



ABIERTO

Análisis genético de un nuevo TSC1 Mutación de empalme que causa esclerosis tuberosa sin fenotipos neurológicos

Xiu-juan Yao^{1,4}, Ying Lin^{2,4}, Jing Zou^{1,4}, Zun-lin Cai^{1,4}, Zi-Yan Xu^{1,4}, Xiao-qin Li^{1,4}, Qian Chen¹, Hong-ping Yu¹, Jian-hui Zhang¹, Dan-dan Ruan¹, Mei-zhu Gao³, Li Zhang³, Jie-wei Luo¹ y Bao-song Xie¹

El complejo de esclerosis tuberosa (CET) es un trastorno genético autosómico dominante que se caracteriza por el desarrollo de tumores benignos y lesiones en múltiples sistemas orgánicos. El síndrome se origina por mutaciones heterocigotas en TSC1 o TSC2. En este estudio, identificamos una familia con un complejo de esclerosis tuberosa (CET) en TSC1. La mutación c.363+668G>C presenta diversos fenotipos clínicos. El probando y los miembros de la familia afectados presentaron hiperplasia neumocítica nodular multifocal (MMPH), hamartomas renales, hiperplasia de médula ósea y linfangioleiomiomatosis pulmonar (LAM). El análisis de cosegregación genética confirmó la asociación entre la mutación y el fenotipo clínico. El análisis de cosegregación genética demostró que la mutación c.363+668G>C de TSC1 se asoció consistentemente con las características clínicas observadas en esta familia. Mediante secuenciación de Sanger de primera generación, se identificó una variación de empalme heterocigótica ubicada en el intrón 5 de TSC1 (NM_000368.5). Los resultados in vitro de Minigene en células y familias muestran que la mutación TSC1 c.363+668G>C puede conducir a la retención anormal de la secuencia intrónica de 92 pb en diferentes posiciones, lo que puede estar relacionado con el fenómeno de empalme alternativo que el mismo gen produce diferentes variantes de empalme en diferentes tejidos o etapas de desarrollo. El análisis de la estructura de la proteína 3D utilizando Chimera reveló que el sitio de la mutación se localizaba en la base 363, dentro del intrón entre los aminoácidos 121 y 122. Esta mutación resultó en la inserción de una secuencia de 92 bases, causando un cambio de marco que condujo a la terminación prematura de la proteína TSC1 después de la traducción de 26 aminoácidos. Además, el aminoácido 121 se alteró de lisina a asparagina, acortando significativamente la proteína TSC1 mutada. Estos hallazgos proporcionan evidencia experimental crítica que respalda el posible mecanismo patogénico de la mutación TSC1 c.363+668G>C. Las investigaciones futuras deberían centrarse en validar esta anomalía de empalme en células o tejidos derivados de pacientes e investigar su impacto en la expresión de proteínas y la actividad funcional para comprender mejor su papel en la progresión de la enfermedad.

Número de ensayo clínico: K2024-09-144.

El complejo de esclerosis tuberosa (TSC) es un trastorno genético autosómico dominante poco común que afecta a múltiples sistemas de órganos en todas las razas y etnias¹. La incidencia global se estima en aproximadamente 1 en 6.000 a 10.000 individuos². El TSC es causado principalmente por mutaciones heterocigotas en los genes TSC1 (ubicado en el cromosoma 9q34) o TSC2 (en el cromosoma 16p13)³, que codifican las proteínas hamartina y tuberina, respectivamente. Los perfiles de mutación de los genes TSC1 y TSC2 difieren significativamente. Las mutaciones de TSC1 involucran predominantemente mutaciones sin sentido truncadas, así como pequeñas inserciones o deleciones, con relativamente pocas mutaciones sin sentido confirmadas funcionalmente^{4,5}.

En cambio, las mutaciones de TSC2 se observan con mayor frecuencia como mutaciones sin sentido y grandes reordenamientos genómicos². Hasta la fecha, se han identificado más de 1800 mutaciones puntuales asociadas con TSC. En concreto, 449

¹Departamento de Neumología, Cuidados Intensivos y Medicina Tradicional China, Facultad de Medicina Clínica Shengli de la Universidad Médica de Fujian, Hospital Provincial de Fujian, Hospital Provincial Afiliado a la Universidad de Fuzhou, Fuzhou, China. ²Departamento de Patología, Hospital Provincial de Fujian, Facultad de Medicina Clínica Shengli de la Universidad Médica de Fujian, Hospital Provincial Afiliado a la Universidad de Fuzhou, Fuzhou, China. ³Departamento de Nefrología, Hospital Provincial Afiliado a la Universidad de Fuzhou, Fuzhou, China. ⁴Los siguientes autores contribuyeron por igual a este trabajo: Xiu-juan Yao, Ying Lin, Jing Zou, Zun-lin Cai, Zi-Yan Xu y Xiao-qin Li. Correo electrónico: lilydoctor9902@163.com; docluo0421@aliyun.com; xbaosong@126.com

mutaciones en el gen TSC1 (<https://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=TSC1>) y se han catalogado 1.432 mutaciones en el gen TSC2 (<https://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=TSC2>) en la base de datos HGMD. Estas mutaciones patogénicas a menudo resultan en la activación constitutiva de la vía de la diana mamífera de la rapamicina (mTOR). Esta disregulación altera el crecimiento y la proliferación celular normales, lo que contribuye al desarrollo de características patológicas relacionadas con la TSC6. Los pacientes con mutaciones de la TSC muestran diferencias individuales significativas en las características clínicas, y a menudo manifiestan una amplia gama de afectación multisistémica que afecta al cerebro, los pulmones, los riñones, el corazón y la piel. Por ejemplo, aproximadamente dos tercios de los pacientes con TSC desarrollan rabdomiomas cardíacos, que pueden aparecer como lesiones únicas o múltiples. En los riñones, los angiomiolipomas renales y los quistes renales son tumores comunes. Las manifestaciones cutáneas con frecuencia incluyen máculas hipopigmentadas, angiofibromas faciales, placas de piel de tiburón y fibromas periungueales de los dedos de las manos y de los pies⁷. Además, pueden ocurrir trastornos neurológicos y mentales como convulsiones, trastorno del espectro autista y deterioro cognitivo.

Cabe destacar que las mutaciones del gen TSC presentan una fuerte asociación con enfermedades pulmonares. Las presentaciones clínicas comunes incluyen linfangioleiomiomatosis (LAM), hiperplasia neumocítica micronodular multifocal (MMPH) y derrames quilosos⁸. El objetivo principal de este estudio es informar sobre una nueva mutación de splicing en el gen TSC1, identificada durante la evaluación clínica, y caracterizar las diversas manifestaciones clínicas de la esclerosis tuberosa observadas en la familia afectada. Además, realizamos una investigación preliminar sobre los mecanismos patogénicos subyacentes a esta mutación de splicing, lo que proporcionó nuevos conocimientos sobre su papel en el desarrollo de la enfermedad.

Materiales y métodos

Sujetos de investigación

Un análisis de una familia Han de Fujian, China, reveló que el probando (III1) es una mujer de 44 años diagnosticada con complejo de esclerosis tuberosa (TSC1). Entre sus familiares, se identificaron otros cuatro individuos (III3, II2, II6 e I1) como portadores de la mutación del gen TSC1, mientras que se confirmó que nueve miembros de la familia (III2, III4, III5, II1, II3, II4, II5, II7 e I2) estaban sanos sin la mutación. Todos los individuos afectados de esta familia cumplieron con los criterios de diagnóstico clínico para TSC establecidos en 2012, lo que subraya la diversidad fenotípica y la base genética de la enfermedad.

Se recopilaron los antecedentes médicos y datos clínicos relevantes de los miembros de esta familia, incluyendo tomografías computarizadas de alta resolución (TCAR) de tórax, tomografías computarizadas con contraste, resonancias magnéticas (RM), tomografías PET-TC, resultados de pruebas de laboratorio y hallazgos histopatológicos. Se construyó un árbol genealógico de la familia y se analizó la correlación entre los fenotipos clínicos identificados y las mutaciones genéticas para comprender mejor los mecanismos patogénicos subyacentes a la CET.

Extracción de ADN y detección de mutaciones genéticas

Se emplearon técnicas de genética molecular para detectar mutaciones en los genes TSC1 y TSC2. El ADN genómico se extrajo de muestras de sangre mediante un kit comercial (Jinyu Inspection Company, Guangzhou, China) mediante un método en columna. La concentración y la pureza del ADN se determinaron con un espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) para garantizar que la calidad cumpliera con los requisitos de los experimentos posteriores. Se diseñaron cebadores específicos para todos los exones e intrones flanqueantes de los genes TSC1 y TSC2. Estas regiones se amplificaron posteriormente mediante ADN polimerasa de alta fidelidad.

Tras la purificación del producto de PCR, se realizó la secuenciación con el kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU.) y se analizó mediante electroforesis capilar en un analizador de ADN ABI Prism3730 (Applied Biosystems). Los datos de secuenciación se analizaron con el software Sequencher (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI, EE. UU.) y se compararon con la secuencia de referencia del genoma humano (GRCh37/hg19) para identificar posibles sitios de mutación. Las secuencias de los cebadores directos (extremo F) e inversos (extremo R) fueron las siguientes:

F-end: tgtaaacgacgagccagtATTCTACCAATCCATTAATTAGAT;

Extremo R: caggaaacagctatgaccACTCAGGGTTATTGTTTAATCTGT.

Se emplearon herramientas bioinformáticas, como BAMtools y GATK, para predecir la patogenicidad de la mutación sin sentido recién descubierta. Además, se evaluó la patogenicidad de las mutaciones conocidas consultando bases de datos como la Base de Datos de Mutaciones Genéticas Humanas (HGMD) y bases de datos especializadas de mutaciones TSC1/TSC2, que proporcionan información depurada sobre mutaciones previamente descritas y su relevancia clínica.

