



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA

FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA

Programa de Doctorado en Medicina

TESIS DOCTORAL INTERNACIONAL

***Estudio de la prevalencia de mutaciones en línea germinal
(síndrome de Birt-Hogg-Dubé) y somáticas del gen FLCN en
pacientes con fibrofolliculomas o tricodiscomas cutáneos y/o
neumotórax recidivantes y/o bilaterales.***

DOCTORANDO: Lda. Verónica López Castillo

DIRECTORES: Prof. Dr. Carlos Monteagudo Castro

Prof. Dra. Esperanza Jordá Cuevas

El trabajo titulado

“Estudio de la prevalencia de mutaciones en línea germinal (síndrome de Birt-Hogg-Dubé) y somáticas del gen FLCN en pacientes con fibrofoliculomas o tricodiscomas cutáneos y/o neumotórax recidivantes y/o bilaterales”

que se presenta en esta memoria, ha sido realizado por el licenciado en Medicina y Cirugía Doña Verónica López Castillo bajo mi supervisión.

Dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para su presentación y defensa como TESIS DOCTORAL.

Y para que conste a efectos oportunos, realizo esta declaración en Valencia a 19 de Octubre de 2015.

Dr. Carlos Monteagudo Castro

Dra. Esperanza Jordá Cuevas

AGRADECIMIENTOS

A mi director de tesis, el Dr. Carlos Monteagudo, sin el cual este proyecto no se hubiese podido llevar a cabo. Gracias no solo por permitirme y ayudarme a realizar este trabajo sino también por la paciencia y el apoyo durante todo este tiempo. Ha sido un largo camino pero al final ha merecido la pena.

A mi directora de tesis y jefa de servicio durante mis años de residencia, la Dra. Esperanza Jordá.

Al Servicio de Dermatología del Hospital Clínico Universitario de Valencia, donde me formé como residente durante 4 años.

A todos los que forman parte de la Fundación de Investigación del Hospital Clínico de Valencia - INCLIVA, especialmente a Javier Chaves, Ana Bárbara García, Cristina Pérez y Verónica Lendínez, que han sido parte importante de este trabajo.

Al personal del Servicio de Anatomía Patológica y del Laboratorio del Departamento de Patología del Hospital Clínico Universitario de Valencia quienes han formado parte de este proyecto.

De manera especial a Lara Navarro, por su amabilidad, profesionalidad y ser la gran persona que es, siempre con una sonrisa y dispuesta a ayudar. Este tiempo me ha permitido conocerla y ha sido para mí todo un descubrimiento. Le agradezco su impagable ayuda sin la cual esta tesis no podría haberse llevado a cabo. Podría decirse que esta tesis es de las dos.

A Bea, porque a pesar de no estar metida de lleno en esta tesis, la hemos “liado” con alguna búsqueda.

A Pedro, por ser mi mitad y haber aguantado mis horas de encierro.... Te quiero mi vida.

A mis padres y a mi hermana Inma. Gracias porque todo lo que soy os lo debo a vosotros. Gracias mamá por estar siempre a mi lado y por apoyarme en todo lo que hago de manera incondicional. Gracias Inma por nuestros momentos “winki & winka”. Os quiero y no podría resumir en pocas líneas lo orgullosa que estoy de teneros a mi lado.

A mi abuela Encarna y mi abuelo Faustino, porque los quiero con locura y sé que si estuviera aquí estaría tan orgulloso de mí como yo lo he estado de él.

A cada uno de vosotros, GRACIAS.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1.1. INTRODUCCIÓN	3
1.2. MANIFESTACIONES CLÍNICAS.....	3
1.2.1. Clínica cutánea	3
1.2.2. Clínica renal	18
1.2.3. Clínica pulmonar	23
1.2.4. Otras manifestaciones	33
1.3. BASES GENÉTICAS	39
1.3.1. Identificación del gen	39
1.3.2. Gen FLCN	41
1.3.3. Localización y expresión de la foliculina	42
1.3.4. Homólogos de FLCN	44
1.3.5. Funciones de FLCN	47
1.3.6. Mutaciones de FLCN	52
1.3.7. Repercusiones funcionales locales o sistémicas de las mutaciones del gen FLCN	60
1.4. CRITERIOS DIAGNÓSTICOS	63
1.5. OTROS PROCESOS QUE PRESENTAN LESIONES CUTÁNEAS, RENALES O PULMONARES SIMILARES	68
1.5.1. Lesiones cutáneas	68
1.5.2. Lesiones renales.....	71
1.5.3. Lesiones pulmonares.....	72
1.6. TRATAMIENTO Y MANEJO DEL PACIENTE	73

1.7.	JUSTIFICACIÓN DE LA TESIS.....	77
1.7.1.	Hipótesis	77
1.7.2.	Objetivos.....	77
2.	METODOLOGÍA	79
2.1.	MATERIAL.....	81
2.1.1.	Muestras estudiadas	81
2.2.	MÉTODOS.....	82
2.2.1.	Estudio clínico	82
2.2.2.	Estudio histológico	84
2.2.3.	Estudio inmunohistoquímico.....	86
2.2.4.	Procedimientos de extracción de ADN	91
2.2.4.1.	De muestras sanguíneas.....	91
2.2.4.2.	De muestras tisulares	93
2.2.5.	Medida de la concentración de ADN	95
2.2.6.	Procedimientos para la detección de mutaciones en ADN en los genes FLCN.....	96
2.2.6.1.	Secuenciación por Sanger.....	96
2.2.6.2.	Secuenciación masiva.....	100
2.2.6.2.1.	Preparación de la librería de ADN	102
2.2.6.2.2.	Amplificación por PCR en emulsión	105
2.2.6.2.3.	Secuenciación	107
2.2.6.2.4.	Análisis de los datos	109
2.2.6.3.	Procedimientos para la detección de metilación en el gen FLCN en las muestras tisulares	113
2.2.7.	Análisis estadístico	116

3.	RESULTADOS Y DESARROLLO ARGUMENTAL	119
3.1.	Resultados	121
3.1.1.	Parámetros clínico-patológicos	121
3.1.1.1.	Sexo.....	121
3.1.1.2.	Edad	122
3.1.1.3.	Antecedentes familiares	122
3.1.1.4.	Afectación pulmonar	123
3.1.1.5.	Afectación cutánea.....	129
3.1.1.6.	Afectación renal	138
3.1.1.7.	Asociación a otros cánceres extrarrenales.....	139
3.1.2.	Parámetros inmunohistoquímicos	139
3.1.3.	Parámetros genéticos	144
3.1.3.1.	Mutaciones en línea germinal del gen FLCN	145
3.1.3.2.	Mutaciones somáticas del gen FLCN.....	157
3.1.3.3.	Análisis de la presencia de inactivación bialélica.....	176
3.2.	DESARROLLO ARGUMENTAL.....	188
4.	CONCLUSIONES.....	199
5.	BIBLIOGRAFÍA.....	203
6.	SUMMARY AND CONCLUSIONS	225
6.1.	Introduction.....	225
6.2.	Hypothesis and objectives	228
6.3.	Material and methods	229
6.4.	Results.....	231
6.5.	Conclusions.....	234

ABREVIATURAS

AA	acrocordón
Ab	antebrazo
Acgh	array de hibridación genómica comparativa
ADN	ácido desoxirribonucleico
AF	antecedentes familiares
AG	angiofibroma
AML	angiomiolipoma
AMP	5'adenosina monofosfato
AMPK	proteín quinasa activada por AMP
AS	adenoma sebáceo
AVA	Amplicon Variant Analyzer
Ax	axila
BDD	Bead Deposition Device
BHD	Birt-Hogg-Dubé
BCRA1	cáncer de mama 1
CBC	carcinoma basocelular
CR	cálculos renales
Cu	cuello

D	derecho
DNTPs	deoxinucleótidos trifosfatos
emPCR	reacción en cadena de la polimerasa en emulsión
F	frente
FAM	fibroadenoma mama
FPF	fibroma perifolicular
FF	fibrofoliculoma
FLCN	Foliculina
FNIP	proteína interactuadora de la foliculina
HAD	herencia autosómica dominante
H&E	hematoxilina-eosina
HFF	hamartoma fibrofolicular
HIF	factor inducible por hipoxia-1
hMLH1	homólogo de mutS 1
hMLH2	homólogo de mutS 2
hMLH3	homólogo de mutS 3
hMLH6	homólogo de mutS 6
HS	hiperplasia sebácea
I	izquierdo
In	ingle

LAM	linfangioleiomiomatosis
LOVD	Leiden Open Variation Database
LSDB	Locus Specific Database list
M	mujer
Me	mejillas
MID	multiplex identifier
MLPA	amplificación de sondas dependiente de ligandos múltiples
MMPs	metaloproteasas de matrix
MPC	separador magnético
mRNA	ácido ribonucleico mensajero
mTOR	diana de rapamicina en células de mamífero
mTOR1	complejo 1 de diana de rapamicina en células de mamífero
mTOR2	complejo 2 de diana de rapamicina en células de mamífero
N	nariz
NGS	secuenciación masiva o Next Generation Sequencing
O	orejas
PC	pólipos colon
PCNA	antígeno nuclear de células en proliferación
PDGFR α	receptor alfa de factor de crecimiento derivado plaquetas
PF	pápula fibrosa

Polyphen-2	polymorphism Phenotyping v2
PPi	pirofosfato inorgánico
PTP	PicoTiterPlate
QR	quiste cortical renal
RQ-PCR	reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real
S	surco nasogeniano
SBHD	síndrome Birt-Hogg-Dubé
SIFT	Sorting Intolerant From Tolerant
SNC	sistema nervioso central
ssDNA	ácido desoxirribonucleico monocatenario
T	tronco
TD	tricodiscoma
TAC	Tomografía axial computarizada
TGF	receptor de factor de crecimiento transformante
TGI	tracto gastrointestinal
TS	esclerosis tuberosa
TSC	complejo escleriosis tuberosa
UTDD	Ultra Turrax Tube Drive
UV	luz ultravioleta
V	varón

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Asociaciones descritas en pacientes con SHBD.....	38
Tabla 2. Principales genes ortólogos de FLCN en las especies más representativas. Similitud con FLCN humana: muestra el porcentaje de similitud al gen humano, seguido por (n) donde la comparación se basa en los ácidos nucleicos o (a) donde la comparación se basa en los aminoácidos.	46
Tabla 3. Criterios diagnósticos del Consorcio Europeo para el diagnóstico del síndrome Birt-Hogg-Dubé.	63
Tabla 4. Criterios para la solicitud del estudio genético según el Consorcio Europeo Birt-Hogg-Dubé.....	64
Tabla 5. Nuevos criterios diagnósticos para el síndrome Birt-Hogg-Dubé basados en las pruebas de imagen.	65
Tabla 6. Diagnóstico diferencial ante un paciente con lesiones papulosas en la cara.	70
Tabla 7. Principales diagnósticos diferenciales del carcinoma hereditario familiar.	71
Tabla 8. Secuencias de los primers.	98
Tabla 9. Características clínicas y frecuencias de quistes pulmonares y neumotórax en los pacientes recogidos.....	127
Tabla 10. Características clínicas de los pacientes con patología pulmonar ..	128
Tabla 11. Características clínicas de los pacientes con patología cutánea.	137
Tabla 12. Tipo de mutaciones germinales encontradas en el gen FLCN.	154

Tabla 13. Características de las mutaciones en línea germinal encontradas en el gen FLCN.....	155
Tabla 14. Clínica de los pacientes con mutaciones en línea germinal en el gen FLCN.	156
Tabla 15. Mutaciones germinales y somáticas patogénicas de las muestras sanguíneas y tisulares.	177
Tabla 16. Mutaciones somáticas no patogénicas de las muestras sanguíneas y tisulares.	179
Tabla 17. Detección de inactivación bialélica en las muestras cutáneas y pulmonares estudiadas.....	181

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Múltiples fibrofoliculomas en nariz y región perinasal.	4
Figura 2. Múltiples fibrofoliculomas en nariz.	4
Figura 3. Múltiples fibrofoliculomas retroauriculares.	5
Figura 4. Múltiples fibrofoliculomas agrupados en modo de placa.	5
Figura 5. Fibrofoliculoma solitario en concha.	6
Figura 6. Características dermatoscópicas de un fibrofoliculoma.	7
Figura 7. Imagen histológica de un fibrofoliculoma.....	7
Figura 8. Imagen histológica de un tricodiscoma.	8
Figura 9. Imagen histológica de un tricodiscoma con predominio de células fusiformes. (H&E x20, x400).....	10
Figura 10. Imagen histológica de un tricodiscoma con predominio de rasgos lipomatosos. (H&E x40, x100).	10
Figura 11. Imagen histológica de un tricodiscoma con predominio de rasgos mixoide. (H&E x40, x400).....	11
Figura 12. Imagen histológica de un tricodiscoma pseudocartilaginoso. (H&E x20, x400).	11
Figura 13. Imagen histológica de un tricodiscoma esclerótico.	12
Figura 14. Imagen histológica de un tricodiscoma con componente glandular apocrino.	12
Figura 15. Imagen de un tricodiscoma simulando un angioleiomioma.	13

Figura 16. Imagen histológica de un tricodiscoma con proliferación vascular. (H&E x40, x100, x400).....	13
Figura 17. Imagen clínica de lesiones pediculadas en un paciente con SBHD.	14
Figura 18. A. Angiofibromas perinasales en un paciente con SBHD. B. Imagen histológica de un angiofibroma.....	16
Figura 19. Lesiones en mucosa oral compatibles histológicamente con fibrofolliculomas.....	16
Figura 20. Principales cánceres renales en pacientes con SBHD: oncocitoma (A), carcinoma cromóforo (B), híbrido (C) y de células claras (D).	19
Figura 21. Tomografía axial computarizada en la que se aprecia el carcinoma renal izquierdo en un paciente con SBHD.	21
Figura 22. Tomografía axial computarizada en la que se evidencian los múltiples quistes en el pulmón derecho.....	24
Figura 23. Tomografía axial computarizada en la que se evidencia neumotórax en el pulmón izquierdo.	26
Figura 24. Rasgos histológicos del pulmón afecto de un paciente con SBHD en el que se aprecia (A y B) una dilatación quística en la pleura visceral (punta de flecha) y septo interlobular (flecha), (C) con células epiteliales de apariencia benigna que se tiñen para prosurfactante C y (D) m-TOR y S6.	27
Figura 25. Hipótesis sugerida para el desarrollo de quistes pulmonares en la que una insuficiencia en la foliculina conllevaría a la activación de la vía mTOR y a un aumento en la producción de moléculas, como p-S6 y VEGF.	29
Figura 26. Interacción entre el complejo foliculina/FNIP1/FNIP2/AMPK y la vía mTOR en el melanoma. La mutación del gen FLCN conlleva a la inactivación de la	

foliculina y a la activación mTOR. La rapamicina y sus análogos inhiben mTOR compensando la inactividad del complejo foliculina/FNIP1/FNIP2/AMPK.....	37
Figura 27. Localización genómica del gen FLCN.	39
Figura 28. Esquema del cromosoma 17, en el que se muestra la localización de los microsatélites ligados al locus BHD.....	39
Figura 29. Transcrito 1 del gen FLCN.....	41
Figura 30. Transcrito 2 del gen FLCN.....	41
Figura 31. Localización de la foliculina en los diferentes tejidos.....	42
Figura 32. a. Cuando se expresa la foliculina, el complejo FLCN–FNIP1–FNIP2 se une al AMPK y FLCN es fosforilada por una cinasa sensible a rapamicina. b. Cuando no existe esta proteína, se activan AKT, mTORC1 y mTORC2 lo cual conlleva a un crecimiento tumoral incontrolado.....	47
Figura 33. Estructura de un cilio.	50
Figura 34. Mutaciones y variantes del gen FLCN en familias con SBHD.	59
Figura 35. Manejo del paciente con sospecha de síndrome Birt-Hogg-Dubé..	67
Figura 36. Imagen mostrando las principales características de la enfermedad de Cowden. a. Tricolemomas faciales. b y e. Lesiones papilomatosas a nivel oral. c. Queratosis acras. d. Pólipos en tracto gastrointestinal.....	68
Figura 37. Imagen mostrando las principales características de la esclerosis tuberosa. a. Angiofibromas faciales. b. Mácula hipopigmentada. c. Manchas café con leche. d. Placa de piel chagrín. e. Fibroma periungueal.	69
Figura 38. Imagen mostrando las principales características del síndrome Brooke-Spiegler. a. Cilindroma y fibrofoliculoma en cuero cabelludo. b. Imagen	

histológica con hallazgos compatibles de cilindroma. c. Imagen histológica con hallazgos compatibles con fibrofoliculoma.	69
Figura 39. Figura en la que se aprecia las fracciones en las que se divide la sangre total tras el centrifugado.	92
Figura 40. Macrodissección con bisturí en el bloque de parafina	93
Figura 41. A. Curva de medición de la concentración de ADN en una de las muestras. B. Espectrofotómetro Nanodrop-1000. C. Espectro de absorción de ADN y de proteína.	95
Figura 42. Esquema de la PCR.	97
Figura 43. Esquema de funcionamiento del sistema Quiaxcel.....	100
Figura 44. 454 Gs Junior (Roche Diagnostics).....	101
Figura 45. Esquema de la secuenciación masiva..	101
Figura 46. Esquema general de la preparación de la librería.....	102
Figura 47. Estructura de los oligonucleótidos usados en la segunda PCR.	103
Figura 48. Esquema explicativo de la PCR2. A. En el primer paso, se añaden las colas universales. B. Segundo paso, se añaden las secuencias específicas de los adaptadores y las secuencias MIDs.	104
Figura 49. PCR en emulsión (emPCR).	105
Figura 50. Esquema explicativo de la técnica de la pirosecuenciación.	107
Figura 51. Mecanismo de secuenciación con la cámara CCD del equipo (pirosecuenciación).	108
Figura 52. Esquema seguido para considerar una mutación patogénica.	111

Figura 53. Esquema del proceso de metilación.	115
Figura 54. Secuenciación del ADN tras la conversión con bisulfito.	116
Figura 55. Gráfica mostrando la presencia de SBHD por sexo.	121
Figura 56. Gráfica mostrando la presencia de antecedentes familiares.	122
Figura 57. Gráfica mostrando el pulmón afecto de neumotórax en los pacientes con SBHD.	123
Figura 58. Gráfica mostrando el número de neumotórax en los pacientes con afectación pulmonar.	124
Figura 59. Radiografía de tórax observando neumotórax izquierdo en uno de nuestros pacientes.	124
Figura 60. Tomografía axial computarizada en la que se evidencia neumotórax izquierdo en uno de nuestros pacientes.	125
Figura 61. Gráfica mostrando la localización de los quistes pulmonares.	125
Figura 62. Tomografía axial computarizada en la que se evidencian quistes en el pulmón derecho de uno de nuestros pacientes.	126
Figura 63. Tomografía axial computarizada en la que se evidencia quistes en el pulmón izquierdo de uno de nuestros pacientes.	126
Figura 64. Gráfica mostrando la presencia de lesiones cutáneas.	129
Figura 65. Gráfica mostrando la localización de las lesiones cutáneas.	130
Figura 66. Gráfica mostrando la localización de las lesiones cutáneas a nivel facial.	130
Figura 67. Lesiones papulosas en región nasal, perinasal, mejillas y frente de un paciente con SBHD.	131

Figura 68. Clínica cutánea de otro de los pacientes del estudio en el que se evidencian las lesiones en área nasal y perinasal, en región retroauricular y cuello.....	132
Figura 69. Clínica cutánea de otra de las pacientes del estudio.	132
Figura 70. Clínica de las lesiones pediculadas en las axilas de un paciente....	133
Figura 71. Clínica de las lesiones pediculadas en las ingles de un paciente. ..	133
Figura 72. Gráfica mostrando el tipo histológico de las lesiones cutáneas.	134
Figura 73. Imagen histológica de un tricodiscoma de uno de los pacientes. .	134
Figura 74. Imagen histológica de un fibrofolliculoma de uno de los paciente	135
Figura 75. A y B. Imagen histológica de un tricodiscoma con componente estromal pleomórfico.	135
Figura 76. Imagen histológica de un angiofibroma de uno de los pacientes..	136
Figura 77. Gráfica mostrando la presencia de quistes renales.	138
Figura 78. Gráfica mostrando la localización de los quistes renales.	138
Figura 79. Gráfica mostrando la localización de la tinción en el estudio inmunohistoquímico.....	140
Figura 80. A. Inmunotinción citoplasmática de los túbulos renales normales para foliculina. B. Ausencia de inmunotinción en un carcinoma renal de un paciente con SBHD.	141
Figura 81. Fibrofolliculoma. A y B. Inmunotinción predominantemente nucleolar en el componente epitelial. C. Detalle de la inmunotinción.	141
Figura 82. Fibrofolliculoma. A y B. Inmunotinción predominantemente nucleolar en el componente epitelial. C. Detalle de la inmunotinción.	142

Figura 83. A. B. C. D. Inmunotinción para foliculina en las células mesoteliales pleurales de un paciente con neumotórax.....	143
Figura 84. Secuenciación por Sanger en la que se aprecia la mutación en el exón 3.	145
Figura 85. Secuenciación por Sanger en la que se aprecia la mutación en el exón 3.	146
Figura 86. Secuenciación por Sanger en la que se aprecia la mutación en el exón 6.	147
Figura 87. Secuenciación por Sanger en la que se aprecia la mutación en el intrón 6.....	148
Figura 88. Secuenciación por Sanger en la que se aprecia la mutación en el exón 9.	149
Figura 89. Predicción in silico realizada por el programa PolyPhen-2 del efecto funcional de la mutación c.1042T>C.	150
Figura 90. Representación de la estructura de la proteína foliculina.....	150
Figura 91. Secuenciación por Sanger en la que se aprecia la mutación en el exón 9.	151
Figura 92. Secuenciación por Sanger en la que se aprecia la mutación en el intrón 6.....	152
Figura 93. Secuenciación por Sanger en la que se aprecia la mutación en el intrón 12.....	153
Figura 94. Predicción in silico realizada por el programa PolyPhen-2 del efecto funcional de la mutación c.16G>A.	157

Figura 95. Predicción in silico realizada por el programa PolyPhen-2 del efecto funcional de la mutación c.272G>A.....	158
Figura 96. Predicción in silico realizada por el programa PolyPhen-2 del efecto funcional de la mutación c.323G>T.....	159
Figura 97. Predicción in silico realizada por el programa PolyPhen-2 del efecto funcional de la mutación c.346C>T.....	160
Figura 98. Predicción in silico realizada por el programa PolyPhen-2 del efecto funcional de la mutación c.394G>A.....	161
Figura 99. Predicción in silico realizada por el programa PolyPhen-2 del efecto funcional de la mutación c.464C>T.....	162
Figura 100. Representación de la estructura de la foliculina mutada.....	162
Figura 101. Predicción in silico del programa PolyPhen-2 de la mutación c.536G>A.....	163
Figura 102. Representación de la estructura de la foliculina mutada.....	163
Figura 103. Predicción in silico del programa PolyPhen-2 de la mutación c.563T>C.....	164
Figura 104. Predicción in silico del programa PolyPhen-2 de la mutación c.833C>A.....	165
Figura 105. Predicción in silico del programa PolyPhen-2 de la mutación c.1084C>T.....	166
Figura 106. Representación de la estructura de la foliculina mutada.....	167
Figura 107. Predicción in silico realizada por el programa PolyPhen-2 del efecto funcional de la mutación c.1157C>T.....	168

Figura 108. Representación de la estructura de la foliculina mutada.	168
Figura 109. Predicción in silico del programa PolyPhen-2 de la mutación c.1615C>T.	170
Figura 110. Representación de la estructura de la foliculina mutada.	170
Figura 111. Predicción in silico del programa PolyPhen-2 de la mutación c.1630G>A.	171
Figura 112. Representación de la estructura de la foliculina mutada.	171
Figura 113. Predicción in silico realizada por el programa PolyPhen-2 del efecto funcional de la mutación c.1667G>A.	172
Figura 114. Representación de la estructura de la foliculina mutada.	172
Figura 115. Predicción in silico realizada por el programa PolyPhen-2 del efecto funcional de la mutación c.1698G>A.	172
Figura 116. Predicción in silico realizada por el programa PolyPhen-2 del efecto funcional de la mutación c.1700C>T.	174
Figura 117. Predicción in silico realizada por el programa PolyPhen-2 del efecto funcional de la mutación c.1732C>T.	174
Figura 118. Mutaciones encontradas en nuestros pacientes. En gris, las mutaciones germinales. En blanco, las mutaciones somáticas.	175

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. INTRODUCCIÓN

En 1977, tres doctores canadienses, Birt y cols., describieron en una serie de pacientes la presencia de múltiples lesiones papulosas, del color de la piel, de aspecto cupuliforme, localizadas en la cara, cuello y tronco, en asociación con lesiones pediculadas en axilas y párpados superiores (1). Estas lesiones correspondían histológicamente a fibrofoliomas, tricodiscomas y fibromas blandos. Esta asociación se definió como síndrome Birt-Hogg-Dubé, una genodermatosis de herencia autosómica dominante caracterizada por la presencia de lesiones cutáneas características, confirmándose más de 20 años después su asociación a cánceres renales y/o lesiones pulmonares (2). La prevalencia del SBHD es 1/200000. La incidencia se desconoce, aunque se han identificado familias en todo el mundo.

1.2. MANIFESTACIONES CLÍNICAS

1.2.1. Clínica cutánea

A nivel cutáneo, el síndrome Birt-Hogg-Dubé se caracteriza esencialmente por la presencia de fibrofoliomas y/o tricodiscomas que suelen presentarse alrededor de la tercera y cuarta década de la vida, aunque se han descrito casos de aparición más tardía (3). Parece ser que los fibrofoliomas, tricodiscomas y acrocordones descritos clásicamente como la “tríada” característica del síndrome Birt-Hogg-Dubé formarían parte de un mismo espectro histopatológico y clínico, el fibrofolioma. A nivel clínico, estas lesiones son prácticamente indistinguibles y se presentan como múltiples pápulas

blanquecinas o amarillentas, de aspecto cupuliforme, superficie lisa, de escasos milímetros de diámetro localizadas principalmente en la nariz, frente y mejillas, aunque también pueden localizarse en el cuello y el tronco (4) (figura 1-3). Alcanzan un tamaño de 3 a 4mm, permaneciendo estables, pero aumentando en número a medida que avanza la edad del paciente pudiendo ser, con frecuencia, desfigurantes y el motivo de consulta de estos.



Figura 1. Múltiples fibrofolliculomas en nariz y región perinasal. (Menko y cols., 2009) (5)



Figura 2. Múltiples fibrofolliculomas en nariz. (Toro y cols., 1999) (2)



Figura 3. Múltiples fibrofolliculomas retroauriculares. (Kluger y cols. 2010) (6)

Por lo general, suelen presentarse como lesiones múltiples, pero se han descrito casos en los que pueden agruparse en placas o de manera localizada (7) (figuras 4 y 5).



Figura 4. Múltiples fibrofolliculomas agrupados en modo de placa. (Toro y cols., 1999) (2)



Figura 5. Fibrofolliculoma solitario en concha (Choo y cols., 2012) (8)

Aunque los fibrofolliculomas se describen principalmente en asociación con otros hallazgos clínicos, existen casos descritos en la literatura de presentación esporádica sin otra clínica asociada (8–11). En estos casos, la edad de presentación es en torno a mitad de la cuarta década y las lesiones suelen localizarse en la cara y el cuero cabelludo.

A pesar de que las lesiones cutáneas constituyen la clave para el diagnóstico de este síndrome, existen algunos pacientes con diagnóstico confirmado de SBHD que se presentan sin dichas lesiones. Esto podría deberse a que inicialmente estas lesiones pueden ser tan sutiles que en la exploración inicial pueden pasar inadvertidas.

La dermatoscopia se viene utilizando como herramienta diagnóstica de muchas lesiones cutáneas y, en los últimos años, su uso también se ha descrito en las lesiones típicas del SBHD. El patrón encontrado con mayor frecuencia consiste en áreas blanquecinas bien delimitadas con un tapón folicular a nivel central como se evidencia en la figura 6 (12).

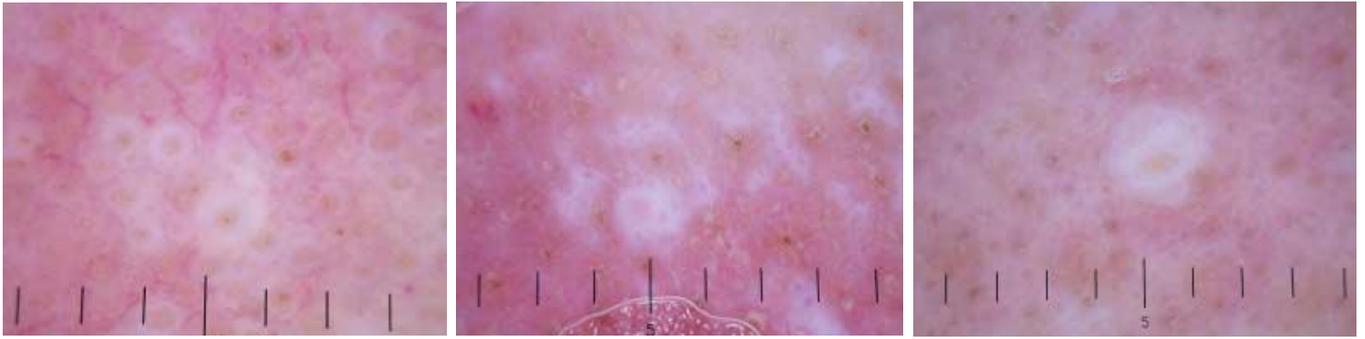


Figura 6. Características dermatoscópicas de un fibrofolliculoma (Jarret y cols. 2009) (12)

Histológicamente, la lesión a tipo fibrofolliculoma es una lesión típicamente vertical o perpendicular a la epidermis, centrada en el folículo piloso. Se caracteriza por la presencia de largas y delgadas proyecciones epiteliales, del tipo del manto folicular, que en ocasiones terminan en glándulas sebáceas maduras, y que están rodeadas por un estroma fibrovascular con variable componente mixoide (figura 7). Las tinciones inmunohistoquímicas muestran positividad para CD34, factor XIIIa, c-kit y CD68, y negatividad para α -SMA.

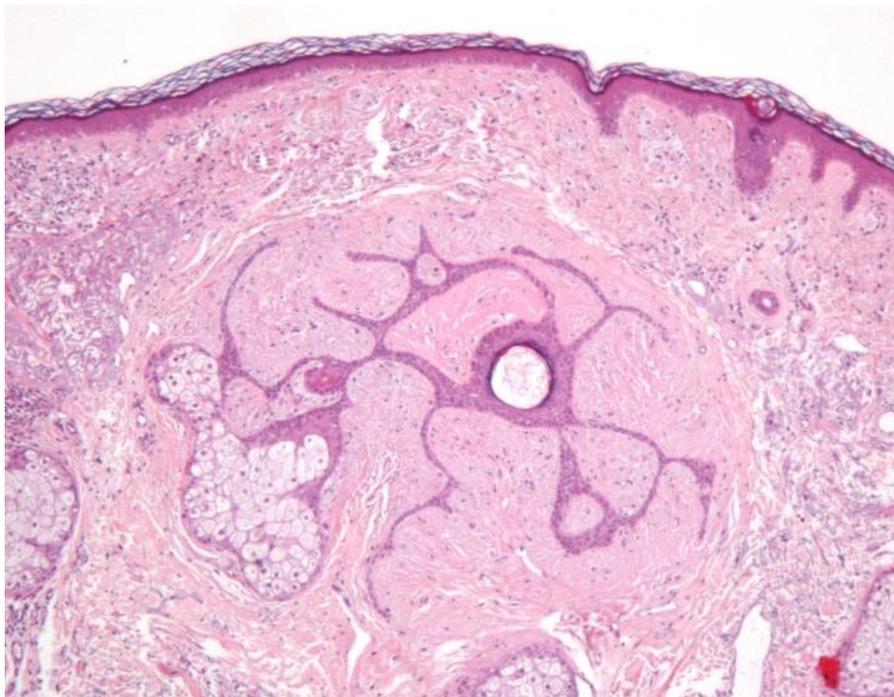


Figura 7. Imagen histológica de un fibrofolliculoma.

A diferencia del anterior, el tricodiscoma es una lesión orientada horizontalmente, es decir, paralela a la epidermis, constituida exclusivamente por un estroma idéntico al fibrofoliculoma, rodeado en la base por unidades folículo-sebáceas simulando dedos de guante (figura 8).

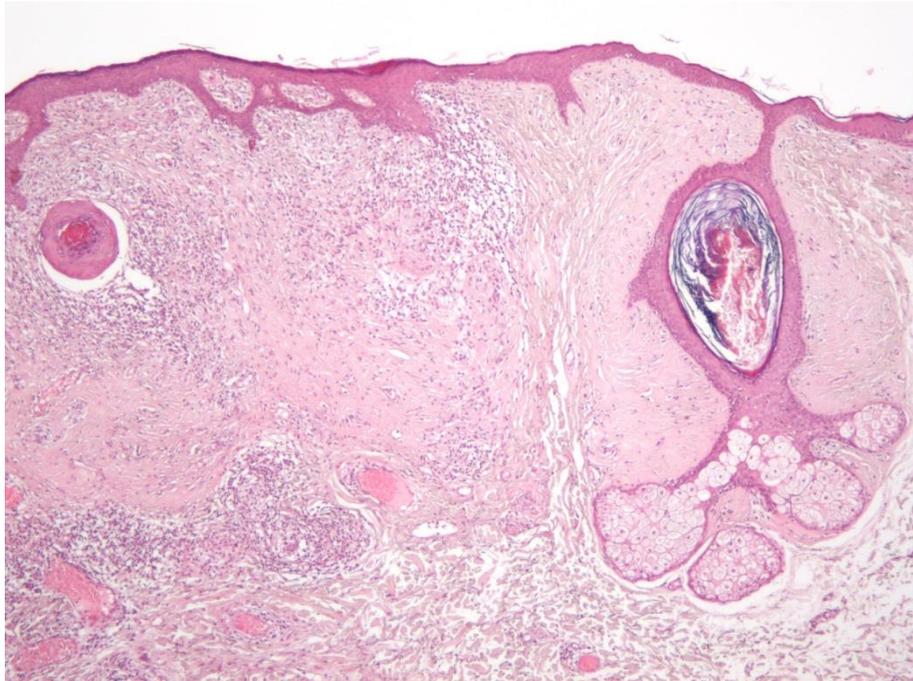


Figura 8. Imagen histológica de un tricodiscoma.

En los artículos originales de tricodiscomas no describen las proyecciones epiteliales típicas del fibrofoliculoma, pero en estos casos, el folículo piloso se encuentra en el margen de la lesión (13). Por ello, para algunos autores ambas lesiones se tratarían de entidades diferentes basándose en los criterios histológicos reseñados por Pinkus y cols. en 1974. Este punto ha sido muy debatido y, así, mientras Schulz y Hartschuh señalan que aunque el tricodiscoma puede compartir algunas características histológicas del fibrofoliculoma, el estroma y los lóbulos sebáceos son más llamativos en el tricodiscoma (14). Otros como Ackerman y cols. mantienen que el fibrofoliculoma y el

tricodiscoma hacen referencia a un único proceso en diferentes estadios de desarrollo, considerándose el tricodiscoma como una forma tardía de fibrofoliculoma (15). Estos autores demuestran que ambas lesiones comparten el mismo componente epitelial y mesenquimal, diferenciándose únicamente por el predominio del componente epitelial en los fibrofoliculomas y el tejido conectivo en los tricodiscomas.

Se han descrito diversas variantes de estas lesiones entre las que se encuentran: tricodiscomas con predominio de células fusiformes, tricodiscomas con metaplasia lipomatosa y células estromales pleomórficas, tricodiscomas con predominio mixoide, tricodiscomas pseudocartilaginosos, tricodiscomas escleróticos, tricodiscomas con prominente componente glandular apocrino y ecrino, tricodiscomas leiomioma-like, tricodiscomas con proliferación vascular o tricodiscomas con la combinación de todos los mencionados anteriormente (16) (figuras 9-16). La diversidad en la presentación de estas lesiones podría deberse a las células a partir de las cuales se originan estas lesiones, el manto. Cuando las células del manto se diferencian hacia los diferentes tumores cutáneos anexiales se observan cordones anastomosados de células epiteliales indiferenciadas, con o sin la presencia de sebocitos maduros a partir del infundíbulo folicular y formando un patrón fenestrado rodeando al estroma fibroso o mucinoso. Se cree que los fibrofoliculomas son aquellas lesiones en las que predominan las células del manto indiferenciadas mientras que los tricodiscomas representarían aquellas lesiones en las que las células del manto se han diferenciado hacia estructuras sebáceas y ductos (16).

