*

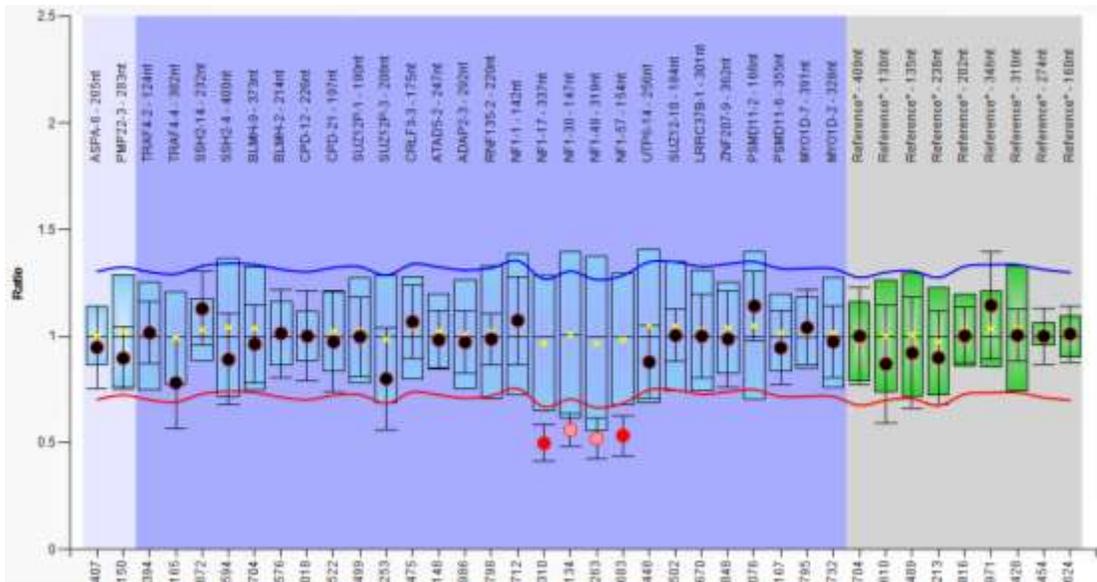


Gráfico 8: En este gráfico de proporciones se puede apreciar como las medias aparecen por debajo de la línea de referencia, mostrando una deleción de los exones 17,30,49 y 57 del gen *NF1*.

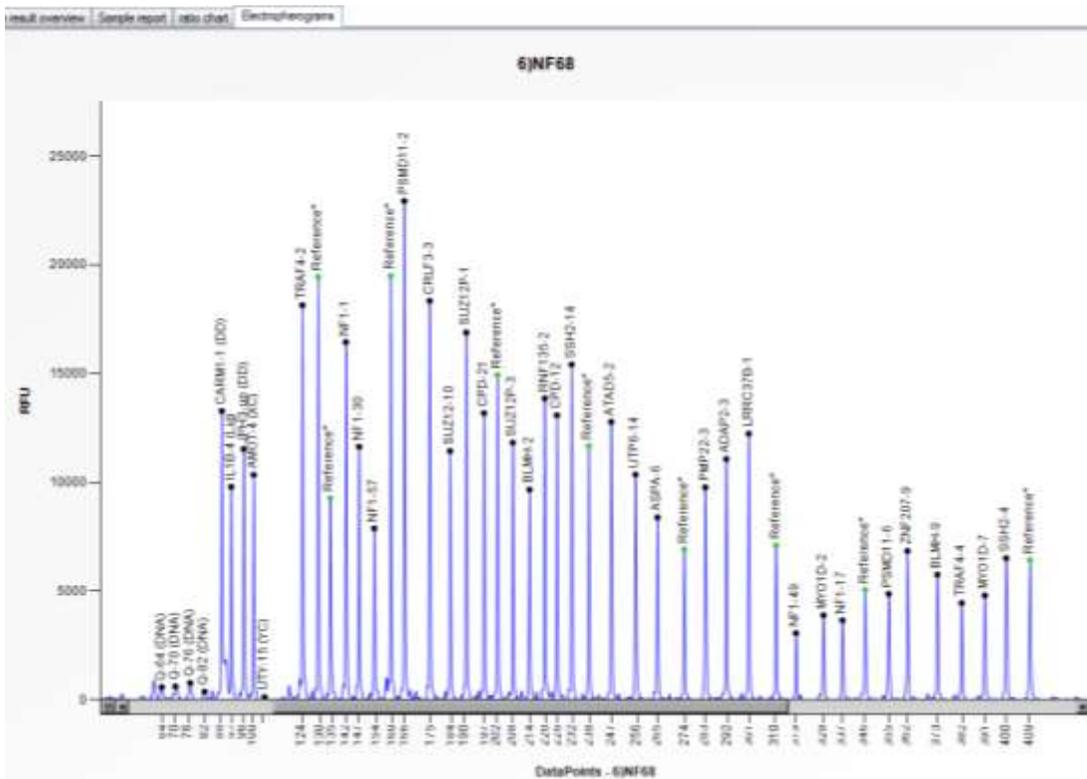


Gráfico 9: Electroferograma que muestra disminución de los picos en los exones 17,30,49 y 57 del gen *NF1*.

Paciente 4: Paciente masculino de 18 años de edad, con antecedente de padre y hermana diagnosticados con neurofibromatosis tipo 1, padre fallecido por un sarcoma, refiere el paciente que a los 4 años se realizó resección de neurofibroma plexiforme en parpado derecho y 5 cirugías reconstructivas de la zona, orquidopexia a los 5 años, ambliopía de ojo der desde los 16 años. Los resultados de MLPA muestran una delección del exón 49 del gen *NF1*. (Gráfico 10,11,12)