RT-qPCR

El ARN total se aisló de células HEK293T utilizando el reactivo de aislamiento TRIPURE (11667165001, Roche, Swit) según el protocolo del fabricante. La síntesis de ADNc de primera cadena se realizó con el reactivo maestro para qPCR SYBR Green (25325100, Roche) en una reacción de 20 µL que contenía 5× All-in-One RT Mix (4 µL), 1 µg de ARN molde, 1 µL de mezcla de cebadores (1 µL de cada uno, cebadores directos e inversos) y agua sin nucleasas. El programa de transcripción inversa se realizó a 37 °C durante 10 min, 55 °C durante 15 min y 95 °C durante 3 min. El ADNc se diluyó 1:20 en agua sin nucleasas y la PCR cuantitativa se realizó en un sistema Bio-Rad CFX96™. Las secuencias de los cebadores se muestran en la Tabla 1.

Detección de minigenes in vitro

El ADN genómico del paciente se utilizó como molde para amplificar mediante PCR el fragmento génico (aproximadamente 500 pb) que contenía la mutación diana y su secuencia flanqueante. La secuencia silvestre también se amplificó como control. Tras la purificación, los productos de PCR se clonaron en el vector de captura de exones pSPL3 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.) utilizando las enzimas de restricción KpnI y BamHI. Tras la secuenciación, los plásmidos recombinantes se transfirieron en células HEK293T (ATCC, Manassas, VA, EE. UU.). Tras 48 h de transfección, se extrajo el ARN total con el reactivo TRIzol (Invitrogen) y se trató con DNase I (Thermo Fisher Scientific) para eliminar cualquier contaminación del ADN genómico. Posteriormente,

Nombre del cebador	Secuencia del cebador
hTSC1 qRT F1	CTTCTTGCCATGCTGGACTC
hTSC1 qRT R1	TCTTGCAAGGTGGTCAGGAT
hTSC1 qRT F2	ACCAGCCTTATGCTGACAC
hTSC1 qRT R2	CCATAGATGGCTCCAAAGA
hTSC1 qRT F3	GGAAGATGGTGTGCCCTCTA
hTSC1 qRT R3	GCGGATCTCATCTGAAGGAG
hTSC1 qRT F4	AATGACGGGTGCTCAGATTC
hTSC1 qRT R4	GTAGAAAGCTCGCTGCTGCTGCT
hGAPDH F	AGAAGGCTGGGGCTCATTG
hGAPDH R	AGGGGCCATCCACAGTCTTC

Tabla 1. Cebadores para qRT-PCR.

III transcriptasa inversa (Invitrogen). Se realizó la amplificación por PCR del ADNc con cebadores específicos del transportador, y los productos se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa. Se extrajo la banda diana del gel y se realizó la secuenciación de Sanger para determinar el patrón de empalme. Además, se utilizó PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) para evaluar la abundancia relativa de los diferentes productos de empalme.

Detección de minigenes familiares

El molde de ARN, la mezcla RT All-In-One 5× y el agua DEPC se disolvieron inicialmente en hielo. Se preparó un sistema de reacción estándar de 20 µL con los siguientes componentes: 4 µL de la mezcla RT All-In-One 5×, 1 µg de molde de ARN, 1 µL de mezcla de cebadores y agua DEPC para ajustar el volumen final a 20 µL. La mezcla se agitó vigorosamente en vórtex y se centrifugó brevemente para recoger la solución residual de las paredes del tubo. Las condiciones de termociclado consistieron en incubaciones secuenciales a 37 °C durante 10 min, 55 °C durante 15 min y, finalmente, 95 °C durante 3 min. El procesamiento posterior a la reacción incluyó una breve centrifugación seguida de un almacenamiento prolongado a -20 °C. Las muestras de ARN retrotranscritas se sometieron posteriormente a amplificación por PCR en condiciones estandarizadas, y los productos resultantes se prepararon para la secuenciación. Las secuencias de cebadores específicas utilizadas fueron:

PCR F de TSC1: 5'-CAAGCACCTCTTTGCCTTC-3';
PCR TSC1 R: 5'-CATGGTCCTTGGATCCAGTC-3'.

Detección de MPLA

Primero, retire la sonda MLPA y el tampón, y deje que se fundan a temperatura ambiente. Luego, centrifugue brevemente. Agite la premezcla de hibridación para mezclarla uniformemente y centrifugúela brevemente para su uso posterior. A continuación, añada 3,0 µL de la premezcla de hibridación al ADN desnaturalizado y pipetee suavemente para asegurar una mezcla completa. Coloque el tubo de PCR en el instrumento de PCR, ajustando el volumen de reacción a 8 µL. Prepare el sistema de reacción de ligación de ligasa-65 e incube la mezcla a 60 °C durante 16 h. Después, enfríe la mezcla a 54 °C durante aproximadamente 1 min. Abra la tapa caliente del instrumento de PCR y añada 32 µL de la mezcla de ligasa-65. Vuelva a colocar el tubo de PCR en el instrumento de PCR, ajustando el volumen de reacción a 40 µL. En hielo, prepare la mezcla de PCR (PM) y añada 10 µL de PM a los tubos que contienen los productos de reacción a temperatura ambiente. Pipetee y mezcle suavemente el contenido. Luego, coloque los tubos de PCR en el instrumento y ajuste el volumen de reacción a 50 µL. Finalmente, analice los datos experimentales con el software GeneMapper.

Examen histológico e inmunohistoquímico de muestras de pulmón

Siguiendo las instrucciones del fabricante, el tejido pulmonar del paciente III1 se fijó primero con formaldehído al 10%. El tejido se incluyó en parafina y las secciones incluidas en ella se tiñeron con hematoxilina-eosina (HE) para su análisis histopatológico. La tinción inmunohistoquímica se realizó con los anticuerpos Ki67 (RMA-0542, Fuzhou Mai-xin Biotech, China), CK7 (Mab-0828, Fuzhou Mai-Xin Biotechnology, China) y TIF1 (Mab-0599, Fuzhou Mai-Xin Biotechnology, China).

Predicción informativa de la estructura proteica de TSC1 c.363+668G>C

La secuencia de la proteína TSC1 se descargó de la base de datos de estructura de proteínas AlphaFold (<https://alphafold.com/entry/Q92574>). Esta secuencia se visualizó posteriormente con el software Chimera10, que permite el análisis detallado de las estructuras proteicas.

Ética y consentimiento

Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Provincial de Fujian (K2024-09–144). Antes de participar, todos los familiares reclutados fueron informados sobre el propósito, los procedimientos y los posibles riesgos del estudio, y firmaron voluntariamente un formulario de consentimiento informado, lo que garantiza su comprensión y aceptación de participar. Esto confirma que todos los experimentos se realizaron de acuerdo con las directrices y regulaciones pertinentes.

Resultados

fenotipo clínico

Se evaluaron las manifestaciones clínicas de cuatro pacientes con mutaciones del gen TSC1 (III1, II2, III3 y II6) y nueve familiares sanos restantes en la familia. Todos los individuos afectados exhibieron manifestaciones cutáneas en forma de manchas de piel de tiburón. El diagrama familiar, que se muestra en la Fig. 1a, ilustra las relaciones: los círculos representan mujeres, los cuadrados representan hombres y los individuos con mutaciones TSC1 están marcados en verde. El probando está indicado por una flecha y las marcas inclinadas denotan familiares fallecidos. En esta familia, el probando (III1) presentó principalmente nódulos pulmonares, exhibiendo el fenotipo MMPH. Los otros pacientes afectados (III3, II2, II6) mostraron características de nódulos linfáticos y renales. El abuelo del probando (I1), al revisar su historial médico, se encontró que había tenido tanto MMPH como manchas de piel de tiburón, y ha fallecido.

La probando (III1) es una mujer de 44 años que no presenta síntomas clínicamente significativos, como convulsiones o pérdida de visión. La resonancia magnética cerebral reveló una ligera hiperintensidad en las secuencias T1 y T2 en el lóbulo frontal izquierdo, junto con una señal T2-FLAIR ligeramente elevada. Estos hallazgos sugirieron una lesión desmielinizante o un foco isquémico (Fig. 2b-c). Durante una exploración física rutinaria, una tomografía computarizada (TC) de tórax reveló una opacidad en vidrio deslustrado en el lóbulo superior del pulmón izquierdo, de aproximadamente 3,7 cm × 1,6 cm, con truncamiento de los bronquios correspondientes. Además, se observaron múltiples nódulos en vidrio deslustrado en ambos pulmones, el mayor de los cuales medía aproximadamente 0,5 cm de diámetro (Fig. 2d-g).

Para investigar más a fondo la naturaleza de la sombra pulmonar, el paciente se sometió a una cirugía toroscópica para extirpar el lóbulo superior izquierdo. Podemos observar que la hiperplasia nodular de las células epiteliales alveolares multifocales de MMPH a aumentos de ×50, ×100, ×200 y ×400 han demostrado que las células epiteliales alveolares proliferan, y la mayoría de las células muestran características atípicas. El volumen tanto de las células como de sus núcleos aumenta, y se observan pseudoinclusiones o nucléolos en algunos núcleos (Fig. 3a-d). El examen patológico confirmó la presencia de adenocarcinoma pulmonar multicéntrico (Fig. 3f), con el nódulo más grande ubicado en el segmento lingual, que se clasificó como adenocarcinoma invasivo (90% tipo adherente, 7% tipo acinar y 3% tipo sólido) (Fig. 3g).