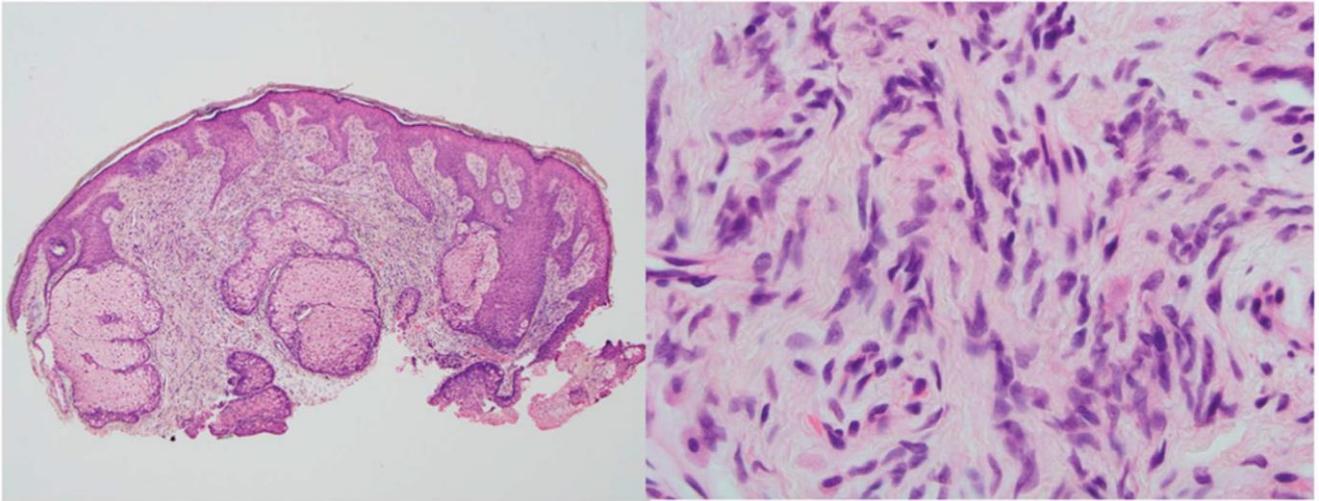


Figura 9. Imagen histológica de un tricodiscoma con predominio de células fusiformes. (H&E x20, x400). López-García y cols., 2014. (16)

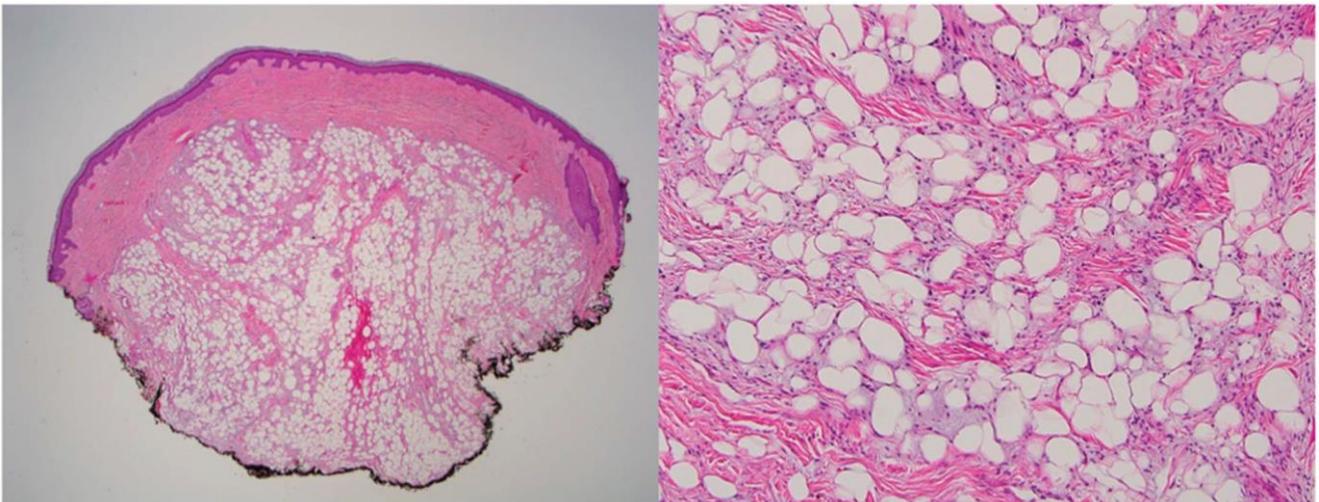


Figura 10. Imagen histológica de un tricodiscoma con predominio de rasgos lipomatosos. (H&E x40, x100). López-García y cols., 2014. (16)

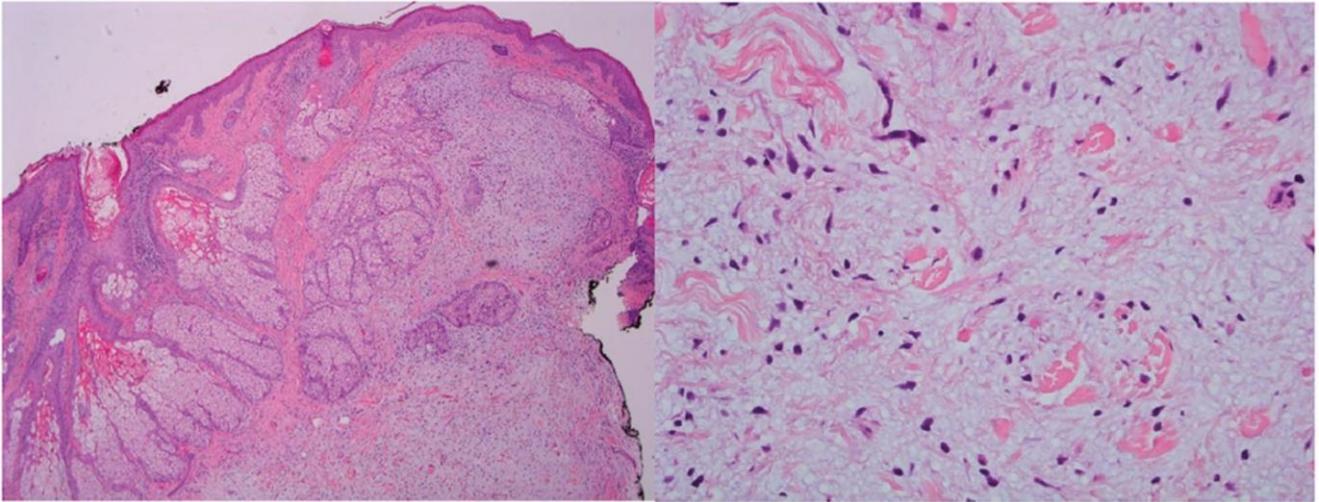


Figura 11. Imagen histológica de un tricodiscoma con predominio de rasgos mixoide. (H&E x40, x400). López-García y cols., 2014. (16)

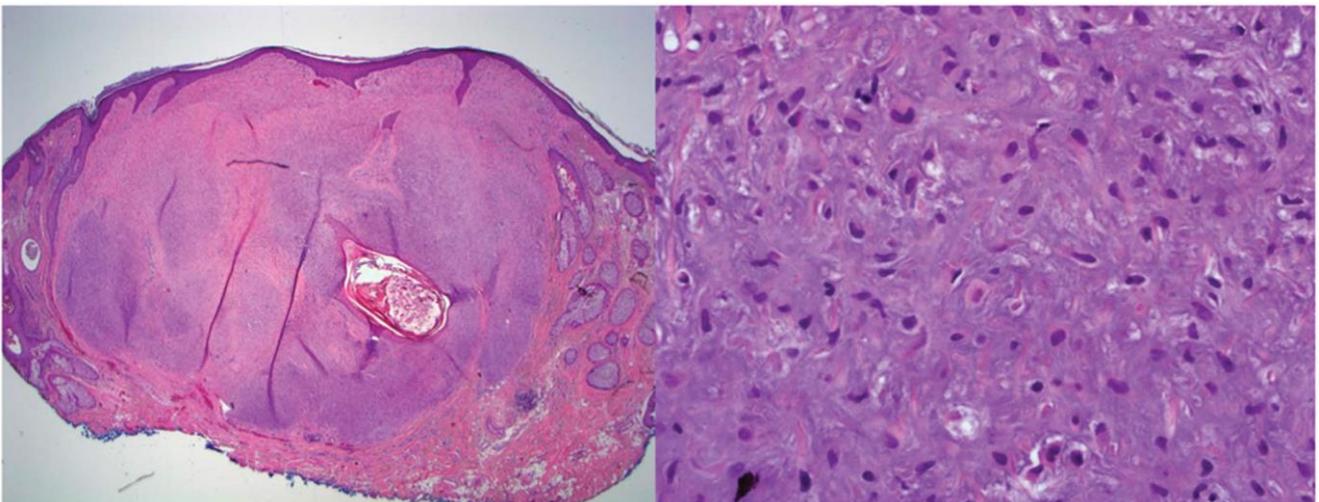


Figura 12. Imagen histológica de un tricodiscoma pseudocartilaginoso. (H&E x20, x400). López-García y cols., 2014. (16)

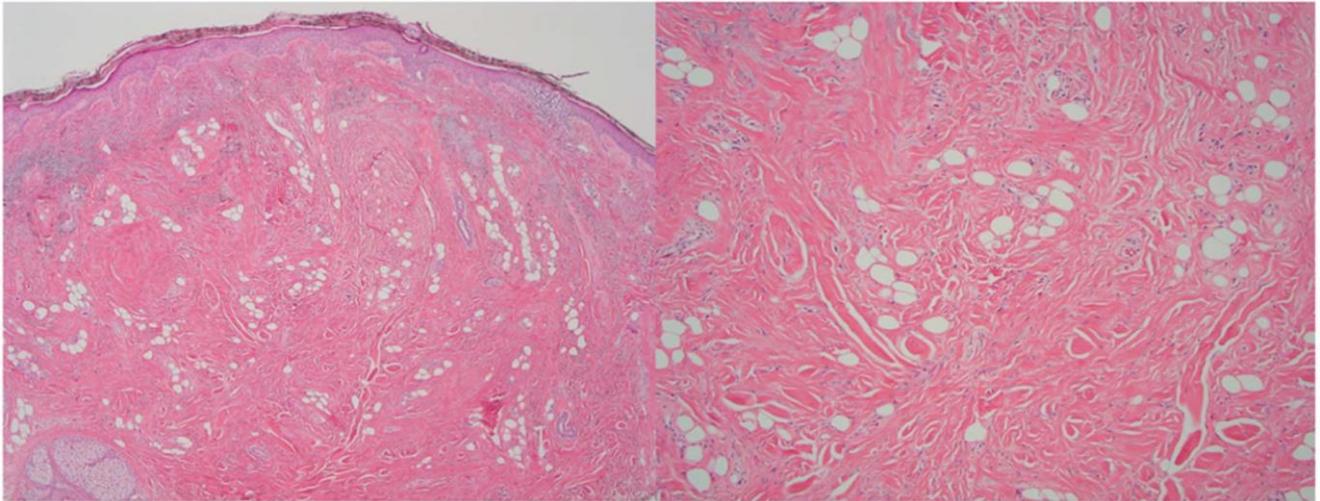


Figura 13. Imagen histológica de un tricodiscoma esclerótico. (H&E x20, x400). López-García y cols., 2014. (16)

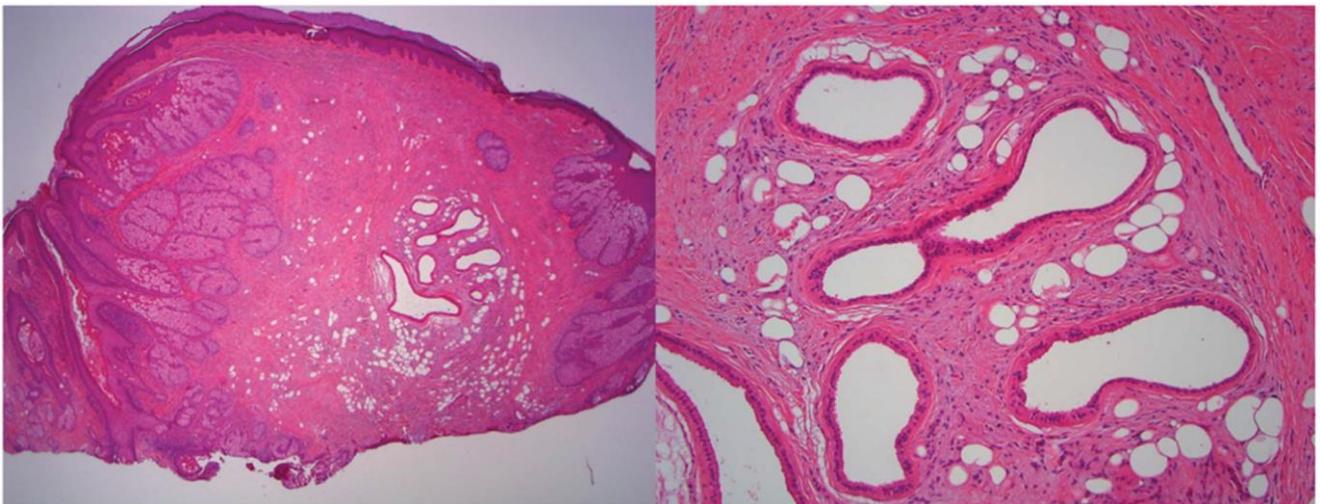


Figura 14. Imagen histológica de un tricodiscoma con componente glandular apocrino. (H&E x20, x100). López-García y cols., 2014. (16)

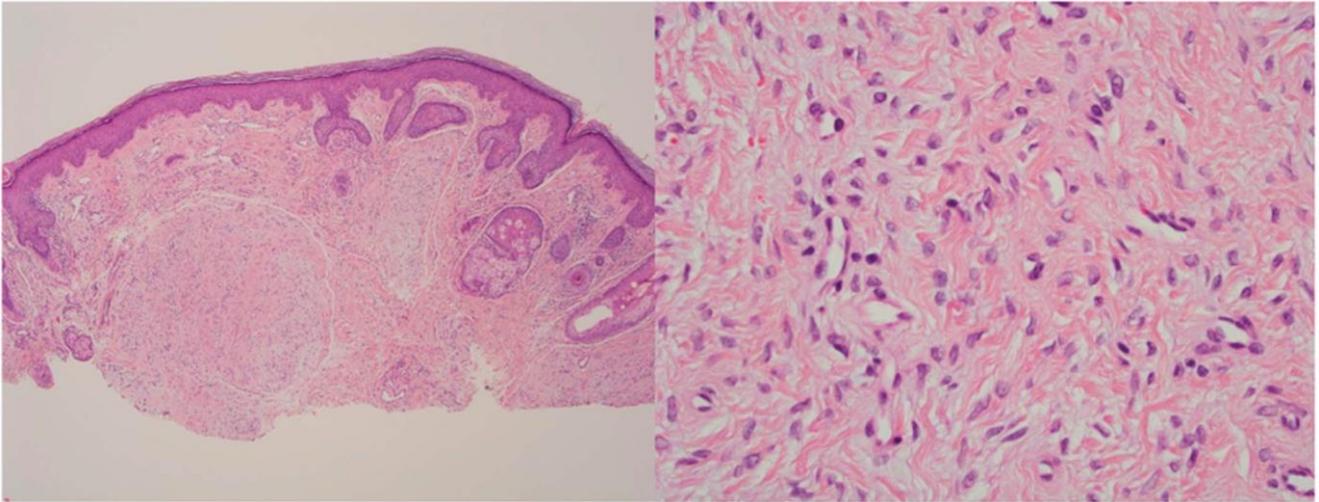


Figura 15. Imagen histológica de un tricodiscoma simulando un angioleiomioma. (H&E x40, x400). López-García y cols., 2014. (16)

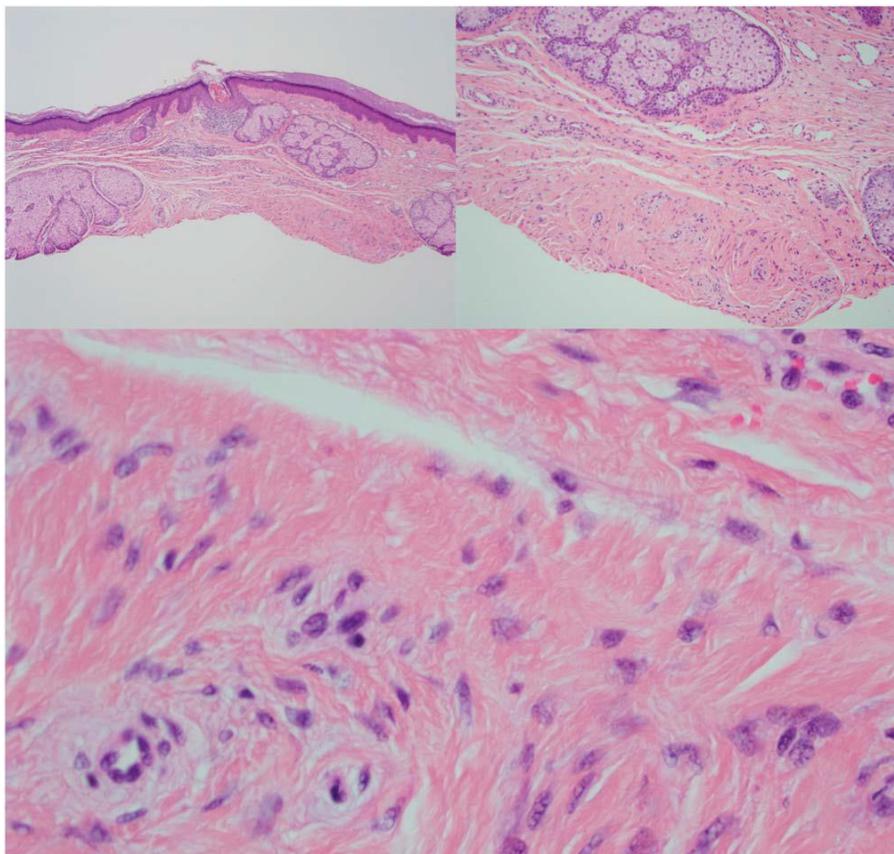


Figura 16. Imagen histológica de un tricodiscoma con proliferación vascular. (H&E x40, x100, x400). López-García y cols., 2014. (16)

Los acrocordones son las lesiones más sencillas de diagnosticar. La gran mayoría de los dermatólogos no suelen biopsiar las lesiones pediculadas y el diagnóstico es directamente clínico. Sin embargo, hay que tener en cuenta que los fibrofoliculomas pueden presentarse pediculados a modo de acrocordón (figura 17).



Figura 17. Imagen clínica de las lesiones pediculadas en un paciente con SBHD.

De hecho, en el artículo original de Birt y cols. una de las lesiones que parecía clínicamente un acrocordón fue confirmada histológicamente de fibrofoliculoma (1). Con posterioridad, otros autores han confirmado este hallazgo (17,18). Así, de la Torre y cols. describen 2 pacientes con SBHD y acrocordones en los que el estudio histológico demuestra unas características histológicas similares a las encontradas en los fibrofoliculomas y tricodiscomas (17).

Estos hallazgos sugieren que las tres lesiones (fibrofolliculomas, tricodiscomas y acrocordones) constituyen variantes de una entidad común. Así, aunque no es necesario biopsiar todas las lesiones pediculadas en pacientes con SBHD, debido a la alta prevalencia de verdaderos acrocordones en la población normal, hay que tener en cuenta que las lesiones cutáneas que se presentan a modo de acrocordón, en realidad, pueden resultar ser una variante fenotípica del fibrofolliculoma característico del síndrome.

Vernooij y cols encuentran que la mayor parte de las bandas epiteliales que forman típicamente un fibrofolliculoma se entremezclan con glándulas sebáceas (19). Estas glándulas expresan FLCN. En ratones, se ha visto que la pérdida de los cilios epidérmicos produce una hiperproliferación epidérmica y una diferenciación sebácea de los folículos sebáceos (20). Los fibrofolliculomas del SBHD reflejarían, según estos autores, un crecimiento anormal y una diferenciación similar a la observada en los mantleomas, posiblemente secundaria a una disfunción ciliar en las células madre o progenitoras de las glándulas sebáceas (19). Este origen del manto podría explicar porque los fibrofolliculomas se localizan preferentemente en zonas ricas en glándulas sebáceas como la nariz o la región perinasal. En los fibrofolliculomas observados en el SBHD, los fibroblastos producen factores de crecimiento que desencadenan la formación de estos tumores (19). Se ha encontrado un aumento en la actividad de la vía WNT en las bandas epiteliales de los fibrofolliculomas. Las WNTs son glicoproteínas secretadas que están implicadas en determinar el destino final de las células madre epidérmicas (21). Se ha observado una alteración en la señalización de la WNT en los tumores sebáceos, viéndose un incremento en dicha actividad con un aumento de la B-catenina citoplasmática y nuclear (22). Esta vía que podría actuar de manera pro-oncogénica podría ser una diana interesante para futuros tratamientos.

Junto a estas lesiones clásicas del síndrome, se ha descrito ocasionalmente la presencia de múltiples angiofibromas faciales y la afectación de la mucosa oral a modo de múltiples pápulas en los labios, mucosa yugal y gingival (6,23) (figs. 18 y 19); así como dos tipos de collagenomas: papular atrófico y en gran placa (2).

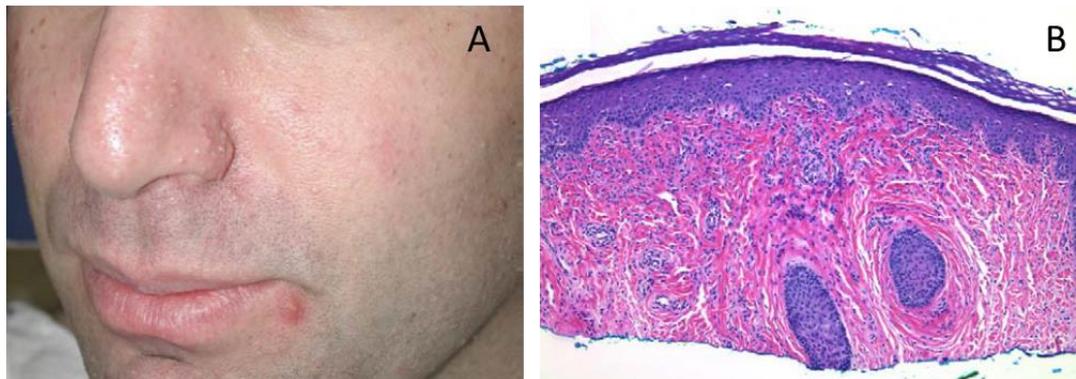


Figura 18. A. Angiofibromas perinasales en un paciente con SBHD. B. Imagen histológica de un angiofibroma (Schaffer y cols. 2005) (23)



Figura 19. Lesiones en mucosa oral compatibles histológicamente con fibrofolliculomas (Kluger y cols., 2010) (6)

Se ha observado que los fibrofolliculomas y los tricodiscomas del síndrome Birt-Hogg-Dubé y los angiofibromas del complejo esclerosis tuberosa presentan rasgos comunes. Histológicamente, la presencia de un estroma con haces de colágeno más gruesos, junto a fibroblastos estrellados, así como la ausencia del

componente epitelial, son útiles para diferenciar los angiofibromas de los fibrofolliculomas. La inmunorreactividad para CK15, CD34 y el factor XIIIa no es muy útil ya que pueden estar presentes en los dos tipos de lesiones. En el síndrome Birt-Hogg-Dubé, una mutación en el gen FLCN provocaría el desarrollo de múltiples fibrofolliculomas y tricodiscomas; mientras que en el complejo esclerosis tuberosa sería la alteración en los genes TS-1 y TS-2 la causante de la aparición de los angiofibromas. Recientes investigaciones ponen de manifiesto que ambas proteínas podrían formar parte de una misma vía, la mTOR, a través de la cual se desarrollarían las lesiones cutáneas características de dichos síndromes (24). De hecho, se ha descrito excepcionalmente la presencia de fibrofolliculomas en pacientes con esclerosis tuberosa, y de angiofibromas en pacientes con síndrome Birt-Hogg-Dubé (23,25). Además, tanto los pacientes con síndrome Birt-Hogg-Dubé como con esclerosis tuberosa, pueden presentar patología pulmonar y renal. Estas similitudes en la clínica y la existencia de características histológicas comunes en las lesiones cutáneas, refuerzan la idea de que las alteraciones genéticas se produzcan en una vía común. De hecho, en un estudio realizado sobre *Schizosaccharomyces pombe*, un hongo unicelular eucariota, se observó que una inhibición inapropiada de la vía mTOR o una activación inapropiada en esta misma vía serían las responsables de producir los tumores renales, cutáneos y la clínica pulmonar característica del síndrome Birt-Hogg-Dubé y de la esclerosis tuberosa, respectivamente (26). Sin embargo, la asociación con la vía mTOR no está clara. Algunos autores encuentran un incremento en la actividad en tumores renales tanto benignos como malignos, mientras que otros encuentran un descenso. El hecho de que el tratamiento con rapamicina tópica en los angiofibromas faciales de pacientes con esclerosis tuberosa haya sido eficaz, haría pensar, dada la similitud de los angiofibromas con los fibrofolliculomas, que este tratamiento pudiera ser eficaz también en estos últimos, aunque los resultados obtenidos hasta la fecha son desalentadores (27).

1.2.2. Clínica renal

El carcinoma renal es un tumor que comprende varios subtipos histológicos: carcinoma de células claras, papilar (tipo I y II), cromóforo, oncocitoma y carcinoma renal de ductos colectores (figura 20). La variante más común es el carcinoma de células claras (75%), asociado a mutaciones en el gen von Hippel-Lindau y a la pérdida de heterocigosidad en el cromosoma 3p. El siguiente en frecuencia, el carcinoma papilar (10%) se asocia a trisomías del cromosoma 7 y 17 y pérdida del cromosoma Y. El carcinoma cromóforo es más raro (5%) y se ha asociado a numerosas pérdidas cromosómicas. Se caracteriza por la mezcla de tres tipos celulares: células pequeñas con citoplasma granular (tipo I), células con gran citoplasma granular eosinófilo y un halo claro perinuclear (tipo II), y células poligonales con citoplasma claro (tipo III) dispuestas con una distribución en sábana. Se caracterizan por su positividad para CK7, c-kit, y hierro coloidal, su positividad parcialmente positiva para CD10, y la negatividad para vimentina. El oncocitoma es menos frecuente (2-5%) y se caracteriza por células grandes, con bordes pobremente definidos, con abundante citoplasma granular eosinofílico y gran núcleo. El oncocitoma y el carcinoma renal cromóforo parecen originarse de los túbulos colectores renales; mientras que el carcinoma de células claras se originaría del epitelio de los túbulos proximales.

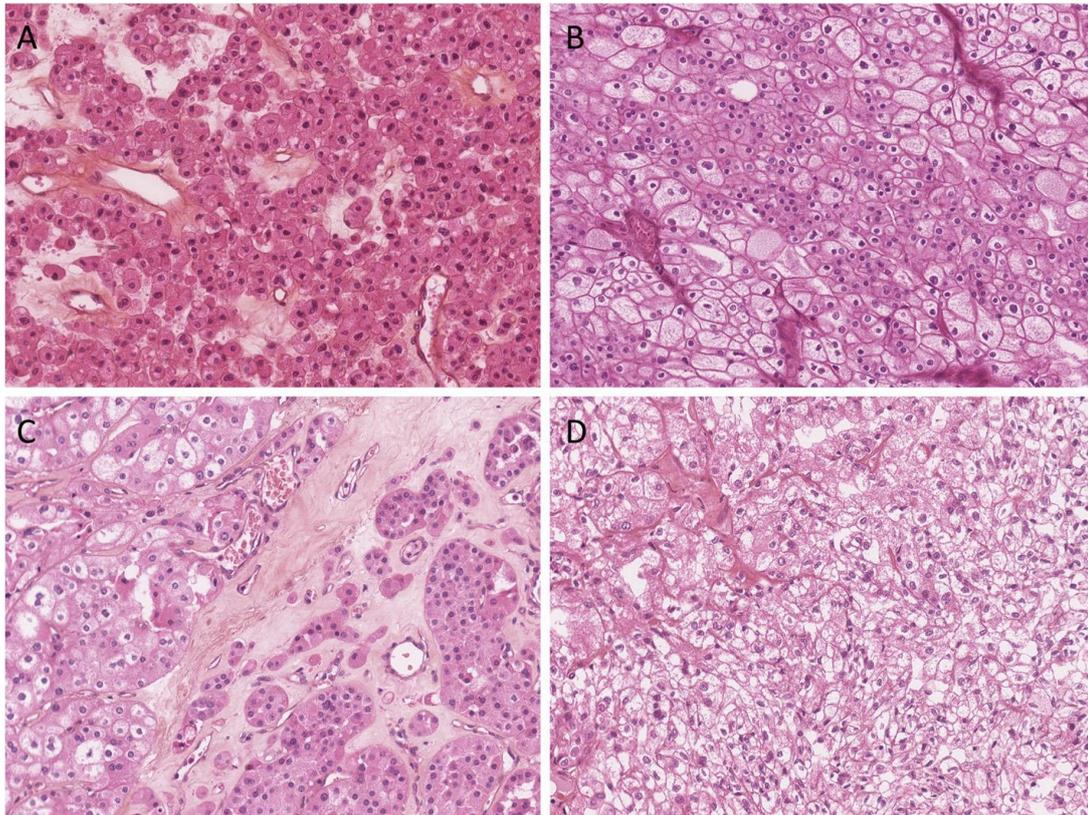


Figura 20. Principales cánceres renales en pacientes con SBHD: oncocitoma (A), carcinoma cromóforo (B), híbrido (C) y de células claras (D). (Benusiglio y cols., 2014) (28)

Aunque la mayor parte de ellos se presentan de manera esporádica; entre un 1 y un 4% de los casos se han asociado a síndromes hereditarios, como la esclerosis tuberosa, la enfermedad von Hippel-Lindau, el carcinoma renal papilar hereditario, el oncocitoma renal familiar, síndromes Beckwith-Wiedemann asociados con el tumor de Wilms, y, recientemente, el síndrome Birt-Hogg-Dubé (29–31).

Los tumores cromófobos son uno de los tumores que con mayor frecuencia se asocian al síndrome Birt-Hogg-Dubé, por ello, se piensa que el gen FLCN podría desempeñar un papel importante a nivel de la nefrona distal (30). La aparición del carcinoma de células claras podría explicarse por el papel oncogénico del gen FLCN en los túbulos proximales y distales o bien por la progresión de carcinoma cromóforo o híbrido a carcinoma de células claras a través de

diferentes mutaciones. Todos estos tipos histológicos pueden desarrollarse en un riñón de un paciente con SBHD, sugiriendo que una única mutación en el gen FLCN podría afectar a las células progenitoras tanto de los túbulos renales proximales como distales. Estas mutaciones podrían alterar la composición de la matriz extracelular, produciendo una alteración microambiental que conllevaría a la proliferación incontrolada de las células (4).

En las publicaciones iniciales, Hornstein y Knickenberg, así como Birt y cols. no reconocen las lesiones extracutáneas como parte del síndrome Birt-Hogg-Dubé. Sin embargo, en el año 1993, casi 20 años tras la descripción inicial de este síndrome, Roth y cols. describen por primera vez la asociación a carcinomas renales bilaterales en un varón de 61 años con SBHD (1,32,33). Con posterioridad, Toro y cols. describieron el síndrome Birt-Hogg-Dubé como un marcador de neoplasia renal (2) y, en los últimos años, se ha confirmado que estos pacientes presentan un mayor riesgo de desarrollar neoplasias renales así como neumotórax espontáneos (6,29–31,34–37).

Pavlovich y cols. estudian 130 casos de neoplasias renales de 30 pacientes con SBHD, 25 hombres y 5 mujeres, con una edad media de aparición del primer tumor renal de 50.7 años, siendo el 60% de los casos de presentación bilateral y el 77% múltiples. En cuanto a los subtipos histológicos, encontraron formas híbridas de oncocitoma y carcinoma cromóforo, carcinoma cromóforo, carcinoma de células claras, oncocitoma y carcinoma papilar en un 50, 34, 9, 5 y 2%, respectivamente (30). El tamaño de los tumores incrementaba a medida que aumentaba el potencial maligno del tumor. Tras esta publicación, se han ido añadiendo nuevos estudios que confirman este hecho (6,23,29,31,35,36). Así, se ha observado que los pacientes con síndrome Birt-Hogg-Dubé presentan un riesgo 7 veces superior de desarrollar neoplasias renales, con una predilección por el sexo masculino y una edad de presentación comprendida entre los 20-55 años (6).

A diferencia de lo que ocurre en el resto de síndromes asociados a carcinoma renal, en el síndrome Birt-Hogg-Dubé la presentación de las lesiones renales suele ser bilateral y multifocal, con una edad de aparición más temprana y con unos determinados tipos histológicos entre los que se incluirían cinco: formas híbridas de oncocitoma y carcinoma cromóforo (50%); o bien formas puras de carcinoma cromóforo (34%), oncocitoma (5%), de células claras (3%) o papilar (2%) (6) (figura 21).

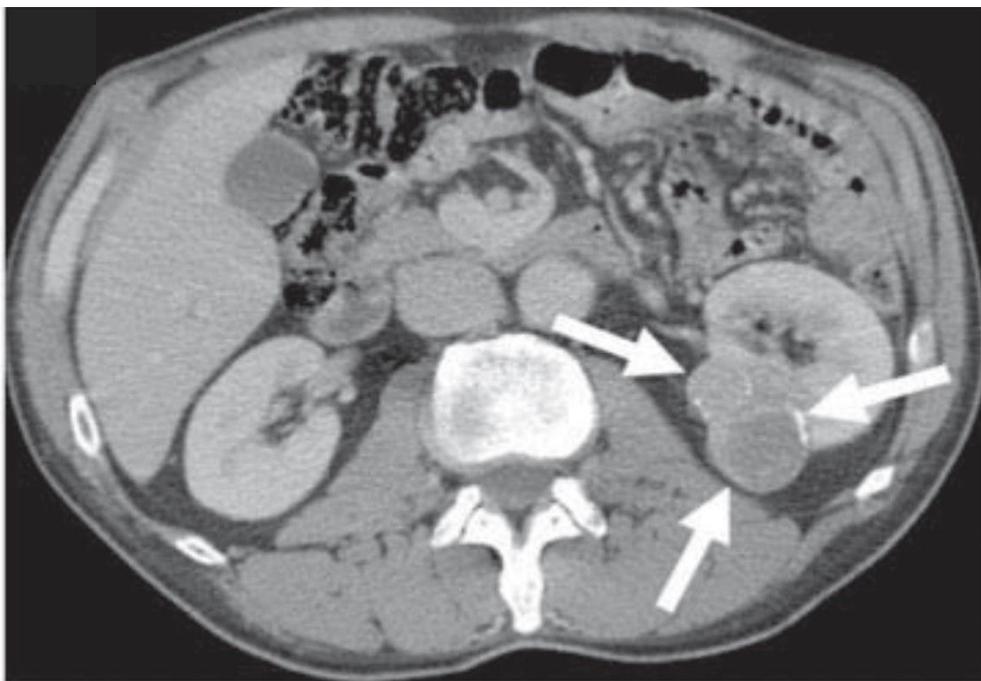


Figura 21. Tomografía axial computarizada en la que se aprecia el carcinoma renal izquierdo en un paciente con SBHD (Stavrakoglou y cols., 2010) (38)

Se ha visto que los pacientes con SBHD presentan pequeños nidos de células que asemejan a las encontradas en los tumores híbridos, fenómeno conocido como oncocitosis renal. Este hallazgo sugiere que prácticamente la totalidad del parénquima renal estaría afectado en los pacientes con SBHD y que una segunda mutación somática en la copia del alelo no afecto por la mutación germinal podría contribuir a la progresión de la oncocitosis renal al cáncer renal

(34). La prevalencia de tumores renales en pacientes con mutación en línea germinal del gen FLCN varía según los estudios, de un 6,5% a un 34% (39). En cuanto al riesgo de metástasis, hasta la fecha, tan sólo se han descrito 5 casos de cánceres renales con metástasis a distancia, siendo el pronóstico similar a los carcinomas renales que se presentan de manera esporádica (39). Vocke y cols. estudian 77 muestras renales de 12 pacientes con SBHD y encuentran que el 70% de los tumores presentan bien una mutación somática en el alelo no afecto por la mutación germinal (53%) o bien pérdida de heterocigosidad (17%), siendo necesaria la inactivación de las dos copias del gen para el desarrollo del cáncer renal. De las mutaciones somáticas encontradas el 75% correspondían a mutaciones “frameshift” y el 8% “nonsense” (34). Estos autores observaron que un mismo paciente puede presentar múltiples tumores renales con diferentes subtipos histológicos y cada uno de ellos puede presentar mutaciones somáticas o pérdida de heterocigosidad diversas. Gatalica y cols. describen el caso de un varón de 64 años con lesiones cutáneas en párpados compatibles con acrocordones y un tumor renal derecho en el que el estudio histológico mostró la presencia de varios subtipos histológicos (oncocitoma, carcinoma de células claras y carcinoma papilar renal tipo II). El estudio genético mostró mutación en línea germinal en el intrón 9 y mutaciones somáticas adicionales diferentes en cada uno de los subtipos histológicos (40). Este hecho sugiere que cada tumor se genera de manera independiente a partir de una segunda mutación del gen FLCN. En el resto de tumores, bien la hipermetilación o mutaciones en regiones reguladoras del gen FLCN podrían explicar la inactivación del gen FLCN y el subsecuente desarrollo del tumor renal. Hasta la fecha, no existe ninguna relación entre la localización de la mutación en línea germinal y el desarrollo de la segunda mutación (30). Por ello, debe sospecharse que podemos estar ante un caso de SBHD cuando encontremos varios tipos histológicos en la nefrectomía de un paciente.

En resumen, la presencia de tumores bilaterales, multifocales, con discordancia en los subtipos histológicos, así como la presencia, en la histología, de pequeños grupos papilares intratumorales en la periferia de la lesión pueden ser pistas para identificar aquellos tumores renales asociados al SBHD.

1.2.3. Clínica pulmonar

La primera asociación entre el SBHD y la presencia de quistes pulmonares fue en 1999 gracias a Toro y cols. (2). Con posterioridad, otros autores han demostrado esta asociación (6,35,36,41,42).

Un neumotórax espontáneo se produce como consecuencia de la rotura de bullas pulmonares. La etiología de estas bullas es desconocida, y se considera que podría representar un subtipo de enfisema, conocido como enfisema acinar distal o enfisema paraseptal. La incidencia de neumotórax espontáneo se estima de 7.4-18/100000 y de 1.2-6/100000 al año en varones y mujeres, respectivamente. Los neumotórax espontáneos pueden ocurrir en pacientes con determinados síndromes sistémicos, como linfangioleiomiomatosis, endometriosis, déficit de α -antitripsina o el síndrome de Marfan, entre otros. Sin embargo, se han descrito casos de familias que se presentan con neumotórax espontáneo en los que no se evidencia clínica de los síndromes anteriormente especificados (43). La localización de las bullas es característica. En general, los neumotórax espontáneos están asociados a la presencia de bullas subpleurales apicales, probablemente producidos por el incremento de presión al que se ve sometido el ápice del pulmón derecho, que podría explicar el por qué los neumotórax aparecen con mayor frecuencia en varones altos y delgados (44,45). La distribución de los quistes pulmonares en regiones extra apicales del pulmón, sobre todo en regiones medias y subpleurales, así como la

afectación bilateral debe hacernos sospechar el diagnóstico de SBHD. La localización predominantemente subpleural de los quistes y bullas sugieren que la foliculina podría tener un papel en el desarrollo de la periferia del pulmón. Se ha visto expresión de mRNA de FLCN en el tejido conectivo, los neumocitos de tipo 1 y los macrófagos alveolares en pulmón sano y en pulmón de pacientes con SBHD (46). En modelos animales, se ha observado que la proliferación alveolar posnatal se produce preferentemente en la periferia del pulmón. Por ello, podría ser que estas bullas pulmonares de localización más externa aparezcan si el proceso de crecimiento pulmonar se ve alterado (47).

Hasta un 80% de los pacientes con síndrome Birt-Hogg-Dubé presentan quistes pulmonares, sin evidencia de neoplasia, inflamación o fibrosis, que pueden ser asintomáticos durante años (6,41,42,48). El número y tamaño de las lesiones varía de un paciente a otro, oscilando desde quistes de pequeño tamaño a bullas de varios centímetros, con una morfología irregular y localizados sobre todo en las bases pulmonares y a nivel subpleural (41,42). Radiográficamente, de un 14% a un 88% tienen quistes pulmonares o bullas (2,36,49) (figura 22).