| Sample result overview | | Sample report | ratio chart | Electropherograms | | | | | | | |
|------------------------|---------------|-------------------|-------------|-------------------|----------|---------|----------|-------|----------|-------|-------|
| | | 7NF70 | | | | | | | | | |
| | | Probe target info | | | | | | | | | |
| | | | Height | Area | Intra r. | Pre ra. | Final r. | Stdev | SamP | d(nt) | Width |
| 17p (n=2) | ASPA-6 | 17-2003 344407 | 11411 | 77858 | 1.03 | 1 | 0.98 | 0.08 | Equal | 0 | 49 |
| | PMP22-3 | 17-2015 103150 | 15376 | 112049 | 1.06 | 1.05 | 1 | 0.1 | Equal | 0 | 51 |
| 17q (n=27) | TRAF4-2 | 17-2024 098254 | 16140 | 105936 | 0.96 | 0.8 | 1.01 | 0.07 | Equal | 0.3 | 42 |
| | TRAF4-4 | 17-2024 099165 | 11465 | 90866 | 1.04 | 1.45 | 1.08 | 0.05 | Equal | 0.04 | 55 |
| | SSH2-14 | 17-2024 987672 | 16043 | 106892 | 1.02 | 0.96 | 0.98 | 0.07 | Equal | 0.01 | 48 |
| | SSH2-4 | 17-2025 046594 | 14672 | 120372 | 0.95 | 1.33 | 1.03 | 0.07 | Equal | -0.02 | 68 |
| | BLMH-9 | 17-2025 623704 | 11294 | 89192 | 0.98 | 1.31 | 1.05 | 0.07 | Equal | 0.01 | 56 |
| | BLMH-2 | 17-2025 642876 | 11745 | 76298 | 1.13 | 1 | 1.08 | 0.07 | Equal | -0.05 | 36 |
| | CPD-12 | 17-2025 795018 | 16599 | 114240 | 1.13 | 1.02 | 1.08 | 0.07 | Equal | 0.03 | 52 |
| | CPD-21 | 17-2025 813522 | 15696 | 105235 | 1.1 | 0.97 | 1.03 | 0.07 | Equal | -0.1 | 48 |
| | SUZ12P-1 | 17-2026 082499 | 17236 | 115720 | 0.95 | 0.83 | 0.94 | 0.08 | Equal | -0.33 | 48 |
| | SUZ12P-3 | 17-2026 109253 | 16964 | 109415 | 1.08 | 0.99 | 1.02 | 0.07 | Equal | -0.08 | 47 |
| | CRLF3-3 | 17-2026 148475 | 16761 | 114170 | 0.97 | 0.84 | 0.95 | 0.09 | Equal | -0.09 | 64 |
| | ATAD5-2 | 17-2026 186148 | 16445 | 109772 | 1.05 | 0.98 | 1 | 0.08 | Equal | -0.01 | 56 |
| | ADAP2-3 | 17-2026 277986 | 15143 | 106523 | 0.98 | 1 | 0.92 | 0.07 | Equal | -0.03 | 52 |
| | RNF135-2 | 17-2026 335798 | 16333 | 113066 | 1.02 | 0.95 | 1 | 0.08 | Equal | -0.02 | 53 |
| | NF1-1 | 17-2026 448712 | 13987 | 91704 | 0.91 | 0.78 | 0.97 | 0.08 | Equal | -0.35 | 41 |
| | NF1-17 | 17-2026 576310 | 12401 | 91111 | 1.03 | 1.13 | 1.04 | 0.08 | Equal | -0.02 | 36 |
| | NF1-30 | 17-2026 600134 | 19391 | 122985 | 0.96 | 0.86 | 0.98 | 0.09 | Equal | -0.4 | 41 |
| | NF1-49 | 17-2026 700263 | 4966 | 36776 | 0.67 | 0.62 | 0.64 | 0.06 | Decrease | -2.03 | 54 |
| | NF1-57 | 17-2026 711683 | 14106 | 95089 | 1.01 | 0.86 | 1 | 0.1 | Equal | -0.68 | 54 |
| | UTP6-14 | 17-2027 226448 | 15341 | 103538 | 1.06 | 1.02 | 1 | 0.07 | Equal | -0.02 | 50 |
| | SUZ12-10 | 17-2027 335502 | 11571 | 76513 | 0.96 | 0.86 | 0.95 | 0.07 | Equal | -0.13 | 50 |
| | LRR37B-1 | 17-2027 372670 | 16159 | 113189 | 0.96 | 1 | 0.93 | 0.09 | Equal | -0.02 | 49 |
| | ZNF207-9 | 17-2027 717848 | 12437 | 85567 | 0.99 | 1.23 | 1.02 | 0.07 | Equal | -0.01 | 47 |
| | PSMD11-2 | 17-2027 798076 | 19650 | 124172 | 0.98 | 0.85 | 0.98 | 0.08 | Equal | -0.11 | 39 |
| | PSMD11-6 | 17-2027 820167 | 8914 | 63462 | 0.99 | 1.22 | 1 | 0.07 | Equal | -0.06 | 44 |
| | MYO1D-7 | 17-2028 118795 | 8467 | 69049 | 0.89 | 1.21 | 1 | 0.09 | Equal | 0.02 | 55 |
| | MYO1D-2 | 17-2028 131732 | 6467 | 45439 | 1.02 | 1.13 | 1.02 | 0.07 | Equal | -0.03 | 62 |
| Reference* | 01-011 785704 | 11917 | 101336 | 0.83 | 1.18 | 0.96 | 0.08 | Equal | 0.01 | 66 | |
| Reference* | 05-132 037670 | 21392 | 134280 | 1.04 | 0.94 | 1.05 | 0.07 | Equal | 0.05 | 61 | |
| Reference* | 06-201 648489 | 70677 | 69821 | 1.08 | 0.98 | 1.14 | 0.22 | Equal | -0.23 | 44 | |
| Reference* | 07-150 278213 | 17080 | 116228 | 1.15 | 1.05 | 1.07 | 0.07 | Equal | 0.02 | 59 | |
| Reference* | 09-129 631816 | 16027 | 105739 | 1 | 0.89 | 0.97 | 0.07 | Equal | -0.01 | 43 | |
| Reference* | 10-010 568971 | 7146 | 56570 | 0.99 | 1.1 | 0.99 | 0.08 | Equal | -0.04 | 39 | |
| Reference* | 13-047 851428 | 10320 | 75978 | 1 | 1.05 | 0.98 | 0.07 | Equal | 0.01 | 53 | |
| Reference* | 15-046 516454 | 10335 | 70811 | 1.15 | 1.14 | 1.07 | 0.07 | Equal | 0 | 47 | |
| Reference* | 16-009 823624 | 18765 | 126193 | 1 | 0.87 | 1 | 0.07 | Equal | -0.93 | 55 | |

Gráfico 10: Este gráfico muestra solo el exón 49 con un rango menor a 0.65 de color rojo el cual demuestra delección del mismo.

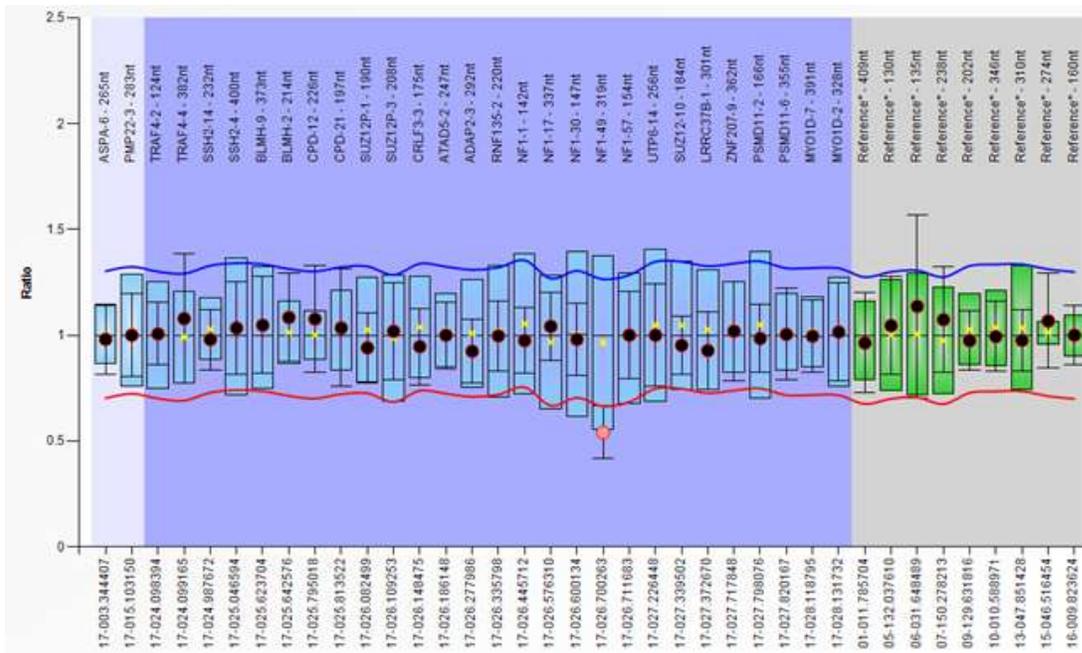


Gráfico 11: Gráfico de proporciones en el que se puede observar el exón 49 por debajo de la línea de referencia (delección).

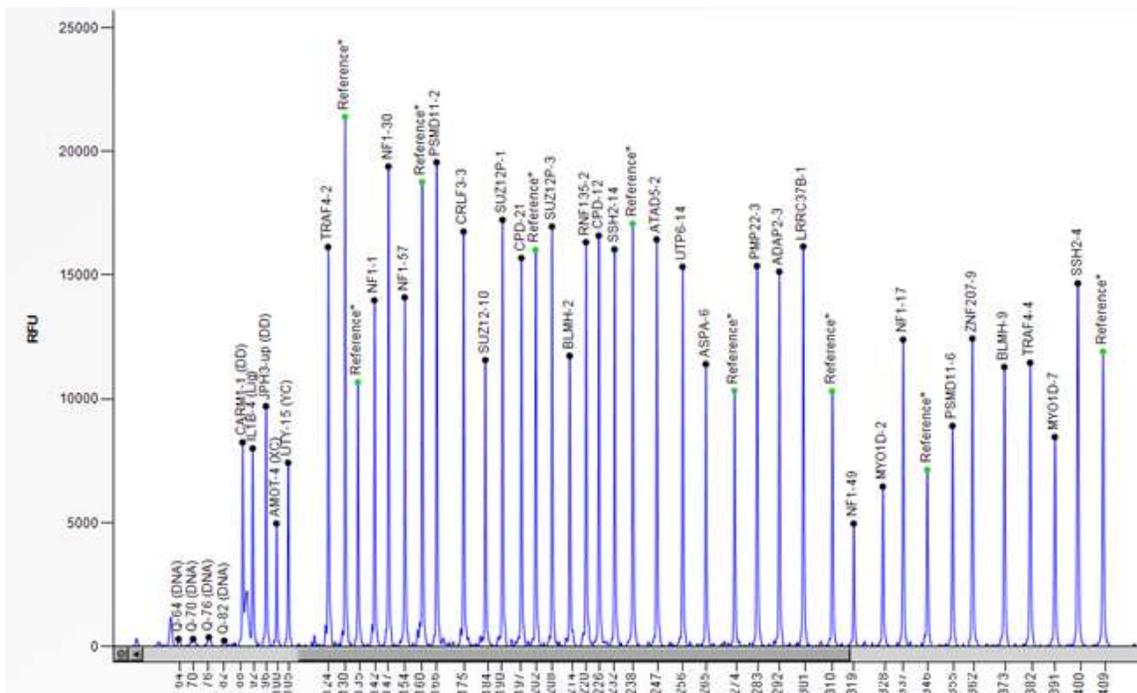


Gráfico 12: Se muestra electroferograma con un pico para el exón 49 inferior a 0.65 (flecha)