El tumor invadió la membrana pulmonar, provocando la rotura de fibras elásticas, pero no se extendió más allá de ella. Los nódulos restantes eran compatibles con adenocarcinoma in situ, algunos acompañados de

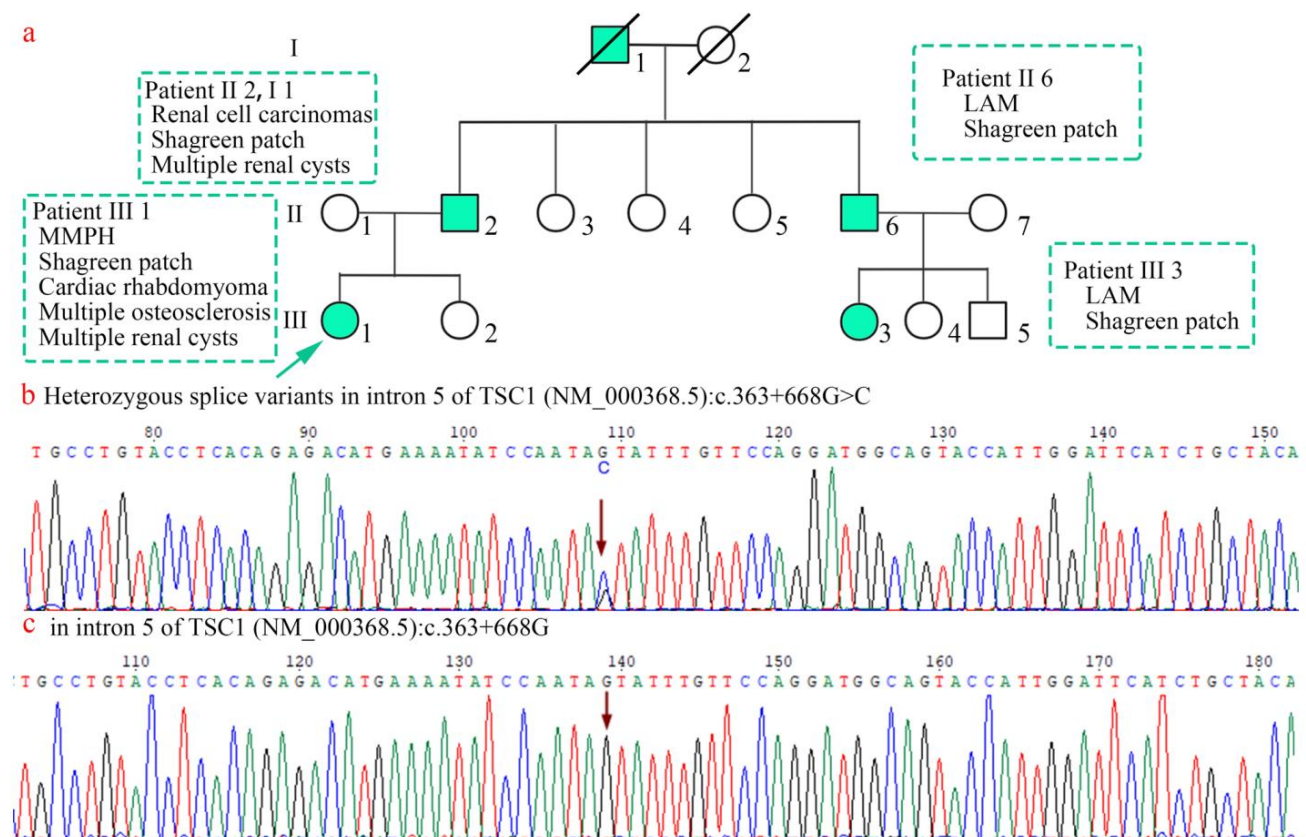


Fig. 1. (a) Diagrama familiar de la mutación TSC1 c.363+668G>C reportada en este estudio. Los círculos representan mujeres y los cuadrados hombres. Los pacientes con la mutación del gen TSC1 están marcados en verde. El probando está indicado por una flecha. Las líneas diagonales indican fallecimiento. En esta familia, cuatro pacientes supervivientes muestran una considerable heterogeneidad fenotípica clínica. La condición del probando se caracteriza principalmente por nódulos pulmonares (como MMPH), mientras que otros presentan nódulos linfáticos (como LAM). (b) Mapa de secuenciación de Sanger de primera generación de la mutación TSC1 c.363+668G>C. Cuando se produce la mutación G→C, la señal originalmente unimodal se vuelve bimodal. (c) Mapa de secuenciación de Sanger de primera generación del tipo silvestre TSC1. En ausencia de mutación, la señal correspondiente a esta base es unimodal.

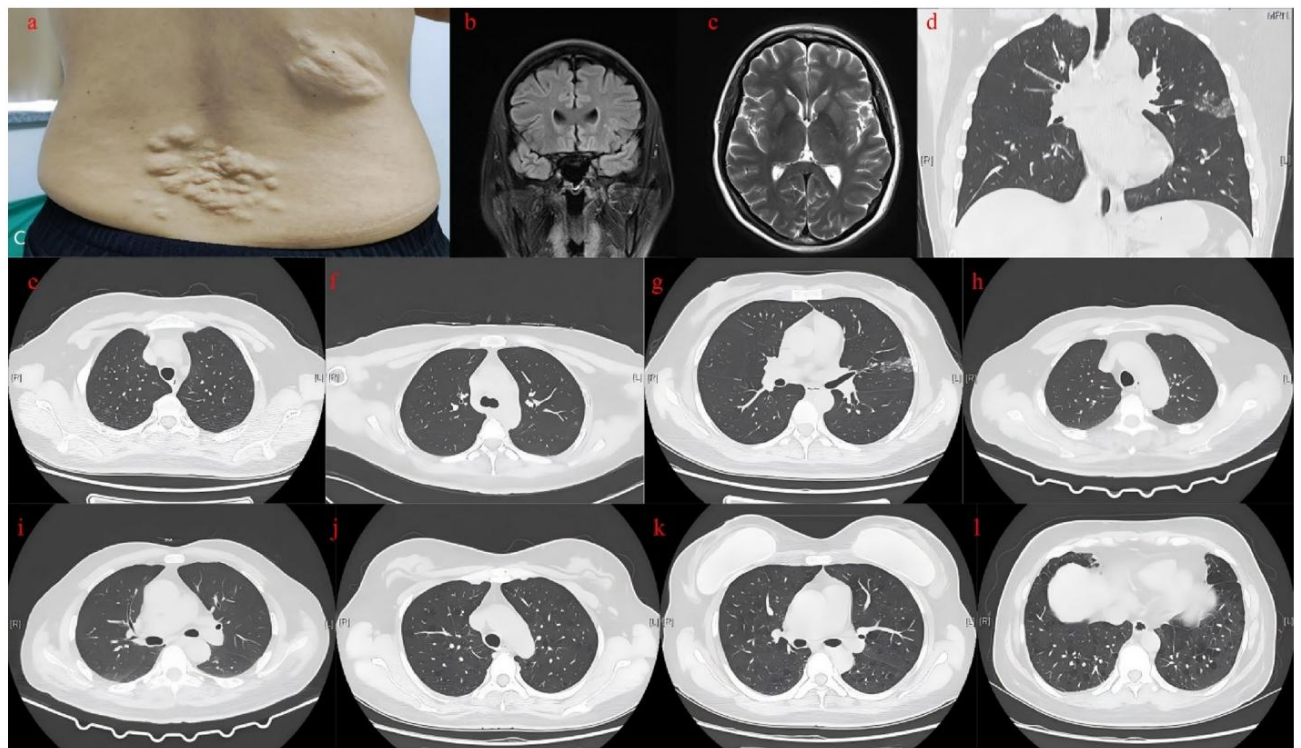


Fig. 2. a. Manchas de cuero de tiburón en la parte posterior del tronco del probando. b, c. La resonancia magnética cerebral reveló una ligera hiperintensidad en las secuencias T1 y T2 en el lóbulo frontal izquierdo, junto con una señal T2-FLAIR ligeramente elevada. Estos hallazgos fueron sugestivos de una lesión desmielinizante o un foco isquémico. dg. La tomografía computarizada de tórax de la ventana pulmonar del probando mostró múltiples nódulos en vidrio deslustrado distribuidos en ambos pulmones, con un tamaño que variaba de 0,2 a 0,5 cm. Además, se observó una sombra de densidad mixta en vidrio deslustrado en el lóbulo superior del pulmón izquierdo, con el bronquio correspondiente apareciendo truncado. h, i. La tomografía computarizada de tórax del padre del probando mostró estructuras pulmonares normales sin nódulos ni lesiones en los sacos aéreos identificados. jl. La tomografía computarizada de tórax del primo del probando reveló sacos aéreos distribuidos uniformemente de tamaños variables en ambos pulmones.

Hiperplasia adenomatosa atípica (Fig. 3e). La mayoría de estos nódulos tenían un tamaño de entre 0,2 y 0,6 cm. Los exámenes histológicos y patológicos moleculares sugieren que estos nódulos representan hiperplasia epitelial alveolar nodular multifocal (Fig. 3a-d). La ecografía Doppler color abdominal total reveló múltiples quistes renales y hamartomas en el riñón izquierdo del paciente. Las tomografías PET-CT de cuerpo entero mostraron múltiples lesiones osteogénicas en las vértebras cervicales, torácicas, lumbares y sacras, así como en el íleon bilateral y las costillas (Fig. 4). La ecografía Doppler color cardíaca sugirió la presencia de rabdomioma cardíaco. La biopsia de médula ósea confirmó hiperplasia medular activa, predominantemente hiperplasia eritroide, siendo los glóbulos rojos jóvenes los más comunes (Fig. 3h). En la parte posterior del tronco del paciente, se observaron múltiples manchas de piel de tiburón (Fig. 2a).

La resonancia magnética craneal del paciente no mostró lesiones compatibles con displasia cortical, nódulos subependimarios ni astrocitoma de células gigantes. Todas las manifestaciones clínicas mencionadas cumplen los criterios diagnósticos del complejo de esclerosis tuberosa (CET).

Al padre del probando (II2), un hombre de 86 años, le extirparon un tumor del riñón derecho hace 20 años. La anatomía patológica postoperatoria confirmó cáncer renal y reveló múltiples quistes renales. Asimismo, se observaron manchas polimórficas de piel de tiburón en la espalda. Sin embargo, la tomografía computarizada de tórax no reveló hallazgos significativos (Fig. 2h, i), ya que no se observaban signos clínicos, cumpliendo únicamente los criterios diagnósticos primarios y secundarios de CET.