Figura 22. Tomografía axial computarizada en la que se evidencian los múltiples quistes en el pulmón derecho.

La ruptura de estos y el colapso pulmonar causan la aparición de neumotórax espontáneos y recurrentes. Se ha visto una relación entre el tamaño y volumen de los quistes y el riesgo de desarrollar neumotórax. Así, cuanto mayor volumen ocupan, mayor es el riesgo de desarrollarlo. La edad media de presentación es de 38 años. Sin embargo, de las tres manifestaciones del SBHD, la afectación pulmonar podría ser la primera en encontrarse ya que se han descrito casos de aparición a edades tan tempranas como los 7 años de edad, y en ocasiones siendo la única manifestación (37,50,51). La predilección por sexo no está clara. Algunos estudios señalan el sexo masculino como un factor de riesgo de neumotórax espontáneo (52), mientras que en otros no existe tal diferencia (41). Entre los pacientes que presentan quistes pulmonares, aproximadamente un 20-30% presentan historia de neumotórax, siendo el número medio de dos episodios (41). Además, cuando se estudian los pacientes con historia de neumotórax, la gran mayoría presentan quistes pulmonares múltiples. El pulmón más afectado suele ser el derecho, aunque pueden afectarse ambos hasta en un 23% de los casos (41) (figura 23). En pacientes con síndrome Birt-Hogg-Dubé el riesgo de desarrollar neumotórax es 50 veces superior al de la población normal (6). Zbar y cols. señalan un riesgo de desarrollar neumotórax espontáneo 32 veces superior a la población normal (36). La mutación más frecuente en pacientes con historia de neumotórax y/o lesiones pulmonares y síndrome Birt-Hogg-Dubé es la c.1733ins/delC localizada en el exón 11 (41). Se ha visto que determinadas mutaciones confieren un incremento en el riesgo de desarrollar lesiones quísticas de mayor tamaño y en mayor número. Así, los pacientes con mutaciones en el exón 9 presentan un riesgo de desarrollar mayor número de quistes y aquellos con mutaciones en el exón 9 y 12 quistes de mayores dimensiones (53). Al contrario, de lo que ocurre a nivel renal o cutáneo, en el pulmón no se ha descrito el desarrollo de tumoraciones ni el crecimiento anormal de las células sino que lo característico es la formación de lesiones quísticas tanto a nivel radiológico como en el estudio histológico. En las

lesiones pulmonares, la haploinsuficiencia podría ser suficiente para su desarrollo, y la inactivación bialélica podría no ser tan necesaria como en el desarrollo del carcinoma renal (41).



Figura 23. Tomografía axial computarizada en la que se evidencia neumotórax en el pulmón izquierdo.

Existen unos rasgos microscópicos a nivel pulmonar que junto con los hallazgos radiológicos orientan al diagnóstico de SBHD. Histológicamente, los quistes pulmonares se caracterizan por una dilatación quística de los espacios alveolares de tamaño variable en la pleura visceral, el septo interlobular o el paquete broncovascular. Las paredes de estos quistes están tapizadas por un epitelio cuboidal, sin encontrar tejido fibroso ni muscular en su pared. Las células epiteliales que forman estos quistes tienen una apariencia benigna, aunque contienen células neumocitos-like tipo II que muestran positividad para PCNA y p-S6. Las células que cubren la parte interna de los quistes se tiñen positivamente para la proteína surfactante A, la proteína prosurfactante C y el factor de transcripción tiroideo 1. Además, se tiñen positivamente para FLCN

(48) (Figura 24). Estos hallazgos sugieren que la haploinsuficiencia de FLCN y una activación sutil de mTORC1 serían suficiente para el desarrollo de estas lesiones.

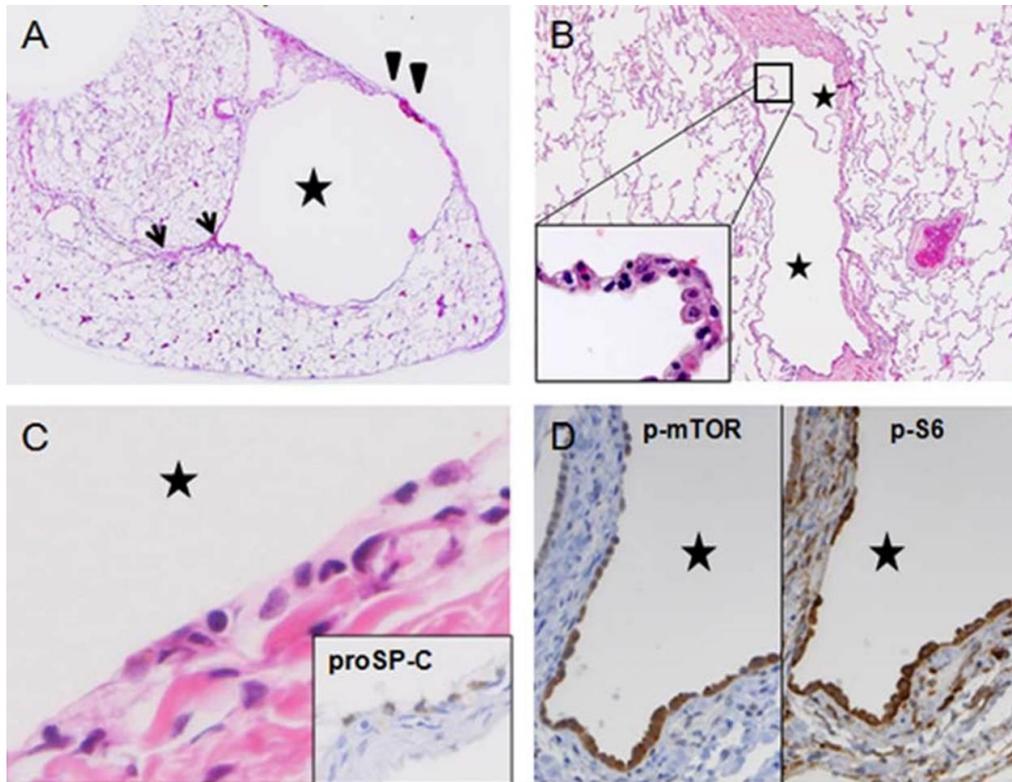


Figura 24. Rasgos histológicos del pulmón afecto de un paciente con SBHD en el que se aprecia (A y B) una dilatación quística en la pleura visceral (punta de flecha) y septo interlobular (flecha), (C) con células epiteliales de apariencia benigna que se tiñen para prosurfactante C y (D) m-TOR y S6. Modificada de Furuya y cols., 2013. (54)

Kunusaka y cols analizan una serie de 229 quistes pulmonares de 50 pacientes (79 en varones y 150 en mujeres) con una edad media de presentación de 38.5 años, oscilando de 24 a 66 años. Las características histológicas de los quistes pulmonares de los pacientes afectados de SBHD mostraron unas diferencias estadísticamente significativas: estaban presentes tanto en las áreas subpleurales como intrapulmonares; se localizaban próximos al septo interlobular, con vénulas protruyendo en el quiste, y ocasionalmente

acompañados de septos intraquísticos, sugiriendo el desarrollo periacinar de los quistes en un lóbulo primario y la desaparición de la pared alveolar adyacente y/o regresión del tejido conectivo del septo interlobular; generalmente no presentaban ningún signo inflamatorio, especialmente aquellos en áreas intrapulmonares. El tamaño máximo de estos oscilaba de 1 a 15.7mm (mediana: 3.8mm). El número disminuía a medida que el tamaño máximo de los quistes aumentaba y el grado de inflamación encontrada incrementaba a medida que el tamaño máximo de ellos aumentaba. No encontraron diferencias en el tamaño de los quistes por sexo ni por consumo de tabaco (41).

Las lesiones quísticas que aparecen en este síndrome podrían deberse muy probablemente a un crecimiento lento de quistes hamartomatosos. Los quistes de pequeño tamaño pueden presentarse de manera silente; mientras que un crecimiento incontrolado de estos y la subsecuente expansión provocarían la rotura de estos y el desarrollo de los neumotórax de repetición, tan característicos del SBHD. Se localizan lejos de los bronquiolos, por lo que la asociación a una alteración del mecanismo valvular que explica el desarrollo de neumotórax espontáneo esporádico o el que aparece secundario al tabaco, en el síndrome de Sjögren y otras enfermedades quísticas pulmonares es menos probable (41). El mecanismo por el cual aparecen los quistes vendría justificado por varios autores. Graham y cols. sugieren que una alteración genética sería responsable de la proliferación alveolar postnatal del pulmón periférico (43). Por otro lado, Warren y cols. encontraron expresión de FLCN en los neumocitos tipo I y en células estromales, incluyendo fibroblastos y macrófagos del pulmón, y, por lo tanto sugieren el papel de estas células en el desarrollo de las lesiones quísticas (46). Furuya y cols. sugieren que la disregulación en la vía mTOR resultante de la haploinsuficiencia de FLCN podría provocar el desarrollo de estos quistes secundario a la proliferación de los neumocitos tipo II (48) (figura 25). Kumasaka y cols. postulan que mutaciones en FLCN provocan anomalías en

las uniones del septo alveolar (41). Varios artículos hacen mención a la regulación de la foliculina en la vía de señalización de TGF- β , especialmente TGF- β 2 (55). Esta proteína está implicada en las interacciones entre el epitelio y el mesénquima, el crecimiento celular, la producción de proteínas de matriz extracelular, y el remodelado tisular durante el desarrollo o la homeostasis de la matriz subepitelial (56–58). La presencia de mRNA de FLCN en el tejido conectivo y en los neumocitos tipo I del pulmón indica que la foliculina podría participar en el mantenimiento de la homeostasis de las paredes alveolares a través del tejido conectivo y los neumocitos tipo I (46). Estos autores analizaron los fibroblastos pulmonares de pacientes con SBHD y encontraron disminución en su migración, así como en la expresión fibroblástica de TGF- β y en el número de proteínas de matriz extracelular (41). Esto podría provocar una disrupción en la homeostasis alveolar que conllevaría a una mayor vulnerabilidad a las fuerzas mecánicas que aparecen durante los ciclos respiratorios con el desarrollo de los quistes. Sin embargo, se requiere una serie más amplia para poder explicar de una manera más detallada la fisiopatología de estas lesiones.

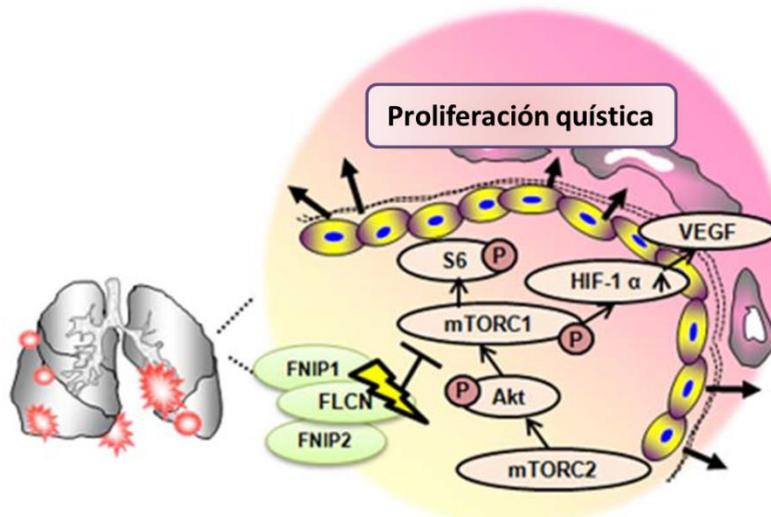


Figura 25. Hipótesis sugerida para el desarrollo de quistes pulmonares en la que una insuficiencia en la foliculina conllevaría a la activación de la vía mTOR y a un aumento en la producción de moléculas, como p-S6 y VEGF. Modificada de Furuya y cols., 2013. (54)

Junto a estos hallazgos microscópicos, existen unos hallazgos en las pruebas de imagen que orientan al diagnóstico del SBHD. En la tomografía axial computarizada, los quistes se manifiestan como lesiones redondeadas entremezcladas con parénquima pulmonar normal, localizados típicamente en las regiones inferiores del pulmón, de manera bilateral, e íntimamente relacionados con el septo interlobulillar y/o la pleura visceral y las venas y arterias pulmonares. La morfología de los quistes es variable desde redondeados, lentiformes y lobulados (59). Las pruebas funcionales no muestran ninguna alteración o solo una disminución leve en estos pacientes.

En 1999, Toro y cols. describen por primera vez la asociación entre quistes pulmonares y SBHD (2). A partir de entonces, se han descrito numerosos pacientes con el SBHD que se presentan con quistes pulmonares y neumotórax espontáneos. En un estudio posterior, Toro y cols. estudian 89 individuos de 51 familias, 37 varones y 52 mujeres con una edad media de 54 años. El número de familiares afectados en una misma familia variaba de 1 a 10. El 90% de ellos presentaron lesiones cutáneas en la cara, cuello y/o tronco superior compatibles histológicamente con fibrofoliculomas. De estos, el 57% presentaban una segunda lesión estudiada histológicamente con diagnóstico de angiofibroma o tricodiscoma (12 familias), fibroma perifolicular (11 familias) y ambos (3 familias). En el 10% restante, el diagnóstico de fibrofoliculoma no pudo establecerse histológicamente y se encontraron otras lesiones cutáneas: carcinoma basocelular, nevus del tejido conectivo, hiperplasias sebáceas, carcinoma epidermoide, melanoma, leiomioma cutáneo, dermatofibrosarcoma cutáneo y leiomiosarcoma cutáneo. El 34% de los pacientes incluidos presentaban carcinoma renal con una incidencia similar por sexos, con afectación mayormente multifocal y bilateral. De los pacientes con afectación cutánea, aproximadamente el 41% presentaban afectación renal. En cuanto a la afectación pulmonar, el 84% presentaban quistes pulmonares, múltiples y

bilaterales con desarrollo de neumotórax en el 53% de los casos. El 88% de los pacientes incluidos presentan mutaciones en línea germinal, encontrando 23: una missense, ocho deleciones, cuatro inserciones, una inserción/delección, tres nonsense y seis con alteración en el splicing. Las mutaciones se encontraron con mayor frecuencia en el exón 11 (47%). Estos autores no encontraron relación genofenotípica entre una mutación y el desarrollo de lesiones cutáneas, neumotórax o quistes pulmonares. La presencia de neumotórax y carcinoma renal eran más comunes en los portadores de la mutación c.1733delC que entre los portadores de la mutación c.1733insC sin ser la diferencia estadísticamente significativa en ninguno de los casos (42).

Schmidt y cols. recogen 61 familias afectas con un total de 219 individuos (110 mujeres y 109 varones). De los 175 pacientes que presentaban lesiones cutáneas, en el 84% se confirmó histológicamente el diagnóstico de fibrofolliculoma, sin aparecer estas lesiones antes de los 20 años de edad. El 32% presentaba historia de neumotórax espontáneo presentando el 85% de ellos uno o más quistes pulmonares en las pruebas de imagen. El 85% de las familias que presentaban mutaciones en línea germinal desarrollaron quistes pulmonares o neumotórax espontáneos. Encontraron carcinoma renal en el 20% de los casos, siendo la frecuencia superior en el sexo masculino (27 varones y 11 mujeres), con una edad media de presentación de 48 años y con afectación bilateral. El 45% de los que presentaban mutación en el gen FLCN desarrollaban carcinoma renal. Encontraron otras asociaciones como pólipos en colon y carcinoma de colon en 9 pacientes, y tumores parotídeos en 4 casos. Las mutaciones en el gen FLCN estaban presentes en el 84% de los casos, estando alterado el exón 11 en el 53% de los casos (c.1733insC o c.1733delC). Adicionalmente, encontraron mutaciones en el intrón 9. Estos autores sugieren que mutaciones en este intrón podrían estar asociadas a un mayor riesgo de desarrollar carcinoma renal (60).

Kunogi y cols. estudian 36 pacientes japoneses (14 varones y 22 mujeres) con múltiples quistes pulmonares de causas indeterminadas (61). En el 70% la afectación pulmonar se presenta sin lesiones cutáneas. Los neumotórax son de repetición en el 86.2% de los casos, con una media de 3 episodios, sin predilección por ningún pulmón. Se encuentran lesiones cutáneas en 7 pacientes confirmándose histológicamente de fibrofoliculomas en tan sólo 2 de ellos. La aparición de carcinoma renal se produce en 2 de ellos, en uno de ellos a modo de angiomiolipoma en el riñón derecho y en el segundo no determinan el tipo histológico. Encuentran mutaciones en el gen FLCN en el 69.4% de los casos, en dos de ellos grandes deleciones que abarcaban del exón 9 al 14 y el exón 14 y la región 3', respectivamente. Las mutaciones que encuentran difieren de las descritas en pacientes caucásicos con SBHD. En los pacientes japoneses las mutaciones se localizan con mayor frecuencia en la región 3' del gen FLCN especialmente detrás del exón 9 (76.7%). Esta región parece tener una gran importancia en la funcionalidad del gen FLCN y de las proteínas de unión a la foliculina FNIP1 y FNIP-L/FNIP2. Así, mutaciones germinales en esta región podrían interferir directamente en la interacción entre FLCN y sus proteínas de unión provocando el fenotipo característico de este síndrome (24,62,63).

Toro et al recogen un total de 198 pacientes (101 varones, 97 mujeres) de edades comprendidas entre los 22 y 77 años, con una media de 49 años (52). En ellos encuentran que el 89% presentan quistes pulmonares en las pruebas de imagen. El 24% presentan historia de neumotórax, con edad media de aparición de 38 años, el número medio de episodios fue de 2 en el 75% de los casos. El pulmón afectado por orden de frecuencia fue el derecho, el izquierdo o ambos, en el 84%, 29% y 23%, respectivamente. El 67% de los pacientes eran fumadores. Se observó carcinoma renal en 45 de los pacientes incluidos y lesiones cutáneas en el 93% de los casos. Las mutaciones en el gen FLCN

estaban presentes en el 81% de los casos, siendo el exón 11 el afectado con mayor frecuencia (48%). Sin embargo, no encontraron asociación genotípica entre la mutación del gen FLCN, la localización y las características clínicas de los quistes pulmonares o neumotórax, aunque sí que aquellos con mutaciones en el exón 9 o 12 parecen tener mayor número de quistes y mayor tamaño de estos (52).

1.2.4. Otras manifestaciones

Además de las asociaciones características ya descritas, en los pacientes con el síndrome Birt-Hogg-Dubé se han descrito adenomas y pólipos colorrectales, oncocitomas parotídeos, oncocitomas paratiroides, tumores neurales, tricoblastomas, lipomas, angioliomas, anomalías del tejido conectivo, coriorretinopatía y neoplasias malignas no renales, como el cáncer de mama, el carcinoma colorrectal, el amigdalario, el pulmonar, el carcinoma de células claras de tiroides, así como también cánceres cutáneos como el melanoma, el carcinoma basocelular, el carcinoma de células escamosas, el dermatofibrosarcoma y el leiomiomasarcoma (64–67) (Tabla 1). A pesar de ello, hasta la fecha no se ha demostrado una asociación significativa entre el síndrome de Birt-Hogg-Dubé y estas neoplasias, siendo necesarios más estudios que permitan esclarecer este aspecto (42).

Originalmente, se describió el síndrome asociado a carcinoma medular de tiroides en el contexto de una neoplasia endocrina múltiple (MEN 2) (1). Sin embargo, esta asociación no se ha vuelto a describir en trabajos posteriores.

En cuanto al oncocitoma parotídeo, algunos autores sugieren que se consideren estos tumores como una manifestación más del síndrome (68). El oncocitoma parotídeo, al igual que los subtipos histológicos de carcinoma renal que

aparecen asociados al SBHD, son ricos en mitocondrias. Es posible, que la foliculina conlleve a un aumento en el número de mitocondrias como consecuencia de una alteración en la vía de señalización de nutrientes en la que esta proteína podría estar implicada (53). Este tipo de tumores parotídeos son lesiones benignas raras que representan alrededor del 1% de los tumores de las glándulas salivares (69). Las lesiones oncocíticas parotídeas se presentan como una oncocitosis difusa en el 10% y son bilaterales en el 7% de los casos. Hasta la fecha, se han descrito varios casos de tumores parotídeos en pacientes con SBHD; siendo todos ellos unilaterales, en la mayor parte de los casos oncocitomas y con una edad de presentación más temprana que en la población general (53,68,70).

Junto a los oncocitomas parotídeos, se han descrito casos asociados a oncocitomas adrenales aunque son necesario más estudios para demostrar esta asociación (71).

El carcinoma colorrectal representa el tercer cáncer más frecuente en Estados Unidos y Europa. Los factores genéticos representan un papel importante en la patogénesis de este carcinoma estando implicados en aproximadamente un tercio de los casos. El carcinoma colorrectal se produce como consecuencia de la existencia de mutaciones en los genes que habitualmente se encargan de la reparación de errores en el ADN. De este modo, estos genes se inactivan y en el material genético aparecen multitud de errores que conducen a la formación de una gran cantidad de mutaciones. Alrededor de un 15% de ellos muestran inestabilidad de microsatélites (72). Los microsatélites son secuencias repetitivas de nucleótidos que existen en el ADN en condiciones normales. Estas secuencias repetitivas son muy propensas a presentar mutaciones, que habitualmente son reparadas por los genes reparadores de errores. El sustrato genético de la inestabilidad de microsatélites es la inactivación de alguno de estos genes. De tal manera que, cuando esto ocurre, se acumulan errores en el

ADN y se produce gran cantidad de mutaciones por inserciones o deleciones. La asociación del SBHD al cáncer de colon y pólipos no está clara (72). Se ha asociado este síndrome al desarrollo de pólipos colorrectales y cáncer de colon, aunque en una serie más amplia de pacientes con SBHD no se pudo establecer dicha relación (36). Zbar y cols. estudian 223 pacientes, 111 con mutación en el gen FLCN y 112 sanos. Cuando estudian el riesgo de desarrollar cáncer de colon encuentran 3 casos en el grupo afecto por el SBHD y 1 caso en el grupo sano, sin mostrar diferencias estadísticamente significativas. En cuanto a los pólipos en colon encuentran una afectación del 8% en ambos grupos, por lo que la diferencia sigue sin mostrar hallazgos significativos, concluyendo que los pacientes con SBHD no presentan mayor riesgo de sufrir cáncer de colon ni pólipos (36). Sin embargo, parece ser que para otros autores existe un riesgo más elevado de desarrollar cáncer de colon en los pacientes con mutación en el punto caliente del exón 11 (mutación c.1285dupC) en comparación con aquellos que presentan alguna otra mutación (42,73). Khoo y cols observan una alta incidencia de pólipos y cáncer de colon en pacientes con mutaciones en línea germinal en FLCN que indicarían que este gen pudiera estar implicado en el desarrollo tumoral de estas lesiones (74). En su estudio encuentran 6 casos de pólipos colorrectales y 2 casos de posible cáncer de colon en una familia con mutación en línea germinal en el gen FLCN. Al mismo tiempo, demuestran que el gen FLCN también estaría implicado en el inicio de cáncer colorrectal esporádico. En un estudio posterior, estos autores evalúan el papel del gen FLCN en 47 tumores colorrectales (10 pólipos y 37 carcinomas) para lo cual estudian todos los exones del gen en busca de mutaciones, analizando la existencia de pérdida de heterocigosidad en las regiones cromosómicas que rodean el locus FLCN, evalúan la inestabilidad de microsatélites y determinando si existen alteraciones de los patrones de metilación del promotor (75). Encuentran inestabilidad de microsatélites en el 17%; el 7% de los casos estudiados presentan mutaciones somáticas en el exón 4 y 12 del gen FLCN,

siendo en ambos casos mutaciones missense. Estas mutaciones producen la sustitución de un aminoácido por otro lo que provoca cambios conformacionales en la estructura de la proteína que conlleva a una disfunción de ésta. No detectaron metilación en el promotor de FLCN. La pérdida de heterocigosidad se presentaba en el 81% y 40% de los carcinomas y pólipos colorrectales, respectivamente. Estos autores proponen que la pérdida de heterocigosidad podría estar implicada en la progresión del cáncer colorrectal pero dado que existen otros genes supresores de tumores que también están localizados en el cromosoma 17p, como el p53, no pueden excluir que también puedan estar implicados. Varios estudios han demostrado que la pérdida de heterocigosidad en 17p podría ser esencial para la transformación de lesiones benignas colorrectales en lesiones malignas, pero los efectos de la pérdida de heterocigosidad en el gen FLCN requiere más estudios (75).

Se ha descrito la asociación de SBHD y melanoma en 8 pacientes (2,74,76–78). Cociolone y cols describen el caso de un varón de 58 años con fibrofoliculomas faciales y mutación en el gen FLCN que presenta melanoma desmoplásico en la mejilla derecha en dos ocasiones de manera recurrente. Con posterioridad se han descrito 2 casos más de pacientes con SBHD y melanoma, siendo uno de ellos coroideo (77,78). El mecanismo patogénico responsable de la aparición de melanoma en estos pacientes parece ser similar al responsable del desarrollo de los tumores típicos del SBHD. Estudios recientes han demostrado que la foliculina interacciona con la proteína FINP₁ y su homólogo, FINP₂, que a su vez interaccionan con la proteína cinasa activada por el AMPK, regulando negativamente la diana de la rapamicina, clave en el crecimiento celular y el desarrollo tumoral (figura 26). Una mutación en la foliculina impide este control negativo, apareciendo una proliferación y un crecimiento incontrolado de las células. Esta disregulación en la vía mTOR está asociada con los mecanismos

patogénicos de los tumores benignos y malignos que se observan en el SBHD, incluyendo el melanoma.

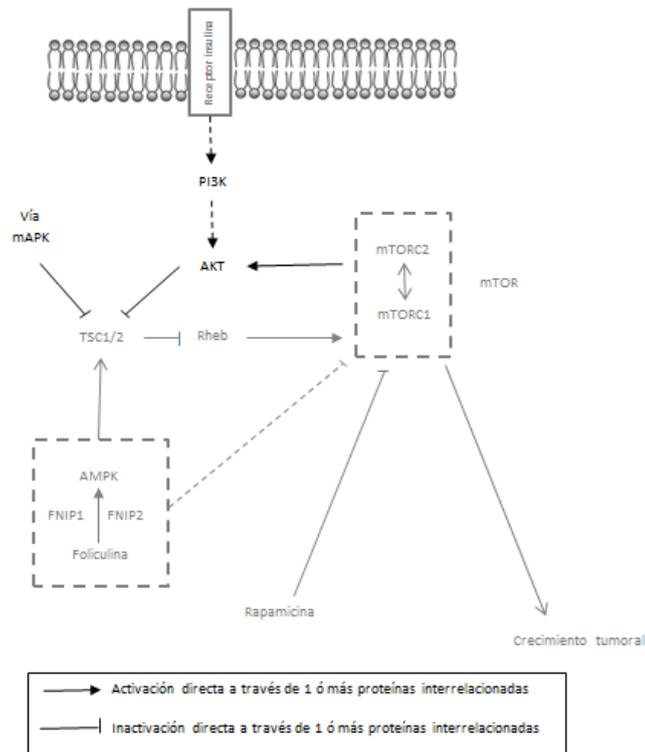


Figura 26. Interacción entre el complejo foliculina/FNIP1/FNIP2/AMPK y la vía mTOR en el melanoma. La mutación del gen FLCN conlleva a la inactivación de la foliculina y con ello la activación mTOR. La rapamicina y sus análogos inhiben mTOR compensando la inactividad del complejo foliculina/FNIP1/FNIP2/AMPK. Imagen modificada de Cocciolone y cols., 2010. (76)

Por el momento, todavía no se sabe si los pacientes con SBHD presentan mayor riesgo de desarrollar melanoma o es sólo una coincidencia pero dado que esta misma vía se activa en ambos, podría ser necesaria una revisión cutánea exhaustiva y la extirpación de cualquier lesión sospechosa en pacientes con el SBHD.

Tabla 1. Asociaciones descritas en pacientes con síndrome Birt-Hogg-Dubé

CARDIO-PULMONARES

Aplasia de la arteria carótida interna

CUTÁNEOS Y DE TEJIDOS BLANDOS

Angiolipoma

Carcinoma basocelular

Nevus del tejido conectivo

Lipomas

Melanoma

Fibroma perivascular

ENDOCRINOS

Bocio multinodular

Adenoma paratiroideo

Oncocitoma parotídeo

GASTROINTESTINAL

Pólipos en colon

Carcinoma colorrectal

OFTALMOLÓGICOS

Coriorretinopatía

OTRAS NEOPLASIAS

Fibroadenomatosis mamaria

Sarcoma de mama

Adenocarcinoma prostático

1.3. BASES GENÉTICAS

1.3.1. Identificación del gen

En 2001, Khoo y cols. localizaron en una familia con SBHD, mediante marcadores moleculares microsatélites, el locus del gen FLCN en el cromosoma 17p12q11.2, una región inestable y asociada con diferentes entidades (79).

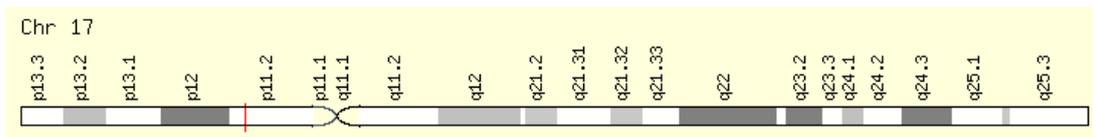


Figura 27. Localización genómica del gen FLCN. Imagen tomada de “*The Human Gene Compendium*” (<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=FLCN>).

Dos meses más tarde, Schmidt y cols. identificaron el locus de la enfermedad en la misma región pericentromérica del cromosoma 17p en una familia afecta de SBHD mediante análisis de ligamiento genético (80) (Figura 28).

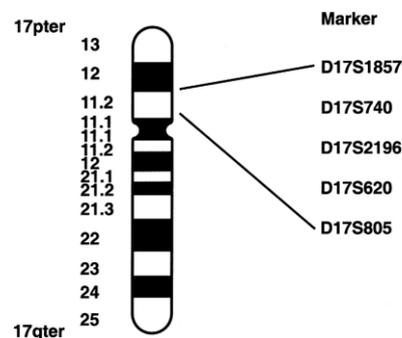


Figura 28. Esquema del cromosoma 17, en el que se muestra la localización de los microsatélites ligados al locus BHD. Imagen tomada de Schmidt y cols., 2001 (80).

Para ello, realizaron un amplio estudio genómico en varias familias con miembros afectados del SBHD, empleando 185 marcadores de microsatélites polimórficos, buscando la asociación entre varios alelos en cualquiera de los marcadores empleados, que permitiera identificar en que región del genoma, de los 19 cromosomas autosómicos estudiados, sería más probable que se encontrara el gen responsable de dicha enfermedad. Consideraron un individuo como afecto cuando presentaba más de diez lesiones cutáneas sugestivas de fibrofoliculomas y al menos una de ellas estaba confirmada histológicamente. Determinaron asociación entre el locus estudiado y el SBHD cuando la puntuación LOD era >3.0 . Los resultados de la primera búsqueda mostraron una fuerte relación con el cromosoma 17, con una puntuación LOD de 4.98 con el marcador D17S40. El análisis de otras regiones del genoma con los 185 marcadores mostró puntuaciones LOD muy bajas. Así, en un primer momento, localizaron el gen BHD en una región de 8.5cM localizada en 17p11-1-p12. El análisis en ocho familias más mostró una puntuación LOD máxima de 16.06 en el marcador D17S2196. El análisis de haplotipos identificó los recombinantes críticos lo que permitió delimitar la región mínima de no recombinación a menos de 4-cM entre el marcador D17S1857 y D17S805. El locus del SBHD se identificó en la banda cromosómica 17p11.2, una región que se asocia a la presencia de elementos repetidos, lo que conlleva a la frecuente aparición de mutaciones implicadas en el desarrollo de diversas enfermedades.

Según estos autores, el modelo que mejor explica la aparición del síndrome, es el modelo de alta penetrancia, ya que en las 33 familias con SBHD que reclutaron para el estudio, el 88% de los miembros mayores de 25 años que eran portadores del haplotipo presentaban fibrofoliculomas. Sin embargo, destacan la heterocigosidad fenotípica del síndrome ya que, aunque parece ser que un único gen es el encargado de la aparición de este síndrome, las lesiones clínicas varían de un individuo a otro debiendo existir otros factores, como

genes modificadores o factores ambientales, en la expresión de este síndrome (80).

En el año 2002, se consiguió clonar el gen FLCN asociado al síndrome Birt-Hogg-Dubé (4), que no sólo se ha encontrado en estos pacientes sino que también se han observado mutado en pacientes con neumotórax espontáneo primario y en el carcinoma renal de células claras (43,81).

1.3.2. Gen FLCN

El gen FLCN, localizado en el cromosoma 17p11.2, está compuesto de 14 exones con el punto de inicio en el primer ATG del exón 4. El splicing alternativo del gen FLCN/BHD produce dos transcritos que codifican dos isoformas diferentes. Una isoforma con la longitud completa, transcrito 1; y el transcrito 2, más corto y con un dominio C-terminal diferente al transcrito 1 (82) (figura 29 y 30).



Figura 29. Transcrito 1 del gen FLCN. Imagen tomada de *Ensembl Genome Browser* (<http://www.ensembl.org/index.html>)



Figura 30. Transcrito 2 del gen FLCN. Imagen tomada de *Ensembl Genome Browser* (<http://www.ensembl.org/index.html>)

El gen fue aprobado con el símbolo FLCN (OMIM# 607273, con número de entrada en el GenBank AF517523-NM_144997.5). La secuencia completa de

dicho gen codifica una proteína llamada foliculina, también conocida como FLCN, BHD, FLCN_HUMAN, MGC17998 o MGC23445, una proteína de 64kDa con un marco de lectura abierta de 579 aminoácidos y sin similitud con ninguna otra proteína humana. La proteína consta de un extremo hidrofóbico n-terminal, un sitio de n-glicosilación, tres de miristoilación y un dominio central superenrollado rico en ácido glutámico (83).

1.3.3. Localización y expresión de la foliculina

La foliculina se expresa en la mayor parte de los tejidos incluyendo cerebro, corazón, placenta, testículos, próstata, ovario, amígdala, nódulos linfáticos, páncreas, bazo, glándula mamaria, vejiga, así como la piel y sus anejos, pulmón (neumocitos tipo 1) y riñón (nefrona distal) (figura 31).

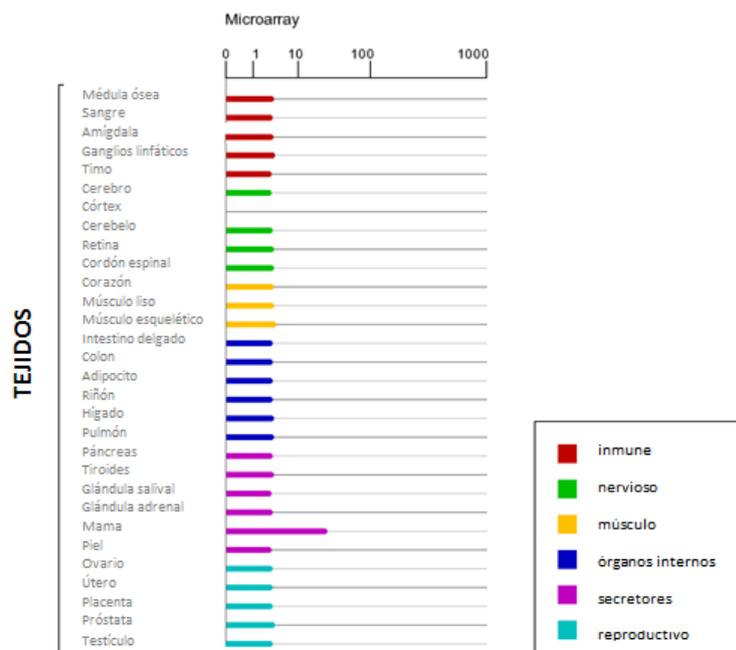


Figura 31. Localización de la foliculina en los diferentes tejidos. Imagen tomada de “The Human Gene Compendium” (<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=FLCN>).

Dicha proteína no presenta ninguna similitud con ninguna otra proteína pero el hecho de estar altamente conservada entre las especies y el estar presente en una amplia variedad de tejidos y órganos, sugiere el importante papel que debe representar a nivel biológico (29). Warren y cols. miden la expresión de mRNA de foliculina mediante hibridación fluorescente in situ en tejidos sanos y neoplásicos encontrando expresión en una gran variedad de tejidos, incluyendo la piel y sus anejos, la nefrona distal del riñón, los neumocitos tipo 1 y las células estromales del pulmón, las células acinares del páncreas y de la glándula parotídea, las células ductales mamarias, la próstata, los testículos, el ovario, la vejiga, el cerebro, el cerebelo, los ganglios linfáticos, los macrófagos y los linfocitos de las amígdalas y el bazo (46). Los tejidos que presentaron una expresión reducida de mRNA de foliculina fueron el corazón, el músculo y el hígado, así como los tumores renales de pacientes con SBHD. El gen FLCN podría jugar un importante papel a nivel secretor al encontrarse una fuerte expresión de mRNA de este gen en órganos con función secretora, como las células acinares del páncreas y glándula parotídea, así como en las células ductales a nivel mamario. Por otro lado, el hecho de encontrar mRNA en los neumocitos de tipo I, implicados en la secreción de surfactante, y en macrófagos alveolares sugieren su implicación en los mecanismos de fagocitosis o endocitosis (46). En el riñón, existe una fuerte expresión en la nefrona distal siendo muy débil en los túbulos proximales e indetectable en el glomérulo. A nivel cutáneo, se expresa mRNA en los queratinocitos del estrato espinoso de la epidermis y débilmente en el estrato basal epidérmico. Cuando se analiza la expresión de mRNA en fibrofoliculomas de pacientes con SBHD, se observa una fuerte expresión de mRNA en las proyecciones epiteliales, así como en los queratinocitos del estrato espinoso de la epidermis y en las glándulas sebáceas. Sin embargo, cuando se analizan diferentes carcinomas renales de pacientes con BHD, la expresión de mRNA es casi inexistente. En las bullas pulmonares, la expresión en el estroma celular y en neumocitos tipo I es similar tanto en afectos de SBHD como en

individuos sanos (46). Esto podría explicarse por la hipótesis de doble impacto en la que para el desarrollo de la patología renal, sería necesaria la pérdida o inactivación del segundo alelo bien por una mutación somática o por pérdida de heterocigosidad y, con ello, la expresión reducida del mRNA en dicho tejido. Sin embargo, parece ser que el epitelio que rodea las lesiones quísticas del riñón tampoco expresa FLCN por lo que solo la pérdida de expresión de FLCN podría no ser suficiente para iniciar el crecimiento celular incontrolado.