Paciente 5: Paciente masculino de 46 años peso 65 Kgs, talla 168 cm, sin antecedentes familiares de la enfermedad, se realizó resección de neurofibroma plexiforme en región torácica que ocasionaba dolor, a la exploración física presenta múltiples manchas café con leche en cara, cuello, tórax, abdomen y extremidades, así como efélides axilares, neurofibromas subcutáneos en región malar y mandibular los cuales provocan prurito, neurofibromas cutáneos diseminados en todo el cuerpo, escoliosis torácica y nódulos de Lisch. En este paciente se encontró una delección del exón 30 del gen *NF1*. (Gráficos 13, 14,15)

| Sample result overview | | Sample report | | ratio chart | | Electropherograms | | | | | |
|------------------------|---------------|-------------------|-------|-------------|--------|-------------------|----------|----------|----------|-------|-------|
| | | Probe target info | | 29) NF94 R | | | | | | | |
| | | | | Height | Area | Intra r. | Final r. | Stdev | SamP | d(nt) | Width |
| 17p (n=2) | ASPA-6 | 17-003 344407 | | 5190 | 62549 | 0.6 | 0.66 | 0.1 | Decrease | 0.02 | 65 |
| | PMP22-3 | 17-015 100150 | | 13118 | 122227 | 1.51 | 1.02 | 0.09 | Equal | 0.03 | 62 |
| 17q (n=27) | TRAF4-2 | 17-024 098394 | | 15086 | 114256 | 1.74 | 1 | 0.1 | Equal | -0.01 | 63 |
| | TRAF4-4 | 17-024 099165 | | 7304 | 75168 | 0.84 | 1 | 0.1 | Equal | -0.01 | 47 |
| | SSH2-14 | 17-024 981672 | | 11904 | 111952 | 1.37 | 0.81 | 0.07 | Equal | 0.01 | 51 |
| | SSH2-4 | 17-025 046594 | | 7771 | 87126 | 0.89 | 0.97 | 0.08 | Equal | 0.38 | 54 |
| | BLMH-9 | 17-025 623704 | | 7211 | 72317 | 0.83 | 0.93 | 0.08 | Equal | -0.02 | 51 |
| | BLMH-2 | 17-025 642576 | | 10013 | 94892 | 1.15 | 0.97 | 0.08 | Equal | -0.02 | 46 |
| | CPD-12 | 17-025 795018 | | 11046 | 94243 | 1.27 | 0.81 | 0.1 | Equal | 0 | 45 |
| | CPD-21 | 17-025 813522 | | 14549 | 118960 | 1.67 | 0.97 | 0.08 | Equal | 0.01 | 51 |
| | SUZ12P-1 | 17-026 062499 | | 17571 | 139806 | 2.02 | 0.96 | 0.09 | Equal | 0.04 | 38 |
| | SUZ12P-3 | 17-026 109253 | | 14904 | 118849 | 1.71 | 1.09 | 0.09 | Equal | 0 | 42 |
| | CRF3-3 | 17-026 148475 | | 11630 | 104856 | 1.34 | 0.83 | 0.08 | Equal | 0.14 | 43 |
| | ATAD5-2 | 17-026 186148 | | 14489 | 126708 | 1.78 | 1.07 | 0.09 | Equal | 0 | 46 |
| | ADAP2-3 | 17-026 277986 | | 12677 | 109110 | 1.46 | 1.06 | 0.1 | Equal | 0.01 | 55 |
| | RNF135-2 | 17-026 335798 | | 13924 | 136886 | 1.6 | 0.91 | 0.08 | Equal | 0 | 56 |
| | NF1-1 | 17-026 445712 | | 11732 | 87870 | 1.29 | 1.08 | 0.1 | Equal | 0 | 34 |
| | NF1-17 | 17-026 576310 | | 3880 | 83181 | 1.02 | 1.05 | 0.1 | Equal | 0 | 48 |
| | NF1-30 | 17-026 600134 | | 10889 | 89934 | 1.25 | 0.64 | 0.07 | Decrease | -0.05 | 36 |
| | NF1-49 | 17-026 700263 | | 5677 | 52895 | 0.65 | 0.86 | 0.09 | Equal | 0.06 | 42 |
| | NF1-57 | 17-026 711683 | | 13103 | 102596 | 1.51 | 1.03 | 0.1 | Equal | 0 | 60 |
| | UTP6-14 | 17-027 226448 | | 13033 | 112243 | 1.5 | 1 | 0.14 | Equal | -0.01 | 68 |
| | SUZ12-10 | 17-027 339502 | | 11021 | 89916 | 1.27 | 1.06 | 0.1 | Equal | 0.03 | 38 |
| | LRRC37B-1 | 17-027 372670 | | 11997 | 104627 | 1.38 | 1.15 | 0.1 | Equal | 0.01 | 48 |
| | ZNF207-9 | 17-027 717848 | | 7560 | 75789 | 0.87 | 0.89 | 0.1 | Equal | -0.05 | 50 |
| | PSMD11-2 | 17-027 798076 | | 17497 | 128625 | 2.01 | 0.99 | 0.09 | Equal | -0.02 | 33 |
| | PSMD11-6 | 17-027 820167 | | 5928 | 57461 | 0.68 | 1.01 | 0.1 | Equal | -0.02 | 40 |
| | MYO10-7 | 17-028 118795 | | 5040 | 56704 | 0.58 | 0.88 | 0.08 | Equal | -0.01 | 53 |
| | MYO10-2 | 17-028 131732 | | 4551 | 47786 | 0.52 | 0.93 | 0.1 | Equal | 0.02 | 55 |
| Reference* | 01-011 785704 | | 6679 | 71205 | 0.77 | 0.92 | 0.1 | Equal | -0.45 | 33 | |
| Reference* | 05-132 037610 | | 18319 | 136013 | 2.11 | 1.03 | 0.09 | Equal | 0.02 | 31 | |
| Reference* | 06-031 648489 | | 8696 | 69318 | 1 | 1.01 | 0.08 | Equal | 0.06 | 38 | |
| Reference* | 07-150 278213 | | 15153 | 116053 | 1.74 | 1.03 | 0.1 | Equal | 0.04 | 49 | |
| Reference* | 09-129 631816 | | 14626 | 118472 | 1.68 | 1.01 | 0.08 | Equal | 0 | 40 | |
| Reference* | 10-010 588971 | | 4475 | 43529 | 0.51 | 0.84 | 0.1 | Equal | 0 | 47 | |
| Reference* | 13-047 851428 | | 7894 | 71632 | 0.91 | 1.05 | 0.1 | Equal | 0.07 | 50 | |
| Reference* | 15-046 516454 | | 4678 | 62369 | 0.54 | 0.6 | 0.06 | Decrease | 0.01 | 63 | |
| Reference* | 16-009 823624 | | 15972 | 119973 | 1.92 | 0.97 | 0.11 | Equal | 0.02 | 36 | |

Gráfico 13: En este gráfico la proporción final del exón 30 se encuentra deletado, menor a 0.65.