La prima del probando (III3) es una mujer de 45 años que refirió tos y disnea después del ejercicio. La tomografía computarizada de tórax mostró cambios difusos en los alvéolos pulmonares, compatibles con LAM (Fig. 2j-l). Al igual que en los dos pacientes anteriores, se observaron manchas de piel de tiburón en su cintura. No se identificaron otras manifestaciones relacionadas con la CET. Con base en estos hallazgos clínicos, cumple los criterios diagnósticos de CET.

El tío del probando (II6) es un hombre de 80 años. Durante la exploración física, se observaron cambios difusos en los alvéolos pulmonares, lo que nuevamente sugiere la presencia de LAM. También se observaron manchas de piel de tiburón en su espalda, similares a las de los demás familiares afectados.

Análisis de mutaciones de las líneas germinales TSC1 y TSC2

La región codificante y las uniones intrón-exón de los genes TSC1 y TSC2 se secuenciaron mediante secuenciación de Sanger.

Además, se analizaron los 23 exones de TSC1 y los 42 exones de TSC2 mediante el método MLPA para descartar deleciones de fragmentos grandes o mutaciones repetidas. En el paciente 1, se identificó una variación de empalme heterocigótica en el intrón 5 del gen TSC1 c.363+668G>A (NM_000368.5). Esta mutación se había descrito previamente en una familia con hiperplasia multifocal de células pulmonares nodulares pequeñas. En nuestro estudio, también detectamos la misma mutación puntual.

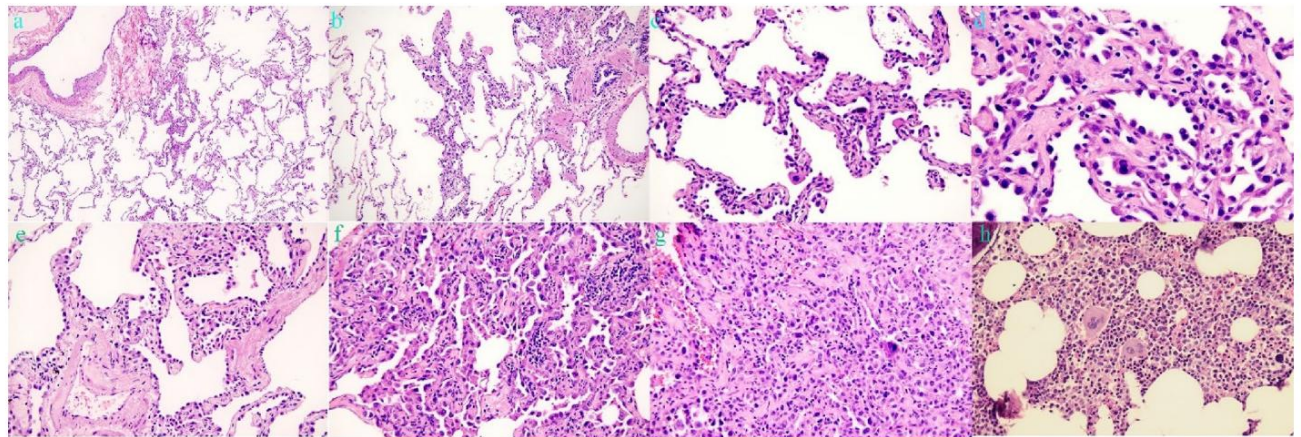


Fig. 3. (a) Hiperplasia nodular de células epiteliales alveolares multifocales de MMPH a 50 aumentos. El pulmón muestra pequeños nódulos dispersos, multifocales y bien definidos. (b) Hiperplasia nodular multifocal de células epiteliales alveolares de MMPH a 100 aumentos. La cavidad alveolar se estrecha o colapsa, con proliferación de células epiteliales alveolares. (c) Hiperplasia nodular multifocal de células epiteliales alveolares de MMPH a 200 aumentos. (d) Hiperplasia nodular multifocal de células epiteliales alveolares de MMPH a 400 aumentos. Las células epiteliales alveolares proliferan, y la mayoría de las células muestran características atípicas. El volumen tanto de las células como de sus núcleos aumenta, y se observan pseudoinclusiones o nucléolos en algunos núcleos. (e) AAH con aumento de $\times 200$. Las lesiones pequeñas y localizadas (generalmente $\leq 0,5$ cm) muestran células alveolares proliferadas, que son redondas, cuboidales o de forma columnar baja, con núcleos redondos u ovalados. Estas células muestran displasia leve a moderada y revisten las paredes alveolares, extendiéndose ocasionalmente hacia los bronquiolos respiratorios. A menudo, hay espacios entre las células y las células no forman grupos continuos. (f) Adenocarcinoma AIS in situ con un aumento de $\times 200$. Está compuesto de epitelio alveolar tipo II o células de Clara, con células cancerosas que crecen estrictamente a lo largo de la pared alveolar original. No hay evidencia de otros patrones de crecimiento, como infiltración intersticial, infiltración vascular o pleural, o propagación a las vías respiratorias. (g) MIA con un aumento de $\times 200$. Parte de la cavidad alveolar está estrecha y colapsada, con una proliferación homogénea y suave de células epiteliales alveolares a lo largo de la pared alveolar. Esto forma un adenocarcinoma no mucinoso con un foco de infiltración menor de 5 mm. (h) Mapa de lesiones de biopsia de médula ósea. La biopsia de médula ósea confirmó hiperplasia medular activa, predominantemente hiperplasia eritroide, siendo los glóbulos rojos jóvenes los más frecuentes.

(c.363+668G>A) en el intrón 5 de TSC1, lo que da como resultado una sustitución de aminoácido no sinónimo (p.Gln3Glu). Esta mutación altera el empalme normal, lo que provoca la pérdida de la función de la proteína TSC1. Además, la nueva mutación c.363+668G>C identificada en este estudio no se ha reportado en las bases de datos gnomAD ni GMD. Según las directrices del Colegio Americano de Genética Médica y Genómica (ACMG), esta mutación se clasifica como patogénica (PVS1+PM2+PM4+PP1+PP3). Análisis posteriores mostraron que todos los familiares afectados (III1, III3, II2 y II6) portaban la mutación TSC1 c.363+668G>C, mientras que no se detectó ninguna mutación en ninguno de los familiares sanos. Además, la mutación del gen TSC1 mostró una cosegregación genética consistente dentro de la familia.

RT-qPCR

Para evaluar los niveles de expresión del gen TSC1 en la cohorte de estudio, realizamos un análisis de PCR cuantitativa (qPCR) en cuatro muestras biológicas que incluían familiares afectados y controles sanos demográficamente coincidentes. Los detalles de la localización del cebador se presentan en la Fig. 5e. El análisis de los datos de amplificación reveló una expresión significativamente reducida de TSC1 en los individuos afectados en comparación con los controles, como se muestra en las Figs. 5a-d. Cabe destacar que los sujetos afectados mostraron diversos grados de reducción del ARNm de TSC1. Este patrón de expresión sugiere firmemente una desregulación transcripcional mediada por mutaciones, lo que podría explicar las manifestaciones fenotípicas observadas. Desde el punto de vista mecanístico, estos hallazgos concuerdan con la hipótesis de la inactivación funcional de TSC1, lo que proporciona una validación experimental del potencial patogénico de las mutaciones identificadas en este linaje.

Análisis de empalme in vitro

Para evaluar el efecto de la variación c.363+668G>C en el gen TSC1 sobre el empalme del ARNm, realizamos un análisis de empalme in vitro. Las células HEK293T se transfectaron transitoriamente con plásmidos que contenían secuencias de tipo silvestre y mutantes, y se observó crecimiento celular después de 24 h de cultivo (Fig. 6a). A continuación, se extrajo el ARN total y el fragmento diana (Fig. 6b) se amplificó mediante PCR con transcripción inversa (RT-PCR). La electroforesis en gel de agarosa de los productos de RT-PCR reveló que la mutación c.363+668G>C generó fragmentos grandes adicionales en comparación con el tipo silvestre. Para confirmar la secuencia específica de los productos de empalme anormales, secuenciamos los productos de PCR. Los resultados de la secuenciación mostraron que, a diferencia del tipo silvestre, que mostró una señal de pico única (Fig. 1c), la mutación resultó en un pico doble en el mismo sitio base (Fig. 1b). Un análisis de secuencia posterior identificó una secuencia de intrón adicional de 92 pb entre c.363 y c.364: GATGGCAGTACATTGGA TTCATCTGCTACAGCACCATGCAAATTGATTTTGTGTCTGC CAAGAA GGGTAACTCTTTTATTATC



Fig. 4. Las imágenes PET-CT mostraron múltiples lesiones osteogénicas en las vértebras cervicales y torácicas.

CCTAGAG (Fig. 6c). Esta retención anormal de la secuencia de 92 pb provoca un desplazamiento del marco de lectura, lo que conlleva la terminación prematura de la traducción y la inactivación funcional de la proteína TSC1.

Detección de minigenes familiares

Para investigar el impacto de la mutación TSC1 c.363+668G>C en el empalme del ARNm, realizamos un ensayo de empalme de minigenes humanos. La región genómica que abarca el sitio de la mutación se amplificó utilizando cebadores específicos (TSC1 PCR F/R), verificando la eficiencia de la amplificación mediante electroforesis en gel de agarosa (Fig. 5f-g). La secuenciación de Sanger reveló patrones de empalme distintivos: (1) Las muestras probando mostraron una inserción de 92 pb entre los nucleótidos 699-700 de la secuencia codificante (CDS) en comparación con los controles sanos; (2) Las construcciones de minigenes que contenían el alelo mutante mostraron una retención de 92 pb entre los nucleótidos 363-367 en la región CDS, en comparación con sus homólogos de tipo silvestre. Este patrón de empalme aberrante sugiere la activación de un sitio de empalme críptico en muestras mutantes, lo que resulta en una retención parcial de intrones.

Predicción informativa de la estructura proteica de TSC1 c.363+668G>C

Se obtuvo el diagrama de la estructura proteica de TSC1 (Fig. 7a). El sitio de mutación identificado en este estudio se localizó en la base 363, ubicada entre los aminoácidos 121 y 122 (Fig. 7b), lo que resultó en la inserción de 92 pares de bases. Esta inserción permite que la proteína TSC1 continúe la traducción de 26 aminoácidos adicionales.