1.3.4. Homólogos de FLCN

De manera similar al humano, se han identificado homólogos a esta proteína en ratones, ratas, gusanos, levaduras, la mosca *Drosophila*, y en el nematodo *Caenorhabditis elegans*, sugiriendo la amplia gama de funciones biológicas realizada por esta proteína (Tabla 2).

La foliculina es idéntica en un 92% al ortólogo del ratón (producto del gen MGC 37841, AAH25820), un 32% al ortólogo *Drosophila* (producto del gen CG8616, AAF50597) y un 29% al ortólogo *Caenorhabditis elegans* (producto del gen F22D3.2, AAK31497) mediante BLASTX y MAST (84,85). La presencia de mutaciones en este gen en ratas y perros produce formas hereditarias de carcinoma renal similares a los del síndrome Birt-Hogg-Dubé. En el pastor alemán, el cambio de una histidina por arginina (H255R) en el gen BHD provoca la aparición de cáncer renal y dermatofibromatosis; en la rata, el carcinoma renal se ha asociado a una región del cromosoma 10 con similitud al cromosoma 17p11.2 humano (46). La homocigosidad en este gen tanto en ratas como en perros conlleva al desarrollo de lesiones quísticas y a un incremento en el tamaño de los riñones, con fallo renal y muerte a las 3 semanas del nacimiento. Las ratas homocigotas *Flcn*^{-/-} son letales embriológicamente mostrando defectos

en el endodermo visceral. Las ratas heterocigotas $Fln^{+/-}$ son normales al nacimiento pero desarrollan tumores renales y tumores sólidos a medida que aumenta la edad (85–87). Los tipos de tumores renales son los mismos que en el humano, incluyendo formas híbridas, oncocitoma y carcinoma de células claras. La inactivación de FLCN en ratas heterocigotas conlleva a la activación de las vías mTORC1 y mTORC2 (88). El grupo de ratas tratadas con rapamicina presentaban lesiones quísticas de menor tamaño y en menor número que aquellas no tratadas, con mayor tiempo medio de supervivencia (86). Aunque no está clara la función que puede desempeñar la foliculina en las fases tempranas de la embriogénesis, la alta letalidad que aparece ante la pérdida homocigótica de este gen sugiere su importancia en las fases tempranas del desarrollo. En *Drosophila* y en levaduras, FLCN está implicada en la vía de señalización de la rapamicina y en el metabolismo energético. Sin embargo, debido a la temprana mortalidad, estos estudios no son aplicables a humanos, ya que la patología renal que aparece en el humano se caracteriza por la aparición tardía de lesiones tumorales, mientras que en los ratones al fallecer en fases tempranas no se existe el riesgo de desarrollar estos tumores (29). Estos hallazgos sugieren que el gen FLCN podría actuar como un gen supresor. Gaur y cols. demuestran la inmunorreactividad de foliculina en el nucléolo de células normales y en muestras de tejido renal en *Drosophila* (89). Encuentran que FLCN regula de manera negativa la síntesis de rRNA bloqueando la unión de la ATPasa proteosomal (Rpt4) al ADN ribosómico. Rpt4 está implicada en la transcripción de rRNA y promueve la síntesis de rRNA, un paso clave en la progresión del cáncer. Por ello, una pérdida de FLCN provocaría un incremento en el volumen nucleolar y un aumento en la síntesis de rRNA. El descubrimiento de la relación de Rpt4 y FLCN podría implicar la aparición de nuevas alternativas para el tratamiento de este síndrome.

<i>ORGANISMO</i>	<i>Clasificación taxonómica</i>	<i>Gen</i>	<i>Descripción de la proteína</i>	<i>Similitud con FLCN humana</i>
Gusano (<i>Caenorhabditis elegans</i>)	Nematodo	F22D.3.2	F22D3.2	40.76(n) 29.33(a)
Mosca (<i>Drosophila melanogaster</i>)	Insecto	BHD	Homólogo BHD	45.89(n) 32.38(a)
Perro (<i>Canis familiaris</i>)	Mamífero	FLCN	Foliculina	88.66(n) 94.47(a)
Rata (<i>Rattus norvegicus</i>)	Mamífero	FLCN	Foliculina	86.59(n) 92.75(a)
Ratón (<i>Mus musculus</i>)	Mamífero	FLCN	Foliculina	87.39(n) 92.57(a)

Tabla 2. Principales genes ortólogos de FLCN en las especies más representativas. Similitud con FLCN humana: muestra el porcentaje de similitud al gen humano, seguido por (n) donde la comparación se basa en los ácidos nucleicos o (a) donde la comparación se basa en los aminoácidos.

1.3.5. Funciones de FLCN

El gen FLCN es considerado un gen supresor de tumores. Hasta la fecha, se desconoce con exactitud la función de esta proteína, pero parece estar implicada en la vía AMPK y mTOR. Diversos estudios han demostrado que dos nuevas proteínas ligadoras de foliculina (FNIP1 y FNIP 2) están implicadas en la vía AMPk y mTOR, y que una pérdida completa de la función de la foliculina llevaría al desarrollo de tumores a través de la disregulación de estas vías (90) (figura 32). El AMPk regula negativamente al mTORC1 y actúa como sensor del estado energético celular. De esta manera, la interacción entre FLCN y FNIP1/2 y AMPk sugiere el papel que podría desempeñar el FLCN en el estado energético de las células (26).

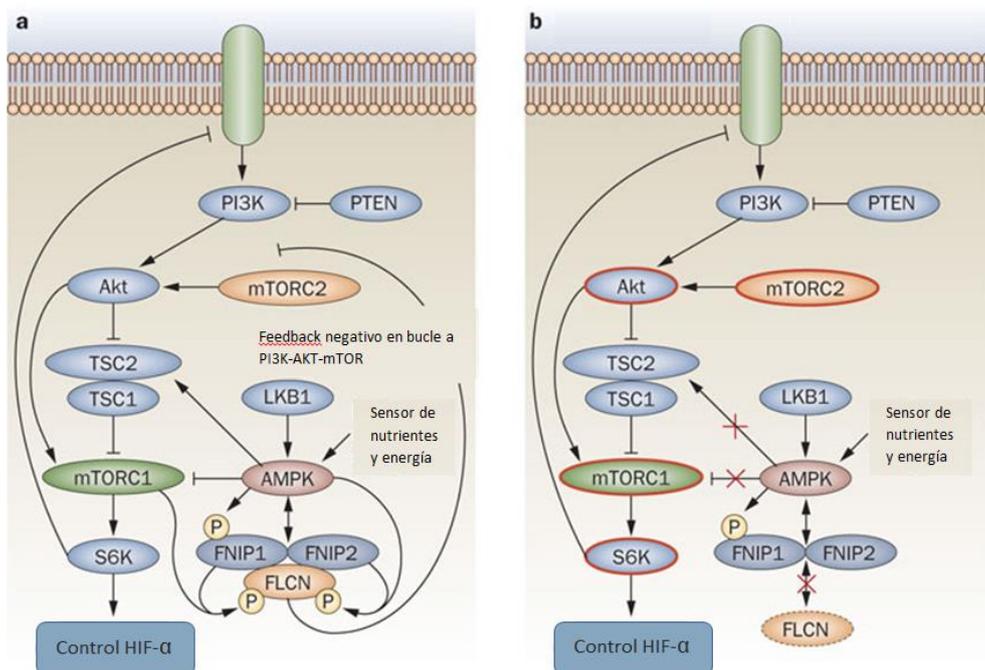


Figura 32. a. Cuando se expresa la foliculina, el complejo FLCN–FNIP1–FNIP2 se une al AMPK y FLCN es fosforilada por una cinasa sensible a rapamicina. b. Cuando no existe esta proteína, se activan AKT, mTORC1 y mTORC2 lo cual conlleva a un crecimiento tumoral incontrolado. Figura modificada de Linehan y cols.(91)

Se sabe que FLCN se une a las proteínas FNIP1 y 2 formando un complejo que interactúa con el AMPK y mTORC1. Debido a esta unión a AMPK y el complejo mTORC1, la proteína FLCN podría compararse a la hamartina (TSC1) y a la tuberina (TSC2). La especificidad por determinados tejidos (piel, pulmón y riñón) en el SBHD indican que podría considerarse un síndrome hamartomatoso asociado a la vía mTOR similar a la esclerosis tuberosa. Como ya hemos comentado antes, el hallazgo clínico de angiomiolipomas renales y angiofibromas faciales característicos de la esclerosis tuberosa en pacientes con SBHD muestra la relación de la vía mTOR en ambos síndromes (23,25,65,66,92). La esclerosis tuberosa se produce por una mutación en TSC1 o TSC2. A diferencia de lo que ocurre con el complejo TSC1-TSC2 que regula de manera negativa mTORC1, el papel de FLCN no está claro. Se han descrito efectos tanto negativos como positivos de FLCN sobre la regulación de mTORC1. Algunos estudios demuestran el efecto negativo en esta vía, tanto que la inactivación del gen FLCN directamente en el riñón provocaría el desarrollo de múltiples quistes renales con un aumento en la señalización mTOR (88). Mientras, otros autores sugieren que la disminución de FLCN conllevaría una disminución en la fosforilación de la proteína S6 ribosomal a través de la disminución de mTORC1 (26). Chen y cols. observaron una reducción de p-S6 en los quistes renales de ratones heterocigotos para FLCN (87). Sin embargo, este dato es contradictorio al encontrado en otros estudios (86,87). En base a estos resultados tan dispares, el papel de FLCN en la activación S6 es complejo y podría depender de otros factores ambientales. En realidad, la activación de mTORC1 y S6 en el carcinoma renal son dependientes de la histología del tumor. Así, mTORC1 y S6 se encuentran elevados en el carcinoma papilar y de células claras, mientras que está bajo o ausente en el carcinoma oncocítico y el cromóforo. Además, existiría la posibilidad de que la activación de S6 pudiera estar causada por las interacciones mesénquima-epitelio, que con gran frecuencia están implicadas en la tumorigénesis (93).

La ausencia o disminución de FLCN tiene consecuencias variadas, la mayor parte de ellas sin una explicación clara. Parece ser que FLCN interactúa con la placofilina 4/p0071 modulando la adhesión celular, regula la actividad transcripcional de HIF1 y tiene un papel en la ciliogénesis y la polaridad celular (94–96). No está clara cuál es la relación entre las funciones de FLCN y la sintomatología del SBHD pero el aumento del HIFa y de la vía de señalización WNT puede actuar como pro-oncogénico, mientras que un defecto en la función ciliar podría ser el causante de los quistes pulmonares y renales (96).

Recientemente, se ha descrito la disfunción ciliar como un factor que podría explicar el desarrollo de enfermedades quísticas renales que se presentan de manera independiente o en asociación a diferentes síndromes (96). Entre los procesos que pueden derivarse de la alteración de los cilios, ciliopatías, se han descrito síndromes renales, como la enfermedad poliquística renal, la nefronoptosis, el síndrome Joubert, el síndrome Bardet-Biedl o el síndrome Meckel-Gurber, entre otros (96).

Las enfermedades quísticas del riñón contribuyen al desarrollo de malformaciones renales y pueden producir en último lugar la aparición de una insuficiencia renal. En ellas se incluyen bien condiciones en las cuales la única presentación son los quistes renales o bien síndromes en los cuales los quistes entrarían a formar parte de un conjunto de manifestaciones clínicas en las que incluso la detección de los quistes se puede realizar en una edad más tardía o incluso en las necropsias. La formación de estos quistes ocurre por un desbalance entre la proliferación y la diferenciación celular, y parece ser que los cilios juegan un papel importante en el mantenimiento de este balance.

Los cilios y flagelos son orgánulos que se extienden a partir de la membrana plasmática apical. Los cilios son prolongaciones del citoplasma apical que contienen un eje de microtúbulos llamado axonema formado por un par central

de microtúbulos y nueve pares periféricos. Las proteínas que se asocian a los microtúbulos del axonema, se disponen de manera regular a lo largo de los microtúbulos y están organizadas para permitir el movimiento de inclinación del cilio y transportar de manera bidireccional, tanto anterógrada como retrógradamente, las partículas necesarias para la formación, mantenimiento y función de este orgánulo, mecanismo conocido como transporte intraflagelar (figura 33). Dado su importante papel en el mantenimiento de la funcionalidad ciliar, no es de extrañar que alteraciones en el transporte intraflagelar provoquen alteraciones renales, sobre todo, lesiones quísticas (96,97).

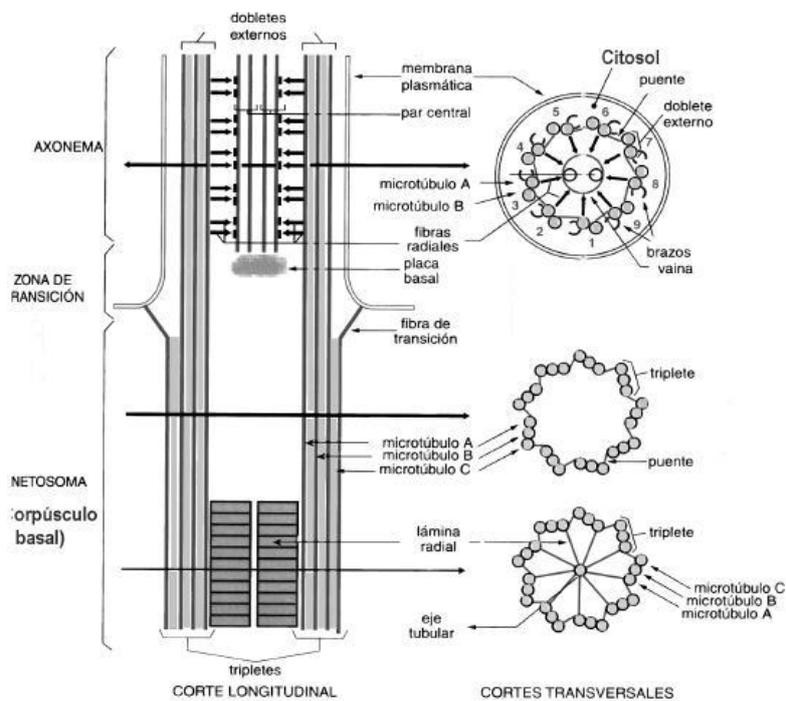


Figura 33. Estructura de un cilio.

Los cilios son necesarios para el movimiento y la propulsión celular, son críticos para la interacción entre las células y el medio ambiente, actúan como estructuras mecano-sensoriales a través de la concentración intracelular de Ca^{++} , así como para la transducción de señales paracrinias; tales como Wnt

importante para el desarrollo y mantenimiento del riñón, la vía Sonic Hedgehog implicada en la morfogénesis y crecimiento de diferentes tejidos y órganos y, el receptor alfa de factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR α) en íntima relación con la regulación del ciclo celular (98–102).

Se han descrito diferentes subtipos de cilios: los cilios primarios que no funcionan como estructuras móviles, los más comunes e implicados en funciones sensoriales; y los cilios móviles. La disfunción de los cilios primarios es causa de ciliopatías, caracterizadas por cambios en la morfología y/o número de cilios, que conllevan a la formación de quistes en diferentes órganos, incluido el riñón (96). Las lesiones quísticas podrían representar un estadio pretumoral con la consiguiente progresión a tumores, como el carcinoma renal, el melanoma, el adenocarcinoma ductal pancreático y el cáncer ovárico (56,103–107). El síndrome von Hippel-Lindau y el complejo de esclerosis tuberosa se han relacionado con la disminución en la función ciliar y la formación de lesiones quísticas (108,109). En los pacientes con SBHD se desarrollan quistes en órganos tales como el riñón y/o el pulmón, por lo que se sugiere que el gen FLCN podría tener un papel en la funcionalidad de los cilios primarios y dicha disfunción podría ser la causante del desarrollo de las lesiones típicas del síndrome (110). La formación de quistes en diversos órganos se considera una característica típica de las ciliopatías. Esto nos lleva a considerar el SBHD como una nueva ciliopatía, y que el gen FLCN tendría un papel en la regulación de la morfología celular y en la vía de la polaridad celular planar, posiblemente a través de la vía Wnt (110). Dicha vía es potencialmente oncogénica y podría representar un nuevo mecanismo en la carcinogénesis del SBHD. Luitjen y cols. encuentran la proteína, FLCN, en los cilios móviles y no móviles, los centrosomas y los husos mitóticos. Estos autores encuentran que la concentración de FLCN está relacionada con el inicio de la ciliogénesis, encontrando un retraso en el inicio y una disminución en la longitud de los cilios en aquellas células con menor

concentración de FLCN. El bloqueo de FLCN produciría una disminución en la longitud y el número de cilios y una disminución en su funcionalidad. Sin embargo, una vez que la formación de los cilios ya se ha iniciado, la alteración en FLCN no produciría ningún defecto en el tamaño ni en la forma de estos. Un retraso en la ciliogénesis podría afectar la habilidad de las células para orientarse en los tejidos polarizados. Dado que los carcinomas renales en el SBHD se forman a partir de lesiones quísticas, el desarrollo de estos tumores no estarían asociados a mutaciones que no afectasen a la ciliogénesis, aunque todavía son necesarios más estudios para esclarecer este punto (110).

1.3.6. Mutaciones de FLCN

Las mutaciones del gen FLCN pueden afectar a cualquier exón (111). Las variantes génicas patogénicas son aquellas mutaciones que se pueden considerar como causa principal del desarrollo del SBHD. La mayoría son alteraciones que dan lugar a una parada prematura en la traducción, lo que genera una proteína más corta (o truncada) y no funcional. Dentro de este tipo de mutaciones encontramos:

- a) *Deleciones o inserciones que alteran el marco de lectura ("frameshift")*: son mutaciones en que la delección o inserción de un nucleótido da lugar a un desplazamiento, desfase o cambio del marco de lectura de los tripletes. El resultado es una alteración importante en la secuencia de aminoácidos de la proteína y pueden originar un codón de parada aguas abajo del sitio de la mutación.
- b) *Mutaciones sin sentido ("nonsense")*: las mutaciones sin sentido, también denominadas mutaciones con terminación prematura de la proteína, generan

un codón de stop (UAA, UAG o UGA) cuya consecuencia es la interrupción prematura de la traducción de la proteína.

c) *Mutaciones no sinónimas o de sentido equivocado o alterado (“missense”)*: son mutaciones en las que la sustitución de una base origina un nuevo triplete o codón que codifica por un aminoácido diferente.

d) *Deleciones o inserciones que no alteran el marco de lectura*: son pequeñas deleciones o inserciones que son múltiples de 3 y por lo tanto introducen o eliminan uno o pocos aminoácidos, pero no cambian el marco de lectura de los tripletes.

e) *Mutaciones que afectan a la maduración del ARNm (“splicing”)*: El resultado es la inclusión de exones nuevos o la exclusión de exones de la proteína. Dependiendo del punto de splicing, además pueden causar un cambio en la fase del marco de lectura.

f) *Grandes reordenamientos*: Se trata de la pérdida o amplificación de partes grandes de un gen, o incluso de la totalidad del mismo. Los reordenamientos más comunes son aquellos en los cuales desaparecen exones enteros o fragmentos de los mismos, y las que amplifican el gen entero. En caso de que desaparezca un exón completo suele cambiar el marco de lectura y se genera una proteína truncada. En el caso de las amplificaciones de exones, aunque la proteína mantenga su longitud, la fase de lectura suele cambiar y aparece una proteína completamente distinta de la germinal. En cualquier caso son proteínas que han perdido su funcionalidad.

Hasta la fecha, aproximadamente el 50% de las mutaciones producidas en línea germinal en pacientes con SBHD son inserciones o deleciones de una citosina en un tracto de ocho citosinas en el exón 11, considerado un punto caliente hipermutable, que provocan un cambio en la lectura de los nucleótidos con la consiguiente pérdida de función de dicha proteína. La hipermutabilidad de este

punto caliente podría ser debida al deslizamiento de la ADN polimerasa durante la replicación, resultando en mutaciones frameshift y consecuentemente a la formación de una proteína truncada. No existe una correlación geno-fenotípica entre el tipo de mutación y la clínica encontrada pero parece ser que aquellos pacientes que presentan una C-delección presentan menor riesgo de desarrollar un cáncer renal que aquellos con una C-inserción (38,82). La mayoría de las mutaciones son deleciones de 10 o más bases, aunque también se han descrito sustituciones de una sola base, duplicaciones y deleciones/inserciones (Figura 34). Estas mutaciones conllevan con mayor frecuencia a alteración del marco de lectura (frameshift) con la posibilidad de aparición de un codón de terminación prematuro. También pueden provocar cambios en la maduración de ARNm, de sentido alterado o deleciones. Debido a estas mutaciones, la proteína se trunca y pierde su función. La tasa de aparición de estas mutaciones en familiares afectados del SBHD es aproximadamente un 84% (60). Sin embargo, el gen FLCN no sólo se ha visto implicado en pacientes afectados de SBHD, sino que también se ha descrito en pacientes con neumotórax espontáneo primario con una penetrancia cercana al 100% en familiares con bullas y quistes pleurales y en pacientes con carcinoma familiar de células claras no asociado a SBHD (43,51,81,112–114). Las mutaciones asociadas al neumotórax espontáneo primario que se han descrito en la literatura incluyen 2 mutaciones con terminación prematura de la proteína y una delección de 4 pares de bases localizadas en el exón 9, 12 y 4, que conllevaron a la interrupción prematura de la traducción de la proteína.

Se han descrito grandes reordenamientos afectando genes como von Hippel-Lindau (VHL), succinato deshidrogenasa subunidad B, fumarato hidratasa, BCRA1 y recientemente en FLCN (61,115,116). Kunugi y cols. publicaron el primer artículo en el que dos pacientes con SBHD presentaban grandes deleciones intragénicas en FLCN (61). Con posterioridad, Benhammou y cols.

sugirieron que estas grandes deleciones y/o duplicaciones en el gen FLCN podrían representar al menos el 5% de los pacientes con SBHD en los que no se identifica ninguna mutación por las técnicas de secuenciación de ADN habituales (117). Estudian 23 casos en los que encuentran grandes deleciones en el gen FLCN en el 40% de los pacientes estudiados. En uno de ellos encuentran una deleción que abarca del exón 2 al 5, lo cual afecta a la translación normal produciendo una proteína más corta que la normal. En otros dos pacientes, encuentran una deleción que afecta del exón 7 al 14 la cual provoca un codón de terminación. La deleción en el exón 1 se produce en seis de los pacientes estudiados. Identifican este exón y su promotor como un punto caliente para la producción de grandes deleciones. Jandaghi y cols también encuentran una deleción intragénica en el exón 1 y sugieren que aunque no es una región codificante podría ser un punto caliente causante del SBHD (118).

La secuencia genómica 5' del exón 1 y de su intrón tienen un alto número de repeticiones Alu en comparación con el resto del gen FLCN que podrían ser las responsables de algunas de las deleciones que afectan a esta región, aunque el mecanismo por el cual se producen deleciones en esta zona es desconocido. El 60% de las deleciones que encuentran están flanqueadas por repeticiones Alu, al igual que ocurre en otros cánceres humanos como el cáncer de mama, el sarcoma de Ewing, el síndrome von Hippel-Lindau o el síndrome de Lynch. En otros dos pacientes estudiados, encuentran duplicaciones en el exón 10-11 que provocan una mutación frameshift y un codón de terminación. Estos autores no encuentran ninguna diferencia geno-fenotípica entre los pacientes estudiados con grandes deleciones o inserciones y los publicados en la literatura con mutaciones puntuales. Los datos que encuentran sugieren que, junto con las mutaciones frameshift, missense, nonsense y con alteración de los sitios de splicing ya descritas en estudios previos, las grandes deleciones o duplicaciones pueden ser causa del SBHD.

Se han identificado mutaciones somáticas del segundo alelo del gen FLCN o pérdida de heterocigosidad en 17p11.2 en la mayor parte de los cánceres renales de pacientes con SBHD y mutación en línea germinal, sugiriendo el papel supresor de este gen. La identificación de distintos segundos impactos mutacionales somáticos en múltiples tumores del mismo paciente, sugiere que los tumores renales múltiples en un único riñón de un paciente con SBHD aparecen como eventos clonales independientes.

Hay poco descrito sobre alteraciones del gen FLCN en tumores esporádicos. En referencia al carcinoma renal esporádico la frecuencia de mutaciones en el gen FLCN es poco frecuente (119,120). Sin embargo, sí que se ha atribuido la metilación del promotor FLCN como causante del desarrollo de este tipo de tumores aunque no todos los autores encuentran este hallazgo (119,121). La metilación de ADN es una alteración epigenética que interfiere con el inicio transcripcional de una proteína. A través de este mecanismo se altera la función de un gen supresor de tumores lo cual conlleva al desarrollo de tumores. La citosina puede ser metilada si se encuentra en una posición anterior a la guanina. Esta secuencia rica en CpG se repite en determinadas regiones y se denomina islotes CpG. Estas regiones se localizan cerca de las regiones promotoras de muchos genes y su metilación no permite la expresión del gen, por lo que el resultado sería el mismo que si no estuviese el gen o estuviese mutado. En líneas generales, la metilación de los dinucleótidos CpG de las regiones promotoras de los genes supresores de tumores conlleva a la pérdida de la expresión de estos genes y a su consiguiente disfunción. Recientemente se ha identificado la implicación del gen FLCN en los tumores renales esporádicos a través de la metilación del promotor FLCN.

Khoo y cols. estudian el gen FLCN en 39 tipos de cánceres renales esporádicos en los que observan pérdida de heterocigosidad en el 36% de los casos (33% en cánceres renales cromófobos, 83% en cánceres papilares, 25% de células claras

y en ningún oncocitoma) (121). La pérdida de heterocigosidad la encontraron en el cromosoma 17p, hallazgos similares a los encontrados en otro estudios (122). En cuanto a las mutaciones somáticas, tan solo la encuentran en uno de los casos (2.6%) siendo una inserción/delección c.1939_1966delinsT en el exón 13. Aunque la mutación de FLCN es rara en los tumores renales esporádicos y no jugaría un papel preeminente en su desarrollo, es posible que la pérdida del cromosoma 17p o la lentificación epigenética pudiera aportar el mecanismo para la inactivación de FLCN en un subgrupo de carcinomas renales esporádicos. La escasa frecuencia de pérdida de heterocigosidad y metilación en el gen BHD en tumores esporádicos sugiere su papel como gen supresor de tumores y se propone que la inactivación epigenética podría ser una posible alternativa en la alteración de su función. Estos autores encuentran metilación en el 28% de las muestras (29% en oncocitomas renales, 11% en cánceres cromóforos, 36% en papilares y en el 33% de células claras). 5 de las muestras con pérdida de heterocigosidad estaban metiladas, algo que reforzaría la teoría del doble impacto (121). La metilación aberrante de islotes CpG es un mecanismo alternativo importante para la inactivación de genes supresores de tumores y podría ser el mecanismo más común en el desarrollo tumoral. Los resultados de todos estos estudios dejan abierta la posibilidad de que una inactivación de FLCN por mutación somática pudiera contribuir al desarrollo de un subgrupo de cánceres renales, especialmente aquellos con inestabilidad de microsatélites.

Los microsatélites son repeticiones múltiples de 1 a 5 nucleótidos que están distribuidos por todo el genoma. Debido a su estructura repetitiva, los microsatélites son susceptibles a errores durante el proceso de replicación. La inestabilidad en microsatélites se origina como consecuencia de una deficiencia en el mecanismo posreplicativo de reparación de apareamientos erróneos. Se conocen varios genes cuyos productos están involucrados en este mecanismo y que están mutados en varios tumores, como el cáncer colorrectal esporádico.

Se conocen al menos 6 genes involucrados en este mecanismo en los humanos: hMLH1, hMSH2, hMSH6, hMLH3, PMS1 y PMS2 (123). Fujii y cols detectan mRNA de FLCN en las células epiteliales endometriales de tejido sano (124). Por lo que, sería asumible pensar que mutaciones en estos tejidos podrían estar implicadas en el desarrollo de carcinoma endometrial. Estos mismos autores encuentran inestabilidad microsatelital (28%), con afectación del exón 11 (12.8%) con un porcentaje similar en pacientes con cáncer endometrial esporádico y cáncer colorrectal. Por ello, sugieren que el gen FLCN podría ser una diana en el carcinoma endometrial esporádico (124,125).

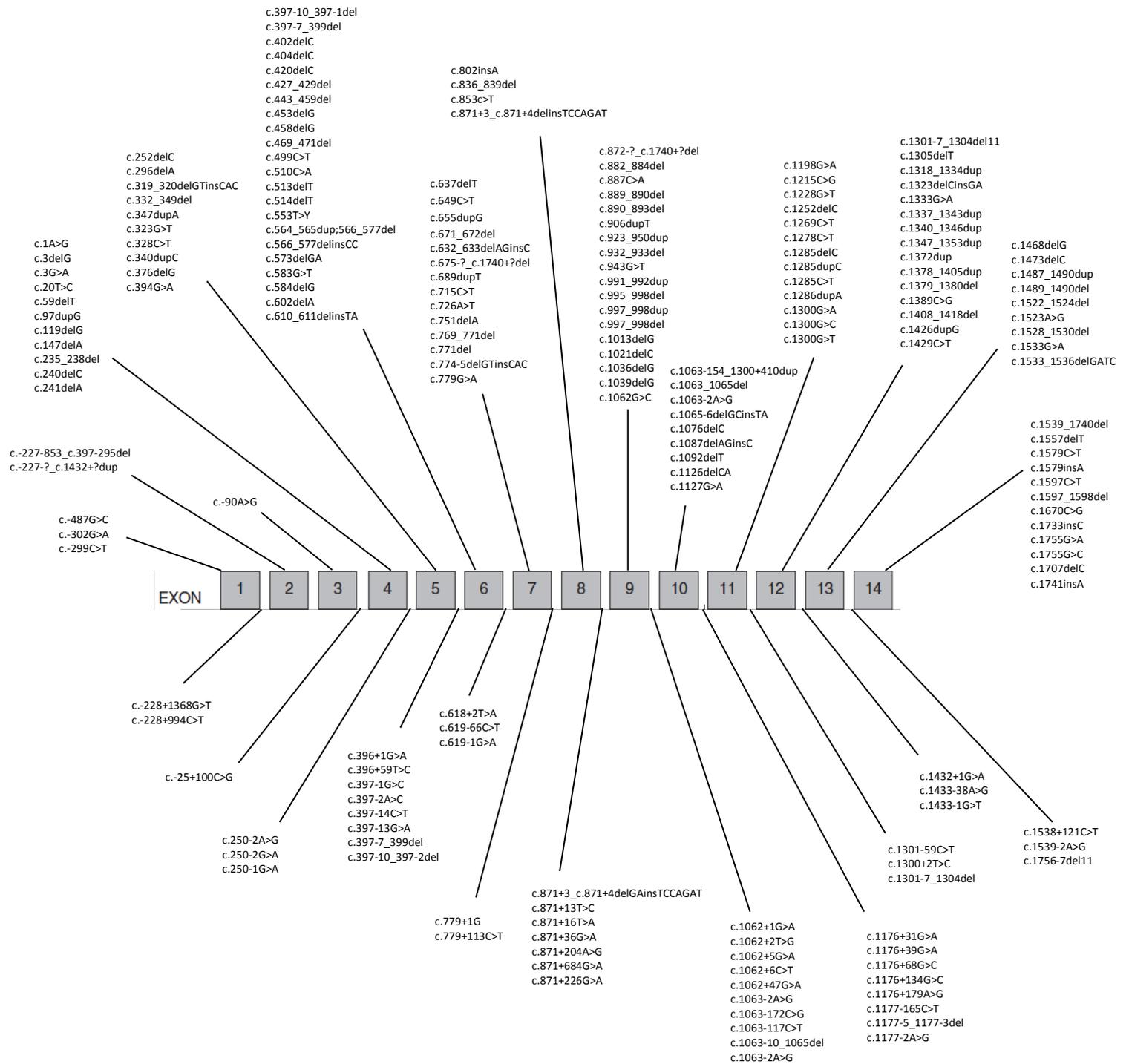


Figura 34. Mutaciones y variantes del gen *FLCN* en familias con SBHD.

1.3.7. Repercusiones funcionales locales o sistémicas de las mutaciones del gen FLCN

Las mutaciones del gen FLCN en el riñón dan lugar al desarrollo de carcinomas renales bilaterales y multifocales, y a nivel cutáneo a hamartomas. El mecanismo por el cual la pérdida de FLCN promueve el desarrollo de lesiones benignas como son los quistes o neumotórax, pero no a neoplasias malignas es desconocido. La hipótesis para explicar el agrandamiento anómalo de los espacios aéreos alveolares y de la formación quística se basa en un desbalance entre las metaloproteasas de matrix (MMPs) y sus inhibidores endógenos (inhibidores tisulares de metaloproteasas) (126). Las interacciones célula-célula y célula-matriz son críticas en la supervivencia de las células epiteliales, y esta disrupción a menudo conlleva a la activación de la apoptosis mediada por caspasas. La actividad de la vía AMPk, necesaria para la supervivencia tisular y para el mantenimiento de las uniones intercelulares, está regulada por la fosforilación llevada a cabo por LKB1, un gen supresor de tumores asociado al 30% de los cánceres de pulmón. Además, LKB1 está implicado en el control de las uniones apicales entre las células epiteliales del bronquio. Esto justificaría la implicación del FLCN en la regulación de la señalización del AMPk de las células epiteliales alveolares y, de este modo, que una mutación que inactivase FLCN conllevaría a una disminución de las uniones intercelulares y de la supervivencia celular (90). Goncharova y cols. estudian esta hipótesis en el epitelio pulmonar de ratones e identifican FLCN como un regulador importante en la homeostasis pulmonar. FLCN contribuiría a la supervivencia de las células epiteliales pulmonares, manteniendo la tensión de la superficie alveolar mediante la producción de fosfolípidos. De esta manera, la pérdida de FLCN conllevaría a una pérdida de las células epiteliales con la consecuente disminución en la producción fosfolipídica que conllevaría a los cambios típicos encontrados en el

SBHD. Además, encuentran que el mantenimiento de las uniones epiteliales celulares depende del AMPK, la E-caderina y LKB1. FLCN es necesario en las uniones célula-célula dependientes de E-caderina, la señalización LKB1-AMPK, y la apoptosis de las uniones celulares mediadas por caspasas, que supone el primer paso en el agrandamiento de los espacios aéreos alveolares (90).

En cuanto a la patología renal, la asociación entre la pérdida de la expresión de FLCN y el desarrollo de casi todos los subtipos histológicos de cáncer renal, sugiere que FLCN estaría implicado en aquellas funciones moleculares que acontecen en la patogénesis del carcinoma renal. Una segunda mutación somática y la inactivación bialélica identificada en diversos carcinomas renales esporádicos y en los asociados al síndrome Birt-Hogg-Dubé sugerirían que es necesaria la inactivación de ambas copias del gen para el desarrollo del tumor renal, de acuerdo a la hipótesis del doble impacto de Hudson para los genes supresores de tumores. Según esta teoría, es necesaria más de una mutación para la transformación maligna. Generalmente, los tumores son portadores de una mutación germinal que inactiva una copia del gen y la segunda copia se pierde bien por pérdida de heterocigosidad, metilación o por una mutación somática. En el carcinoma renal asociado al síndrome Birt-Hogg-Dubé, tras una primera mutación en línea germinal que alteraría la función del gen FLCN, habría de producirse una segunda mutación somática o una delección sobre el otro alelo para que se iniciara el tumor (29).

Durante la organogénesis renal, una población de las células pluripotenciales se subdividen en las diferentes líneas de células epiteliales que darán en último término a las nefronas. Podría ser que la segunda mutación, que conlleva a la pérdida de expresión de FLCN, ocurriera en las fases tempranas del desarrollo renal cuando las células pluripotenciales se estuvieran dividiendo. Así, la división de estas células doblemente mutadas formarían células hijas sin expresión de FLCN lo cual conllevaría al desarrollo de quistes y lesiones tumorales. El

momento de la segunda mutación es importante para determinar el número de unidades nefríticas sin FLCN, ya que cuanto más temprana sea la mutación mayor será el número de células que no expresarán FLCN, siendo esto lo que determinará el riesgo de un paciente con SBHD de desarrollar múltiples tumores renales (29). La inactivación heterocigótica de FLCN conllevaría a la consiguiente aparición de quistes con capacidad de progresar a carcinoma (29). Parece ser que el FLCN se expresa en los túbulos distales del riñón, algo que concuerda con los datos encontrados en un estudio que demuestra la pérdida de expresión del cotransportador NaCl en los quistes renales asociados al síndrome BHD tras la delección de ambos alelos de FLCN (87).

En cuanto a la patología cutánea, la alteración del gen FLCN produce lesiones hamartomatosas a modo de fibrofoliculomas y/o tricodiscomas, principalmente. Hasta el momento, la inactivación de un único alelo y, por tanto, la haploinsuficiencia, había sido aceptada como responsable del desarrollo de estas lesiones hamartomatosas. Sin embargo, en el 4º simposio internacional de BHD, Toro y cols. encontraron pérdida de heterocigosidad por delección del alelo nativo en fibroblastos aislados de fibrofoliculomas, sugiriendo que estas células podrían desencadenar una alteración en el crecimiento celular y ser las causantes de la aparición de la lesión (127). Aunque hasta entonces se venía considerando que la haploinsuficiencia podría ser un mecanismo suficiente para el desarrollo de las lesiones cutáneas, este hallazgo plantea la posibilidad de que la inactivación bialélica pudiera ser necesaria para el desarrollo de las lesiones dermatológicas del mismo modo que ocurre en las lesiones renales.

1.4. CRITERIOS DIAGNÓSTICOS

En la tabla 3 se muestran los criterios diagnósticos actualmente propuestos por el Consorcio Europeo para el estudio del síndrome Birt-Hogg-Dubé (128). Sin embargo, la especificidad y sensibilidad de estos criterios todavía no está clara y son necesarios más estudios para demostrarla.

Tabla 3. Criterios diagnósticos del Consorcio Europeo para el diagnóstico del síndrome Birt-Hogg-Dubé

CRITERIOS MAYORES

- Al menos cinco fibrofolliculomas o tricodiscomas de inicio en edad adulta con al menos una lesión confirmada histológicamente.
- Mutación patogénica en línea germinal del gen FLCN.

CRITERIOS MENORES

- Múltiples quistes pulmonares: localizados basalmente, sin causa evidente asociado o no a neumotórax espontáneo.
- Cáncer renal: de inicio temprano (<50 años), multifocal, bilateral y/o con formas histológicas características (forma híbrida de oncocitoma y cromóforo).
- Familiar de primer grado con síndrome de Birt-Hogg-Dubé.

Para el diagnóstico de síndrome Birt-Hogg-Dubé, el paciente debe presentar un criterio mayor o 2 menores.