Paciente 6: Paciente masculino de 26 años de edad, sin antecedentes familiares de neurofibromatosis, cuenta con los antecedentes de fractura clavicular a los 4 años, orquiectomía a los 25 años por presentar cáncer testicular izquierdo y miopía desde los 14 años. A la exploración física presenta macrocefalia relativa, manchas café con leche en tórax, abdomen y extremidades, efélides axilares, neurofibromas cutáneos y subcutáneos principalmente en tórax y nódulos de Lisch. Los resultados del estudio de MLPA mostro una delección del gen *TRAF4-4* sin delección del gen *NF1* (Gráficos 16, 17, 18).

| | | Probe target info | | Height | Area | Intra r. | Final r. | Stdev | SampP | d(nt) | Width |
|------------|---------------|-------------------|-------|--------|--------|----------|----------|----------|----------|-------|-------|
| 17p (n=2) | ASPA-6 | 17-003 344407 | | 7011 | 58261 | 0.85 | 0.99 | 0.32 | Equal | -0.07 | 45 |
| | PMP22-3 | 17-015 103150 | | 10375 | 91982 | 1.26 | 0.92 | 0.11 | Equal | -0.05 | 43 |
| 17q (n=27) | TRAF4-2 | 17-024 098394 | | 15358 | 116425 | 1.87 | 1.15 | 0.16 | Equal | 0.01 | 73 |
| | TRAF4-4 | 17-024 099165 | | 3835 | 40233 | 0.47 | 0.61 | 0.11 | Decrease | -0.04 | 44 |
| | SSH2-14 | 17-024 987672 | | 14470 | 125331 | 1.76 | 1.07 | 0.19 | Equal | -0.05 | 47 |
| | SSH2-4 | 17-025 046594 | | 5772 | 62838 | 0.7 | 0.78 | 0.11 | Equal | 0.44 | 58 |
| | BLMH-9 | 17-025 623704 | | 5484 | 57168 | 0.87 | 0.79 | 0.08 | Equal | 0.02 | 45 |
| | BLMH-2 | 17-025 642576 | | 9737 | 81 | | | | | 0.02 | 40 |
| | CPD-12 | 17-025 792018 | | 14128 | 122139 | 1.72 | 1.13 | 0.16 | Equal | 0 | 50 |
| | CPD-21 | 17-025 813522 | | 15545 | 125108 | 1.89 | 1.18 | 0.16 | Equal | -0.01 | 65 |
| | SUZ12P-1 | 17-026 087499 | | 18817 | 146567 | 2.29 | 1.13 | 0.16 | Equal | -0.01 | 40 |
| | SUZ12P-3 | 17-026 109253 | | 12099 | 92756 | 1.47 | 0.98 | 0.16 | Equal | 0.02 | 39 |
| | CRLF3-3 | 17-026 148475 | | 14104 | 122062 | 1.72 | 1.13 | 0.24 | Equal | -0.15 | 52 |
| | ATAD5-2 | 17-026 186148 | | 12460 | 102229 | 1.32 | 0.95 | 0.1 | Equal | 0 | 41 |
| | ADAP2-3 | 17-026 277886 | | 9974 | 85613 | 1.21 | 0.95 | 0.16 | Equal | -0.03 | 37 |
| | RNF135-2 | 17-026 335798 | | 14925 | 125003 | 1.82 | 1.09 | 0.16 | Equal | -0.02 | 46 |
| | NF1-1 | 17-026 445712 | | 7632 | 71738 | 0.93 | 0.82 | 0.16 | Equal | -0.05 | 62 |
| | NF1-17 | 17-026 576310 | | 6081 | 58028 | 0.74 | 0.8 | 0.16 | Equal | -0.02 | 64 |
| | NF1-30 | 17-026 600134 | | 18984 | 140196 | 2.31 | 1.25 | 0.25 | Equal | 0 | 49 |
| | NF1-49 | 17-026 700263 | | 6316 | 57149 | 0.77 | 1.03 | 0.16 | Equal | -0.08 | 47 |
| | NF1-57 | 17-026 711883 | | 12396 | 101589 | 1.58 | 1.16 | 0.16 | Equal | -0.01 | 47 |
| | UTP6-14 | 17-027 226448 | | 11213 | 91386 | 1.37 | 0.97 | 0.16 | Equal | -0.05 | 37 |
| | SUZ12-10 | 17-027 339502 | | 10421 | 87312 | 1.27 | 1.12 | 0.16 | Equal | -0.04 | 54 |
| | LRR37B-1 | 17-027 372670 | | 8119 | 71226 | 0.99 | 0.89 | 0.16 | Equal | -0.07 | 38 |
| | ZNF207-9 | 17-027 717848 | | 6988 | 69694 | 0.85 | 0.96 | 0.11 | Equal | 0 | 52 |
| | PSMD11-2 | 17-027 798076 | | 20096 | 148703 | 2.45 | 1.25 | 0.29 | Equal | 0.01 | 43 |
| | PSMD11-6 | 17-027 820167 | | 4417 | 44681 | 0.54 | 0.83 | 0.1 | Equal | 0 | 59 |
| | MYO1D-7 | 17-028 118795 | | 4256 | 48497 | 0.62 | 0.81 | 0.11 | Equal | 0.01 | 53 |
| | MYO1D-2 | 17-028 131732 | | 4097 | 39277 | 0.5 | 0.95 | 0.11 | Equal | -0.05 | 47 |
| Reference* | 01-011 785704 | | 4195 | 47060 | 0.51 | 0.67 | 0.08 | Decrease | -0.32 | 52 | |
| Reference* | 05-132 037610 | | 18029 | 130119 | 2.2 | 1.13 | 0.17 | Equal | -0.03 | 50 | |
| Reference* | 06-031 648489 | | 9213 | 53951 | 1 | 1.11 | 0.17 | Equal | -0.05 | 26 | |
| Reference* | 07-150 278213 | | 11024 | 87844 | 1.34 | 0.92 | 0.16 | Equal | 0 | 38 | |
| Reference* | 09-129 631816 | | 12872 | 104117 | 1.57 | 0.99 | 0.1 | Equal | 0 | 55 | |
| Reference* | 10-010 588971 | | 4655 | 46741 | 0.65 | 0.99 | 0.12 | Equal | -0.05 | 61 | |
| Reference* | 13-047 851428 | | 6365 | 57116 | 0.77 | 0.95 | 0.11 | Equal | -0.03 | 55 | |
| Reference* | 15-046 516454 | | 7309 | 61659 | 0.89 | 1 | 0.11 | Equal | -0.03 | 35 | |
| Reference* | 16-009 823624 | | 16566 | 126651 | 2.02 | 1.16 | 0.19 | Equal | -0.07 | 45 | |

Gráfico 16: Gráfico de muestras en el que se puede ver una proporción final menor a 0.65 que evidencia una delección del gen *TRAF-4*.

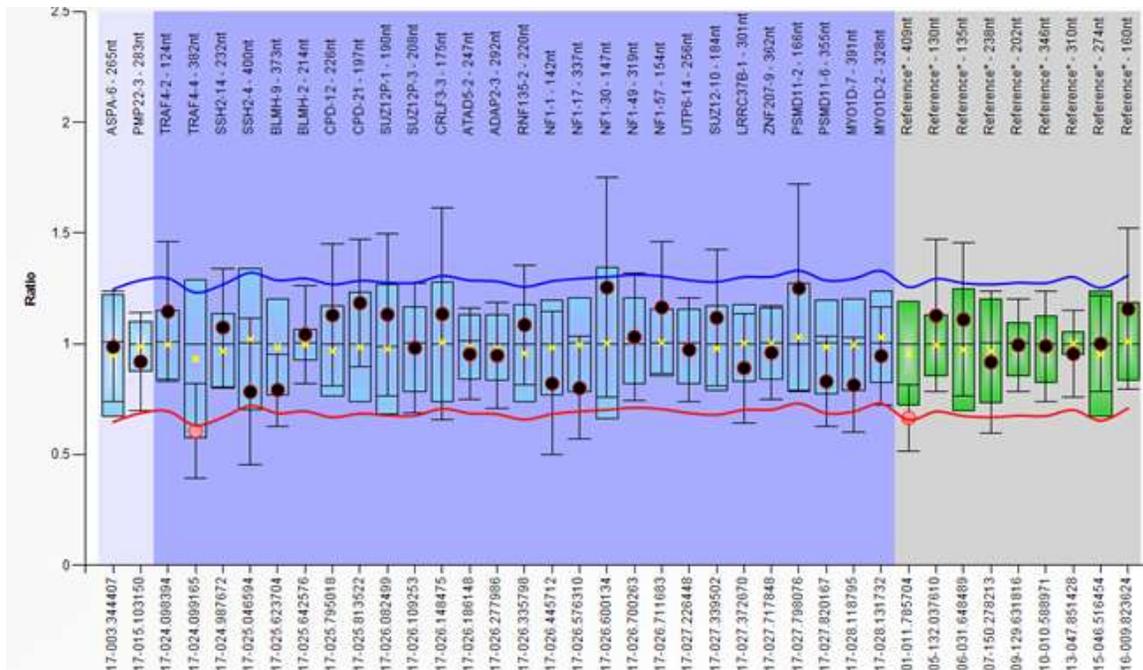


Gráfico 17: Gráfico de proporciones en el que se ve el gen TRAF-4-4 por debajo de la línea basal de referencia.