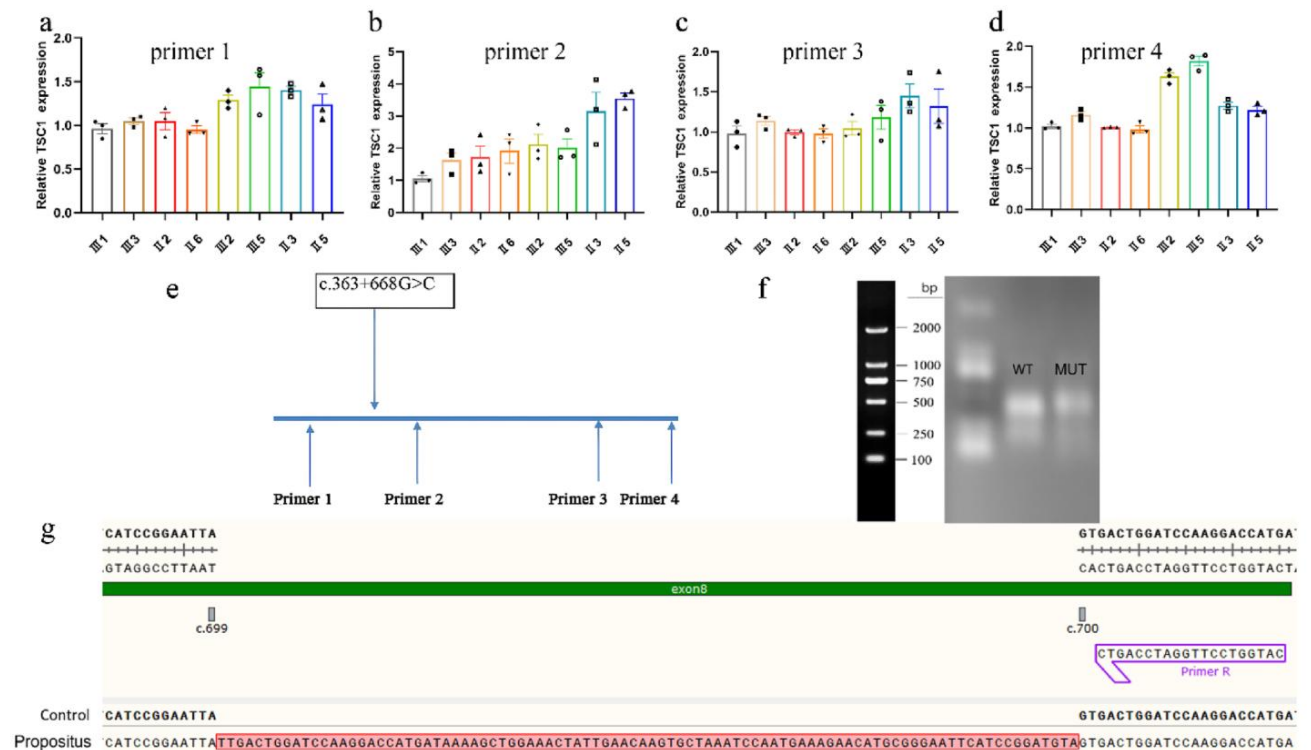


Fig. 5. ad. Basándose en el análisis de RT-qPCR con cuatro conjuntos de cebadores distintos dirigidos al gen TSC1, los resultados revelan que los niveles de expresión del paciente se reducen de forma variable en comparación con los de los familiares sanos. La figura ilustra la posición de los cebadores utilizados en los experimentos de RT qPCR. f. Tras la amplificación con el cebador F/R de PCR TSC1 en la familia, el resultado de la amplificación por PCR se muestra en la figura. g. Se presentan los resultados de la electroforesis en gel de agarosa que confirman el minigén de la familia.

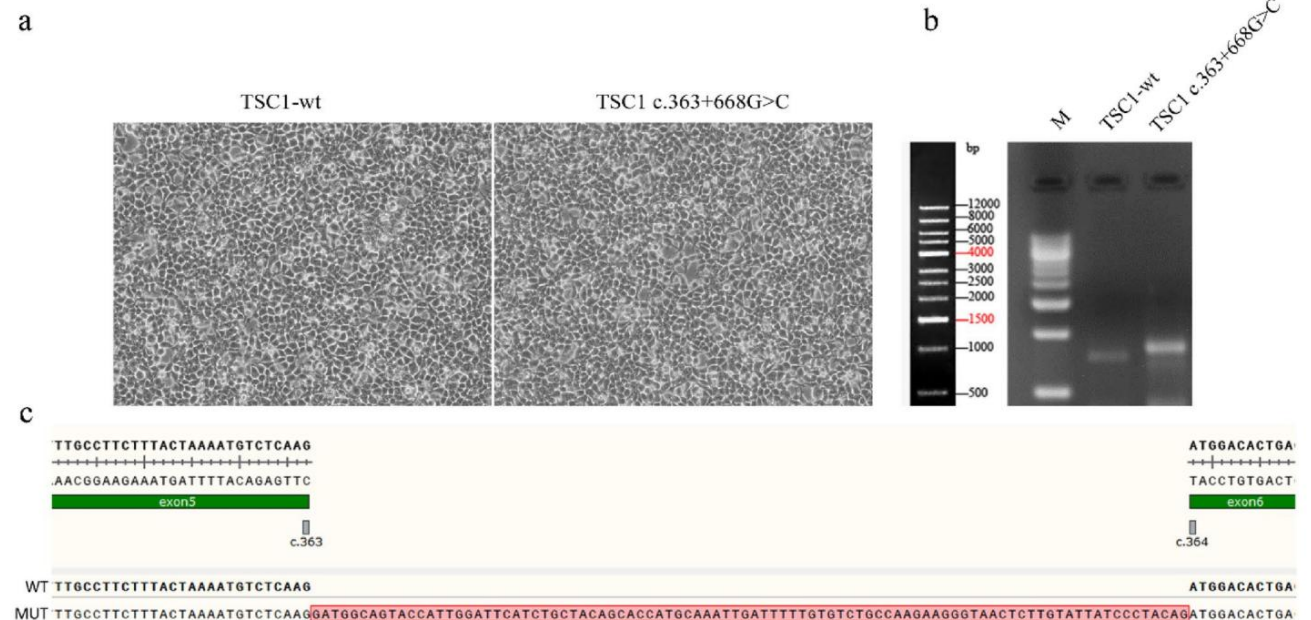


Fig. 6. (a) El crecimiento de células de tipo salvaje y mutantes para Minigene después de la transfección transitoria durante 24 h. (b) Después de recolectar las células de tipo salvaje y mutantes para la precipitación, se extrajo el ARN y se transcribió de forma inversa. El gen diana se amplificó mediante PCR. (c) El producto amplificado se recuperó y secuenció. Tras la mutación c.363+668G>C, se insertó una secuencia intrónica de 92 pb entre c.363 y c.364.

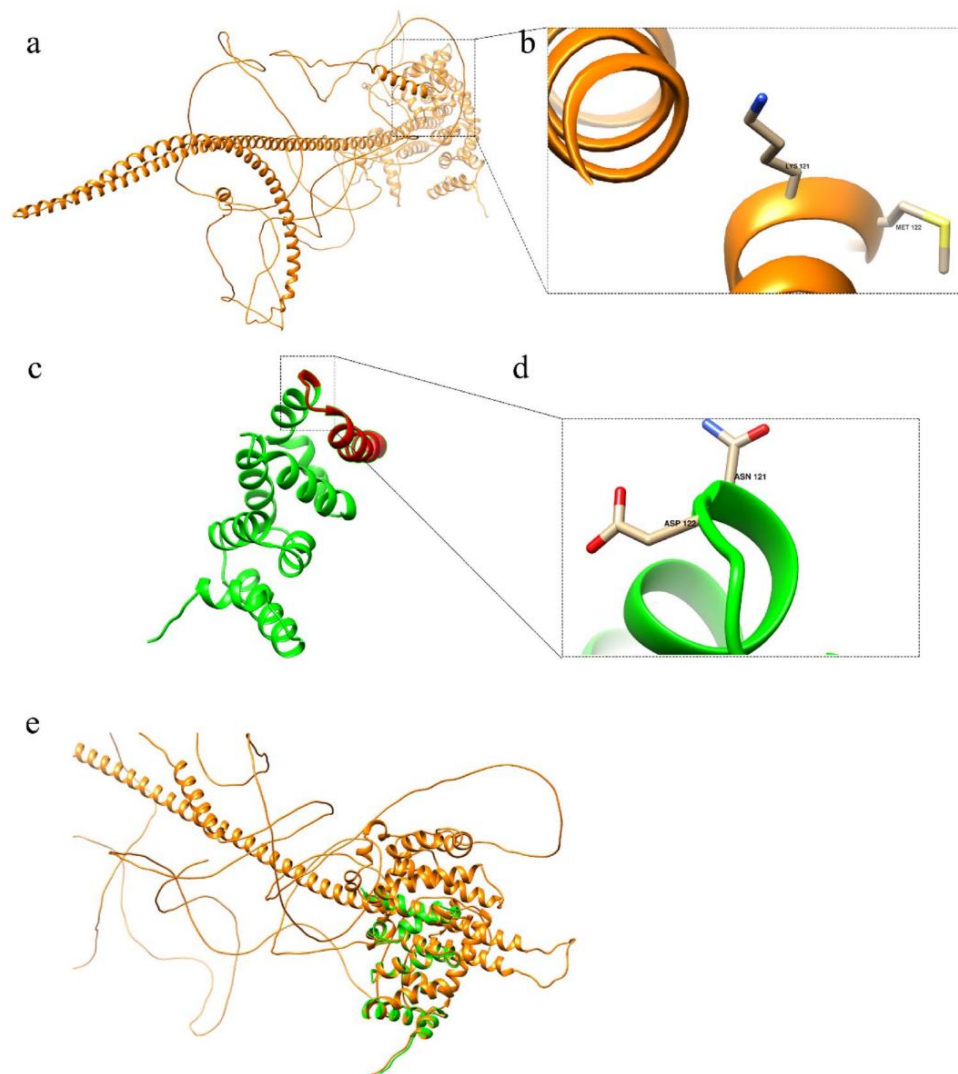


Fig. 7. Predicción y análisis de la estructura tridimensional de la proteína TSC1. (a) Diagrama de la estructura proteica de TSC1. (b) Diagrama de la estructura local de aminoácidos de la lisina 121 (121 LYS). La mutación se produce en la base 363, lo que resulta en la inserción de una secuencia de 92 bases en el intrón entre los aminoácidos 121 y 122. (c) Diagrama de la estructura proteica predicha de la mutación c.363+668G>C de TSC1. El área roja del diagrama resalta el sitio de la mutación y la estructura alterada de la secuencia de aminoácidos. Como resultado, la traducción de la proteína TSC1 continúa durante 26 aminoácidos adicionales antes de terminar prematuramente. (d) Estructura local de aminoácidos de la asparagina 121 (121 ASN) después de la mutación. El aminoácido 121 se altera de lisina a asparagina. (e) Comparación de las estructuras de la proteína mutante TSC1 c.363+668G>C y la proteína TSC1 de tipo silvestre. La proteína TSC1 mutada presenta un truncamiento significativo.