Cabe destacar que a pesar de que las lesiones cutáneas son el signo de alerta para el dermatólogo, no todos los pacientes con síndrome Birt-Hogg-Dubé las presentan. De hecho, no todos los pacientes se presentan con la tríada clásica de afectación cutánea, renal y pulmonar (61). Kunogi y cols. observaron que hasta un 70% de pacientes con síndrome Birt-Hogg-Dubé y neumotórax no

presentaban lesiones cutáneas ni alteraciones renales (61). Por ello, dada la variabilidad clínica de este síndrome y aunque la afectación cutánea representa el predictor más importante de SBHD, el diagnóstico de sospecha no debería plantearse solamente en aquellos pacientes con las lesiones cutáneas características, sino también en pacientes con lesiones extracutáneas, como las descritas con anterioridad. Así, el Consorcio Europeo del síndrome Birt-Hogg-Dubé ha propuesto una serie de criterios que representarían una indicación para la solicitud del estudio genético, entre los que se encuentran aquellos pacientes con carcinoma renal de inicio temprano (<50 años), particularmente si es multifocal y/o bilateral, y con una histología característica (cromófoba, oncocítica o híbrida), y pacientes con enfermedad pulmonar quística inexplicable y/o neumotórax espontáneo, especialmente si la afectación es bilateral y los quistes se localizan basalmente (128). Además, deberían considerarse aquellos pacientes con historia familiar de enfermedad pulmonar quística, neumotórax espontáneo, carcinoma renal o una combinación de estos (128) (tabla 4). De este modo, en aquellos pacientes cuya única manifestación sea la afectación pulmonar o renal, la detección de una mutación germinal de FLCN nos ayudaría a confirmar el diagnóstico y poder realizar consejo genético.

Tabla 4.- Criterios para la solicitud del estudio genético según el Consorcio Europeo Birt-Hogg-Dubé.

- Lesiones cutáneas características (fibrofolliculomas y/o tricodiscomas).
- Enfermedad pulmonar quística sin causa evidente.
- Neumotórax espontáneo de etiología idiopática.
- Cáncer renal: de inicio temprano (<50 años), multifocal, bilateral y/o con formas histológicas características (forma híbrida de oncocitoma y cromófobo o formas puras).
- Familiar de primer grado con alguna de las características previas.

Recientemente, se han propuesto nuevos criterios diagnósticos basados principalmente en las pruebas de imagen (tabla 5) (129).

Tabla 5. Nuevos criterios diagnósticos para el síndrome Birt-Hogg-Dubé basados en las pruebas de imagen

BHD PULMONAR DEFINITIVO

- TAC compatible* o característico** y biopsia cutánea positiva para fibrofoliculoma o tricodiscoma.
- TAC compatible o característico e historia familiar de BHD en familiar de primer o segundo grado.
- TAC compatible o característico y confirmación de carcinoma renal cromóforo u oncocitoma.
- TAC compatible o característico y mutación FLCN confirmada.

PROBABLE BHD PULMONAR

- TAC característico, tras excluir esclerosis tuberosa y linfangioleiomiomatosis, e historia familiar o personal de neumotórax.
- TAC compatible, tras excluir esclerosis tuberosa y linfangioleiomiomatosis, y uno de los siguientes:
 - Historia familiar o personal de cáncer renal.
 - Angiofibroma cutáneo
 - Angiomiolipoma renal

POSIBLE BHD PULMONAR

1. TAC compatible o característico.

*TAC característico**: Múltiples quistes redondeados, elípticos o lentiformes, con distribución predominantemente basilar, medial y subpleural, con volumen pulmonar preservado o incrementado y sin ninguna otra afectación pulmonar.

*TAC compatible***: quistes de pared delgada sin la típica morfología elíptica o la distribución subpleural.

Como hemos visto, la clínica del síndrome Birt-Hogg-Dubé no sólo se limita al ámbito dermatológico, sino que también se manifiestan en otros niveles. De ahí que el manejo de estos pacientes deba realizarse de manera multidisciplinar y con la colaboración de distintos especialistas (Figura 35). El diagnóstico de las lesiones cutáneas asociadas a este síndrome se basa en las características clínicas e histológicas. Por ello, debe realizarse una correcta exploración cutánea junto a la extirpación de las lesiones sospechosas.

Como hemos comentado previamente, los pacientes con síndrome Birt-Hogg-Dubé tienen un riesgo aumentado de desarrollar cáncer renal. Por ello, deberían vigilarse aquellos pacientes portadores de la mutación en línea germinal en el gen FLCN o en pacientes de riesgo. No existen unas guías establecidas que definan a qué edad comenzar, el mejor método de screening, ni con qué periodicidad realizarlo. Se ha visto que la edad en la que se desarrolla cáncer renal está comprendida entre los 25-75 años por lo que la edad de inicio podría establecerse en los 20 años (5). Como prueba de imagen se puede emplear la ecografía, la tomografía axial computarizada o la resonancia magnética nuclear. Algunos autores defienden realizar pruebas de imagen periódicas cada 12-36 meses a partir de los 20 años de edad (130,131).

Aquellos pacientes con historia de neumotórax de repetición o con enfermedad pulmonar sintomática deberían ser derivados a un especialista. La realización de una radiografía de tórax o una tomografía axial computarizada sería útil para el diagnóstico de los quistes pulmonares, aunque no existen protocolos universalmente aceptados para el seguimiento de estas lesiones.

Referente a la asociación, por parte de algunos autores, del síndrome Birt-Hogg-Dubé y el cáncer de colon, no se ha descrito una indicación específica de colonoscopia en estos pacientes, siendo la recomendación la misma que para la población general (73).

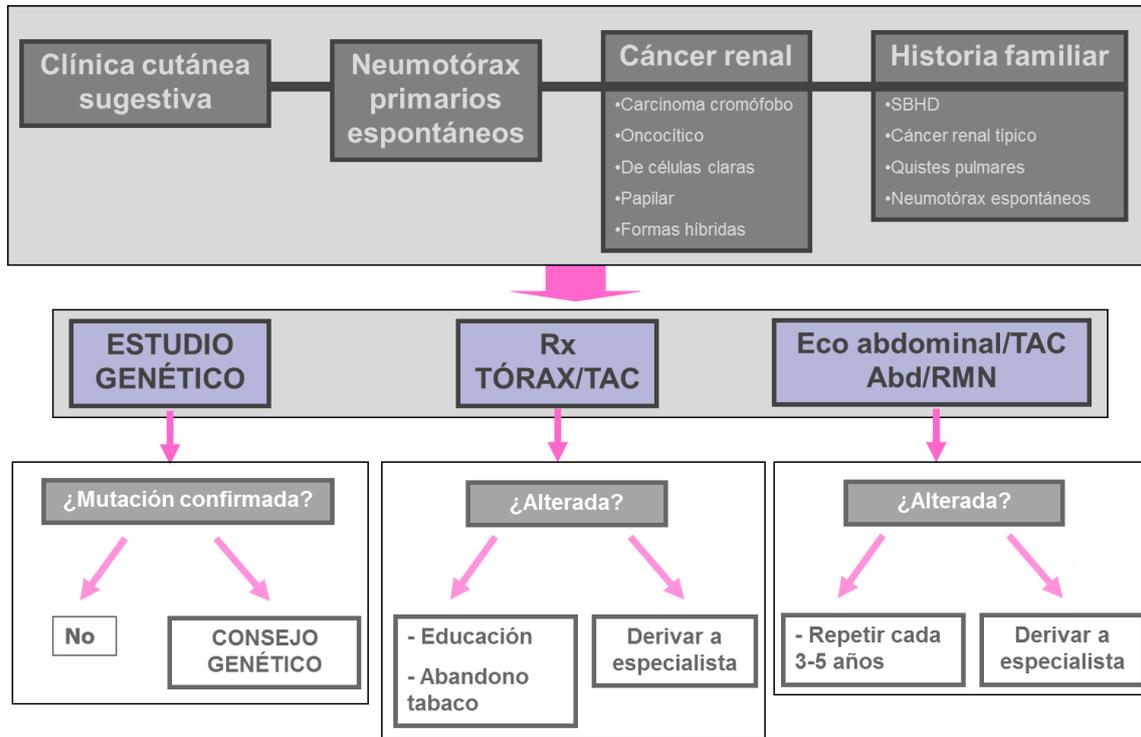


Figura 35. Manejo del paciente con sospecha de síndrome Birt-Hogg-Dubé.

1.5. OTROS PROCESOS QUE PRESENTAN LESIONES CUTÁNEAS, RENALES O PULMONARES SIMILARES

1.5.1. Lesiones cutáneas

El diagnóstico diferencial ante un paciente con lesiones papulosas a nivel facial debe establecerse con otros síndromes, entre los que encontramos la enfermedad de Cowden, el síndrome de Brooke-Spiegler, el síndrome Rombo, la esclerosis tuberosa o el síndrome de hamartomas foliculares basaloides (5,128,132–137) (figuras 36-38). El diagnóstico puede realizarse gracias a las características clínicas y el estudio histológico. La tabla 6 muestra las principales características de cada uno de ellos.

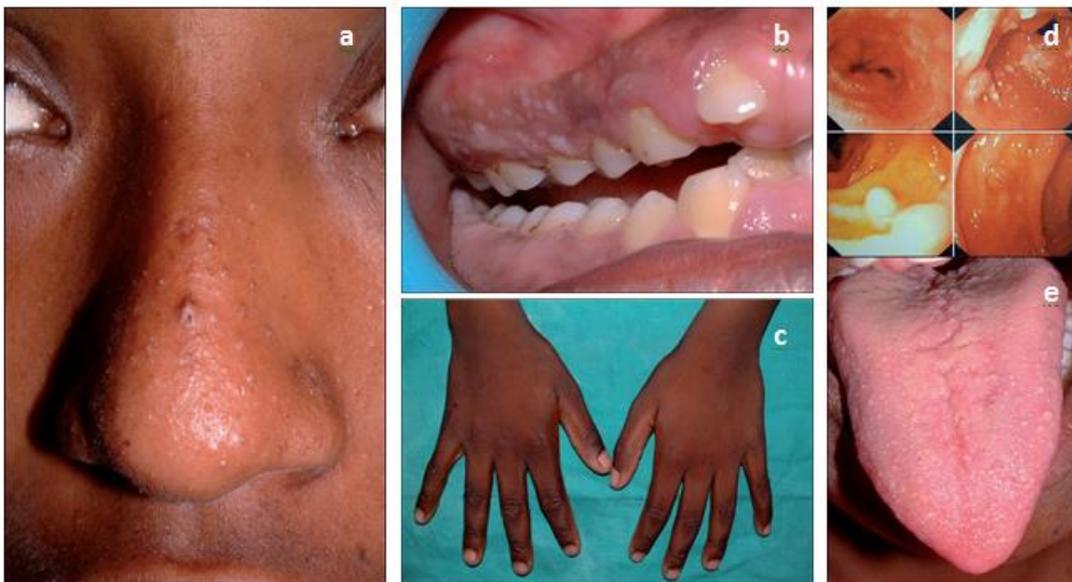


Figura 36. Imagen mostrando las principales características de la enfermedad de Cowden. a. Tricolemmomas faciales. b y e. Lesiones papilomatosas a nivel oral. c. Queratosis acras. d. Pólipos en tracto gastrointestinal.



Figura 37. Imagen mostrando las principales características de la esclerosis tuberosa. a. Angiofibromas faciales. b. Mácula hipopigmentada. c. Manchas café con leche. d. Placa de piel chagrín. e. Fibroma periungueal.

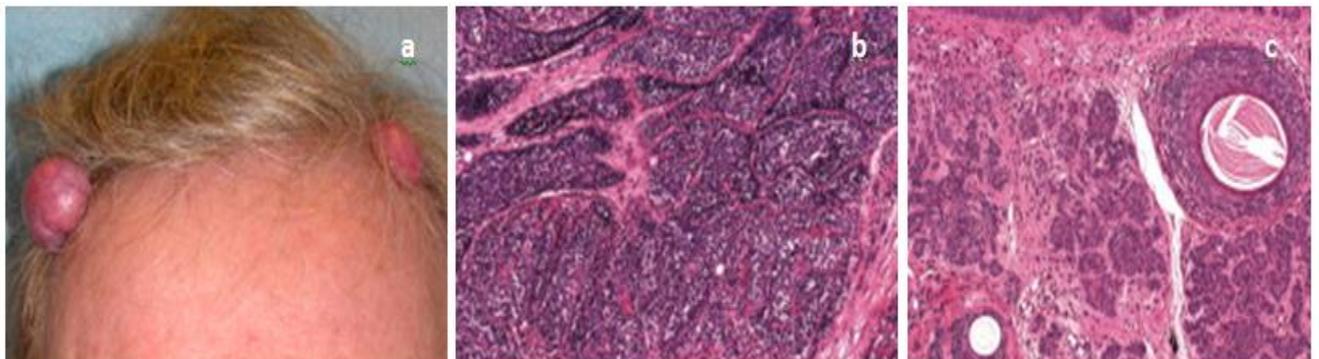


Figura 38. Imagen mostrando las principales características del síndrome Brooke-Spiegler. a. Cilindroma y fibrofolliculoma en cuero cabelludo. b. Imagen histológica con hallazgos compatibles de cilindroma. c. Imagen histológica con hallazgos compatibles con fibrofolliculoma. Imagen tomada de Doherty y cols., 2008. (138)

Tabla 6.- Diagnóstico diferencial ante un paciente con lesiones papulosas en la cara. Tabla tomada de López V. y cols.(131)

Enfermedad	Patrón de herencia	Etiología	Edad de inicio	Cutánea	Clínica	Extracutánea	Asociación a cáncer
Enfermedad de Cowden	HAD	Mutación línea germinal gen PTEN (crom. 10q23)	20-30 años	-Tricolemomas faciales (alrededor de boca, nariz y orejas). -Lesiones papilomatosas con aspecto empedrado en cavidad oral y labios. -Queratosis acras. -Fibromas escleróticos.		-Macrocefalia -Retraso mental	-Mama: Adenocarcinoma, fibroadenoma y enfermedad fibroquística. -Carcinoma tiroideo. -Pólipos hamartomatosos en tracto gastrointestinal (+frec. en colon).
Esclerosis tuberosa	HAD (50-70%). Mutaciones nuevas.	Gen TSC1 (cromosoma 9q34, hamartina) y TSC2 (cromosoma 16p13, tuberina)	Infancia	-Angiofibromas faciales -Placa fibrosa de la frente -Máculas hipomelanóticas lanceoladas, poligonales, en confeti. -Placa de piel chagrín. -Fibromas periungueales. -Manchas café con leche.		-Endocrinas: pubertad precoz, hipotiroidismo. -Oculares: hamartomas retinianos, placas retinianas acrómicas. -Esqueléticas. -Dentales. -Pulmonares -Renales: quistes. -Neurológicas. -Cardíacas.	-Rabdomioma cardíaco. -Angiomiolipomas múltiples bilaterales renales.
Sd. Brooke-Spiegler y Sd. Rombo	HAD	Cromosoma 9p21.	Infancia	-Sd. Brooke-Spiegler: Tricoepiteliomas y cilindromas. -Sd. Rombo: Atrofia vermiculada, milia, hipertricosis, tricoepiteliomas, carcinomas basocelulares, vasodilatación periférica.		Ninguna	Ninguna
Síndrome de hamartomas foliculares basaloideos	HAD	Desconocida	Nacimiento- infancia	Hamartomas foliculares basaloideos.		Marcador de miastenia gravis.	Ninguno
Síndrome Birt-Hogg-Dubé	HAD	FLCN (cromosoma 17p11.2 (foliculina)	A partir de los 25 años.	-Fibrofoliculomas -Tricodiscomas -Acrocordones -Angiofibromas faciales. -Pápulas en mucosa oral.		-Quistes pulmonares. -Neumotórax.	Cáncer renal

1.5.2. Lesiones renales

En la tabla 7 se recogen brevemente los principales diagnósticos diferenciales del carcinoma hereditario renal.

<i>Tabla 7.- Principales diagnósticos diferenciales del carcinoma hereditario familiar</i>			
Síndrome	Cromosoma afecto	Tumor renal predominante	Otras asociaciones
SBHD	17p11.2	Formas híbridas (cromóforo y oncocitoma)	Fibrofoliculomas Quistes pulmonares Neumotórax
Von Hippel-Lindau	3p25-26	Células claras	Hemangioblastomas SNC Angiomas retinales Quistes pancreáticos Tumores neuroendocrinos del páncreas Feocromocitomas
Esclerosis tuberosa	9q34, 16p13	Células claras	Angiofibromas Rabdomiomas cardíacos Angiomiolipomas renales Tumores SNC
Carcinoma renal papilar hereditario	7q34	Papilar tipo 1	Ninguna
Carcinoma renal y leiomioma hereditario	1q42-43	Papilar tipo 2	Leiomiomas cutáneos y uterinos
Carcinoma medular	11p	Carcinoma medular	Anemia de células falciformes

1.5.3. Lesiones pulmonares

Los neumotórax espontáneos familiares pueden presentarse en diferentes procesos hereditarios. Así, cuando nos encontramos ante un paciente con historia familiar de neumotórax espontáneo y quistes pulmonares el diagnóstico diferencial debe plantearse con otras entidades que pueden presentarse con cambios quísticos en el parénquima pulmonar (139). Entre ellos, el déficit de α 1-antitripsina, el síndrome de Marfan, el síndrome de Ehlers-Danlos, la linfangioleiomiomatosis, la esclerosis tuberosa, la histiocitosis de células de Langerhans o la fibrosis quística. La fibrosis pulmonar idiopática, la infección por *Pneumocystis jiroveci*, la neumonía intersticial linfocítica o el embolismo séptico también deberían incluirse en el diagnóstico diferencial. La localización de los quistes pulmonares, el antecedente de historia familiar, así como la presencia de otras lesiones acompañantes, sobre todo dermatológicas, nos orientan al diagnóstico.

En los pacientes con linfangioleiomiomatosis (LAM), especialmente aquellos asociados al complejo esclerosis tuberosa, se acompañan de lesiones cutáneas y renales que son normalmente angiofibromas y angiomiolipomas. Además, a diferencia del SBHD en el que no encontramos predilección por sexos, la LAM ocurre fundamentalmente en mujeres en la tercera y cuarta década de la vida. Los quistes en la LAM son más uniformes en tamaño, redondeados y con una distribución difusa.

La neumonía intersticial linfocítica y la neumonía por *Pneumocystis* se acompañan de una clínica característica, junto con cambios en el parénquima pulmonar a modo de quistes irregulares, opacidades, consolidaciones y nódulos.

La histiocitosis pulmonar de células de Langerhans aparece en adultos, en relación con el hábito tabáquico y se caracteriza por lesiones quísticas

irregulares y nódulos que afectan predominantemente las zonas medias y superiores del pulmón, respetando las bases.

1.6. TRATAMIENTO Y MANEJO DEL PACIENTE

En las lesiones cutáneas, el tratamiento debería considerarse por motivos estéticos. Desafortunadamente, a pesar de la variedad de tratamientos descritos en la literatura, no existe un tratamiento gold standard para los fibrofoliculomas y tricodiscomas que se presentan en el SBHD.

Recientemente, Pritchard y cols. han descrito su buena respuesta en una paciente de 51 años con tricodiscomas y fibrofoliculomas faciales con electrodisecación a bajas energías (140). Es una técnica simple, segura, con bajo coste, a disposición de prácticamente cualquier dermatólogo que podría considerarse una buena alternativa en el tratamiento estético de estas lesiones. Del mismo modo, otros autores proponen el empleo de otra técnica sencilla como es el curetaje y la electrocoagulación a bajas energías con resultados satisfactorios (141). Además del tratamiento quirúrgico, se ha descrito el uso de isotretinoína oral, láser CO2 y láser erbio:YAG (5,142,143). Korge y cols. describen una reducción en el número de lesiones con tretinoína tópica y metronidazol; mientras que Junkins-Hopkins y cols. no encuentran respuesta con el empleo de isotretinoína oral (144,145). Los derivados del ácido retinoico podrían ser útiles si se confirma que los fibrofoliculomas se originan a partir de glándulas sebáceas. Vernooij y cols. sugieren que podrían ser eficaces de manera preventiva para evitar su aparición pero no cuando estas lesiones están ya establecidas (19).

El láser ablativo es útil en el tratamiento de otros tumores anexiales, por lo que también puede emplearse en estas lesiones hamartomatosas. Así, Gambichler y

cols describieron el tratamiento con láser erbio:YAG (spot 1.5mm, fluencia $5\text{J}/\text{cm}^2$, energía de pulso 340mJ) en las lesiones cutáneas de un paciente con síndrome Birt-Hogg-Dubé (142). Defienden que el empleo del láser permite obtener unos resultados estéticos mejores, con menor tasa de recidiva y con la posibilidad de acceder a zonas de localización anatómica donde tal vez el acceso quirúrgico sea más complicado. Posteriormente, en el año 2001, Jacob y cols. utilizan la combinación de láser CO₂ y erbio:YAG para el tratamiento de un paciente de 46 años con lesiones similares (143). Emplearon el láser dióxido de carbono (Coherent Ultrapulse 5000C; Coherent, Palo Alto, Calif) con los siguientes parámetros: 300mJ por pulso, 60W, con forma 2, tamaño 9 y densidad de 5 con un total de 2 pases. Las lesiones se trataron de manera individual con un cabezal de 3mm con forma 2, tamaño 9 y densidad de 5 con un total de 3 a 5 pases hasta el aplanamiento de la lesión. Posteriormente, las lesiones fueron tratadas con un pase de láser Er:YAG (CB Erbium/2.94; Continuum Biomedical, Dublin, Calif) con fluencias de $5.2\text{J}/\text{cm}^2$ (cabezal de 7mm, 2J) con una superposición de los pases del 50%. Se repitió una segunda sesión a los 2 meses del primer tratamiento empleando valores similares (143).

Los tratamientos láser descritos hasta ahora presentan una alta tasa de recidiva; se ha visto que las lesiones recidivan tras el tratamiento en 2 o 3 años e incluso en meses y no son efectivas para prevenir la aparición de estas lesiones (142). Además, no están exentas de efectos secundarios, como la aparición de hipo o hiperpigmentaciones o cicatrices residuales. Wee y cols. describen el caso de dos pacientes con múltiples fibromas discoides familiares, una dermatosis extremadamente rara que se caracteriza por múltiples fibromas discoides, que típicamente aparecen en la región facial sobre la segunda década de vida con similitud a las lesiones que aparecen en el SBHD. Los tratan con la aplicación tópica de rapamicina en solución oral 1 mg mL^{-1} (Rapamune®; Pfizer, Tadworth, UK) dos veces al día con importante mejoría de las lesiones tras 16 semanas de

tratamiento (146). La rapamicina es un inhibidor mTOR empleado como fármaco inmunosupresor en los trasplantes de órganos. A partir de su aplicación en otras patologías, como la esclerosis tuberosa, donde la vía mTOR está afectada, se ha empleado en otras entidades, como el SBHD (147,148). A raíz de los resultados observados por otros autores con la rapamicina tópica en lesiones similares (146–148), en el año 2014, Gijzen y cols. llevaron a cabo un ensayo clínico a doble ciego para valorar la eficacia del tratamiento con rapamicina tópica (0,25ml dos veces al día de rapamicina en solución oral 1mg/ml) en el manejo de estas lesiones (27). Recogieron un total de 19 pacientes con al menos 10 fibrofoliculomas faciales a los que trataron con rapamicina (sirolimus) en solución oral 1mg/ml y una solución de placebo cada mitad de la cara, respectivamente. Dichos tratamientos se aplicaban dos veces al día durante un total de 6 meses. Los pacientes fueron evaluados en el momento basal, a los 3 y a los 6 meses del inicio de tratamiento realizando una exploración de las lesiones faciales, valorando el tamaño y el número de lesiones presentes en cada visita, así como la mejora cosmética. Estos autores no encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el empleo de rapamicina o placebo en ninguno de los parámetros estudiados por lo que proponen el empleo de esta sustancia por vía oral o tópicamente en concentraciones más altas aunque habrá que esperar a futuros estudios para ver los resultados.

Respecto a la presencia de lesiones renales, el estadiaje en caso de diagnóstico de cáncer renal no difiere de aquellos pacientes sin síndrome asociado. Una vez diagnosticado, en aquellas lesiones menores de 3 cm, se aboga por un tratamiento conservador y se recomienda control mediante pruebas de imagen. En las lesiones de mayor tamaño, el tratamiento es en la mayor parte de los casos quirúrgico, pero intentando preservar, en la medida de lo posible, la mayor cantidad de parénquima renal, empleando la cirugía conservadora de

nefronas en lugar de la nefrectomía radical en aquellos casos donde sea posible (73). En casos metastásicos, se podría considerar el uso de análogos de la rapamicina dada la implicación del gen FLCN en la regulación de la vía mTOR, aunque todavía son necesarios más estudios que demuestren su beneficio (5).

En cuanto al manejo de la afectación pulmonar, los pacientes con síndrome Birt-Hogg-Dubé pueden presentar mayor riesgo de neumotórax cuando se someten a cambios de presión, como viajes en avión o actividades acuáticas como el buceo. No está clara la necesidad de limitar o desaconsejar este tipo de actividades, pero se debe indicar al paciente de este riesgo, así como educarle sobre la sintomatología y signos con los que se puede manifestar. En lo referente al hábito tabáquico, no existen suficientes datos que avalen una clara asociación pero sí que se ha observado una mayor prevalencia de cáncer renal y neumotórax en pacientes fumadores, por lo que debe desaconsejarse su empleo (52).

Pimenta SP y cols. encuentran resultados alentadores en el tratamiento de la afectación pulmonar con doxicilina 100mg/d, observando un aumento de la función pulmonar y una disminución de los niveles séricos y urinarios de metaloproteasa-9 (149). La doxiciclina es un inhibidor de las metaloproteasas que, como se ha comentado previamente estarían implicadas en mantenimiento de las fibras de colágeno y fibras de elastina de la matriz extracelular. Así, una sobreexpresión de estas implicaría una disregulación de sus niveles con la consecuente destrucción tisular y aparición de lesiones quísticas (150,151). Por este motivo, estos autores sugieren que la doxiciclina podría ser una alternativa en el tratamiento de la patología pulmonar de los pacientes con SBHD (149).

1.7. JUSTIFICACIÓN DE LA TESIS

1.7.1. Hipótesis

En este trabajo planteamos que:

- Un grupo de pacientes portadores de mutación germinal en el gen FLCN no presenta las típicas alteraciones cutáneas.
- Un grupo de pacientes cuyo único motivo de consulta son neumotórax recidivantes y/o bilaterales presenta el síndrome de Birt-Hogg-Dubé.
- La presencia de una doble mutación o inactivación bialélica del gen FLCN podría ser necesaria para el desarrollo de los tumores cutáneos y/o de las lesiones pulmonares.

1.7.2. Objetivos

Para el desarrollo de esta tesis, se han propuesto los siguientes objetivos:

1. Detectar la presencia de mutaciones o deleciones en línea germinal del gen FLCN en los pacientes con fibrofoliculomas o tricodiscomas.
2. Determinar la presencia de mutaciones o deleciones en línea germinal del gen FLCN en los pacientes con neumotórax recidivantes y/o bilaterales.
3. Estudiar las mutaciones somáticas del gen FLCN en muestras tumorales cutáneas y pulmonares de estos pacientes.
4. Estudiar la metilación del gen FLCN en los pacientes con fibrofoliculomas o tricodiscomas, y/o antecedentes de neumotórax.

5. Estudiar la expresión tisular de foliculina en fibrofoliculomas y tricodiscomas y en las lesiones pulmonares.
6. Identificar lesiones cutáneas y/o pulmonares, así como mutaciones germinales o somáticas del gen FLCN en los familiares de primer grado de los pacientes incluidos en este estudio.

2. METODOLOGÍA

2.1. MATERIAL

Éste es un estudio descriptivo, retrospectivo clínico, histopatológico, inmunohistoquímico y genético de una serie de pacientes con fibrofoliculomas o tricodiscomas y/o neumotórax recidivantes o bilaterales.

2.1.1. Muestras estudiadas

Se ha incluido en este trabajo todos aquellos pacientes con diagnóstico clínico y/o histológico de fibrofoliculomas o tricodiscomas; todos aquellos con diagnóstico de neumotórax recidivantes y/o bilaterales en el Hospital Clínico Universitario de Valencia en los últimos 15 años (1995-2012) y los familiares en primer grado de los pacientes incluidos en los puntos anteriores.

El estudio incluyó un total de 39 sujetos (22 varones y 17 mujeres). Se recogió un consentimiento informado escrito por cada paciente y familiares incluidos en el estudio. Éste fue evaluado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Clínico Universitario de Valencia el cual certificó que los aspectos éticos y científicos relacionados con el proyecto de investigación reunían las características adecuadas referentes a información a los pacientes y cumplimiento de los criterios éticos para la investigación médica y biomédica establecidos en la Declaración de Helsinki (Junio 1964, Helsinki, Finlandia) de la Asamblea Médica Mundial, y sus revisiones y en la Declaración Universal sobre el Genoma Humano y los Derechos del Hombre de la UNESCO y los acuerdos del Protocolo Adicional del Consejo de Europa para la protección de los Derechos del Hombre y de la dignidad del ser humano frente a las aplicaciones de la biología y de la medicina (Paris 12-1-1998, ratificado el 23-7-1999).

Las lesiones cutáneas objeto de estudio en este trabajo (fibrofoliculomas y/o tricodiscomas) fueron obtenidas de pacientes procedentes del servicio de Dermatología y Anatomía Patológica del Hospital Clínico Universitario de Valencia. Se incluyeron aquellos pacientes que tenían al menos una lesión de fibrofoliculoma y/o tricodiscoma confirmada histológicamente.

Se revisó el archivo general de historias clínicas del Hospital Clínico Universitario de Valencia recogiendo aquellos pacientes que habían presentado neumotórax espontáneo en los últimos 15 años (1995-2012). De ellos, se seleccionaron para nuestro estudio solamente aquellos con diagnóstico de neumotórax recidivantes y/o bilaterales.

2.2. MÉTODOS

2.2.1. Estudio clínico

Los datos clínicos generales y de seguimiento se obtuvieron a partir de las historias clínicas del archivo del Hospital Clínico Universitario de Valencia. Se citaron a cada uno de los pacientes en el departamento de Dermatología del Hospital Clínico Universitario y se les realizó una exploración exhaustiva del tegumento cutáneo y cavidad oral. Se recogieron aquellas lesiones sugestivas de acrocordones, fibrofoliculomas, tricodiscomas, lipomas, pápulas orales, angiofibromas y/o colagenomas. Las lesiones fueron fotografiadas y se biopsiaron aquellas lesiones sugestivas de fibrofoliculomas y/o tricodiscomas. Se realizó una historia clínica completa anotando sistemáticamente los antecedentes de quistes y tumores renales, patología tiroidea, patología gastrointestinal y antecedentes de neumotórax recurrentes. Se definió la

presencia de neumotórax recurrentes como aquellos que ocurrieron ipsilateralmente a tan solo 7 días de la resolución del neumotórax previo. Junto a la exploración clínica, se les solicitó una radiografía de tórax, una ecografía renal y, en aquellos casos con resultados radiológicos inespecíficos, una tomografía axial computarizada toraco-abdominal para detectar la presencia de quistes pulmonares, identificando el número, la localización y el tamaño; o la presencia de lesiones renales.

Además, se realizó la extracción de 10 ml de sangre periférica en tubo EDTA para el estudio genético. Todas las muestras de sangre total procedentes de los casos fueron enviadas a laboratorios externos para su amplificación y secuenciación.

Los parámetros clínicos evaluados en cada paciente fueron los siguientes:

- Sexo: femenino o masculino.
- Edad: Edad actual y edad en el momento de aparición de la clínica cutánea y/o pulmonar.
- Antecedentes familiares: diagnóstico de SBHD, neoplasia previa o neumotórax.
- Número, tipo y localización de lesiones cutáneas (fibrofoliculomas y/o tricodiscomas) en cada paciente.
- Desarrollo de otras lesiones cutáneas diferentes a fibrofoliculomas o tricodiscomas.
- Existencia de neumotórax, así como número de episodios y localización.
- Número de pacientes con antecedentes de neumotórax que presentan lesiones cutáneas características del síndrome.
- Existencia de alteraciones renales.
- Presencia de otras neoplasias en los pacientes incluidos en el estudio.

- Detección de mutaciones o deleciones en el gen FLCN en muestras de sangre y muestras tisulares de los pacientes incluidos en el estudio.
- Detección de metilación en el gen FLCN en muestras tisulares de los pacientes incluidos en el estudio.
- Identificación de lesiones cutáneas (tipo, número y localización) en familiares de primer grado de los pacientes incluidos en el estudio.
- Identificación de patología pulmonar en familiares de primer grado de los pacientes incluidos en el estudio.
- Detección de mutaciones o deleciones en el gen FLCN en muestras de sangre y en muestras tisulares en familiares de primer grado de los pacientes incluidos en el estudio.

2.2.2. Estudio histológico

El análisis histológico se realizó sobre muestras de tejido cutáneo y pulmonar fijadas en formaldehído tamponado al 10%, que fueron procesadas en alcoholes a concentraciones crecientes (deshidratación) y en xiloles, para, a continuación, ser incluidas en parafina. Se realizaron secciones de 3 micrómetros y se montaron en portaobjetos con Poly-L-Lysina para diagnóstico histopatológico mediante hematoxilina-eosina.

La hematoxilina-eosina es la técnica de tinción histológica convencional, en la que se emplea la hematoxilina para teñir el núcleo celular de azul y la eosina, que por su naturaleza ácida, tiñe el citoplasma de rojo a rosa. A continuación, se describe el protocolo de la tinción que se siguió:

- Incubamos las muestras a 60°C aproximadamente 20 minutos antes de desparafinar.

- Se sumergieron los preparados histológicos en xilol (Merck co) para eliminar los excesos de parafina durante 5 min.
- A continuación, se realizaron pases por etanol (Merck co) en concentraciones decrecientes (90º/80º/70º) para rehidratar, de 2 a 5 veces en cada uno.
- Se realizó la tinción nuclear con Hematoxilina de Harris, 5 minutos y enjuagamos con agua destilada 2 minutos para eliminar los excesos y se sumergieron las muestras en ácido clorhídrico al 0,5% (Merck co).
- Lavamos con agua corriente y luego con hidróxido de amonio (Merck co). Nuevamente realizamos un lavado rápido con agua corriente.
- Para la tinción citoplasmática, se sumergieron las muestras en eosina durante 4 minutos y lavamos con agua corriente (inmersiones rápidas). Posteriormente, para deshidratar la muestra se realizó otra serie de pases en etanol en orden creciente (70º/80º/90º), aproximadamente de 30 segundos cada uno.
- Finalmente se aclararon con xilol, 1 minuto, y se realizó el montaje final con “entellan” y cubreobjeto para observar la laminilla al microscopio.

Para el diagnóstico histológico de fibrofoliculoma o tricodiscoma se emplearon los siguientes criterios. Se diagnosticaron de fibrofoliculomas aquellas lesiones típicamente verticales o perpendiculares a la epidermis, centradas por un folículo piloso bien desarrollado, alrededor del cual se observaron la presencia de largas y delgadas proyecciones epiteliales, del tipo del manto folicular, que en ocasiones terminaban en glándulas sebáceas maduras, y que estaban típicamente rodeadas por un estroma fibrovascular con variable componente mixoide dibujando un patrón retiforme. Por el contrario, se empleó el término de tricodiscoma para el diagnóstico de aquellas lesiones orientadas horizontalmente, cubiertas por una epidermis aplanada y formada por fibras de colágeno fino distribuidas desordenadamente o con un patrón estoriforme

constituidas exclusivamente por un estroma idéntico al fibrofoliculoma y rodeadas en la base por unidades foliculo-sebáceas (152).

2.2.3. Estudio inmunohistoquímico

La inmunohistoquímica constituye una herramienta muy útil en dermatopatología, ya que ayuda no sólo en el diagnóstico, sino también en el diagnóstico diferencial y pronóstico de procesos inflamatorios y neoplasias cutáneas, siendo especialmente útil para determinar el origen de un tejido o la diferenciación de células neoplásicas.

Las técnicas inmunohistoquímicas son técnicas de inmunolocalización de antígenos tisulares o celulares mediante su unión con anticuerpos específicos marcados por un enzima. Por ello, la reacción antígeno-anticuerpo se visualiza añadiendo al final de la reacción el sustrato de la enzima más una sustancia que absorbe o emite luz, o bien produce coloración, al dar lugar a un precipitado insoluble y coloreado.

En las técnicas de inmunoperoxidasa se emplean como marcadores enzimas capaces de colorear sustratos incoloros. La enzima peroxidasa es el trazador, junto con la fosfatasa alcalina, más comúnmente empleada en inmunohistoquímica. Los cromógenos más comunes son la diaminobenzidina (color marrón), el aminoetilcarbazol (color rojo) y el nitroazul de tetrazolio (color azul). En las técnicas de inmunofluorescencia se utilizan como marcadores compuestos fluorescentes que bajo luz ultravioleta emiten luz de longitud de onda visible, dependiente de la naturaleza del compuesto.

Cuando se trata de la técnica con anticuerpos marcados indirectamente, el anticuerpo secundario se une al primario, que a su vez ya se ha unido al

antígeno específico en estudio. En otras ocasiones, estos marcadores pueden unirse directamente al anticuerpo primario.

La técnica empleada en nuestros casos se realizó siguiendo el protocolo que se detalla a continuación:

- a. Se seleccionaron en primer lugar las secciones tumorales más representativas que incluyesen la práctica totalidad del tumor. En estas, se seccionaron y microdisecionaron manualmente para obtener tanto tumor como tejido sano. Se realizaron secciones de 3 micrómetros en los bloques seleccionados.
- b. Desparafinación
 - Se calentaron las preparaciones histológicas en estufa de 65 °C durante 30 minutos.
 - Posteriormente, se incubaron dichas secciones en xilol durante 15 minutos y luego se realizaron 3 pases por xilol limpio durante 5 minutos.
- c. Rehidratación
 - Se lavaron con alcohol absoluto.
 - Se lavaron con alcohol al 70%.
 - Se lavaron con alcohol al 50%.
 - Se lavaron bien con agua y agua destilada.
- d. Desenmascaramiento antigénico
 - Se realizó la recuperación antigénica en tampón citrato con pH bajo (EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50x) (Dako, código K8005). Se incubaron las secciones en dicho tampón durante 3 minutos, a 1.5 atmósferas de presión, en autoclave.
- e. Bloqueo de peroxidasa endógena
 - Una vez realizada la descompresión del autoclave se dejaron enfriar las preparaciones en los respectivos tampones y después

se lavaron con agua, agua destilada y por último con TBS comercializado por Dako

- (EnVision™ FLEX Wash Buffer (20x) (DM831); solución salina tamponada con Tris que contiene Tween 20, concentrada 20 veces, pH 7.6 (± 0.1); para su uso se realizó una dilución 1:20 con agua destilada).
- Se incubaron las preparaciones en solución de bloqueo de peroxidasa comercializada por Dako durante 10 minutos, que es una solución tamponada que contiene peróxido de hidrógeno y conservante (Ref. S2023).
- No se bloqueó el colágeno para evitar la tinción de fondo inespecífica, ya que gracias a la presencia de proteínas estabilizantes en los reactivos de Dako utilizados no es necesario (según la información aportada por la casa comercial).

f. Anticuerpo primario

- El anticuerpo empleado para estudiar la expresión de Foliculina en secciones de las biopsias incluidas en parafina fue el anticuerpo policlonal FL-342 (Folliculin) de Santa Cruz (nº de catálogo: SC-25777) obtenido en conejo.
- Se lavaron 3 veces con TBS.
- La dilución empleada para el anticuerpo primario fue de 1/100 en diluyente de anticuerpo comercializado por Dako
 - (EnVision™ FLEX Antibody Diluent Ref. K8006; Tampón Tris, pH 7,2 que contiene 15 mmol/L de NaN₃ y proteína).
- Se incubó una hora a temperatura ambiente.

g. Sistema de visualización

- Se lavaron 3 veces con TBS.
- En el caso de los anticuerpos secundarios, se realizó una incubación con EnVision durante 30 minutos.