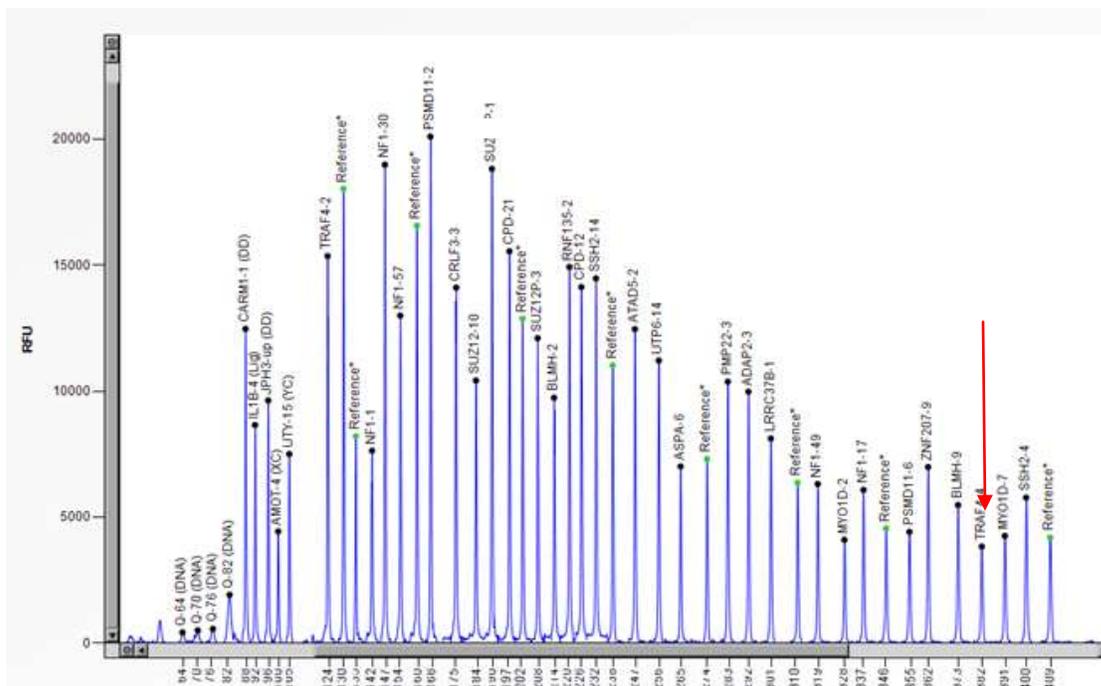


Gráfico 18: Electroferograma donde se ve el pico de TRAF4-4 disminuido en su tamaño con respecto a los picos de referencia (flecha).

Las 5 deleciones del gen *NF1*, encontradas en nuestros 40 pacientes corresponden al 12.5%, dato que es ligeramente superior a lo reportado en la literatura si se tiene en cuenta que las deleciones completas del gen, se presentan en alrededor del 5 al 10% de los casos con neurofibromatosis tipo 1.

Las deleciones de los exones del gen *NF1* explican el fenotipo encontrado en los pacientes sin embargo no se puede hacer una relación fenotipo-genotipo dado que los pacientes presentaban datos clínicos muy similares, entre los que tuvieron deleciones de tres exones y los que tuvieron deleciones de un solo exón, El paciente que presento la deleción completa del gen *NF1* y genes adyacentes a este, tiene características ligeramente más severas como una mayor cantidad de manchas café con leche y de neurofibromas incluyendo trastornos psiquiátricos aunque no se pudo demostrar un déficit intelectual o daño neurológico.

Finalmente se encontró una deleción del gen *TRAF-4* ó factor 4 asociado al receptor de necrosis tumoral, el cual se ha identificado que esta sobre expresado en cáncer de mama, el gen TRAF4 es requerido en la embriogénesis para la formación de la tráquea, el esqueleto axial y el cierre del tubo neural, (52) por lo que participa en la neurulación. Esta deleción de TRAF-4 se encontró en forma aislada y no explica el fenotipo de neurofibromatosis tipo 1, probablemente porque se debe a una mutación puntual la cual no pudo ser detectada por este método o que la deleción se encuentre en un exón que no fue incluido en la SALSA con la que se realizó el MLPA. En todos los casos con deleción se repitió el estudio de MLPA con una SALSA que contenía más exones del gen, para la búsqueda de una deleción en cualquier otro exón del gen *NF1*, que no estuviera incluido en la SALSA que se utilizó inicialmente

XII.- DISCUSION

El gran tamaño del gen *NF1* plantea un reto metodológico para estudiar las alteraciones moleculares a nivel génico y de este modo establecer un método diagnóstico rutinario de la enfermedad. Además, la complejidad de la arquitectura genómica de 17q11 que contiene secuencias homólogas contiguas al gen *NF1* plantea aún más dificultades para el análisis metodológico de las alteraciones a nivel génico. En este trabajo utilizamos el método de MLPA con el fin de caracterizar las deleciones y duplicaciones que se encuentran presentes en el gen *NF1* en pacientes con neurofibromatosis que acuden al Servicio de Genética del Hospital General de México.

Los datos obtenidos nos permitieron identificar una deleción completa del gen *NF1* en uno de los pacientes, lo que representa una deleción atípica. Este defecto molecular es uno de los menos frecuentes de los observados en la *NF1*. En general las deleciones totales *NF1* representan de 5 a 10% de los casos, en nuestra muestra solo uno de 40 presentó la deleción total lo que significa un 2.5% más bajo que lo reportado internacionalmente. Este tipo de deleciones se presenta con tamaños diferentes y generalmente tiene puntos de ruptura variables que se superponen en algunas ocasiones a las deleciones tipo 1 y tipo 2. En esta deleción atípica encontramos los puntos de ruptura ubicados en el pseudogén *SUZ12P-1* y el gen *UTP6-14*, conservando los genes *SUZ12-10* y *LRRC37B-1*, los cuales están perdidos en la deleción tipo 2, que abarca 1.2 Mb y presenta puntos de ruptura en los genes *SUZ12* y su pseudogén *SUZ12P* (4). *SUZ12* se separa de *NF1-REP C* por 30 kb, mientras que existe una superposición de 4 kb entre *SUZ12P* y *NF1-REP A*. Aunque no se ha establecido una correlación clara entre el genotipo y el fenotipo en pacientes con *NF1*, sabemos que en los pacientes que presentan deleciones completas del gen *NF1* y en las que se involucran genes adyacentes a éste, sufren una forma más severa de la enfermedad que incluye dimorfismo facial, retraso mental, inicio temprano de un gran número de neurofibromas y un mayor riesgo para el desarrollo de tumores malignos de la vaina de los nervios periféricos. En nuestro paciente se presentó únicamente una

mayor cantidad de neurofibromas cutáneos y manchas café con leche, así como trastornos psiquiátricos, probablemente debido a que esta delección no abarca los genes *REP-A* y *C*, como en las delecciones tipo 1 y 2.

Las delecciones intragénicas del gen *NF1* encontradas en cuatro pacientes representan 10% de las encontradas en nuestro estudio. En el paciente que presentó delecciones de los exones 17, 30 y 49, se realizó microarreglos de hibridación genómica comparativa (CGH) para su confirmación demostrando que se perdieron 32 exones. Esto explicaría en este paciente el por qué se presentaron una mayor cantidad de neurofibromas plexiformes y manchas café con leche. El paciente 3 presentó delección de los exones 17, 49 y 57, esta delección es más pequeña que la anteriormente descrita ya que no presento delección en el exón 30 y el fenotipo de los pacientes es muy similar a los otros dos pacientes en los que solo se perdió un exón. Esta alteración molecular no ha sido reportada previamente lo que enriquece el espectro genotípico en la *NF1*.