Antes de terminar prematuramente (Fig. 7c). Además, el aminoácido en la posición 121 se alteró de lisina a asparagina (Fig. 7d). Se utilizó el software Chimera para comparar las estructuras de la proteína mutante TSC1 c.363+668G>C y la proteína TSC1 de tipo silvestre (Fig. 7e). La comparación reveló que la proteína TSC1 mutada estaba significativamente truncada.

Discusión

Los estudios han demostrado que los pacientes con TSC con la misma mutación pueden presentar diversos fenotipos clínicos^{12,13}. Sin embargo, existen informes sobre diversas manifestaciones de esclerosis tuberosa causadas por mutaciones de empalme en el mismo TSC1. La presencia de genes dentro de una misma familia sigue siendo relativamente limitada. Cabe destacar que la familia TSC descrita en este estudio presenta una amplia gama de manifestaciones clínicas. El paciente III1 presenta hiperplasia micronodular multifocal de células pulmonares (MMPH) asociada a cáncer de pulmón, dermoide de piel de tiburón, rabdomiosarcoma cardíaco, múltiples cambios osteopetróticos y múltiples quistes y hamartomas renales. El paciente II2 presenta carcinoma renal, quistes renales y manchas cutáneas de tipo tiburón. Por otro lado, los pacientes III3 y II6 presentan LAM pulmonar y manchas dermoides de piel de tiburón.

Entre los pacientes con diagnóstico clínico de CET, las mutaciones TSC2 se encuentran en el 70% de los casos, mientras que las TSC1 Las mutaciones representan el 20%^{13–15}. El 10% restante de los casos, como se informó en estudios previos, involucran niveles bajos

Mosaicism somático o variaciones en el empalme de intrones que afectan a TSC1 o TSC22. La mayoría de las mutaciones de TSC1 son truncamientos cortos o mutaciones de inserción/delección (indel), que provocan pérdida de función. Solo se han identificado unas pocas mutaciones de sentido erróneo con consecuencias funcionales confirmadas, las cuales se localizan principalmente en cinco regiones específicas del [gen5,16](#).

Tetsuaki Shoji et al.¹¹, informaron otra mutación del mismo alelo, c.363+668G>A, encontrada en el intrón 5 de TSC1, que fue validada funcionalmente. En este estudio, los pacientes con la mutación del gen TSC1 y fenotipo MMPH exhibieron MMPH, mácula melanótica, convulsiones, displasia cortical cerebral, nódulos corticales cerebrales y nódulos subependimarios. El análisis de RT-PCR confirmó la presencia de la mutación c.363+668G>A en todos los pacientes, lo que conduce a un proceso de empalme anormal. Esta anomalía de empalme causa un cambio de marco y resulta en la pérdida de función de TSC1. Específicamente, la mutación puntual introduce una nueva secuencia de sitio de ramificación de 6 pb, "AATAGT", que altera el mecanismo de empalme normal. La secuencia "AG" aguas arriba de la inserción se reconoce ahora como el sitio aceptor de empalme, mientras que las dos secuencias "GT" aguas abajo se consideran el sitio donante de empalme, lo que provoca un empalme anormal. Independientemente de si la longitud de la secuencia insertada es de 68-92 pb, la inserción no es múltiplo de tres, lo que contribuye aún más al desplazamiento del marco de lectura y la pérdida de la función de TSC1. Además, el gen TSC1 desempeña un papel crucial en la supresión tumoral mediante la regulación de la vía de la fosfoinosítido 3-quinasa (PI3K)/Akt/diana de la rapamicina en mamíferos. La inmunohistoquímica confirmó que cuando TSC1...

c.363+668G>Se produce una mutación y los productos del gen TSC1 no pueden inhibir el complejo 1 de mTOR, específicamente p70S6K fosforilados y 4E-BP1, lo que provoca la alteración del complejo proteína hamartoma/proteína tubérculo. La familia con la mutación TSC1 identificada en este estudio es portadora de una mutación heterocigótica c.363+668G>C en el intrón 5. El análisis in vitro reveló que una secuencia intrónica de 92 pb entre c.363 y c.364 puede causar anomalías de empalme.

Las mutaciones del gen TSC1 causan nódulos corticales, nódulos subependimarios y sustancia blanca central anormal, así como diversas manifestaciones sistémicas fuera del sistema nervioso. Por ejemplo, la afectación ocular puede presentarse como hamartomas de la red óptica; cuando se afecta el área macular, puede producirse disminución de la visión o defectos del campo visual. La afectación cardíaca suele manifestarse como rabiomioma, el tumor más común en fetos y recién nacidos con mutaciones en el gen TSC1. Aunque estos tumores suelen ser benignos, pueden causar arritmia o insuficiencia cardíaca; sin embargo, la mayoría remiten espontáneamente durante la infancia. La afectación renal suele manifestarse como angiomiolipoma (AML), la lesión renal más común en pacientes con mutaciones en el gen TSC. Los AML consisten en proliferaciones anormales de vasos sanguíneos, músculo liso y tejido adiposo, que pueden provocar sangrado, dolor o insuficiencia renal. El angiobroma facial es una manifestación cutánea característica de las mutaciones en el gen TSC, que suele manifestarse en la infancia como nódulos pequeños, rojizos o del color de la piel. Los signos cutáneos tempranos también pueden incluir manchas blancas irregulares y despigmentadas comunes en la infancia. Además, la afectación de la piel puede presentarse como "manchas de tiburón" y fibromas periungueales¹⁷. Los síntomas de TSC causados por mutaciones de TSC1 tienden a ser más leves y pueden pasarse por alto fácilmente¹³. Por ejemplo, el Paciente 1 en este estudio fue diagnosticado con TSC después de una biopsia quirúrgica, que reveló anomalías pulmonares detectadas durante un examen físico de rutina. Las pruebas genéticas y las manifestaciones extrapulmonares adicionales confirmaron aún más el diagnóstico. Curiosamente, la afectación pulmonar se identificó como MMPH en combinación con adenocarcinoma de pulmón. Actualmente, hay pocos informes sobre la afectación pulmonar en pacientes con TSC con hiperplasia de células pulmonares micronodulares multifocales (MMPH) y adenocarcinoma de pulmón. Además, ningún estudio ha explorado aún si las mutaciones de TSC1/2 están asociadas con el adenocarcinoma de pulmón o la relación entre MMPH y adenocarcinoma de pulmón. Dadas estas incertidumbres, es crucial que los familiares de personas con mutaciones en TSC1/2 se sometan a pruebas de detección periódicas para detectar afecciones relacionadas. Los métodos habituales de detección de la CET incluyen la resonancia magnética cerebral, la ecografía abdominal y la ecografía cardíaca para detectar lesiones en el sistema nervioso central, los riñones, el corazón y otros órganos. De ser necesario, el diagnóstico puede confirmarse mediante pruebas de detección de las mutaciones en TSC1 o TSC2^{18,19}.

La MMPH es una proliferación nodular multifocal de células pulmonares, una enfermedad pulmonar rara de la esclerosis tuberosa. La TC de tórax muestra múltiples y pequeños nódulos en vidrio esmerilado¹¹. Histológicamente, la MMPH se caracteriza por el crecimiento nodular multicéntrico y bien definido de células pulmonares tipo II20. Su mecanismo patogénico se debe principalmente a la mutación del gen TSC1/2, que conduce al debilitamiento o pérdida de la función inhibidora del complejo TSC sobre mTOR1, y posteriormente al debilitamiento de dicha función inhibidora sobre mTOR1, lo que conduce a una proliferación celular anormal causada por la activación anormal de la transducción de señales en las células mTOR1. La MMPH es muy similar a la hiperplasia adenomatosa atípica (HAA) en morfología, por lo que es difícil distinguirla de la HAA en la histología²¹.

El cáncer es un proceso gradual impulsado por la activación de oncogenes y la inactivación de genes supresores de tumores, lo que conduce a la acumulación de cambios genéticos con el tiempo. Estudios han demostrado que las anomalías genéticas y otras características inmunohistoquímicas o morfológicas observadas en la HAA se superponen con las del adenocarcinoma²⁰, por lo que la HAA se considera una lesión precancerosa del adenocarcinoma de pulmón²². Además, la pérdida de heterocigosidad (LOH) en las regiones relacionadas con el gen TSC es común en el adenocarcinoma de pulmón con múltiples HAA²³, lo que destaca el papel crucial de la LOH en el desarrollo de la HAA. En conclusión, especulamos que existe una relación causal entre la LOH en las regiones relacionadas con el gen TSC y la aparición del adenocarcinoma de pulmón.