- (Dako REAL™ EnVision™/HRP, Rabbit/Mouse (ENV) Ref. K5007); se trata de dextrano unido a moléculas de peroxidasa y moléculas de anticuerpo secundario de cabra frente a inmunoglobulinas de conejo y ratón en solución tamponada, que contiene proteína estabilizante y conservante. Este reactivo es un polímero conjugado con peroxidasa, que también está recubierto de anticuerpos frente a las inmunoglobulinas de conejo y de ratón. Se compone de un esqueleto de dextrano al que se han unido un gran número de moléculas de peroxidasa (HRP) y moléculas de anticuerpo secundario. Para la reacción de unión se ha utilizado una química única, que permite la unión de hasta 100 moléculas de HRP y hasta 20 moléculas de anticuerpo por esqueleto.
- El anticuerpo secundario unido al esqueleto de dextrano se ha obtenido de cabras, y reacciona igualmente bien con inmunoglobulinas de conejo y ratón.
 - Se lavaron 3 veces con TBS en todos los casos.
 - Se lavaron con agua destilada.
 - Visualización de la reacción
 - Para la visualización de la reacción se incubaron las preparaciones durante 5 minutos en DAB (Substrate Working Solution) suministrada por el kit Dako REAL™
 - (EnVision™ Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse (Código K5007). El kit contiene un Frasco B (Dako REAL™ Substrate Buffer) con 250 mL de solución tamponada que contiene peróxido de hidrógeno y conservante, y un Frasco C (Dako REAL™ DAB+ Chromogen) con 5 mL de 3,3'

diaminobenzidina en solución de cromógeno. La solución Substrate Working Solution, que contiene DAB (CHROM), se prepara mezclando bien 20 µL de Dako REAL™ DAB+ Chromogen (frasco C) y 1 mL de Dako REAL™ Substrate Buffer (frasco B). El sistema de sustrato produce un producto final marrón claro en el lugar del antígeno diana).

- Se paró la reacción lavando con agua destilada.
- h. Tinción de contraste
 - Se utilizó tinción de hematoxilina-eosina.
 - Se lavaron las preparaciones con agua destilada.
- i. Deshidratación
 - Se realizó con pases en alcoholes de graduación creciente hasta etanol absoluto.
- j. Aclarado
 - Se realizó mediante pases en Xilol.
- k. Montaje
 - Se cubrieron las preparaciones con cubreobjetos y Entellan®.

La expresión de foliculina en las lesiones cutáneas (epitelio y estroma lesional) y pulmonares (mesotelio) fue valorada por un patólogo utilizando una escala de 0 a 5. La escala empleada fue la siguiente:

- NV (no valorable): cuando las características de la inmunotinción no pudieron ser evaluadas de forma concluyente (controles negativos, inmunotinción inconstante, paradójica o no reproducible).
- 0: negativo.
- 1: pérdida parcial de inmunotinción citoplásmica y/o nuclear.

- 2: inmunotinción citoplásmica pura.
- 3: mayor inmunotinción citoplásmica que nuclear.
- 4: mayor inmunotinción nuclear que citoplásmica.
- 5: inmunotinción nuclear pura.

2.2.4. Procedimientos de extracción de ADN

2.2.4.1. De muestras sanguíneas

Las muestras de los pacientes fueron extraídas mediante venopunción en tubos Vacutainer que contenían K₃EDTA (1 mg/mL) como anticoagulante, aproximadamente unos 10ml de sangre total. El aislamiento de ADN fue realizado por un método automatizado.

- En primer lugar, se preparó un concentrado de buffy coat, parte de la sangre total que contiene la mayor parte de los leucocitos. Para ello se centrifugó la sangre total a 2500 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- Después del centrifugado, se puede observar tres fracciones claramente diferenciadas: el plasma en la parte superior, la capa leucocitaria en la parte intermedia y el concentrado de hematíes en la parte inferior (figura 39).

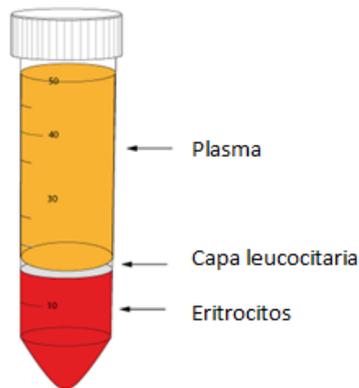


Figura 39. Figura en la que se aprecia las fracciones en las que se divide la sangre total tras el centrifugado.

- Recogimos 200 μ l de la capa leucocitaria y añadimos 200 μ l de la solución tampón AL a la muestra y mezclamos con agitador vortex durante 15 segundos. Incubamos a 56°C durante 10 minutos.
- Añadimos 200 μ l de etanol (96-100%) a la muestra y mezclamos de nuevo mediante vórtex 15 segundos. Colocamos cuidadosamente esta mezcla en una columna Spin QIAamp y centrifugamos a 8000 rpm durante 1 minuto.
- Añadimos 500 μ l de tampón AW1 y centrifugamos de nuevo a 8000 rpm durante 1 minuto.
- Añadimos 500 μ l de tampón AW2 y centrifugamos a 14000 rpm durante 3 minutos.
- Añadimos 200 μ l de agua destilada e incubamos a temperatura ambiente (15-25°C) durante 1 minuto y centrifugamos a 8000 rpm durante 1 minuto.

2.2.4.2. De muestras tisulares

Se realizó macrodissección manual con bisturí de las muestras de tumores incluidos en parafina para seleccionar las áreas lesionales de los hamartomas cutáneos y lesiones pulmonares de los cuales iba a extraer ADN (figura 40).



Figura 40. Macrodissección con bisturí en el bloque de parafina.

A continuación, se llevaron a cabo los siguientes pasos:

- Se realizaron secciones de 5-10 μm de grosor. Se incluyeron en un tubo de microcentrífuga y añadimos 1ml de xileno vorteadando durante 10 segundos. Centrifugamos a máxima velocidad durante 2 minutos a temperatura ambiente. Removimos el sobrenadante y volvimos a añadir 1ml de xileno, vorteamos durante 10 segundos y centrifugamos a máxima velocidad durante 2 minutos a temperatura ambiente.

- Añadimos 1ml de etanol (96-100°C) y mezclamos vorteando. Centrifugamos a velocidad máxima durante 2 minutos a temperatura ambiente y removimos el sobrenadante.
- Añadimos nuevamente 1ml de etanol (96-100°C) y mezclamos vorteando. Centrifugamos a velocidad máxima durante 2 minutos a temperatura ambiente y removimos el sobrenadante. Incubamos a temperatura ambiente (15-25°C) durante 10 minutos con el tapón del tubo de microcentrífuga abierto.
- Añadimos 180 µl de tampón ATL, añadimos proteinasa K y mezclamos vorteando. Incubamos a 56 °C durante 2 horas y a 90 °C durante 1 hora. Centrifugamos durante 15 segundos.
- Añadimos 200 µl de tampón AL y mezclamos vorteando.
- Añadimos de nuevo 200 µl de etanol (96-100°C) y mezclamos vorteando. Traspasamos a una columna QIAamp MinElute y centrifugamos a 8000 rpm durante 1 minuto.
- Añadimos 500 µl de tampón AW1 y centrifugamos a 8000 rpm durante 1 minuto. Desechamos el sobrenadante líquido y cambiamos el resto a un tubo de microcentrífuga nuevo.
- Añadimos 500 µl de tampón AW2 y centrifugamos a 8000 rpm durante 1 minuto. Desechamos el sobrenadante líquido y centrifugamos a velocidad máxima 14000 rpm durante 3 minutos.
- Añadimos 50 µl de tampón ATE, incubamos a temperatura ambiente durante 1 minuto y centrifugamos a velocidad máxima 14000 rpm durante 1 minuto.

2.2.5. Medida de la concentración de ADN

La medida de la concentración de ADN se realizó con un espectrofotómetro Nanodrop-1000, basado en la Ley de Lambert Beer, que relaciona la densidad óptica con la concentración (figura 41). Así, la absorbancia de luz ultravioleta (UV) a 260 nm (A_{260}) igual a 1, corresponde a una concentración de 50 ng/ μ l de ADN de doble cadena. Los datos espectrales permiten evaluar la presencia de contaminantes en la muestra, tales como EDTA, fenol o guanidina. La pureza se evalúa mediante los ratios de absorbancias a A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{230} . La proporción A_{260}/A_{280} indica la presencia de proteínas y debe aproximarse a 1,8 en ADN puro, mientras que A_{260}/A_{230} detecta contaminaciones y debe encontrarse entre 1,8 y 2,2.

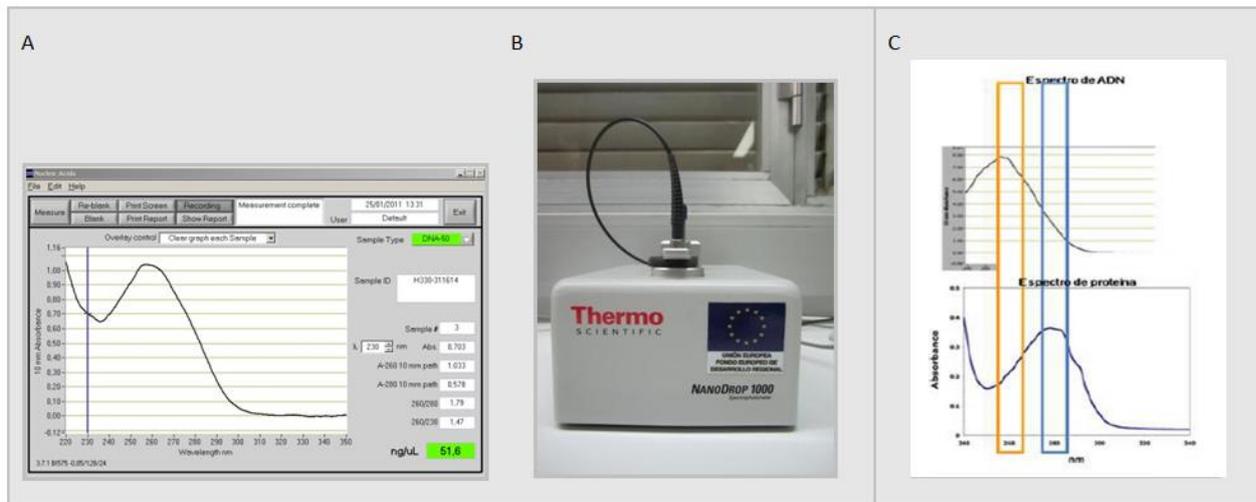


Figura 41. A. Curva de medición de la concentración de ADN en una de las muestras. B. Espectrofotómetro Nanodrop-1000. C. Espectro de absorción de ADN y de proteína.

2.2.6. Procedimientos para la detección de mutaciones en ADN en los genes FLCN

2.2.6.1. Secuenciación por Sanger

Se secuenció el gen FLCN en cada una de las muestras mediante PCR y secuenciación capilar. La PCR es una técnica rápida y eficaz para conseguir un gran número de copias de una región de interés de ADN, ya que en cada ciclo de amplificación se duplica el número de copias de esta región, de manera que podemos obtener millones de copias de un fragmento de ADN a partir de pequeñas cantidades de muestra.

Para la realización de esta técnica se necesitan deoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs sigma), una enzima recombinante termoestable para duplicar las cadenas de ADN (Taq polimerasa QIAGEN), 1,5mM de iones Mg^{2+} , cebadores específicos de la secuencia que queremos amplificar o primers, una solución tampón o buffer que mantiene el pH adecuado para el funcionamiento de la ADN polimerasa y la muestra de ADN.

La PCR se fundamenta en la repetición de tres etapas: desnaturalización, hibridación y extensión (figura 42). En la primera etapa, los puentes de hidrógeno formados entre las bases son eliminados y se produce la separación de las cadenas de ADN por medio del incremento de temperatura, hasta llegar a 94-96 °C. En la etapa de hibridación, la temperatura disminuye, oscilando entre 40 y 65 °C, para que los cebadores hibriden con la secuencia complementaria en el ADN molde. La temperatura dependerá de la longitud y contenido en guaninas y citosinas de los cebadores. De esta manera, la polimerasa une el híbrido de la cadena molde y el cebador, y empieza a sintetizar ADN. La tercera etapa, de extensión, se realiza a 72 °C generalmente, la temperatura a la que la enzima tiene la máxima actividad. En ésta, la polimerasa sintetiza, a partir del

cebador, una nueva hebra de ADN complementaria a la hebra molde añadiendo los dNTPs complementarios en dirección 5' → 3', uniendo el grupo 5'-fosfato de los dNTP con el grupo 3'-hidroxilo del final de la hebra de ADN creciente.

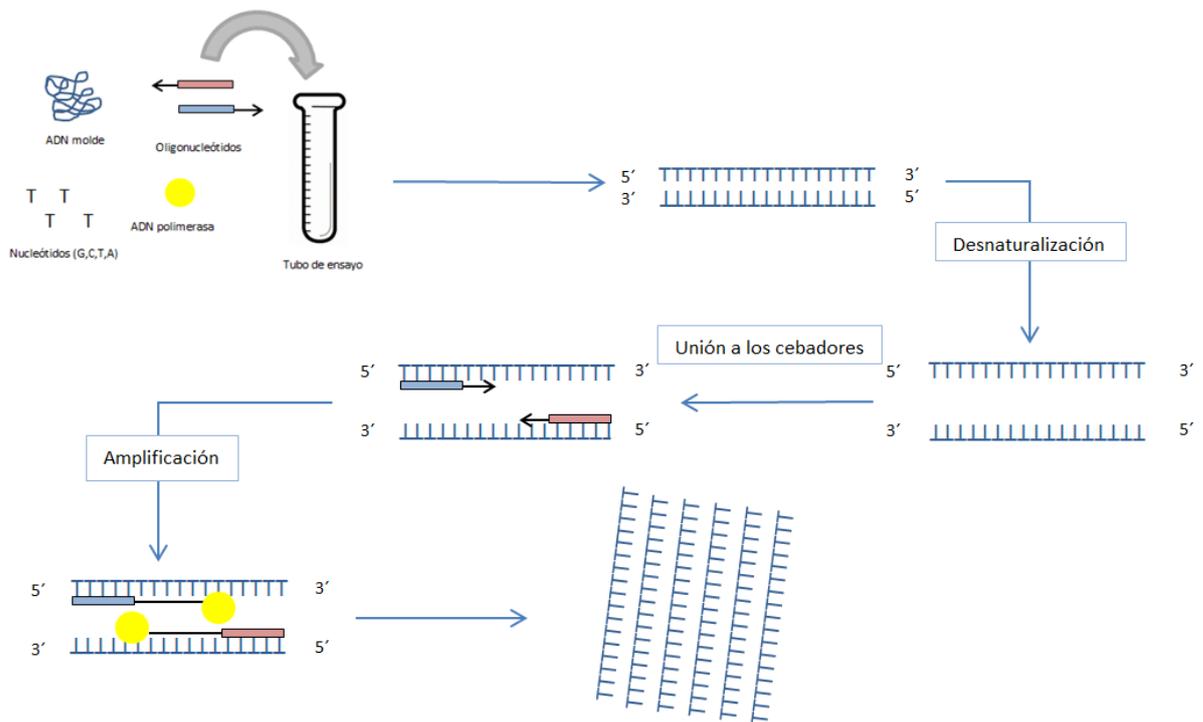


Figura 42. Esquema de la PCR.

Para la amplificación de cada uno de los exones del gen FLCN, se utilizaron los siguientes cebadores:

Tabla 8. Secuencias de los primers.

<i>EXON</i>	<i>PRIMER FORWARD (5'-3')</i>	<i>PRIMER REVERSE (5'-3')</i>
Promotor	GGT TGG CTA TAT TTA CCC TCA AAT CTC	CAG GAG CGA CCA CAC TCA CTC
Exón 1	CAG TGT TGG GTG GTG GTA CG	CAA CGA AAA CTC GGA CAT GC
Exón 2	TGA GAC TGG CTG TAA GCT GCTC	TCA GGG GAA GAG AAA TAA GGT TCC
Exón 3	GTC TCC CTC TCT GAC TCC CAC AC	AAG CCG CTA ACT CTA GGA AGA AGC
Exón 4	GAG GTT TCA TGG AGT CAA TAG GC	CTC TCA GGT CCT CCT GTC CAT C
Exón 5	AAC AGA TTT ACT TTT CCT TTT CAT GGAC	GTG GGC TCC CAC AGA GAC AG
Exón 6a	GGC TTT GAT TTG GTG TCA CTA AGC	GAA GGG CCA GGA GTT GAT GAG
Exón 6b	CTG GTA CAG CAT CAT CAC CAT CAT	GGC TGT AAG CAG AGG GGA AGA C
Exón 7	TTA AAG AGG CCA TCC CTT CC	CCT AAC AGA TAT GCC AAA AGC AG
Exón 8a	CCT GCT GGT GTT CTT TTA TAC CC	ACG AGA CAG GAA ATC ACA ACA ATC
Exón 8b	CTC TGA ATC AGC CCA GAA CGA G	CAG ATC AGG AAC CTG GGG AAG
Exón 9	GCA GCC AGG AAT CTA CAC TGA C	AGT CAC TTC CTG CAG GGT TTT G
Exón 10	AAA CCA TTT CTA CTA GTC ACG CTG AA	CCG CAC ACC TAA GGA AAA GAT G
Exón 11	CTT CCT CGT GTC CTT GGT CTG	CTG AGG CGT GGG GAA CCT
Exón 12	AGT CTT TTC ACC AGC AGC CTT C	CTC CCA CTG GTC ACC ACA AAC T
E12E13	GGA TGA CCA GTC TCT CAG CAA GTA	GTC AGA GCC GCT TCA ATC TTA TTC
Exón 13	CCC AGG CAG AGT GTC CTT TT	CTT TTG GAA ACA GCT CCA GGT TT
Exón 14	GGT GTG GAT TCC AGC TCT GC	GAC AGC CAT CCC TGT CTT TAG G

Las reacciones se llevaron a cabo utilizando un volumen de 25 μ l que contenía Taq polimerasa (QIAGEN), 0.4 μ M de cada cebador y ADN de cada lesión en cantidad suficiente para poder llevar a cabo la PCR. La secuenciación se llevó a cabo usando Big Dye Terminator y empleando un 3730 DNA analyzer. Se realizaron varias repeticiones de PCR y secuenciación para confirmar las mutaciones detectadas.

La mezcla de reacción y el programa de amplificación utilizado fueron los siguientes, para 40 μ l de volumen final:

			Programa de amplificación		
	Volumen (μ l)	Concentración final en tubo	Temperatura	Tiempo	Repeticiones
Tampón 10X MgCl ₂ 15mM	4	1X	95°C	10 min	1
dNTPs 10mM	0,8 (x dNTP)	0,2 mM	95°C	20s	} 35
Agua	20,48	-	64°C	30s	
Cebador F (20 μ M)	2	0,5 μ M	72°C	1 min	
Cebador R (20 μ M)	2	0,5 μ M	72°C	10 min	1
Taq polimerasa 5 U/ μ l	0,32	3,2 U			
Muestra DNA	8				

Una vez realizada la amplificación de ADN, se procedió a analizar los fragmentos obtenidos mediante el sistema Qiaxcel. El sistema Qiaxcel utiliza la electroforesis en gel capilar para permitir una rápida separación de los ácidos nucleicos en base a su tamaño (figura 43). A diferencia de la electroforesis tradicional en gel de agarosa, este sistema separa los ácidos nucleicos en un capilar dentro de un cartucho de gel prefabricado. Cada muestra se carga automáticamente en un capilar individual y el voltaje seleccionado es aplicado durante un tiempo seleccionado también. La carga negativa de las moléculas de ácidos nucleicos migra hasta el extremo positivo.

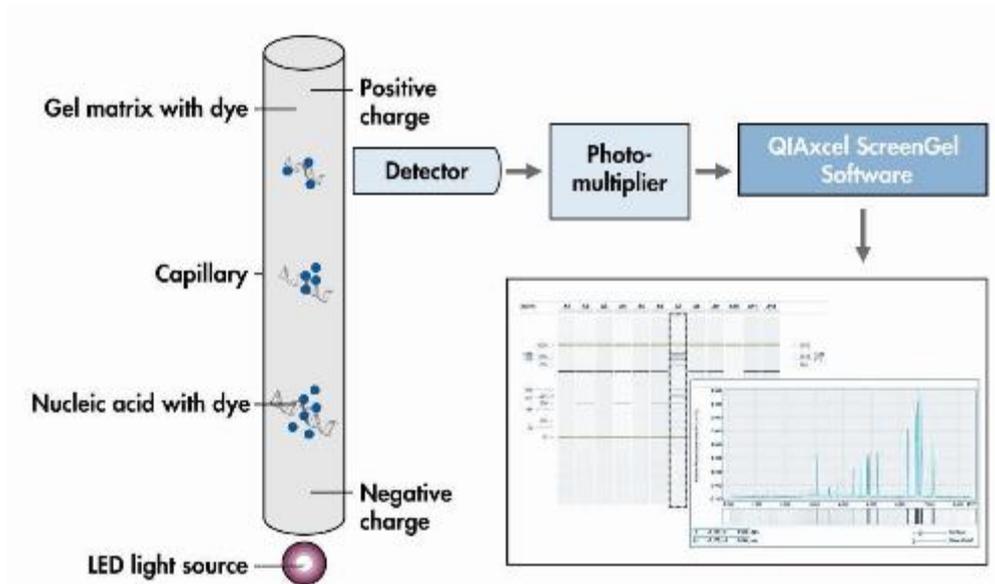


Figura 43. Esquema de funcionamiento del sistema Quiaxcel

Como ocurre en un gel de agarosa tradicional, las moléculas de menor tamaño migran más rápidamente. Mientras las moléculas pasan hacia el extremo positivo, pasan por un detector que detecta y mide la señal de fluorescencia que es convertida en un electroferograma y en imagen por un fotomultiplicador al transformar la señal en datos electrónicos.

Una vez purificado, con el mismo sistema que se utilizó en el Junior, se llevó a cabo el proceso de secuenciación. Por último, se realizó el análisis de las secuencias con el software DNA Sequencing Analysis (Applied Biosystems).

2.2.6.2. Secuenciación masiva

Junto a la secuenciación Sanger, empleamos un método de secuenciación de segunda generación, secuenciación masiva o Next Generation Sequencing (NGS), mediante la cual se realiza secuenciación masiva en paralelo, en el que

millones de fragmentos de ADN obtenidos a partir de una sola muestra se secuencian a la vez. Para ello, se utilizó el 454 Gs Junior (Roche Diagnostics) (figura 44).



Figura 44. 454 Gs Junior (Roche Diagnostics)

Esta técnica se encuentra dividida en tres fases: preparación de la librería de ADN (para la selección, amplificación y secuenciación), emPCR (PCR en emulsión de agua y aceite de las cadenas simples seleccionadas) y la secuenciación (síntesis de la cadena complementaria y detección de los nucleótidos incorporados) (figura 45).



Figura 45. Esquema de la secuenciación masiva.

2.2.6.2.1. Preparación de la librería de ADN

Se generaron, a partir de ADN genómico, amplicones con su secuencia identificadora para poder reconocer cada uno de los individuos según los pasos siguientes:

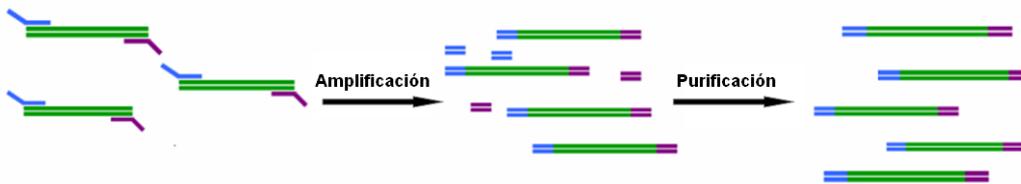


Figura 46. Esquema general de la preparación de la librería.

- **PCR multiplex 1:** Para amplificar las secuencias donde estaban las variaciones a estudiar diseñamos parejas de oligonucleótidos específicos. Estos oligonucleótidos, además, tenían unida una secuencia concreta en uno de sus extremos, cola universal, que sirve para pasos posteriores.

Para la amplificación de la primera PCR multiplex se utilizó un master mix comercial y un pool de las tres parejas de oligonucleótidos de los fragmentos a amplificar. En el programa de PCR se utilizaron las condiciones requeridas por el enzima y los oligonucleótidos. Una vez se puso a punto la multiplex se llevó a cabo la amplificación de todas y cada una de las muestras en placas multipocillo de 384 con el ADN a una concentración de partida de 25 ng/μL.

- **PCR anidada 2 (MIDs):** Con el producto de la PCR anterior se llevó a cabo una segunda PCR. En ésta se utilizó un oligonucleótido que consiste en: una secuencia complementaria a la secuencia de la cola universal de los

oligonucleótidos de la primera PCR, un MID o secuencia de identificación específica para cada uno de los individuos, una secuencia “key” de cuatro bases como referencia para calibrar el detector de intensidad de luz emitida en cada ciclo del aparato de secuenciación masiva y una secuencia que se unirá por complementariedad de bases a la secuencia del oligonucleótido que porta la “bead” o bola en la emPCR (Figura 47).



Figura 47. Estructura de los oligonucleótidos usados en la segunda PCR. En azul, la secuencia específica para unirse a la bola, en rojo la secuencia “key; en naranja/amarillo los dos MIDs distintos y en verde la secuencia complementaria al oligonucleótido universal.

Con este oligonucleótido, se consigue amplificar la secuencia de la PCR inicial al unirse por complementariedad de bases. Como producto, se obtiene cada muestra con su identificador, que será la combinación del MID en 5' y en 3' para leer la secuencia en las dos direcciones, es decir, en “forward” y en “reverse” detectando así ambos MIDs¹³ (Figura 48).

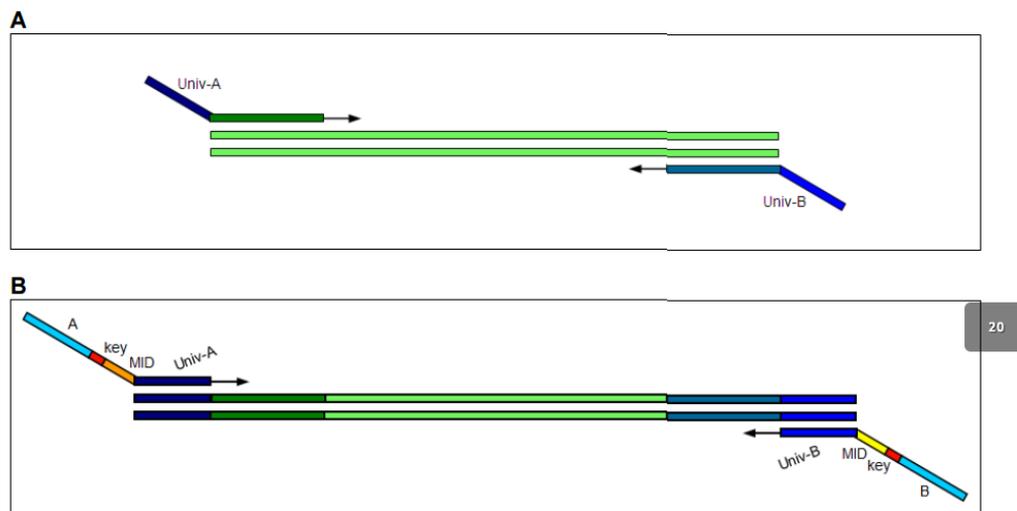


Figura 48. Esquema explicativo de la PCR2. A. En el primer paso, se añadieron las colas universales. B. Segundo paso, se añadieron las secuencias específicas de los adaptadores y las secuencias MIDs.

- **Purificación de la librería:** La purificación se llevó a cabo con el sistema de purificación de productos de PCR con bolas magnéticas Agencourt AMPure XP.
- **Cuantificación de la librería:** La librería purificada, conteniendo los fragmentos de tamaño deseado, se cuantificó usando Quant-iT™ PicoGreen® dsAADNssay Kit (Invitrogen™), midiendo la fluorescencia emitida entre 510-570 nm en el espectrofluorímetro GLOMAX Multi+ DetectionSystem (Promega), según las especificaciones de la casa comercial.

Comparando con una recta patrón generada a partir de un ADN de concentración conocida, se calculó la concentración del pool purificado. Posteriormente, estos pool se diluyeron a $2 \cdot 10^6$ moléculas/ μ L, concentración indicada por el protocolo del 454 GS Junior.

2.2.6.2.2. Amplificación por PCR en emulsión

A continuación, se continuó con la PCR en emulsión. La librería una vez convertida a ssDNA se inmovilizó en las beads. De manera que cada bead contuvo una única molécula de ssDNA de la librería, que se emulsionó con los reactivos de amplificación en una micela de agua y aceite. Cada bead quedó englobada en su propio microrreactor dentro del cual ocurrió la amplificación mediante PCR. El resultado fue una bead inmovilizada conteniendo fragmentos de DNA amplificados clonalmente a partir de una sola molécula (figura 49).

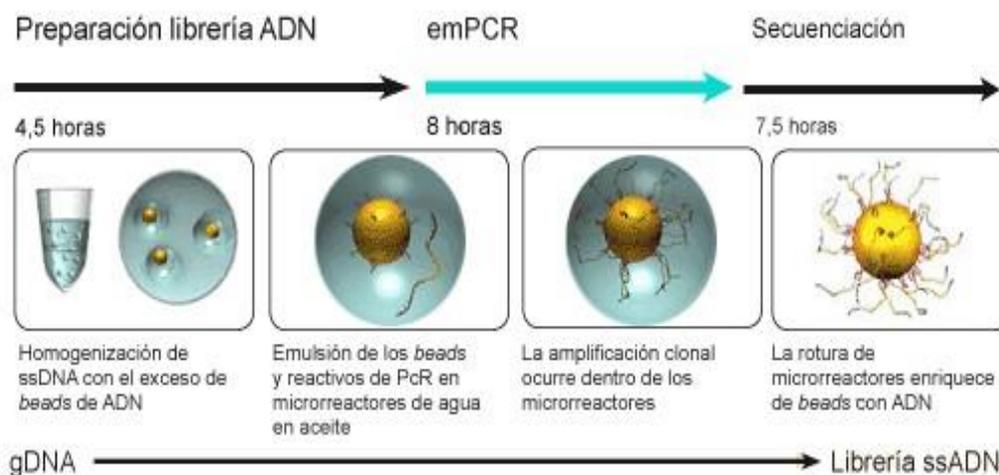


Figura 49. PCR en emulsión (emPCR).

La amplificación se llevó a cabo en microesferas generadas a partir de una emulsión. Lo ideal es que en cada una de esas microesferas haya una molécula de ADN unida a una bola o "capture bead" a través de los oligonucleótidos.

Para amplificar la librería fue necesario calcular el volumen a añadir de cada pool a los reactivos que se indica en el protocolo para que, al final, se unieran una media de dos moléculas por bola. Hay que tener en cuenta que hay 5

millones de bolas por reacción y que nuestro pool estaba a una concentración de $2 \cdot 10^6$ moléculas/ μL :

$\text{Volumen a añadir } (\mu\text{L}) = \frac{\text{N}^\circ \text{ moléculas/bola} \times 5 \cdot 10^6 \text{ bolas}}{2 \cdot 10^6 \text{ moléculas}/\mu\text{L}}$

En los pasos posteriores se inmovilizaron las muestras a las “capture beads” a través de un oligonucleótido complementario al de las muestras amplificadas en la PCR2 unido covalentemente. Se realizó la emPCR intentando que en cada microrreactor generado o microesfera hubiese una molécula unida a una bola y para generar miles de clones en cada uno, de ahí la importancia de ajustar la concentración de la muestra.

Tras el paso de amplificación, se rompió la emulsión para lavar las bolas con el ADN de doble cadena amplificado y se procedió al enriquecimiento de la librería para eliminar las “capture beads” sin muestra y aumentar la proporción de bolas con ADN amplificado. Se elimina la cadena no unida covalentemente a la esfera mediante desnaturalización con NaOH. Posteriormente se unieron a los amplicones los primers de enriquecimiento unidos a biotina para, posteriormente, unirse a unas bolas magnéticas cubiertas de estreptavidina gracias a la unión biotina-estreptavidina. De esta forma, y gracias a un imán, se consiguió separar las bolas magnéticas unidas a las bolas con la muestra, de las bolas sin muestra para eliminarlas.

Este sistema de amplificación y secuenciación proporciona una tecnología eficiente y robusta de amplificación masiva en paralelo. Esto significa que a partir de una sola molécula por bola se genera la librería con miles de copias en la emPCR, separando cada amplificación de forma física gracias a las microesferas.

2.2.6.2.3. Secuenciación

Se trata de una técnica de secuenciación de ADN basada en la detección de pirofosfato liberado (PPi) durante la síntesis de ADN, también denominada pirosecuenciación. En una cascada de reacciones enzimáticas, la luz que se genera es proporcional al número de nucleótidos incorporados. La cascada comienza con una reacción de polimerización de ácido nucleico en el que el PPi inorgánico se libera como resultado de la incorporación de nucleótidos por la polimerasa. El PPi liberado es posteriormente convertido en ATP por la sulfurilasa, que proporciona la energía para que la luciferasa pueda oxidar la luciferina y generar luz. Debido a que el nucleótido añadido es conocido, la secuencia de la plantilla se puede determinar (figura 50).

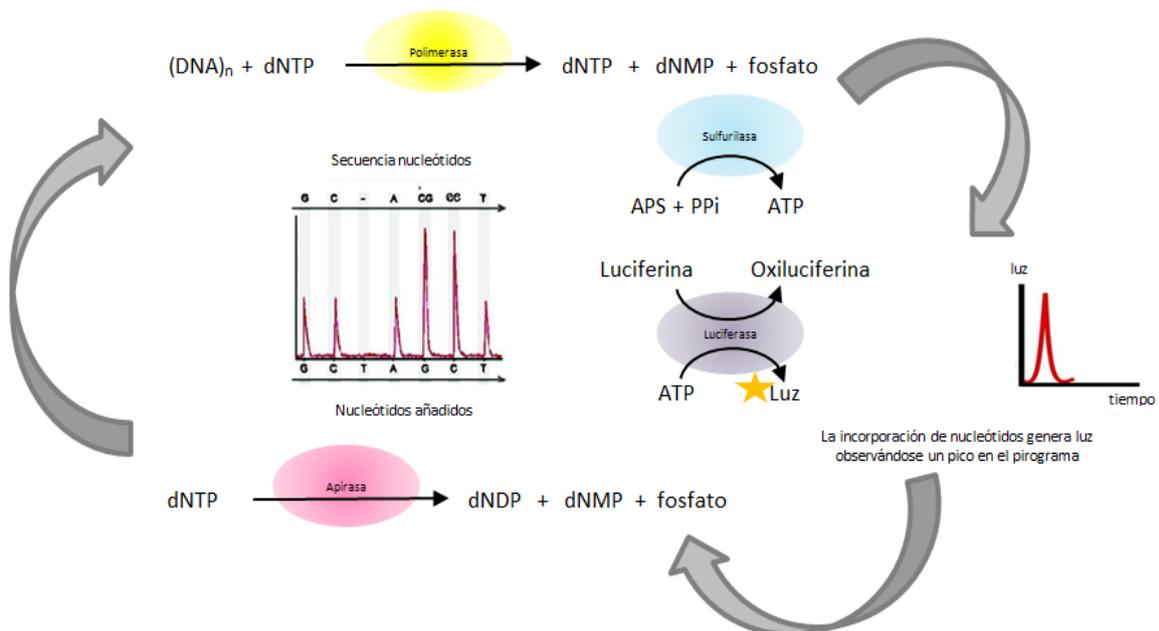


Figura 50. Esquema explicativo de la técnica de la pirosecuenciación.

La adición de cada una de las bases se realiza por ciclos, es decir, en cada ciclo se añade cada uno de los cuatro nucleótidos de manera secuencial y siempre en el mismo orden, y se registran las posiciones en las que se detecta una señal de luz al añadir cada uno de los nucleótidos gracias a la cámara. La intensidad de luz obtenida es proporcional al número de nucleótidos añadidos (Figura 51).

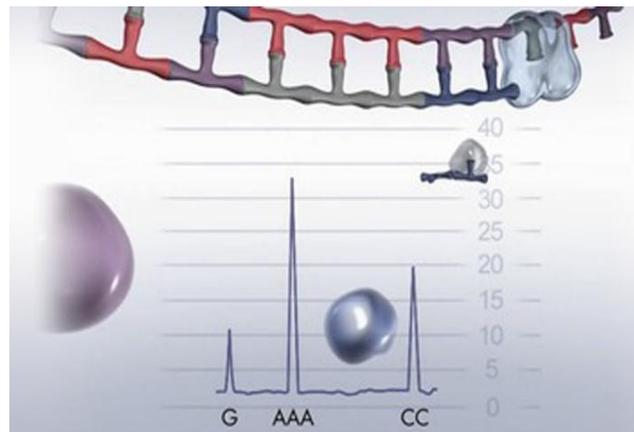


Figura 51. Mecanismo de secuenciación con la cámara CCD del equipo (pirosecuenciación).

Previamente a la reacción de secuenciación deben unirse los oligonucleótidos de secuenciación a las cadenas de ADN ya sintetizadas para que, a partir de éstos, se vayan añadiendo los nucleótidos de la nueva cadena en síntesis. Y, posteriormente, se carga la placa multipocillo con los reactivos necesarios y las muestras, de forma que caiga una bola con ADN en cada uno de los pocillos para que la señal de unos pocillos no interfiera en la de los otros.