La última delección encontrada en nuestro estudio involucra al gen *TRAF-4* o factor 4 asociado al receptor de necrosis tumoral, el cual no se ha encontrado perdido en forma aislada en casos de neurofibromatosis, por lo que las características clínicas en nuestro último paciente son atribuibles probablemente a una mutación puntual en el gen *NF1* y no a la delección de este gen *TRAF-4*. El papel de *TRAF-4* ha permanecido sin dilucidar, sin embargo en el caso de la pérdida de este gen en ratones knock-out y se ha relacionado con alteraciones de la embriogénesis en la formación de la tráquea, del esqueleto axial y del cierre del tubo neural (52).

En conclusión este estudio nos permitió identificar un nuevo espectro de alteraciones moleculares del gen *NF1* en la neurofibromatosis tipo 1. Encontramos una porcentaje menor de delecciones totales en el gen *NF1* (2.5%) que lo reportado en la literatura mundial (5-10%). Detectamos por otro lado delecciones intragénicas que no habían sido reportadas previamente, esto remarca la importancia de realizar pruebas moleculares en distintas poblaciones para caracterizar en cada una de ellas a nivel mundial lo que ocurre a nivel molecular en el gen *NF1* en la neurofibromatosis. En el presente estudio no encontramos en los pacientes con *NF1* una asociación entre la gravedad de los datos clínicos y la alteración a nivel

molecular, por lo que podemos considerar que no existe una relación genotipo-fenotipo. Sin embargo, quizás el tamaño de la muestra pudiera ser escaso para ser contundentes con esta aseveración, el incrementar la muestra para detectar un número mayor de deleciones totales nos permitiría tener más certeza al respecto. Empero, dada la frecuencia de este tipo de alteraciones observadas en el gen NF1 en la neurofibromatosis el tamaño de la muestra tendría que ser muy elevado. .

Por otro lado, las pruebas moleculares que están disponibles y se utilizan actualmente son el protocolo de detección de mutaciones que identifican más de 95% de las mutaciones de NF1 en los individuos que cumplen los criterios diagnósticos, caracterizado por manchas café con leche, efélides axilares e inguinales, nódulos de Lisch, neurofibromas cutáneos y plexiformes, gliomas de la vía óptica, lesiones óseas, tales como displasia de esfenoides y pseudoartrosis tibial así como riesgo de desarrollar tumores malignos de las vainas de los nervios periféricos (53). Este protocolo de detección de mutaciones, implica el análisis tanto de ARNm y ADN genómico, incluye RT-PCR, la secuenciación directa, análisis de marcadores de micro satélites, MLPA, y FISH en interface. Debido a la frecuencia de mutaciones en el sitio de splicing así como la gran cantidad y falta de sitios calientes de las mutaciones individuales que se encuentran en las personas con neurofibromatosis tipo 1,(54,55,56) los métodos basados exclusivamente en análisis de ADN genómico tienen tasas de detección más bajas ya que no detecta deleciones o duplicaciones.

XIII.- ANEXOS

ANEXO 1

Procedimientos

Extracción de DNA de sangre periférica (28).

Extraer asépticamente 5 ml de sangre periférica.

Colocar la sangre en un tubo de ensaye con EDTA .

Identificación de la muestra:

- Nombre completo, Institución de procedencia, Médico que solicita el estudio, Datos clínicos.

Procedimiento :

- 1.- Transferir 3 ml de sangre a un tubo cónico de 15 ml y agregar un volumen igual de amortiguador TTS (Tris-Tritón-Sacarosa), el Tris con pH 7.6. Invertir el tubo varias veces.
- 2.- Centrifugar a 3000 rpm/ 6 minutos; decantar con cuidado.
- 3.- Agregar al botón 1 ml de amortiguador TTS. Agitar resuspendiendo el botón y pasar a un microtubo de 1.5 ml. Agitar hasta homogeneizar.
- 4.- Centrifugar a 10,000 rpm / 2 minutos en microcentrífuga. Decantar, añadir 1 ml de amortiguador TTS, resuspender.
- 5.- Centrifugar a 10,000 rpm / 2 minutos en microcentrífuga (repetir de dos a tres veces el paso anterior).
- 6.- Al botón limpio agregar 570 µl de NaCl 5mM. Agitar 2 minutos y colocar 30 µl de SDS (Dodecil Sulfato de Sodio) al 10 %. Agitar 5 minutos.

Observar si hay consistencia viscosa y agregar 200 μl de NaCl saturado.
Agitar 10 minutos.

7.- Centrifugar a 11500 rpm / 30 minutos a 4 °C

Decantar el sobrenadante a un tubo de 13 x 100 mm estéril.

8.- Añadir 2 ml de etanol absoluto a -20 °C para precipitar el DNA.

9.- Tomar el DNA con una varilla de vidrio, enjuagar el DNA con etanol al 70 %, dejar evaporar el etanol en condiciones estériles y posteriormente resuspender el DNA en un microtubo con 250 μl de agua estéril, colocar en baño maría a 60° C durante 2 hrs.

Análisis espectrofotométrico, para cuantificación de DNA.

En cuanto al análisis espectrofotométrico, éste consiste en determinar la absorbancia de una dilución 1:500 de la muestra a dos longitudes de onda (260 nm y 280nm). A partir de la lectura a 260 nm. (correspondiente a los ácidos nucleicos), se calcula la concentración de la muestra: concentración de DNA

$$(\mu\text{g}/\mu\text{l}) = A_{260} \times (\text{dilución})^{-1} \times 0.05$$

1 D.O. $_{260} = 50 \mu\text{g}$ de DNA/ml = 0.05 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ La cantidad total de DNA (en μg) se calcula: μg totales de DNA = conc. ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) x volumen total (μl). Además la relación 260/280 permite conocer si la muestra está contaminada con proteínas, considerando que la lectura a 280 nm, corresponde a la fracción proteica. Una relación menor a 1.8 indica la presencia de proteínas.

ANEXO 2

LEY GENERAL DE SALUD EN MATERIA DE INVESTIGACIÓN PARA LA SALUD TÍTULO SEGUNDO

De los Aspectos Éticos de la Investigación en Seres Humanos

CAPITULO I

ARTÍCULO 14.- La Investigación que se realice en seres humanos deberá desarrollarse conforme a las siguientes bases:

III.- Se deberá realizar sólo cuando el conocimiento que se pretenda producir no pueda obtenerse por otro medio idóneo; (la única forma de conocer la frecuencia de deleciones y duplicaciones en el gen NF1 en pacientes con Neurofibromatosis tipo 1 del Hospital General de México es haciendo un estudio molecular en dichos pacientes.

IV.- Deberán prevalecer siempre las probabilidades de los beneficiados esperados sobre los riesgos predecibles; los beneficios para los pacientes es recibir un asesoramiento genético adecuado cuando se tiene el diagnóstico de certeza de la enfermedad, y los riesgos son mínimos al obtener una muestra de sangre periférica.

V.- Todo paciente incluido en el estudio cuenta con un consentimiento informado, firmado por el paciente, y dos testigos así como del responsable de la investigación.

VI.- El estudio se realiza por personal médico especializado y personal paraclínico con posgrado. Referido en el artículo 114 de este Reglamento.

VII. Se someterá a su autorización de la comisión de ética en investigación del Hospital General de México de conformidad con los artículos 31, 62, 69, 71, 73, y 88 de este Reglamento.

ANEXO 3



HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO



CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN EL PROTOCOLO DE INVESTIGACION

ANÁLISIS DEL GEN NF1 MEDIANTE MLPA (AMPLIFICACIÓN DE SONDA MULTIPLEX DEPENDIENTE DE LIGAMIENTO) EN PACIENTES CON NEUROFIBROMATOSIS TIPO 1

Le estamos invitando a participar en el estudio llamado: Análisis del gen NF1 mediante MLPA (amplificación de sonda multiplex dependiente de ligamiento) en pacientes con neurofibromatosis tipo 1, en el que se buscan alteraciones en la información genética que pueden estar presentes en la enfermedad llamada neurofibromatosis tipo 1.

OBJETIVO

La neurofibromatosis tipo 1, es una enfermedad hereditaria, en la que se encuentran manchas de color café claro y tumores de diferentes tamaños que se observan en la piel. El propósito de este estudio es buscar algunas alteraciones como pérdidas o ganancias en la información genética, que pueden estar presentes en esta enfermedad.

PROCEDIMIENTOS:

El estudio se llevará a cabo mediante la extracción de 5 mililitros de sangre periférica (una cucharadita), a través de la punción en una vena, posteriormente se extrae el DNA (información genética individual) de dicha muestra y se procede a la realización del estudio genético. Una vez terminado el estudio las muestras restantes se desecharán conforme a los lineamientos que marca la institución.