Los informes indican que la prevalencia de LAM en pacientes con CET está entre el 1% y el 3%³, con una mayor incidencia observada en mujeres. En mujeres con CET, la prevalencia de LAM varía de 26 a 49%, y esto está estrechamente relacionado con la edad. Específicamente, la prevalencia en mujeres menores de 21 años es de 27%, mientras que en mujeres mayores de 40 años, aumenta hasta 81%. Por el contrario, la hiperplasia neumocítica micronodular multifocal (MMPH) se observa tanto en pacientes con CET masculinos como femeninos, sin diferencia de género significativa^{24,25}. Se estima que la incidencia de MMPH en pacientes con CET varía de 40 a 60%^{26,27}. Sin embargo, debido al amplio diagnóstico diferencial para los nódulos y al hecho de que se presume que la mayoría de los pacientes con CET con nódulos tienen MMPH sin confirmación histopatológica, determinar la incidencia exacta de MMPH en CET sigue siendo un desafío²⁸.

En esta familia, las manifestaciones pulmonares relacionadas con la TSC incluyen tanto MMPH como LAM, lo que sugiere que

La mutación TSC1 c.363+668G>C recientemente descubierta en esta familia puede estar asociada con manifestaciones pulmonares heterogéneas.

Al combinar los resultados de experimentos de qPCR y minigenes, nuestros hallazgos indican que la mutación TSC1 altera la función génica mediante dos mecanismos principales: expresión reducida y empalme anormal del ARNm. El análisis de PCR cuantitativa reveló que los niveles de ARNm de TSC1 en los pacientes eran significativamente menores que en el grupo control normal. Esta reducción respalda la hipótesis de que la mutación podría provocar una pérdida parcial o total de la función de TSC1, posiblemente mediante la desintegración mediada por genes sin sentido y otros mecanismos.

Además, el análisis del minigén demostró que la mutación c.363+668G>C interrumpió el empalme normal.

Aunque todas las muestras produjeron el amplicón esperado, la secuenciación por PCR mostró que el transcrito del probando contenía una inserción de 92 pares de bases, en comparación con los de los controles sanos y los progenitores del probando. Este evento de empalme anormal puede alterar el marco de lectura abierto o resultar en productos proteicos disfuncionales, contribuyendo así a la patogénesis de la enfermedad. Podemos extraer las siguientes conclusiones. En primer lugar, la mutación c.363+668G>C de TSC1 produce un empalme anormal, lo que provoca una retención aberrante de secuencias intrónicas en el ARNm y podría conducir a la terminación prematura de la traducción de la proteína. En segundo lugar, el análisis por qPCR reveló que TSC1 Los niveles de ARNm en los pacientes fueron significativamente inferiores a los de los controles normales (Fig. 5a-d), lo que sugiere que la mutación puede regular negativamente la expresión del gen TSC1 al afectar la estabilidad del ARNm o la eficiencia de la transcripción. Finalmente, la inactivación funcional del gen TSC1 puede ser la base de las diversas manifestaciones clínicas observadas en esta familia. Como regulador clave de la vía mTOR, la pérdida de la función de la proteína TSC1 puede provocar una activación anormal de la señalización de mTOR, lo que a su vez puede contribuir a tumores multisistémicos y anomalías del desarrollo. Además, experimentos in vitro han revelado diferentes patrones de empalme entre células y construcciones de minigenes humanos, probablemente reflejando eventos de empalme alternativo. El empalme alternativo se refiere al proceso por el cual el mismo pre-ARNm retiene o excluye selectivamente ciertos exones o intrones a través de varios mecanismos de empalme, generando así múltiples variantes de ARNm. Este proceso permite que un solo gen codifique múltiples isoformas proteicas con funciones distintas, lo que aumenta significativamente la diversidad proteica. El mismo gen puede producir diferentes variantes de empalme en varios tejidos o en diferentes etapas del desarrollo. Por ejemplo, las isoformas de troponina T en el corazón y el músculo esquelético desempeñan funciones distintas. Este complejo proceso biológico puede implicar mecanismos de empalme diferencial y la activación de sitios de empalme crípticos, con múltiples sitios donantes o aceptores ocultos potencialmente presentes dentro de la misma secuencia²⁹.

El análisis de la estructura de la proteína TSC1 reveló que la mutación c.363+668G>C produce una alteración significativa, caracterizada por la inserción de 92 pares de bases en la región intrónica entre los aminoácidos 121 y 122. Esta mutación no solo provoca la terminación prematura de la traducción de la proteína TSC1 después de 26 aminoácidos, sino que también modifica el aminoácido 121 de lisina (Lys) a asparagina (Asn). Mediante el software Chimera para comparar las estructuras de la proteína mutante y la silvestre, se observó un truncamiento pronunciado en la proteína mutante. Estos hallazgos sugieren que el truncamiento de la proteína TSC1 puede provocar la pérdida completa o una reducción significativa de su función. La proteína TSC1 forma un complejo con TSC2 y, en conjunto, regulan negativamente la vía de señalización de mTOR. Sin embargo, la proteína TSC1 truncada puede no unirse correctamente a TSC2, lo que provoca una activación anormal de mTOR que promueve la proliferación celular y la formación de tumores. Además, la sustitución de lisina por asparagina en el aminoácido 121 podría alterar la estructura o función local de TSC1. La lisina, un aminoácido con carga positiva, suele participar en las interacciones proteicas y la formación de sitios activos enzimáticos, mientras que la asparagina es neutra; esta sustitución puede alterar regiones funcionales críticas de TSC1. La consiguiente pérdida de la función de TSC1 puede provocar la activación constitutiva de la vía mTOR, asociada a diversos procesos patológicos como la proliferación celular, los trastornos metabólicos y la tumorigénesis.

Esta activación aberrante de mTOR puede ser un factor clave subyacente al desarrollo de tumores multisistémicos, incluido el angiomiolipoma renal y la linfangioleiomiomatosis pulmonar, en pacientes con mutaciones TSC1.

La activación anormal de la vía mTOR puede alterar aún más la actividad de los efectores dependientes, como S6K y 4E-BP1, lo que resulta en una síntesis proteica y un crecimiento celular descontrolados. Estos cambios podrían contribuir a los síntomas del sistema nervioso, como la epilepsia y el deterioro cognitivo, así como al desarrollo de tumores en pacientes con CET. El truncamiento proteico y la pérdida funcional inducidos por la mutación c.363+668G>C de TSC1 probablemente constituyen la base molecular de las diversas manifestaciones clínicas observadas en esta familia. Además, las variaciones en los antecedentes genéticos y los factores ambientales podrían explicar las diferencias en la gravedad de la enfermedad y la afectación orgánica entre los pacientes.

En el futuro, planeamos verificar los efectos de la mutación TSC1 c.363+668G>C en la expresión proteica y la vía mTOR utilizando células o tejidos derivados de pacientes. Por ejemplo, evaluaremos los niveles de proteína TSC1 mediante Western blot y analizaremos la actividad de las moléculas dependientes de mTOR mediante inmunohistoquímica. Basándonos en la activación anormal observada de la vía mTOR, también pretendemos explorar el potencial terapéutico de los inhibidores de mTOR (como la rapamicina) en pacientes con mutaciones TSC1. Además, las estrategias para restaurar la función de TSC1, como la edición génica o los estabilizadores proteicos, justifican una mayor investigación. Dado que la mutación TSC1 c.363+668G>C provoca el truncamiento de proteínas y la sustitución de aminoácidos, lo que resulta en la pérdida de la función de TSC1 y la consiguiente activación anormal de la vía mTOR, este mecanismo molecular podría ser la causa de las diversas manifestaciones clínicas en los pacientes afectados. Las investigaciones futuras deberían validar aún más el impacto de la mutación en la función proteica y desarrollar estrategias de tratamiento individualizadas dirigidas a mTOR para mejorar el pronóstico de los pacientes.

Limitaciones y direcciones futuras

El número de familiares incluidos en este estudio es reducido. En estudios futuros, planeamos ampliar el tamaño de la muestra incluyendo más pacientes y familias con TSC1, en particular aquellos con manifestaciones clínicas diversas, para validar aún más la diversidad fenotípica y los mecanismos patogénicos de la mutación c.363+668G>C de TSC1. También pretendemos investigar la relación entre la mutación c.363+668G>C de TSC1 y el adenocarcinoma de pulmón, con especial atención al posible papel del MMPH como lesión precancerosa. Se emplearán análisis de patología molecular y genómicos para dilucidar el papel de la mutación en el adenocarcinoma de pulmón. Además, los pacientes...

Se hará un seguimiento de los pacientes que albergan la mutación TSC1 c.363+668G>C durante un período prolongado para evaluar la progresión de la enfermedad, la eficacia del tratamiento y el pronóstico, informando así estrategias de manejo clínico más efectivas. Además, planeamos establecer una extensa base de datos de pacientes con mutaciones del gen TSC1 mediante la integración de datos clínicos, genéticos y moleculares para impulsar la investigación y el tratamiento clínico de la TSC1. Esta iniciativa profundizará nuestra comprensión de la heterogeneidad genética y la diversidad fenotípica de la TSC1.

Conclusiones

Este estudio informa sobre una familia con esclerosis tuberosa que presenta diversas manifestaciones clínicas causadas por una nueva mutación de splicing en el gen TSC1. El análisis de splicing in vitro proporcionó evidencia experimental crucial que respalda el posible mecanismo patogénico de la mutación c.363+668G>C de TSC1. Las investigaciones futuras deberían centrarse en validar con mayor precisión esta anomalía de splicing en células o tejidos derivados de pacientes y evaluar su impacto en la expresión y la función de la proteína TSC1.

Disponibilidad de datos

Los conjuntos de datos generados y/o analizados durante el estudio actual están disponibles en el manuscrito, los archivos de material complementario, el repositorio ClinVAR y el número de acceso es RCV002274870.1 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/RCV002274870.1/>).