La secuenciación es bidireccional, es decir, se sintetizan las dos cadenas de una hebra de ADN de las cuales se obtienen lecturas en “forward” y “reverse” en diferentes esferas; así se aumenta la calidad y precisión de las lecturas para que el error en la secuenciación sea menor. Además, las lecturas tienen una longitud media de 400 pb de forma que cubren la secuencia amplificada completa y la secuencia de los MIDs en cada uno de los extremos.

2.2.6.2.4. Análisis de los datos

Una vez se llevó a cabo la secuenciación, se usó el programa Amplicon Variant Analyzer de Roche (AVA) para analizar las secuencias y detectar las variantes presentes por cada amplicón en el pool de muestras secuenciado, cuántas lecturas corresponden a cada uno de los amplicones por muestra y en cada dirección. También se verificaron en los flujogramas los datos obtenidos y se comprobó si las variaciones encontradas eran artefactos de la secuenciación o podrían ser reales. Con estos datos se definieron los distintos genotipos para cada uno de los pacientes en todos los SNPs encontrados.

Con el objeto de conocer si las mutaciones encontradas se habían descrito previamente y conocer su significado patogénico se utilizaron las siguientes bases de datos:

- a. Ensembl Genome Browser (<http://www.ensembl.org/index.html>). Nos permite obtener importante información genómica, genética, filogenética, fenotípica, bibliográfica y su frecuencia en distintas poblaciones de las variantes.
- b. BHD foundation (<http://www.bhdsyndrome.org/>). En esta página podemos encontrar importante información tanto para pacientes como profesionales de la salud. En ella, existe una base de datos en la que se muestran las mutaciones descritas indicando el tipo de cambio que produce.
- c. Leiden Open Variation Database (LOVD) (https://grenada.lumc.nl/LOVD2/shared1/home.php?selec_db=FLCN). Tiene información sobre una gran cantidad de genes y permite conocer las citas bibliográficas donde se han descrito las mutaciones previamente.

- d. Pubmed. Búsqueda exhaustiva de los casos publicados sobre BHD, recogiendo todas las mutaciones descritas.
- e. The Human Gene Mutation Database (HGMD®, <http://www.hgmd.org>). Consiste en una base de datos que tiene como objeto recopilar las mutaciones de la línea germinal de genes nucleares asociados a enfermedades humanas hereditarias. Esta base de datos fue desarrollada originalmente para el estudio de mecanismos mutacionales en genes humanos, aunque actualmente ha adquirido una utilidad mucho más amplia ya que representa una fuente de referencia actualizada del espectro de lesiones heredables en genes humanos.
- f. SNPeffect (<http://snpeffect.switchlab.org/>). Utiliza herramientas bioinformáticas para el estudio de la secuencia y estructura proteica. Integra herramientas para realizar una predicción de la tendencia a la agregación (TANGO), predicción de tendencia amiloidea (WALTZ), predicción de la unión a chaperonas (LIMBO) y análisis de estabilidad proteica (FoldX).

Tras la búsqueda exhaustiva en todas estas bases de datos, clasificamos las variantes de la siguiente manera (figura 52):

- Variantes patogénicas: serían aquellas variantes con información contrastada de su patogenicidad en las distintas bases de datos o aquellas de nueva descripción que causan un codón de parada prematuro y truncamiento de la proteína.
- Variantes de efecto clínico desconocido (UV): Aquellas variantes de las que se desconoce todavía su clasificación por falta de estudios que lo corroboren.
- Variantes en los intrones

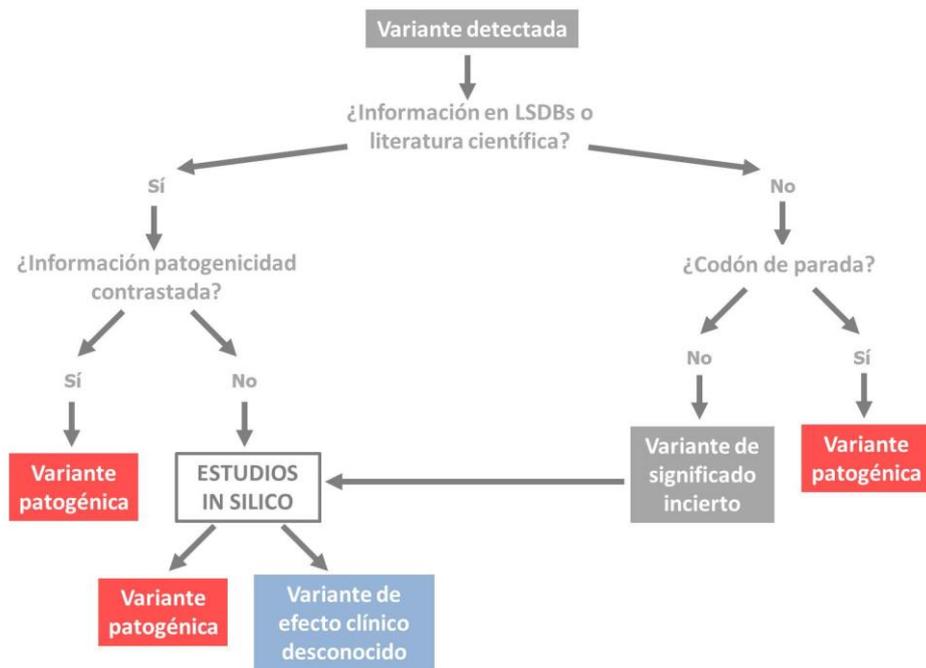


Figura 52. Esquema seguido para considerar una mutación patogénica.

Los Sistemas de Secuenciación Masiva (Next Generation Sequencing) generan enormes cantidades de información, lo que conlleva a estudiar una enorme cantidad de variaciones de la secuencia. Las herramientas de predicción sirven para dar prioridad a las mutaciones descubiertas, haciendo hincapié en las mutaciones que tienen un impacto negativo en la proteína codificada. A todas las variantes de significado clínico desconocido (UVs) se les aplicaron análisis a través de herramientas bioinformáticas (estudios in silico), para poder predecir la patogenicidad de estas variantes sobre la proteína. Se realizaron estudios de predicción del efecto patógeno de las variantes con cambio de sentido (Polyphen-2, SIFT y Pmut) y de predicción del efecto de las variantes en el splicing (Human Splicing Finder). Consideramos patológica una mutación cuando en 2 o más de los estudios de predicción, la mutación resultó ser patogénica.

Polymorphism Phenotyping v2 (Polyphen-2)

Es una herramienta que predice el posible impacto de una sustitución de un aminoácido en la estructura y función de una proteína humana usando consideraciones físicas y comparativas directas. Se puede acceder a través de la siguiente página web <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>.

En ella, se introduce manualmente la secuencia de la proteína (Folliculin) en formato FASTA, el codón donde se produce la variación y, el cambio de aminoácido producido. Las mutaciones son catalogadas como benignas (<0,452), posiblemente dañinas (0,453-0,956) o probablemente dañinas (0,957-1,000).

Sorting Intolerant From Tolerant (SIFT)

Es un algoritmo que predice si un cambio en un aminoácido afectará a la función de la proteína y se apoya en la homología de las secuencias y en las propiedades físicas de los aminoácidos. La predicción SIFT se basa en el grado de conservación de los residuos de aminoácidos en la alineación de secuencias estrechamente relacionadas recogidas a través de PSI-BLAST. Se puede acceder en la siguiente página web <http://sift.jcvi.org/>.

Se requiere el número de identificación ENSP (Protein Ensembl) y la sustitución del aminoácido a estudiar. Los resultados se presentan como la probabilidad de que la sustitución de un aminoácido pueda ser perjudicial o tolerada (expresada como una cifra entre 0 y 1). La sustitución de un aminoácido con una puntuación SIFT de menos de 0,05 se prevé que sea una variante no tolerada (patógena). Uno con una puntuación mayor o igual a 0,05 se prevé que sea tolerable.

pMut

La primera entrada a PMUT es o bien la secuencia de la proteína o su código SwissProt/TrEMBL y las posiciones de las variantes que estudiamos. Se puede acceder a través de la siguiente página web <http://mutpred.mutdb.org/>.

Los resultados llegan al correo electrónico referenciado y, éstos pueden ser un índice de patogenicidad que va desde 0 al 1 (a partir de 0.5 se consideran mutaciones patológicas) y un índice de confianza que van desde 0 (bajo) a 9 (alto).

Human Splicing Finder

Los estudios in-silico se pueden utilizar para predecir el efecto de una variante genética en el sitio de empalme del ARN (sitios de splicing). Se puede acceder a través de la siguiente página web <http://www.umd.be/HSF3/HSF.html>.

En ella, se introduce la secuencia de interés en formato FASTA, teniendo cuidado de utilizar sólo los nucleótidos de una sola letra (A, C, G y T). La consulta permite realizar un análisis de una secuencia para encontrar creación/destrucción de posibles sitios donador (splicing izquierdo o 5')/ aceptor (derecho o 3').

2.2.6.3. Procedimientos para la detección de metilación en el gen FLCN en las muestras tisulares

La metilación del ADN consiste en la adición de un grupo metilo a la posición 5' del anillo pirimidínico de las citosinas que van seguidas de guaninas, denominados nucleótidos CpG. Estos dinucleótidos CpG tienden a concentrarse

en la región promotora de aproximadamente un 60% de los genes codificantes en humanos, configurando las islas CpG, regiones que contienen entre 200 y 2.000 bases con una proporción de CG superior al 50%, y en general se encuentran no metilados en tejidos normales, permitiendo la actividad génica cuando los factores de transcripción correspondientes están disponibles. Esta reacción es llevada a cabo por unas enzimas denominadas DNA metiltransferasas que utilizan S-adenosilmetionina como donante de grupos metilo. En las células tumorales, el patrón aberrante de metilación está caracterizado por una hipometilación global del ADN genómico y por hipermetilación de las áreas promotoras. Tales procesos conducen a inestabilidad genómica y a silenciamiento génico, respectivamente. La represión transcripcional asociada a metilación aberrante de los islotes CpG en áreas promotoras juega un papel muy importante en la regulación de la expresión génica y es responsable de intensos cambios de la estructura de la cromatina. La distribución de las CpGs no es uniforme a lo largo de todo el genoma. La mayoría de las CpGs, que supone el 70% del total, están localizadas en el cuerpo de los genes y secuencias repetitivas del ADN, que incluyen regiones centroméricas, secuencias satélite, y se encuentran metiladas. El 30% restante se encuentra en las islas CpG, secuencias de aproximadamente 1 Kb que fundamentalmente se encuentran en la región promotora de más del 60% de los genes humanos.

El tratamiento con bisulfito sódico nos permite discriminar entre secuencias metiladas y no metiladas ya que convierte las citosinas no metiladas en timidinas, mientras que las citosinas metiladas son resistentes a la reacción por lo que permanecen sin cambios.

Para la conversión del ADN se empleó el kit EZ-96 DNA Methylation-Gold (Zymo Research) utilizando el protocolo indicado por el fabricante. La preparación de

las muestras, reactivos, y protocolo de purificación se hizo tal como recomienda la casa comercial (figura 53).

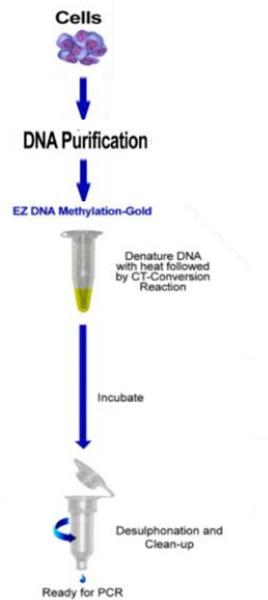


Figura 53. Esquema del proceso de metilación.

Después de convertir, se amplificó y procesó mediante secuenciación masiva siguiendo el protocolo indicado en dicho apartado (figura 54). Para ello, se utilizaron primers específicos, uno para la secuencia metilada y otro para el caso de no estar metilado. Estos primers deben contener 2-3 CpGs para poder discriminar entre secuencias metiladas y no metiladas. Los cebadores específicos para la metilación fueron diseñados como se indica a continuación: BHD-BISF-OF (5'-AGGTTAGGAGTTTAAGATTAGTTTGGT-3') como cebador directo y BHD-BISF-OR (5'-CTCTTATTACCCAAACTAAAATCCAATAA-3') como cebador inverso.

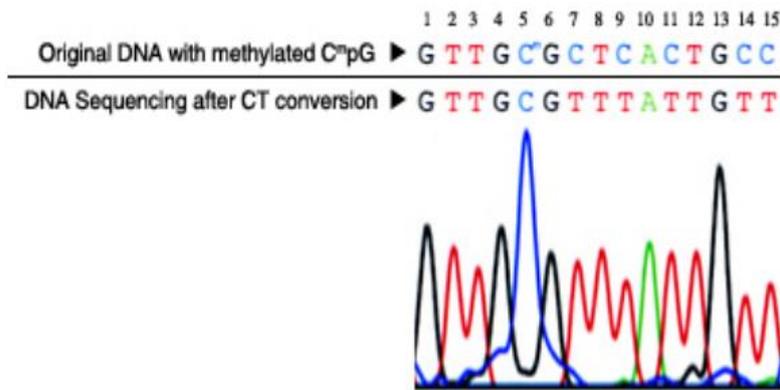


Figura 54. Secuenciación del ADN tras la conversión con bisulfito.

2.2.7. Análisis estadístico

En primer lugar, analizamos, en forma descriptiva, las variables cuantitativas (numéricas) con una distribución normal mediante la media y la desviación típica de cada una de ellas. Las variables cuantitativas que no siguieron una distribución normal se describieron mediante mediana y rango. Las variables cualitativas se presentaron en forma de tabla incluyendo las frecuencias relativas y absolutas.

En nuestro estudio, las condiciones de aplicación de los análisis estadísticos se verificaron previamente a los mismos. Cuando la población estudiada sigue una distribución normal, se emplean las denominadas “pruebas paramétricas”, mientras que las pruebas “no paramétricas” se utilizan cuando la población a estudio es demasiado pequeña, o la información disponible es insuficiente para comprobar la hipótesis de trabajo. La normalidad se contrastó mediante el test de Kolmogorov– Smirnov y la homocedasticidad mediante la prueba de Levene. En caso de incumplimiento de alguna de las condiciones se procedió al análisis mediante pruebas no paramétricas.

Para las variables cuantitativas se llevaron a cabo comparaciones mediante la prueba no paramétrica de U de Mann-Whitney. Si la probabilidad asociada al estadístico de contraste es menor que el nivel de significatividad, se rechaza la hipótesis nula a dicho nivel de significatividad.

En el caso de las variables cualitativas se compararon mediante el test de chi-cuadrado de Pearson, según requerimientos del número de casos.

En todos los casos, el nivel de significatividad empleado ha sido de 5% ($\alpha=0.05$). De este modo, las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas cuando el valor de p asociado a la prueba estadística de contraste era menor de 0,05. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa SPSS v 21.0.

3. RESULTADOS Y DESARROLLO ARGUMENTAL

3.1. RESULTADOS

El estudio incluyó un total de 39 pacientes con diagnóstico clínico y/o histológico de fibrofoliculomas o tricodiscomas y/o neumotórax recidivantes y/o bilaterales registrados entre los años 1995 a 2012 en el Hospital Clínico Universitario de Valencia.

A continuación, analizamos las características clínicas de los pacientes y posteriormente las características histológicas, inmunohistoquímicas y las alteraciones genéticas encontradas en el gen FLCN.

3.1.1. Parámetros clínico-patológicos

3.1.1.1. Sexo

De los 39 casos analizados, 22 eran hombres y 17 mujeres.

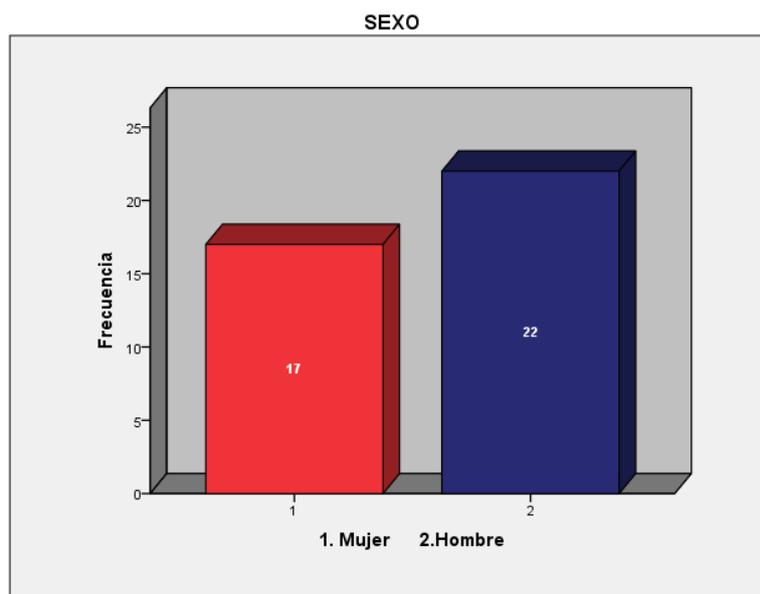


Figura 55. Gráfica mostrando la presencia de SBHD por sexo.

3.1.1.2. Edad

La edad de los pacientes estudiados estuvo comprendida entre los 17 y 89 años, con una edad media de 53,26 y una desviación típica de 16,96.

3.1.1.3. Antecedentes familiares

Los pacientes estudiados presentaban antecedentes familiares de SBHD en el 46,15% de los casos (n=18). 2 de los pacientes recogidos (5,13%) presentaban antecedentes familiares de neumotórax de repetición. La existencia de antecedentes familiares de neoplasia fue del 15,38% (n=6).

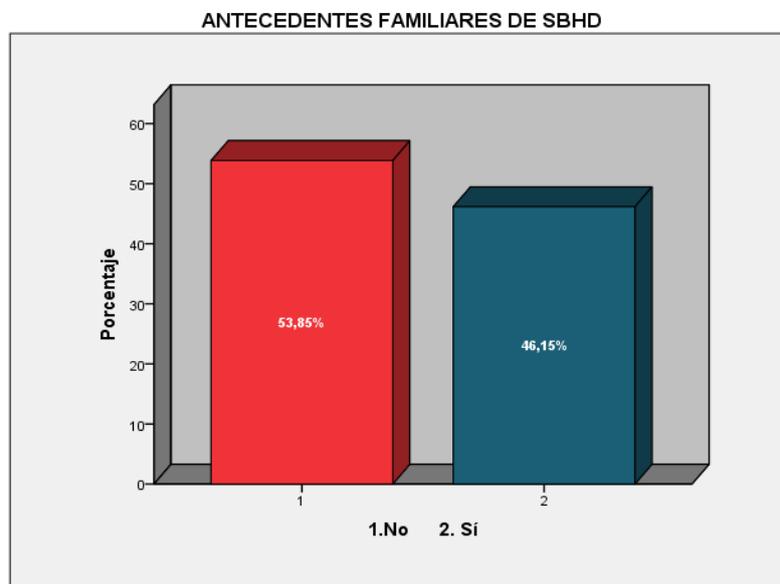


Figura 56. Gráfica mostrando la presencia de antecedentes familiares de SBHD.

3.1.1.4. Afectación pulmonar

Se encontró neumotórax en 15 de los pacientes recogidos (38,5%). El número medio de episodios fue 2,4 y una desviación típica de 1,35. El número mínimo de episodios fue 1 y el máximo fue 5. La localización más frecuente de neumotórax fue el pulmón izquierdo (n=7, 46,7%), seguido del pulmón derecho (n=6, 40%) y de ambos pulmones (n=2, 13,3%). El 73,3% de pacientes presentaron neumotórax de repetición. La edad media de presentación del neumotórax fue de 43,27 años y una desviación típica de 11,01. El paciente más joven presentó el primer neumotórax a los 22 años y la edad máxima de presentación fue a los 65 años. De los pacientes con SBHD, se encontró patología pulmonar en el 26,3% de los casos.

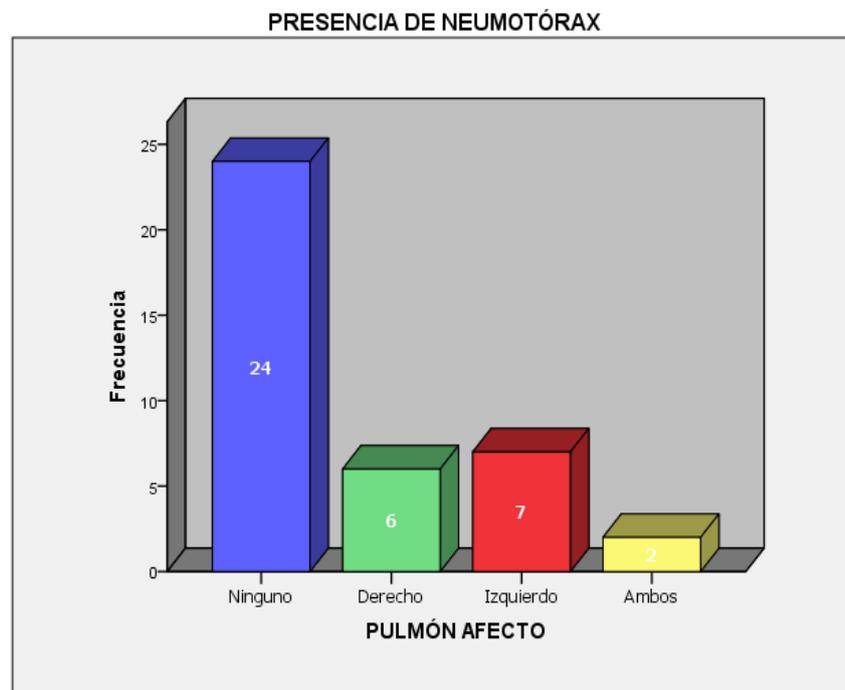


Figura 57. Gráfica mostrando el pulmón afecto de neumotórax en los pacientes con SBHD.

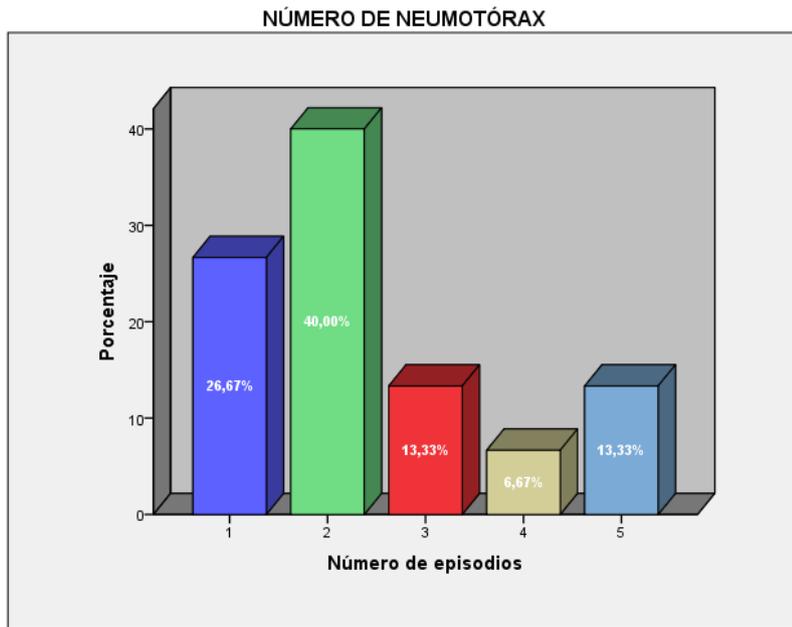


Figura 58. Gráfica mostrando el número de neumotórax en los pacientes con afectación pulmonar.



Figura 59. Radiografía de tórax observando neumotórax izquierdo en uno de nuestros pacientes.

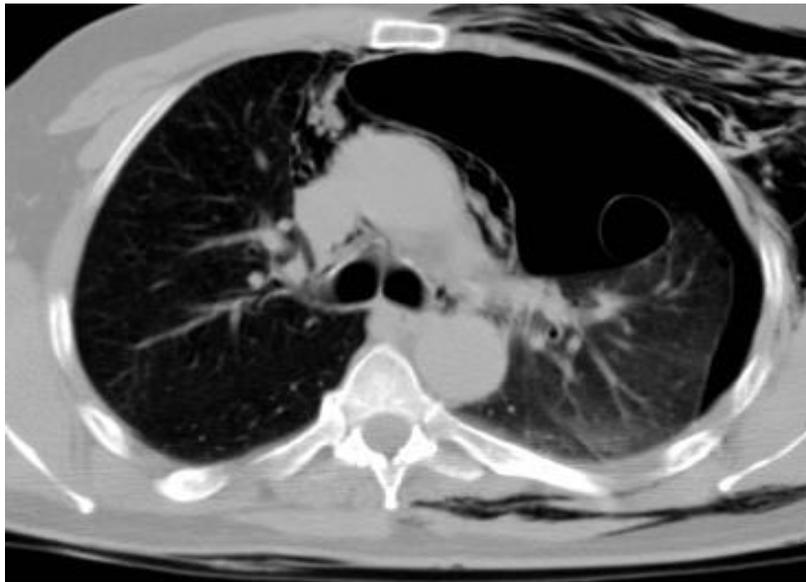


Figura 60. Tomografía axial computarizada en la que se evidencia neumotórax izquierdo en uno de nuestros pacientes.

En cuanto a los quistes pulmonares, se encontraron presentes en el 41% de los casos (n=16). La localización más frecuente de los quistes fue en ambos pulmones (n=13, 33,33%), seguida del pulmón izquierdo (n=2, 5,13%) y el pulmón derecho (n=1, 2,56%).

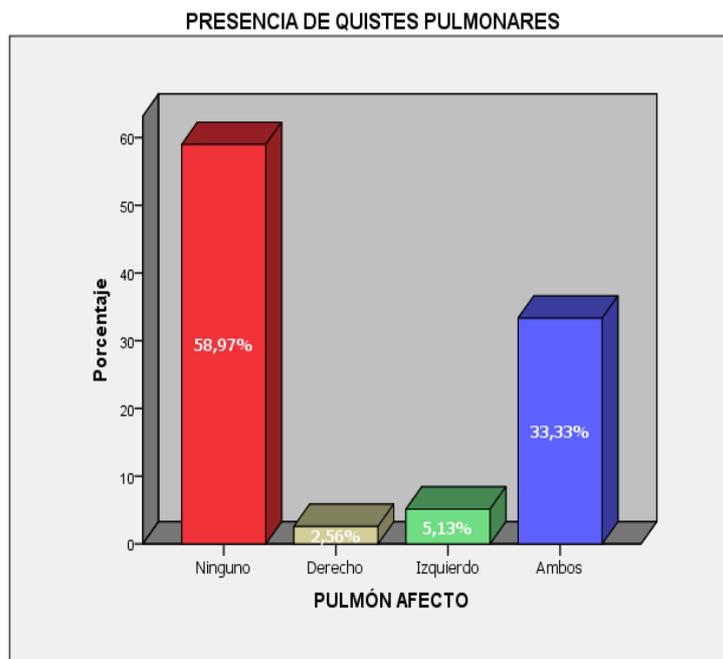


Figura 61. Gráfica mostrando la localización de los quistes pulmonares.

En cuanto a la distribución por sexo, se encontró una predilección por el sexo masculino (75%) frente al sexo femenino (25%). En la tabla 9 y 10, se recogen las principales características clínicas de los pacientes con patología pulmonar.



Figura 62. Tomografía axial computarizada en la que se evidencian quistes en el pulmón derecho de uno de nuestros pacientes.

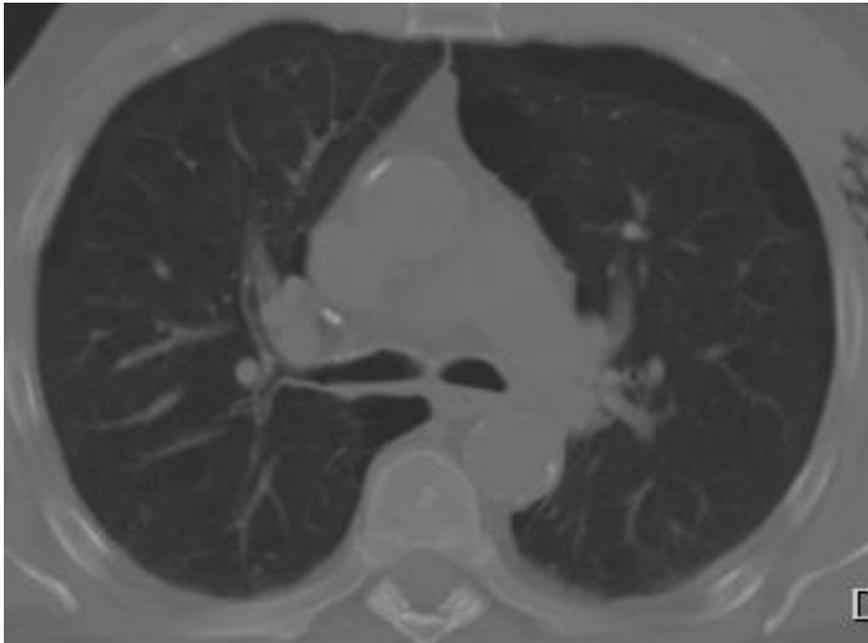


Figura 63. Tomografía axial computarizada en la que se evidencia quistes en el pulmón izquierdo de uno de nuestros pacientes.

Tabla 9. Características clínicas y frecuencias de quistes pulmonares y neumotórax en los pacientes recogidos.

	<i>Número</i>	<i>Porcentaje</i>
TOTAL CON AFECTACION PULMONAR	16	41%
SEXO		
Varones	12	75%
Mujeres	4	25%
FUMADORES		
Sí	14	87,5%
No	2	12,5%
NEUMOTÓRAX		
Sí	15	38,5%
No	24	61,5%
Pulmón derecho	6	40%
Pulmón izquierdo	7	46,7%
Bilateral	2	13,3%
QUISTES PULMONARES		
Sí	16	41%
No	23	59%
Distribución superior	8	50%
Distribución inferior	8	50%

Tabla 10. Características clínicas de los 16 pacientes con patología pulmonar.

Paciente	Edad	Sexo	Hábito tabáquico	Nº NTX	Edad 1er NTX	Pulmón afecto	Afectación cutánea	Cáncer renal	Otras asociaciones	Mutación germinal FLCN
6	70	V	No	1	56	I	Sí	No	CR	c.323G>T
12	50	V	Sí	3	40	B	No	No	No	No
13	70	V	No	2	65	B	Sí	No	Ca.colon, QR	No realizado (†)
17	44	M	Sí	1	38	I	Sí	No	No	No
18	41	M	Sí	3	22	B	Sí	No	QR, pólipo endometrial	No
22	59	V	Sí	4	45	D	Sí	No	No	No
23	60	V	Sí	5	40	I	No	No	Ca.esófago	No
24	63	V	Sí	1	62	I	No	No	Hipoplasia renal	No
26	53	M	Sí	5	43	D	No	No	Ca. Útero	c.573-574delG>AinsT
27	56	V	Sí	2	50	D	Sí	No	No	No
29	45	V	Sí	1	37	D	No	No	No	c.-93C>T
30	48	V	Sí	2	43	I	No	No	No	No
31	73	V	Sí	0	0	Quistes I	Sí	Ca renal dcho	No	c-618<2T>A
32	51	V	Sí	2	39	I	Sí	No	QR, PC	No
35	48	M	Sí	2	37	D	No	No	QR, Ca.mama	No
36	47	V	Sí	2	35	I	No	No	No	No

B: bilateral, CR: cálculos renales, D: derecho, I: izquierdo, M: mujer, NTX: neumotórax, PC: pólipos colon, QR: quiste cortical renal, V: varón, (†): exitus anterior al estudio.

3.1.1.5. Afectación cutánea

Presentaron lesiones cutáneas el 71,8% de los pacientes recogidos (n=28), con una media en el número de lesiones de 17,68 y una desviación típica de 26,31. En los pacientes diagnosticados de SBHD, se encontraron lesiones hamartomatosas características en el 79% de los casos, estando ausentes en el 21%. Las lesiones se localizaron por orden de frecuencia en las axilas, seguidas del área facial, el cuello, el cuero cabelludo, las ingles, las extremidades superiores, el tronco, las extremidades inferiores y la zona genital con una presentación del 32,76%, 17,24%, 17,24%, 6,90%, 6,90%, 6,90%, 5,17%, 3,45% y 3,45%, respectivamente. Dentro del área facial, las lesiones se encontraban con mayor frecuencia en la nariz y las mejillas (33,33%), seguidas por la frente (26,67%) y la región retroauricular (6,67%).

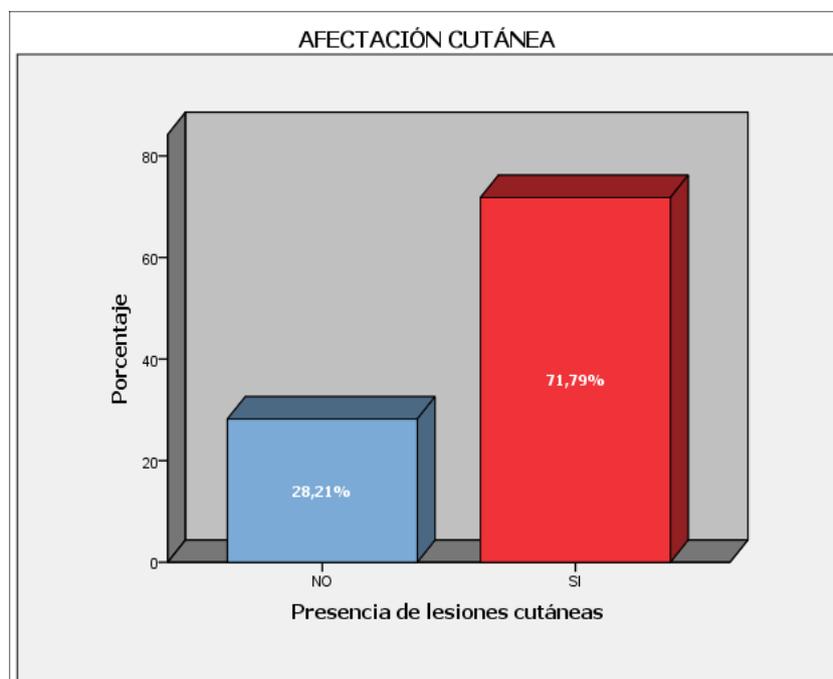


Figura 64. Gráfica mostrando la presencia de lesiones cutáneas.

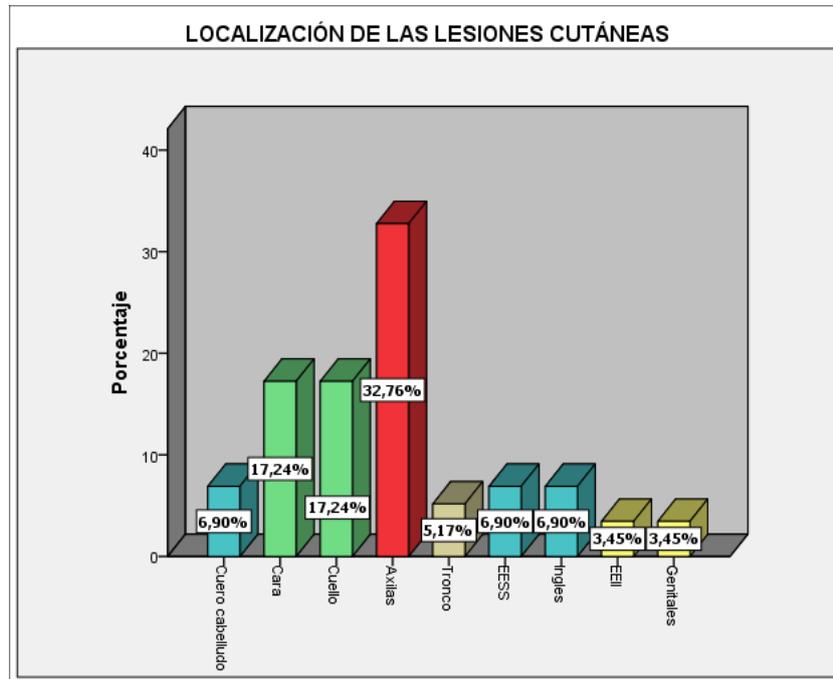


Figura 65. Gráfica mostrando la localización de las lesiones cutáneas.

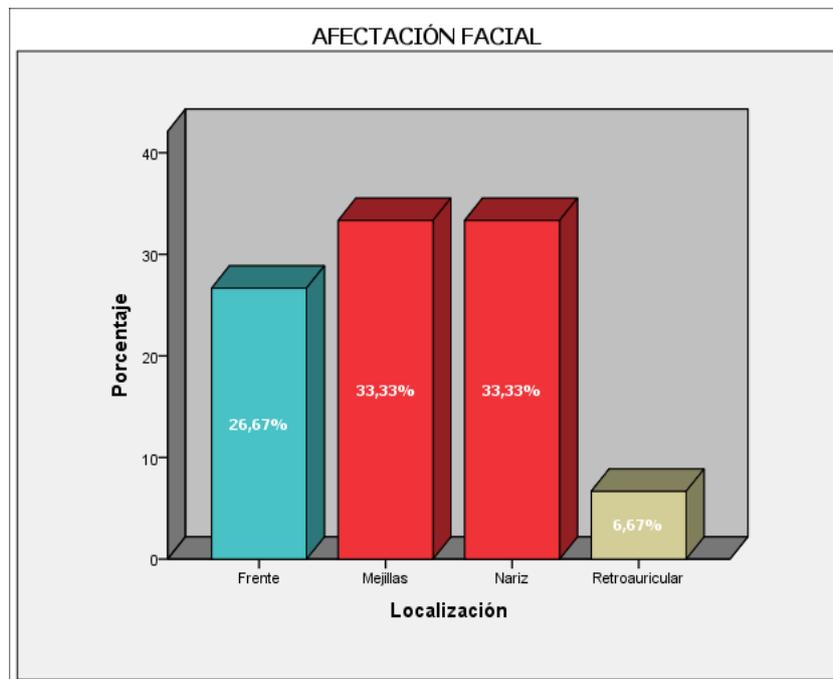


Figura 66. Gráfica mostrando la localización de las lesiones cutáneas a nivel facial.

La mayor parte de las lesiones cutáneas tenían una coloración blanquecina amarillenta, con un tamaño que oscilaba de los 2 a los 4mm.



Figura 67. Lesiones papulosas en región nasal, perinasal, mejillas y frente de un paciente con SBHD.



Figura 68. Clínica cutánea de otro de los pacientes del estudio en el que se evidencias las lesiones en área nasal y perinasal, en región retroauricular y cuello.



Figura 69. Clínica cutánea de otra de las pacientes del estudio.