POSIBLES RIESGOS Y MOLESTIAS:

Los riesgos que implica la punción venosa, son dolor así como la posible presencia de un moretón en la zona donde se extrajo la sangre.

POSIBLES BENEFICIOS

En los casos en los que la neurofibromatosis sea debida a una pérdida o ganancia de material genético se podrá ofrecer a los familiares cercanos (hermanos e hijos del paciente) el diagnóstico genético.

INFORMACION DE RESULTADOS

Los resultados obtenidos positivos o negativos para las pérdidas o ganancias del material genético, se entregarán por escrito, en un lapso no mayor a 6 meses.

PARTICIPACION Y RETIRO

La participación en el estudio es libre y voluntaria en caso de que surja cualquier duda, en relación al procedimiento del estudio, le será explicada por el personal médico participante en dicho proyecto. En caso de abandonar o no aceptar el estudio, no repercutirá en la atención médica que se le brinda en esta institución. En el caso de que decida abandonar el estudio, las muestras de sangre serán desechadas conforme a los lineamientos que marca la institución, siempre y cuando no hayan sido procesadas, en cuyo caso los resultados no serán considerados en el estudio.

PRIVACIDAD Y CONFIDENCIALIDAD

Los datos personales y toda la información relacionada con el estudio, será resguardada por el investigador y solo tienen acceso a ella, el personal médico que interviene en la atención del participante.

DECLARACION DE CONSENTIMIENTO

Yo _____ acepto en forma voluntaria y previa información detallada, de las características del estudio, para que me sean practicados los estudios de ADN (material genético individual) para tratar de identificar alteraciones genéticas que pudieran estar relacionadas con mi enfermedad o de mi familiar.

Los resultados de este estudio serán manejados con estricta confidencialidad.

Sí autorizo a que se tome la muestra de sangre periférica para este estudio.

En caso de dudas o aclaraciones relacionadas con el estudio podrá dirigirse a:

Comité de ética en investigación Hospital General de México
Calle: Dr. Balmis No.148, Col. Doctores, Delegación Cuauhtémoc
Ciudad de México. C.P. 06726, Tel: 2789 2000 ext. 1164 (55) 50 04 53 43

Dr. Sergio Alberto Cuevas Covarrubias
Investigador responsable tel. 27892000 ext. 1278
Correo electrónico: srgiocuevasunam@gmail.com

Nombre Participante _____ Firma _____

Fecha _____

Nombre testigo _____ Firma _____

Fecha _____

Parentesco _____

Nombre testigo _____ Firma _____

Fecha _____

Parentesco _____

Nombre responsable _____ Firma _____

Fecha _____

XIV.- BIBLIOGRAFÍA

- 1.- María Victoria Moreno Londoño*, Mariana Takane Imay, María Cristina González González, Wilson Koga Nakamura, Carlos Eduardo Estrada Reyes y Gilberto Islas de la Vega. Nódulos de Lisch y ultra biomicroscopía. Rev Mex Oftalmol. 2014; 88(4):189-193
2. - Morales J, Chaudhry IA, Bosley TM. Glaucoma and globe enlargement associated with neurofibromatosis type 1. Ophthalmology.2009; 116:1725---30
3. - Louis, D.N., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Cavenee, W.K., Burger, P.C., Jouvett, A., et al., 2007. The 2007 WHO classification of tumors of the central nervous system. Acta Neuropathol. 114, 97–109.
4. - Katharina Steinmann, David N. Cooper, Lan Kluwe, Nadia A. Chuzhanova, Cornelia Senger, Eduard Serra, Conxi Lazaro, Montserrat Gilaberte, Katharina Wimmer, Viktor-Felix Mautner, and Hildegard Kehrer-Sawatzki. Type 2 NF1 Deletions Are Highly Unusual by Virtue of the Absence of Nonallelic Homologous Recombination Hotspots and an Apparent Preference for Female Mitotic Recombination. Am. J. Hum. Genet. 2007; 81:1201–1220.)
5. - Dorschner MO, Sybert VP, Weaver M, Pletcher BA, Stephens K.) NF1 microdeletion breakpoints are clustered at flanking repetitive sequences. Hum Mol Genet. 2000; 9:35–46)
- 6.- Upadhyaya M, Ruggieri M, Maynard J, Osborn M, Hartog C, Mudd S, Penttinen M, Cordeiro I, Ponder M, Ponder BA, et al Gross deletions of the neurofibromatosis type 1 (NF1) gene are predominantly of maternal origin and commonly associated with a learning disability, dysmorphic features and developmental delay. Hum Genet .1998; 102:591–597

- 7.-Petek E, Jenne DE, Smolle J, Binder B, Lasinger W, Windpassinger C, Wagner K, Kroisel PM, Kehrer-Sawatzki H. Mitotic recombination mediated by the JJAZF1 (KIAA0160) gene causing somatic mosaicism and a new type of constitutional NF1 microdeletion in two children of a mosaic female with only few manifestations. *J Med Genet.* 2003; 40:520–525)
8. - Hildegard, K.; Schmid, E.; Carsten, F. et al: Absence of cutaneous neurofibromas in an NF1 patient with atypical deletion partially overlapping the common 1, 4 Mb microdeleted region. *Am J Med Genet* 2008; 146 A: 691-699.)
- 9.-Ferner, R. E., Huson, S. M., Thomas, N., Moss, C., Willshaw, H., Evans, D. G., Upadhyaya, M., Towers, R., Gleeson, M., Steiger, C., Kirby, A. Guidelines for the diagnosis and management of individuals with neurofibromatosis 1. *J. Med. Genet.* 44: 81-88, 2007.
10. - Woodruff JM. Pathology of tumors of the peripheral nerve sheath in type 1 neurofibromatosis. *Am J Med Genet* 1999; 89 (1): 23–30
- 11.-Cichowski K, Jacks T. NF1 tumor suppressor gene function: narrowing the GAP. *Cell* 2001; 104 (4): 593–604.
12. - Stephan MR, Kirby MB, Blackwell KM. Common newborn dermatologic conditions. *Clin Fam Prac* 2003; 5:535-555, 12 Taïeb A, Boralevi F. Hypermelanoses of the newborn and of the infant. *Dermatol Clin* 2007; 25:327-336.
- 13.- Bolognia JL, Jorizzo JL, Rapini RP. *Dermatología*. Madrid: Mosby, 2004;p:986-987.
- 14.-Jennifer Pérez Hernández, Gabriela Frías Ancona, Alma Vergara López. Prevalencia de las manchas café con leche en pacientes de consulta externa

del Servicio de Dermatología del Centro Médico Nacional 20 de Noviembre.
Dermatología Rev Mex 2010; 54(6):315-320

- 15.-Stephan MR, Kirby MB, Blackwell KM. Common newborn dermatologic conditions. Clin Fam Prac 2003; 5:535-555. Taïeb A, Boralevi F. Hypermelanoses of the newborn and of the infant. Dermatology Clin 2007; 25:327-336
- 16.- Fitzpatrick TB, Freedberg IM, Eisen AZ. Dermatology in general medicine. 6th ed. New York: McGraw-Hill, 2003; p: 866.
- 17.-Landau M1, Krafchik BRJ. The diagnostic value of café-au-lait macules. Am Acad Dermatol. 1999 Jun; 40(6 Pt 1):877-90; quiz 891-2.
18. - Kevin P. Boyd, MD, Bruce R. Neurofibromatosis type 1. J Am Acad Dermatol. 2009 July; 61(1): 1–16.
- 19.- De Schepper S, Boucneau J, Lambert J, Messiaen L, Naeyaert JM. Pigment cell-related manifestations in neurofibromatosis type 1: an overview. Pigment Cell Res 2005; 18:13–24
- 29.- Mafalda Barbosa¹, Jorge Pinto-Basto², Margarida Reis Lima³, Ana Maria Fortuna¹, Gabriela Soares NASCER E CRESCER revista do hospital de crianças maria pia ano 2009, vol XVIII, n. ° 2 Genes, Crianças e Pediatras
- 21.- D. Martín Fernández-Mayoralas. Detección y manejo del retraso psicomotor en la infancia Pediatr Integral 2015; XIX (8): 532–539,
- 22.- (Tadini G, Brena M, Pezzani L et al. Anemic nevus in neurofibromatosis type 1. Dermatology 2013;226:115–118.),