Recibido: 28 de diciembre de 2024; Aceptado: 18 de junio de 2025

Published online: 09 July 2025

Referencias

1. Crino, PB, Nathanson, KL y Henske, EP El complejo de esclerosis tuberosa. *N Engl. J. Med.* 355 (13), 1345–1356 (2006).
2. Henske, EP, Jozwiak, S., Kingswood, JC, Sampson, JR y Thiele, EA. Complejo de esclerosis tuberosa. *Nat. Rev. Dis. Primers.* 2, 16035 (2016).
3. Curatolo, P., Bombardieri, R. y Jozwiak, S. Esclerosis tuberosa. *Lancet* 372 (9639), 657–668 (2008).
4. Morrison, PJ, Shepherd, CH, Stewart, FJ y Nevin, NC. Prevalencia de la esclerosis tuberosa en el Reino Unido. *Lancet* 352 (9124), 318–319 (1998).
5. Mayer, K., Ballhausen, W. y Rott, HD Cribado de mutaciones de todas las regiones codificantes de los genes TSC1 y TSC2 con el La prueba de truncamiento de proteínas (PTT) identifica defectos frecuentes de empalme. *Hum. Mutat.* 14 (5), 401–411 (1999).
6. Crino, PB Neurobiología evolutiva del complejo de esclerosis tuberosa. *Acta Neuropathol.* 125 (3), 317–332 (2013).
7. Northrup, H., Koenig, M.K., Pearson, D.A. y Au, K.S. Complejo de Esclerosis Tuberosa. En: Adam, M.P., Feldman, J., Mirza, G.M., Pagon, RA, Wallace SE, Amemiya A, editores. *Reseñas genéticas*(R). Seattle (WA) 1993.
8. Rebaine, Y., Nasser, M., Girerd, B., Leroux, C. y Cottin, V. Complejo de esclerosis tuberosa para el neumólogo. *Eur. Respir Rev.* 30(161), 200348 (2021).
9. Northrup, H., Krueger, DA y Consenso Internacional del Complejo de Esclerosis Tuberosa G. Actualización de los criterios diagnósticos del complejo de esclerosis tuberosa: recomendaciones de la conferencia de consenso internacional del complejo de esclerosis tuberosa de 2012. *Pediatr. Neurol.* 49 (4), 243–254 (2013).
10. Pettersen, EF et al. UCSF Chimera: un sistema de visualización para la investigación y el análisis exploratorios. *J. Comput. Chem.* 25 (13), 1605–1612 (2004).
11. Shoji, T. et al. Hiperplasia neumoática micronodular multifocal familiar con una nueva mutación de empalme en TSC1: tres casos en uno familia. *PLoS One.* 14 (2), e0212370 (2019).
12. Niida, Y. et al. El análisis mutacional de TSC1 y TSC2 en pacientes japoneses con complejo de esclerosis tuberosa reveló una mayor Incidencia de pacientes con TSC1 mayor que la reportada previamente. *J. Hum. Genet.* 58 (4), 216–225 (2013).
13. Dabora, SL et al. El análisis mutacional en una cohorte de 224 pacientes con esclerosis tuberosa indica una mayor gravedad de TSC2, en comparación con TSC1, enfermedad en múltiples órganos. *Am. J. Hum. Genet.* 68 (1), 64–80 (2001).
14. Sancak, O. et al. Análisis mutacional de los genes TSC1 y TSC2 en un contexto diagnóstico: correlaciones genotipo-fenotipo y comparación de técnicas diagnósticas de ADN en el complejo de esclerosis tuberosa. *Eur. J. Hum. Genet.* 13 (6), 731–741 (2005).
15. Jones, AC et al. Análisis exhaustivo de mutaciones de TSC1 y TSC2 y correlaciones fenotípicas en 150 familias con esclerosis tuberosa. *Am. J. Hum. Genet.* 64 (5), 1305–1315 (1999).
16. Hoogveen-Westerveld, M. et al. Evaluación funcional de las variantes sin sentido de TSC1 identificadas en personas con esclerosis tuberosa. *complejo. Tararear. Mutación.* 33 (3), 476–479 (2012).
17. von Ranke, FM et al. Complejo de esclerosis tuberosa: Revisión de vanguardia con enfoque en la afectación pulmonar. *Pulmón* 193 (5), 619–627 (2015).
18. Krueger, DA, Northrup, H. y Consenso Internacional del Complejo de Esclerosis Tuberosa G. Vigilancia y manejo del complejo de esclerosis tuberosa: recomendaciones de la Conferencia de Consenso Internacional del Complejo de Esclerosis Tuberosa de 2012. *Pediatr Neurol.* ;49(4):255–65. (2013).
19. Northrup, H. et al. Criterios actualizados de diagnóstico, vigilancia y tratamiento del complejo internacional de esclerosis tuberosa. *Recomendaciones. Pediatr. Neurol.* 123, 50–66 (2021).
20. Kitamura, H. et al. Hiperplasia adenomatosa atípica y carcinoma broncoalveolar pulmonar. Análisis por morfometría y Expresiones de p53 y antígeno carcinoembrionario. *Am. J. Surg. Pathol.* 20 (5), 553–562 (1996).
21. Guinee, D. et al. Hiperplasia neumoática micronodular multifocal: una manifestación pulmonar distintiva de la esclerosis tuberosa. *Mod. Patol.* 8 (9), 902–906 (1995).
22. Takamochi, K. et al. Pérdida de heterocigosidad en los cromosomas 9q y 16p en la hiperplasia adenomatosa atípica concomitante con Adenocarcinoma de pulmón. *Am. J. Pathol.* 159 (5), 1941–1948 (2001).
23. Suzuki, K. et al. Pérdida de heterocigosidad en las regiones asociadas al gen de la esclerosis tuberosa en el adenocarcinoma de pulmón acompañado de hiperplasia adenomatosa atípica múltiple. *Int. J. Cancer.* 79 (4), 384–389 (1998).
24. Lim, KH, Silverstone, EJ y Yates, DH Hiperplasia de neumocitos micronodulares multifocales en el complejo de esclerosis tuberosa: Resolución con tratamiento con everolimus. *Am. J. Respir Crit. Care Med.* 201 (10), e76 (2020).
25. Moss, J., DeCastro, R., Patronas, Nueva Jersey y Taveira-DaSilva, A. Meningiomas en linfangioleiomiomatosis. *JAMA* 286 (15), 1879–1881 (2001).
26. Tanaka, M., Hirata, H., Wataya-Kaneda, M., Yoshida, M. y Katayama, I. Linfangioleiomiomatosis e hiperplasia neumoática micronodular multifocal en pacientes japoneses con complejo de esclerosis tuberosa. *Respir Investig.* 54 (1), 8–13 (2016).
27. Muzykewicz, DA et al. Hiperplasia neumoática micronodular multifocal: apariencia tomográfica computarizada y seguimiento en complejo de esclerosis tuberosa. *J. Comput. Assist. Tomogr.* 36 (5), 518–522 (2012).
28. Gupta, N. y Henske, EP. Manifestaciones pulmonares en el complejo de esclerosis tuberosa. *Am. J. Med. Genet. C. Semin Med. Genet.* 178 (3), 326–337 (2018).

29. Ule, J. y Blencowe, B.J. Redes reguladoras del empalme alternativo: funciones, mecanismos y evolución. *Mol. Cell.* 76 (2), 329–345 (2019).

Contribuciones del autor

BSX, JWL y LZ concibieron y diseñaron el estudio. ZLC, ZYX y XQL recopilaron los datos. QC, HPY, JZ y JHZ realizaron el análisis e interpretación de los datos. XJY, YL y JZ redactaron el manuscrito. DDR, MZG, YL y XJY realizaron revisiones críticas del contenido importante del manuscrito.

Declaración de financiación

Este trabajo fue financiado por la Especialidad Clínica Clave Nacional (Subvención N.º 2023002), el Proyecto del Fondo de Ciencias Naturales de la Provincia de Fujian (2022J01417, 2022J01409, 2023J011159, 2022J01996, 2024Y0033), Fondos Conjuntos para la Innovación en Ciencia y Tecnología en la Provincia de Fujian (2023Y9284), la Fundación para la Innovación Médica de la Provincia de Fujian (2022CXA001), Fondo de Inicio para la Investigación Científica, Universidad Médica de Fujian (2022QH2042, 2023QH2038), y el proyecto de construcción del estudio de herencia de expertos nacionales famosos y antiguos en medicina china (Xuemei Zhang, Xiaohua Yan, Lv Shaoguang, Yichun Jin).

Declaraciones

Aprobación ética y consentimiento para participar

Este estudio fue revisado y aprobado por el Comité de Ética del Hospital Provincial de Fujian, Fuzhou, China, con el número de aprobación: K2024-09-144. Todos los participantes y sus tutores legales contaron con el consentimiento informado por escrito para participar en el estudio.

Intereses en competencia

Los autores declaran no tener intereses en conflicto.

Información adicional

Información complementaria La versión en línea contiene material complementario disponible en <https://doi.org/10.1038/s41598-025-07906-6>

La correspondencia y las solicitudes de materiales deberán dirigirse a LZ, J.-wL o B.-sX.

La información sobre reimpresiones y permisos está disponible en www.nature.com/reprints.

Nota del editor: Springer Nature permanece neutral con respecto a los reclamos jurisdiccionales en los mapas publicados y las afiliaciones institucionales.

Acceso abierto. Este artículo está bajo la licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional, que permite cualquier uso no comercial, compartir, distribuir y reproducir en cualquier medio o formato, siempre que se otorgue el crédito correspondiente al autor o autores originales y a la fuente, se proporcione un enlace a la licencia Creative Commons y se indique si se modificó el material licenciado. Esta licencia no permite compartir material adaptado derivado de este artículo o partes del mismo. Las imágenes u otros materiales de terceros en este artículo están incluidos en la licencia Creative Commons del artículo, a menos que se indique lo contrario en una línea de crédito del material. Si el material no está incluido en la licencia Creative Commons del artículo y el uso previsto no está permitido por la normativa legal o excede el uso permitido, deberá obtener el permiso directamente del titular de los derechos de autor. Para ver una copia de esta licencia, visite <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>.

[ns.org/licencias/by-nc-nd/4.0/](http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

© El autor(es) 2025