- 23.- Angela Hernandez-Martín, M.D.,* Francisco Javier García-Martínez, M.D.
Nevus Anemicus: A Distinctive Cutaneous Finding in Neurofibromatosis Type 1. *Pediatric Dermatology* Vol. 32 No. 3 342–347, 2015
- 24.- Norton KK, Xu J, Gutmann DH. Expression of the neurofibromatosis I gene product, neurofibromin, in blood vessel endothelial cells and smooth muscle. *Neurobiol Dis* 1995; 2:13–21
- 25.- Zhiguo Chen, Cells of origin in the embryonic nerve roots for NF1-associated plexiform neurofibroma, *Cancer Cell*. 2014 November 10; 26(5): 695–706.)
- 26.- Page PZ, Page GP, Ecosse E, Korf BR, Lepage A, Wolkenstein P. Impact of neurofibromatosis 1 on Quality of Life: a cross-sectional study of 176 American cases. *Am J Med Genet A* 2006; 140:1893–8
- 27.- Tórax, E. (2015). *Examen del Tórax*. *Utesasqxgabrielrdelgado.blogspot.mx*. Retrieved 7 October 2016, from <http://utesasqxgabrielrdelgado.blogspot.mx/2015/07/examen-del-torax.html>
- 28.- Tsao H., Luo S. Neurofibromatosis and Tuberous Sclerosis. In: Bologna JL, Jorizzo JL, Schaffer JV, editors. *Dermatology*. 3th ed. Oxford: Elsevier; 2012: 61, 925-941.
- 29.- Levy Bencheton A, Mallet S, Rojat Habib MC, Figarella-Branger D, Sigaudy S, Grob JJ, et al. Isolated late-onset plexiform neurofibroma in the absence of neurofibromatosis. *Ann Dermatol Venereol*. 2010;137:301-4.
- 30.- Marocchio LS, Oliveira DT, Pereira MC, Soares CT, Fleury RN. Sporadic and multiple neurofibromas in the head and neck region: a retrospective study of 33 years. *Clin Oral Investig*. 2007;11:165-9.

- 31.- Fujiwara M, Isaka F, Honjo G, Ozawa T, Tachibana T. Solitary plexiform neurofibroma: recurrence 32 years after excision. *J Eur Acad Dermatol Venereol.*2006; 20:756-7
- 32.- Tonsgard JH, Kwak SM, Short MP, Dachman AH. CT imaging in adults with neurofibromatosis-1: frequent asymptomatic plexiform lesions. *Neurology.* 1998; 50:1755–1760.).
- 33.- Brems, H., Beert, E., de Ravel, T., Legius, E., Mechanisms in the pathogenesis of malignant tumours in neurofibromatosis type 1. *Lancet Oncol.* 2009.10, 508–515
- 34.- Evans, D.G., Baser, M.E., McGaughan, J., Sharif, S., Howard, E., Moran, A., Malignant peripheral nerve sheath tumours in neurofibromatosis 1. *J. Med. Genet.* 2002 39, 311–314
- 35.- Jelte Helfferich. Neurofibromatosis type 1 associated low grade gliomas: A comparison with sporadic low grade gliomas. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* Volume 104, August 2016, Pages 30–41
- 36.-Rosalie E Ferner, Susan M Huson, Guidelines for the diagnosis and management of individuals with neurofibromatosis 1. (*J Med Genet* 2007;44:81–88. doi: 10.1136/jmg.2006.045906
- 37.- Williams, V. C., Lucas, J., Babcock, M. A., Gutmann, D. H., Korf, B., Maria, B. L. Neurofibromatosis type 1 revisited. *Pediatrics* 123: 124-133, 2009.).
- 38.- Gutmann, D.H., Donahoe, J., Brown, T., James, C.D., Perry, A., 2000. Loss of neurofibromatosis 1 (NF1) gene expression in NF1-associated pilocytic astrocytomas. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 26, 361–367
- 39.- Serra E, Puig S, Otero D, et al. Confirmation of a double-hit model for the NF1 Gene in benign neurofibromas.. *Am J Hum Genet* 1997 Sep; 61 (3): 512-9.

- 40.- Llan Kluwe, phd, C. Hagel. Loss of NF1 Alleles Distinguish Sporadic from NF1-Associated Pilocytic Astrocytomas. Journal of Neuropathology and Experimental Neurology. Vol. 60, No. 9 September, 2001 pp. 917-920)
- 41.- Gutmann, D.H., McLellan, M.D., Hussain, I., Wallis, J.W., Fulton, L.L., Fulton, R.S., et al., 2013. Somatic neurofibromatosis type 1 (NF1) inactivation characterizes NF1-associated pilocytic astrocytoma. Genome Res. 23, 431–439
- 42.- Xiong Zhao, MD, Jun Li, MD, Shi Lei, MD, Liu Yang, MD, Zi Xiang Wu, MD, Da-Wei Zhang, MD, Wei Lei, PhD, and Qiang Jie, PhD. Surgical Treatment of Dystrophic Spinal Curves Caused by Neurofibromatosis Type 1. Medicine. Volume 95, Number 14, April 2016.
- 43- René Rivera Z. Fresia Caba B, Jorge Delgado D. Angélica Larraín H. Neurofibromatosis tipo I diagnosticada en el embarazo rev chil obstet ginecol 2004; 69(5): 376-380)
- 44.- Dandy WE: An operative treatment for certain cases of meningocele (or encephalocele) into the orbit. Arch Ophthalmol 2:123–132, 1929
- 45.- Brownstein S, Little JM: Ocular neurofibromatosis. Ophthalmology 90:1595–1599, 1983.).
- 46.- Vitale MG, Guha A, Skaggs DL. Orthopedic manifestations of neurofibromatosis in children. An Update. Clin Orthop 2002; 401: 107–118.
- 47.- Alwan S, Tredwell SJ, Friedman JM. Is osseous dysplasia a primary feature of neurofibromatosis 1 (NF1). Clin Genet 2005; 67: 378–390.).

- 48.- Stevenson DA, Birch PH, Friedman JM et al. Descriptive analysis of tibial pseudarthrosis in patients with neurofibromatosis 1. *Am J Med Genet* 1999; 84: 413–419
- 49.-Hefti F, Bollini G, Dungal P et al. Congenital pseudarthrosis of the tibia: history, etiology, classification, and epidemiological data. *J Pediatr Orthop B* 2000; 9: 11–15
- 50.- D'Angelo I, Welti S, Bonneau F and Scheffzek K. A novel bipartite phospholipid-binding module in the neurofibromatosis type 1 protein. *EMBO Rep.* (2006) 7: 174-179.
- 51.- L Q Le and L F Parada. Tumor microenvironment and neurofibromatosis type I: connecting the GAPs. *Oncogene* (2007) 26, 4609–4616; doi:10.1038/sj.onc.1210261; published online 12 February 2007
- 52.- Regnier ,C.H., Masson,R.,Kedinger,V., Textoris,J., Stoll,I., Chenard,M.-P., Dierich,A., Tomasetto,C.,Rio,M,-C.Impaired neural tube closure, axial skeleton malformations, and tracheal ring disruption in TRAF4- deficient mice. *Proc.Nat.Acad. Sci.*99: 8457only, 2002.
- 53.- Valero MC, Martín Y, Hernández-Imaz E, Marina Hernández A, Meleán G, Valero AM, Javier Rodríguez-Álvarez F, Tellería D, Hernández-Chico C. A highly sensitive genetic protocol to detect NF1 mutations. *J Mol Diagn.* 2011;13:113– 22
- 54.- Messiaen LM, Callens T, Mortier G, Beysen D, Vandenbroucke I, Van Roy N, Speleman F, Paepe AD. Exhaustive mutation analysis of the NF1 gene allows identification of 95% of mutations and reveals a high frequency of unusual splicing defects.*Hum Mutat.* 2000;15:541–55

- 55.- Wimmer K, Yao S, Claes K, Kehrer-Sawatzki H, Tinschert S, De Raedt T, Legius E, Callens T, Beiglböck H, Maertens O, Messiaen L. Spectrum of single-and multiexon NF1 copy number changes in a cohort of 1,100 unselected NF1 patients. *Genes Chromosomes Cancer*. 2006; 45:265–76
- 56.- Pros E, Gómez C, Martín T, Fábregas P, Serra E, Lázaro C. Nature and mRNA effect of 282 different NF1 point mutations: focus on splicing alterations. *Hum Mutat*. 2008;29:E173–93