Figura 70. Clínica de las lesiones pediculadas en las axilas de un paciente.



Figura 71. Clínica de las lesiones pediculadas en las ingles de un paciente.

El tipo histológico encontrado con mayor frecuencia fueron los acrocordones y fibrofolliculomas (60,7%), seguidos de tricodiscomas (3,6%).

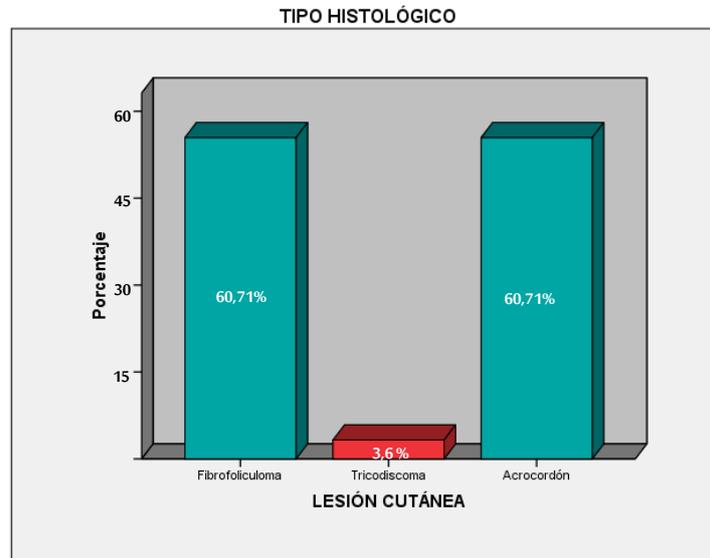


Figura 72. Gráfica mostrando el tipo histológico de las lesiones cutáneas.

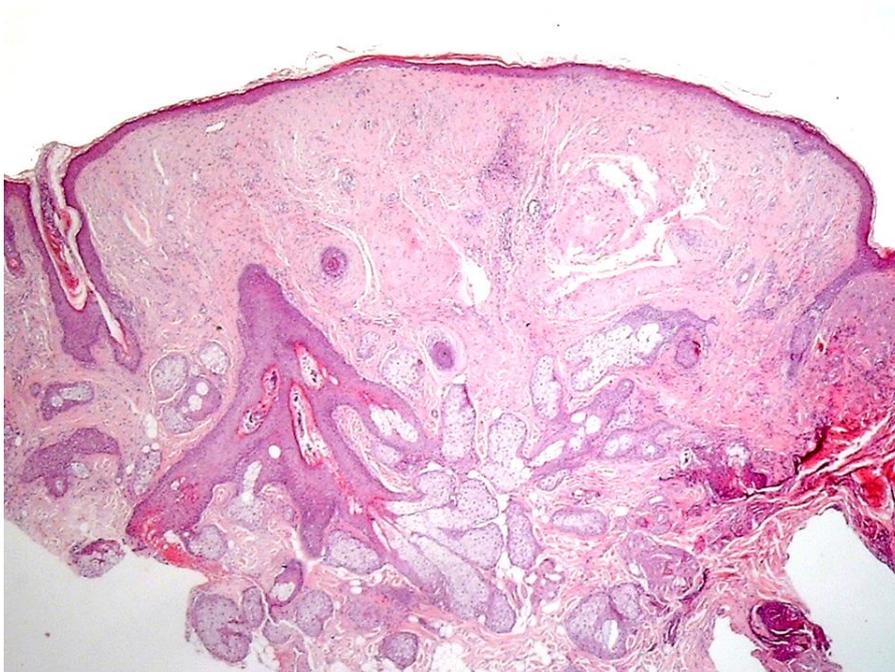


Figura 73. Imagen histológica de un tricodiscoma de uno de los pacientes.

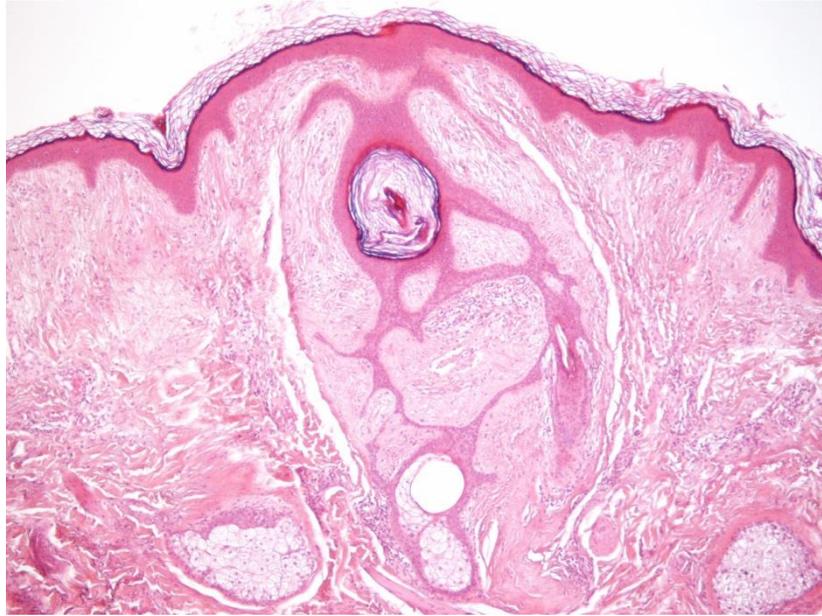


Figura 74. Imagen histológica de un fibrofolliculoma de uno de los pacientes.

Uno de los tricodiscomas de un paciente incluido en el estudio, presentó rasgos pleomórficos (figura 75).

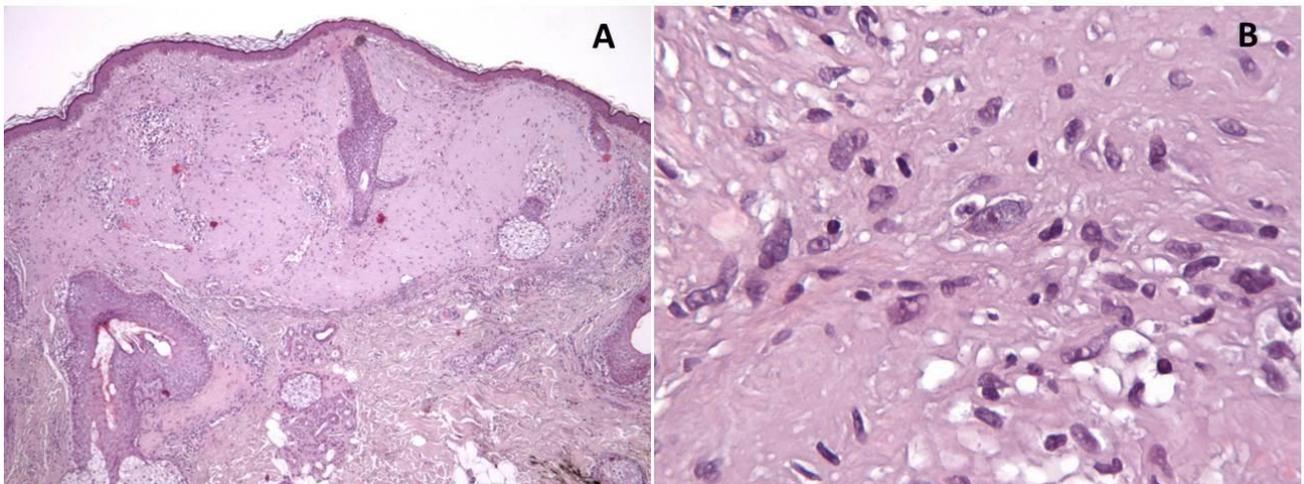


Figura 75. A y B. Imagen histológica de un tricodiscoma con componente estromal pleomórfico.

Se encontraron lesiones compatibles histológicamente con angiofibromas en 2 de los pacientes incluidos en el estudio, 2 carcinomas basocelulares y 1 melanoma cutáneo.

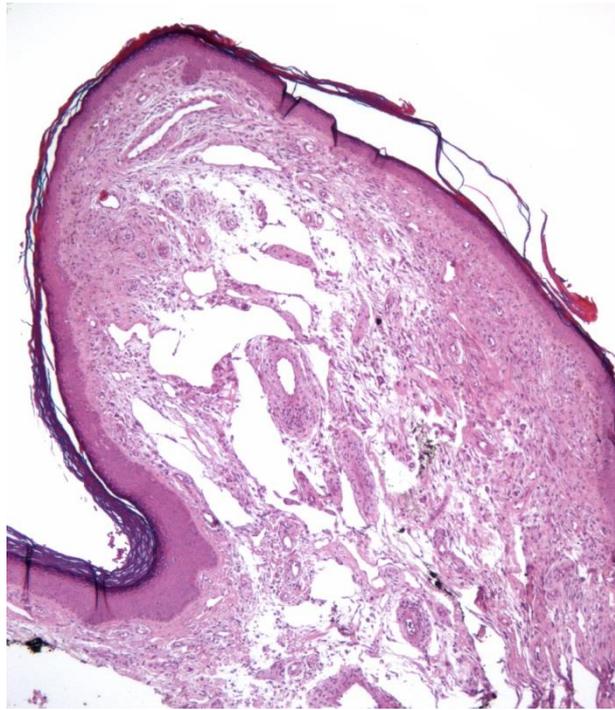


Figura 76. Imagen histológica de un angiofibroma de uno de los pacientes.

En la tabla 11, se presentan las principales características clínicas de los pacientes con patología cutánea.

Tabla 11. Características clínicas de los pacientes con patología cutánea.

Paciente	AF	Edad/Sexo	Nº de lesiones cutáneas			Localización	Edad inicio	Tipo histológico	Otras lesiones cutáneas	Patología pulmonar	Patología renal	Otras asociaciones	Mutación germinal FLCN
			<5	5-10	10-100								
1	No	81/M	Sí	-	-	Facial (N)	65	CBC	No	No	QR, FAM	-	
2	Sí	71/M	-	-	Sí	Facial (Me, O), Ax, in, T, codos	30	FF/AA	No	No	-	c.1433-1G>T	
3	Sí	45/M	-	-	Sí	Facial (N, S, O), ax, in, cu, ab	30	FF/AA	No	No	-	c.1433-1G>T	
4	Sí	48/V	-	-	Sí	Facial (Me, F), cu, ax	20	FF/AA	No	No	QR	c.1286insC	
5	Sí	78/M	-	-	Sí	Cu	30	FF	No	No	QR, ADS	c.1286insC	
6	Sí	70/V	-	-	Sí	Facial (F, N, Me, S), ax	40	FF/AA	Sí	No	CR	c.323G>T	
7	Sí	23/M	Sí	-	-	Ax	20	AA	No	No	-	c.1286insC	
8	Sí	51/V	-	-	Sí	Cu	30	HFF	No	No	-	-	
10	Sí	49/M	-	-	Sí	Cu, ax, ab, in	30	FF/AA	No	No	Ca.colon	c.1286insC	
11	Sí	44/V	Sí	-	-	Cu, T	35	AA	No	No	-	c.618+2T>A	
13	Sí	70/V	-	-	Sí	Facial (Me, N, F), cu, ax	35	TD/FF	Sí	No	Ca colon, QR	No realizada (†)	
14	Sí	17/V	-	-	Sí	Facial, ax	16	TD	No	No	No	No realizada	
15	Sí	50/M	-	-	Sí	Facial	30	TD	No	No	Ca mama	No realizada	
16	No	61/M	-	-	Sí	Cu, ax, T	50	AA	No	Sí	-	-	
17	No	44/M	-	Sí	-	Cu, T	35	AA	Sí	No	-	-	
18	No	41/M	Sí	-	-	Ax, T	35	AA	Sí	No	Pólipo endometrial, QR	-	
19	Sí	78/V	-	-	Sí	Facial (F, Me, N), ax	30	FF	No	No	Ca vesical	c.1042T>C	
21	Sí	73/M	-	-	Sí	Facial (Me), cu, ax	30	FF/AA	No	No	Ca ovario, ca mama, AML	-	
22	No	59/V	-	-	Sí	Cu, ax, in, T	35	AA	Sí	No	-	-	
25	Sí	46/M	Sí	-	-	Facial (F), ax	35	AA	No	No	-	-	
27	No	56/V	-	Sí	-	Ax, in, cu	35	AA	Sí	No	-	-	
28	No	26/V	Sí	-	-	Espalda	25	FF	No	No	-	-	
31	Sí	73/V	-	-	Sí	Facial (O, Me, N), cu, ax	30	FF/AA	Sí	Sí	QR	c.618+2T>A	
32	No	51/V	Sí	-	-	Ax	40	AA	Sí	No	QR, PC	-	
33	No	48/M	Sí	-	-	T	35	FF/AA	No	No	-	-	
34	No	40/M	Sí	-	-	C/cab	35	FF con signos TD	No	No	QR	-	
38	No	79/V	-	-	Sí	Facial (F, Me, N)	30	FF	No	No	Ca colon	c.1135A>T	
39	Sí	40/M	-	Sí	-	Ax, ab, in, T	35	FF	No	No	-	c.1286insC	

AA: acrocardón, Ab: antebrazo, ADS: adenoma suprarrenal, AF: antecedentes familiares, AG: angiofibroma, AML: angiomolipomas, AS: adenoma sebáceo, Ax: axila, CBC: carcinoma basocelular, CR: cáncer renal, Cu: cuello, F: frente, FAM: fibroadenoma mama, FF: fibrofolículo, HFF: fibroma perifolículo, HS: hiperplasia sebácea, In: ingle, M: mujer, Me: mejillas, N: nariz, O: orejas, PC: pólipos colon, PF: pápula fibrosa, QR: quistes renales, S: surco nasogeniano, T: tronco, TD: tricodiscoma, V: varón, (†): exitus anterior al estudio.

3.1.1.6. Afectación renal

Presentaron afectación renal el 38,46% de los pacientes recogidos (n=15). De ellos, se encontraron quistes renales en el 53,3% de los casos, localizándose de manera bilateral en el 50% de ellos, seguidos por el riñón izquierdo y derecho en el 37,5% y 12,5%, respectivamente. 3 de los pacientes recogidos presentaron carcinoma renal (7,7%), siendo 2 de ellos un carcinoma cromóforo y 1 un oncocitoma. 2 de ellos presentaron carcinoma papilar vesical, 1 un angiomiolipoma, 1 litiasis renal, 1 presentó hipoplasia renal derecha y otro ausencia del riñón derecho. En los pacientes con diagnóstico de SBHD, se encontró carcinoma renal en el 5%.

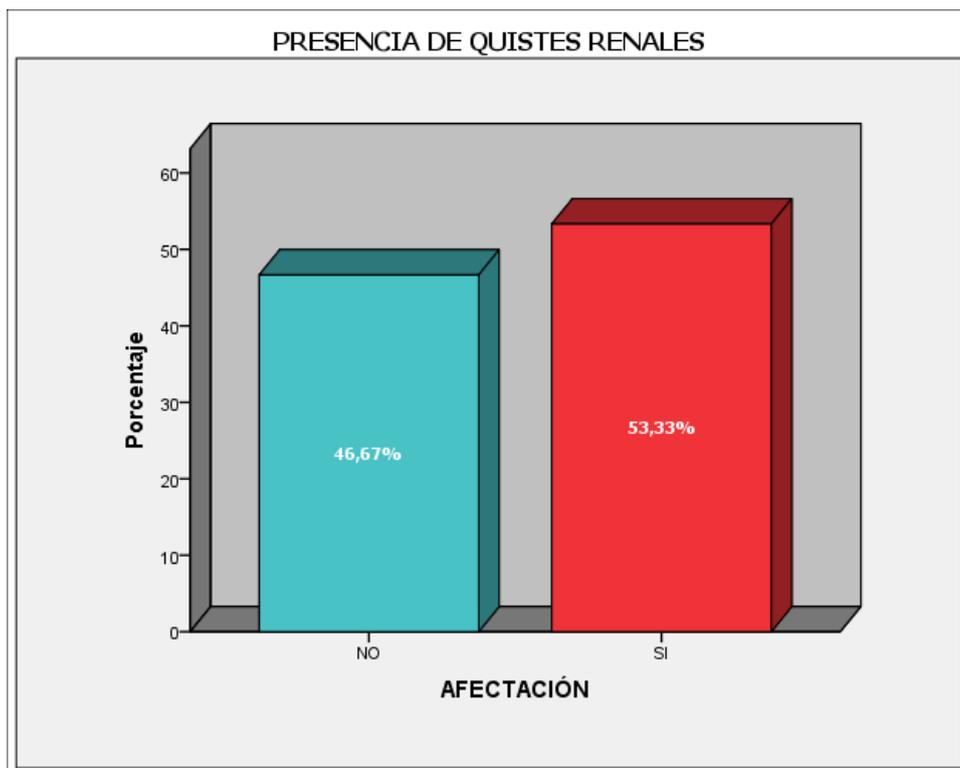


Figura 77. Gráfica mostrando la presencia de quistes renales.

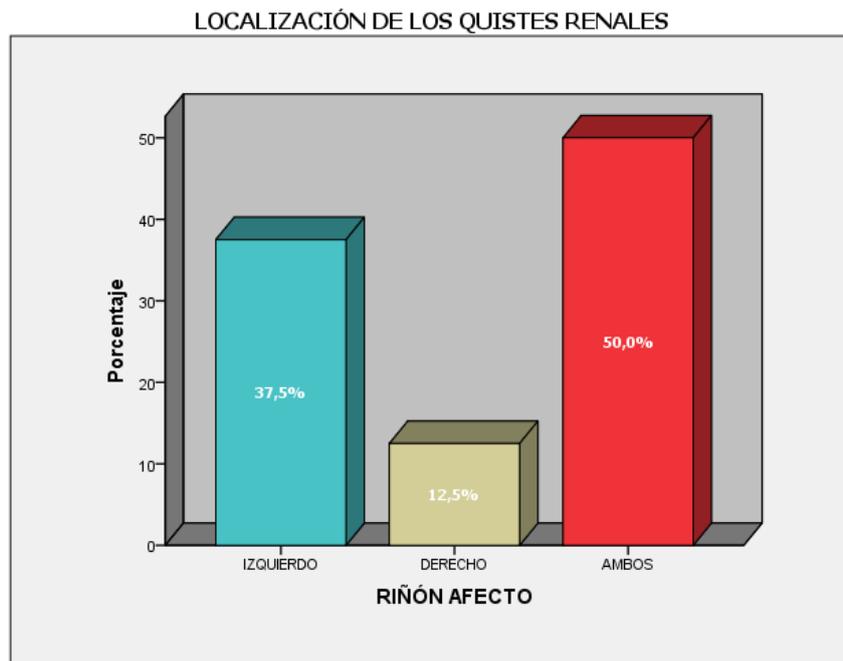


Figura 78. Gráfica mostrando la localización de los quistes renales.

3.1.1.7. Asociación a otros cánceres extrarrenales

Los pacientes presentaban antecedentes de patología tumoral en el 35,9% de los casos (n=14), siendo en 4 de ellos carcinoma de mama, en 3 de ellos carcinoma colorrectal, en 3 de origen ginecológico (ovario, endometrio y cérvix) y en 1 caso un carcinoma esofágico.

Se encontró un melanoma cutáneo en uno de los pacientes de nuestro estudio.

3.1.2. Parámetros inmunohistoquímicos

Se incluyeron un total de 24 piezas incluidas en parafina para estudio inmunohistoquímico. Se establecieron 7 categorías:

- NV (no valorable): cuando las características de la inmunotinción no pudieron ser evaluadas de forma concluyente (controles negativos, inmunotinción inconstante, paradójica o no reproducible).
- 0: negativo.
- 1: pérdida parcial de inmunotinción citoplásmica y/o nuclear.
- 2: inmunotinción citoplásmica pura.
- 3: mayor inmunotinción citoplásmica que nuclear.
- 4: mayor inmunotinción nuclear que citoplásmica.
- 5: inmunotinción nuclear pura.

De manera global, se encontró una inmunotinción mayoritariamente nuclear (45,83%) (figura 79). Al analizar la inmunohistoquímica de manera independiente en piel, pulmón y riñón, se observa que los tumores renales no presentan inmunotinción nuclear y sí citoplásmica. Sin embargo, en las lesiones cutáneas y pulmonares la inmunotinción es nuclear pura o mayoritariamente nuclear (figuras 87-90).

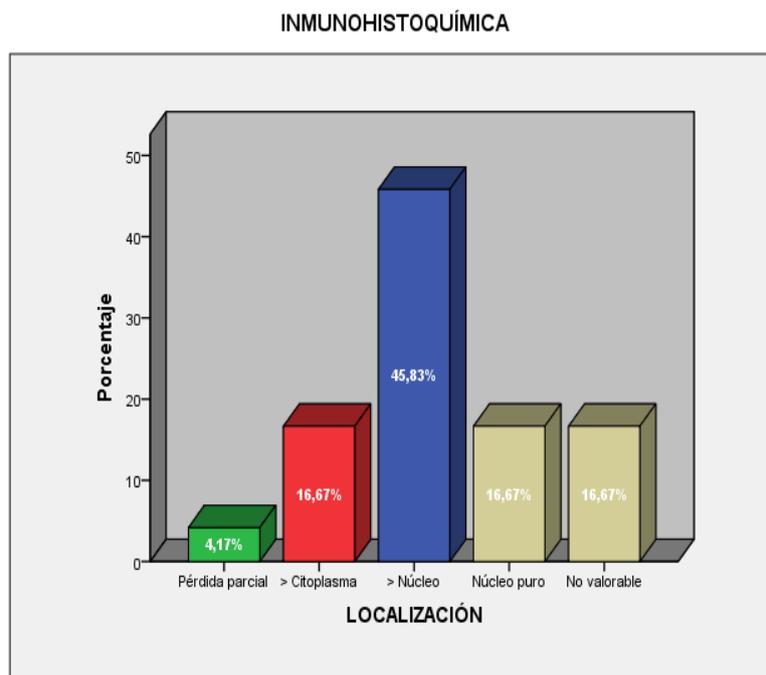


Figura 79. Gráfica mostrando la localización de la tinción en el estudio inmunohistoquímico.

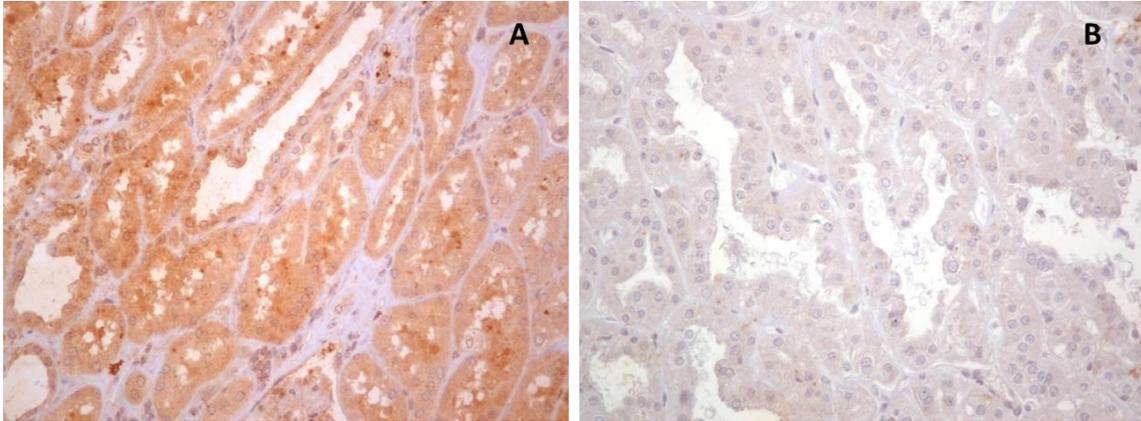


Figura 80. A. Inmunotinción citoplasmática de los túbulos renales normales para foliculina. B. Ausencia de inmunotinción en un carcinoma renal de un paciente con SBHD.

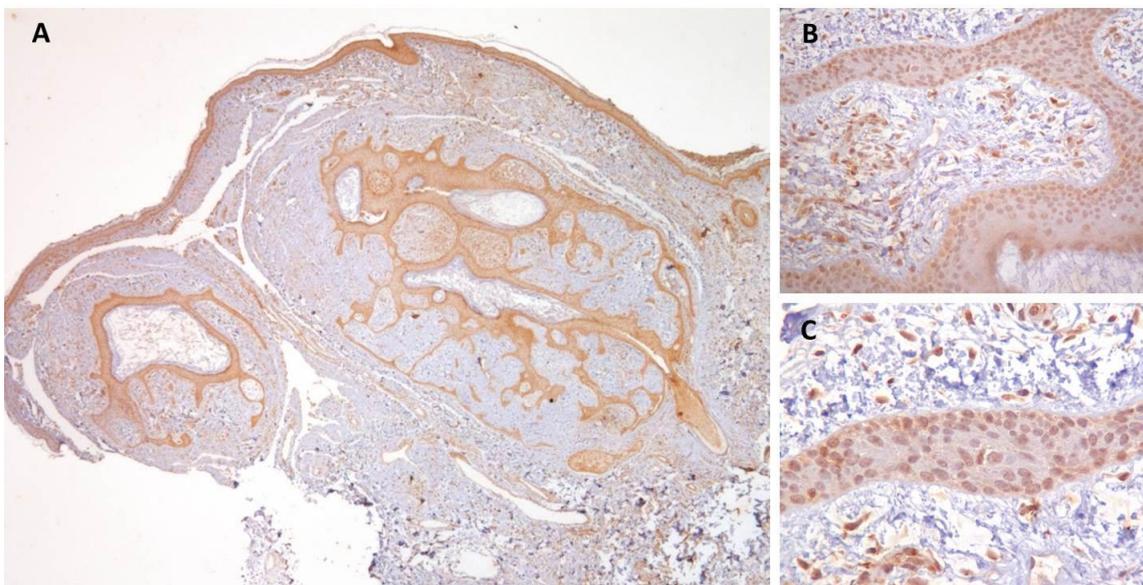


Figura 81. Fibrofolliculoma. A y B. Inmunotinción predominantemente nucleolar en el componente epitelial. C. Detalle de la inmunotinción.

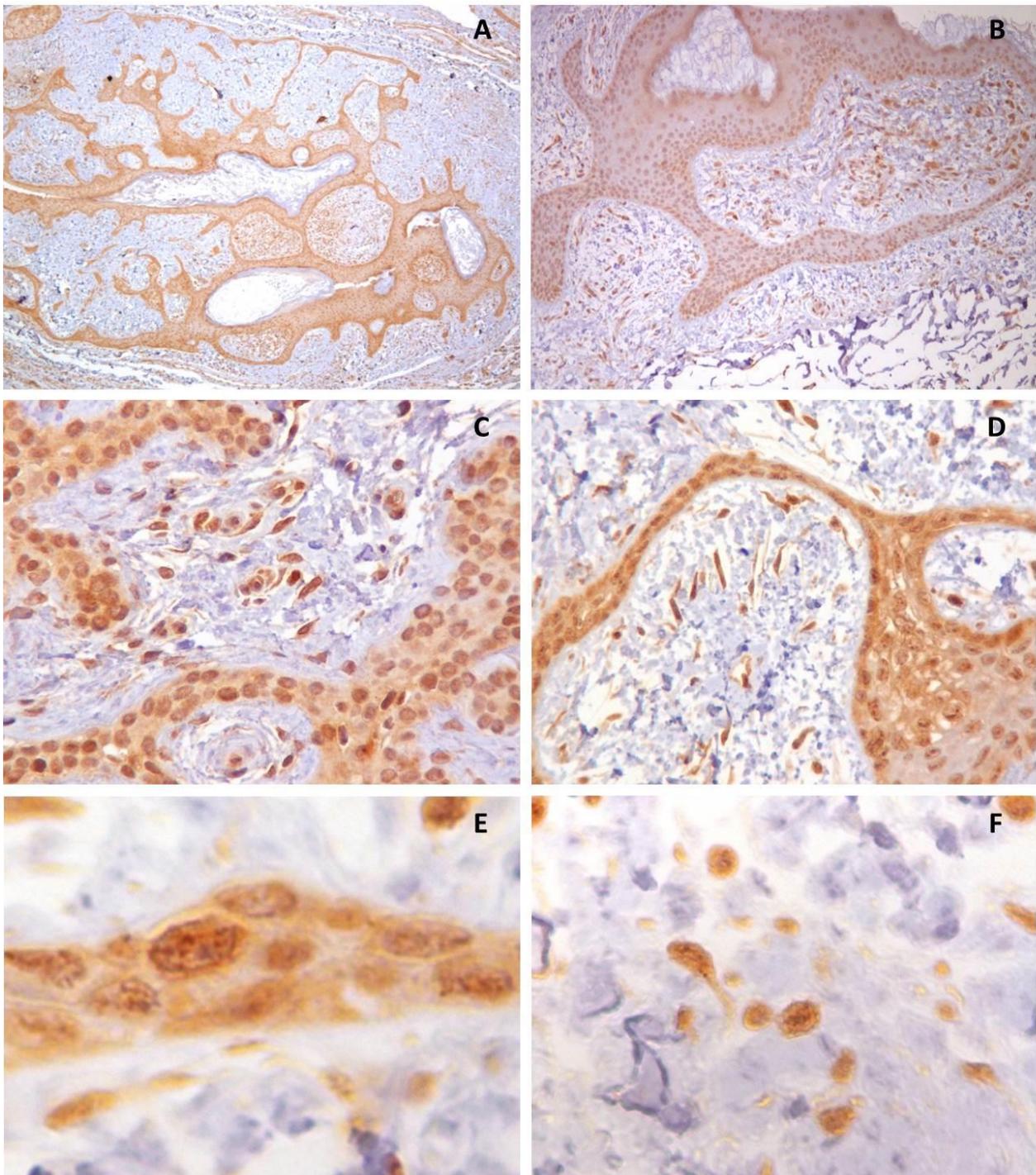


Figura 82. Fibrofolliculoma. A y B. Inmunotinción predominantemente nucleolar en el componente epitelial. C. Detalle de la inmunotinción.

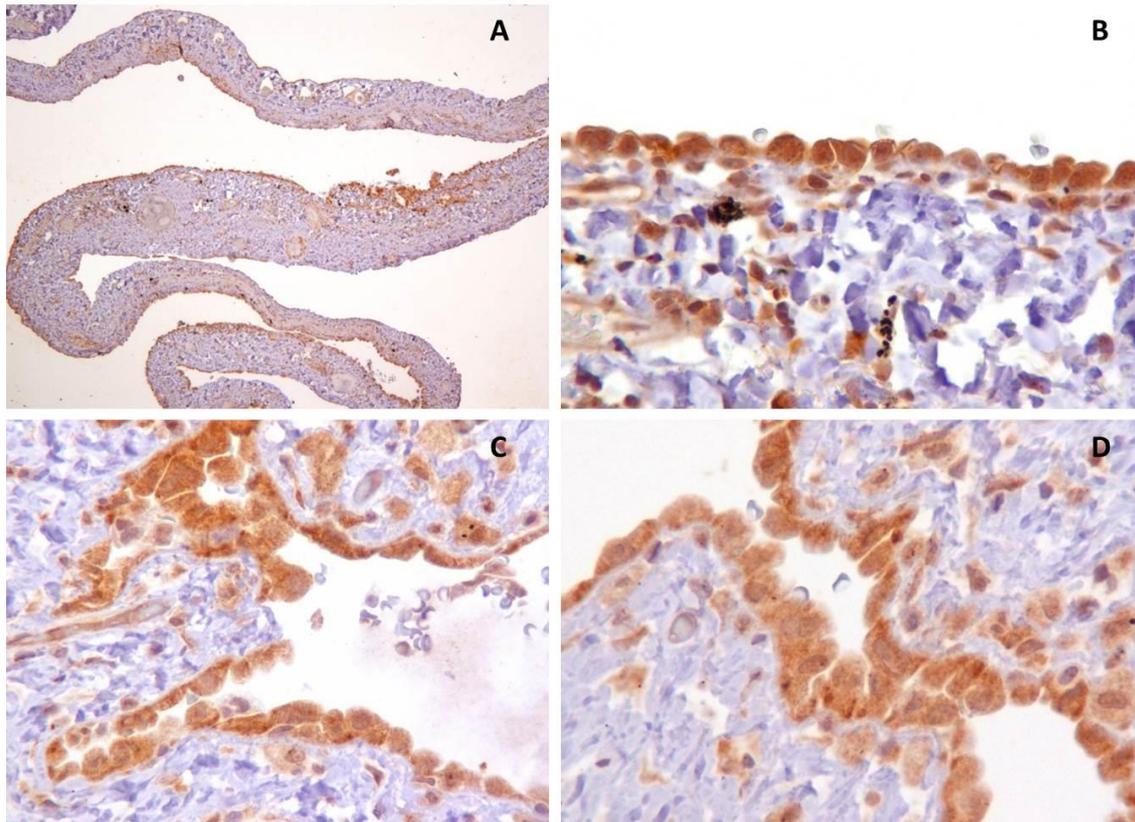


Figura 83. A. B. C. D. Inmunotinción para foliculina en las células mesoteliales pleurales de un paciente con neumotórax.

3.1.3. Parámetros genéticos

La secuenciación masiva nos proporcionó una gran cantidad de variantes. Sin embargo, solo consideramos patológicas las publicadas previamente en la literatura y aquellas en las que el análisis en al menos 2 de las herramientas bioinformáticas, previamente descritas en el apartado de material y métodos, predijo su efecto patogénico. De todas las muestras recogidas, se pudo estudiar el 75% de todos los amplicones. Del resto, se obtuvo una cobertura del 60% de los amplicones por la calidad del material estudiado. Encontramos la presencia de mutaciones en línea germinal en el gen FLCN en el 73,7% de los pacientes diagnosticados de síndrome Birt-Hogg-Dubé, siendo la mutación c.1286insC, en el exón 11, la más frecuente. Todos aquellos pacientes que fueron diagnosticados de SBHD a través de la clínica pulmonar como único motivo de consulta presentaban mutaciones germinales del gen FLCN, mientras que estaba presente en el 66,7% de los pacientes con SBHD y lesiones cutáneas hamartomatosas típicas. En cuanto a las mutaciones somáticas, las variantes se presentaron con mayor frecuencia en el exón 14, seguido del exón 5 y 6 en un 23, 19 y 19%, respectivamente. En las tablas 15 y 16 hemos recogido las mutaciones consideradas variantes patológicas y no patogénicas, respectivamente. También encontramos mutaciones silenciosas (SNP) que no se han incluido en ninguna de las tablas por no producir cambio de ningún aminoácido.

3.1.3.1. Mutaciones en línea germinal del gen FLCN

c.-93C>T (exón 3)

Mutación en heterocigosis en el exón 3 que produce un cambio de citosina por timina en la posición -93 en la región 5-UTR del gen FLCN que afectaría a la unión de un factor de transcripción.

ALELO NORMAL g c t c a g c **c g** t a

ALELO MUTADO g c t c a g c **t g** t a

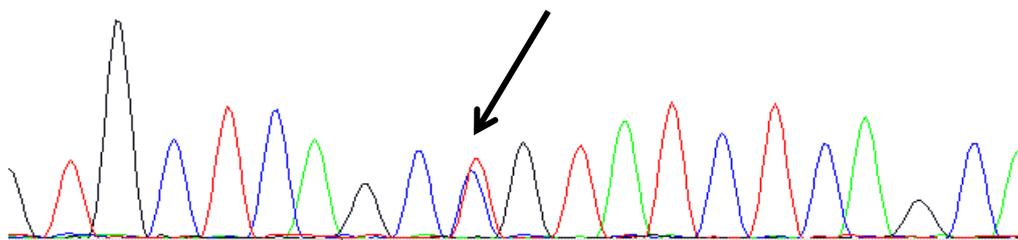
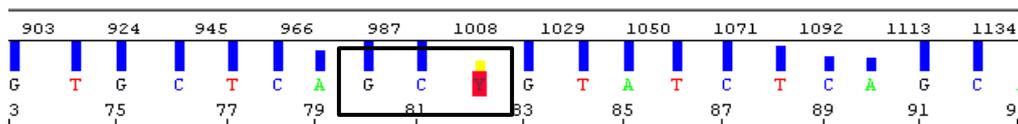


Figura 84. Secuenciación por Sanger en la que se aprecia la mutación en el exón 3.

c.323G>T (exón 5); p.Ser108Ile

Mutación en heterocigosis en el exón 5 que produce un cambio de guanina por timina en la posición 323 del cDNA. En la proteína resultante, se sustituye una serina en la posición 108 por una isoleucina.

ALELO NORMAL T C A **G C** C A C C A G

ALELO MUTADO T C A **T C** C A C C A G

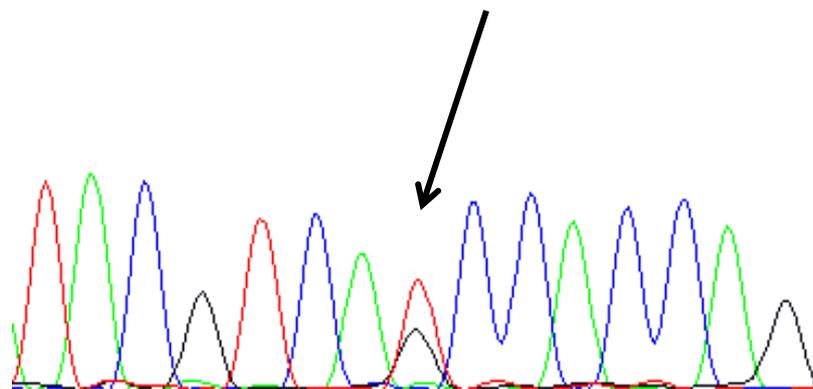
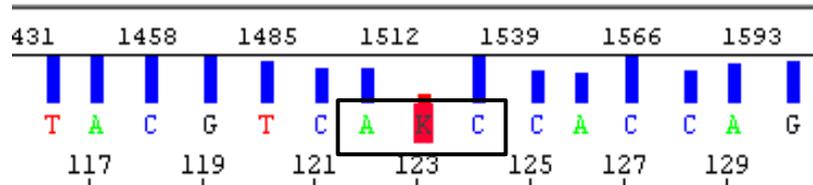


Figura 85. Secuenciación por Sanger en la que se aprecia la mutación en el exón 3.

La mutación ya ha sido descrita por otros autores como causante del SBHD (6).

c.573_574delinsT (exón 6); p.Lys192Rfs*31

Mutación en heterocigosis en el exón 6 que produce una deleción de la adenina y guanina en la posición 573 y 574 del cDNA y una inserción de timina. En la proteína resultante, se sustituye una lisina en la posición 192 por una arginina con desplazamiento del marco de lectura a partir de dicho aminoácido

originando en un codón de parada temprano que produciría una proteína más corta, de 195 aminoácidos (p.Lys192Rfs*31).

ALELO NORMAL G C T G **G G G A** A G G T

ALELO MUTADO G C T G **G G - T** A G G T

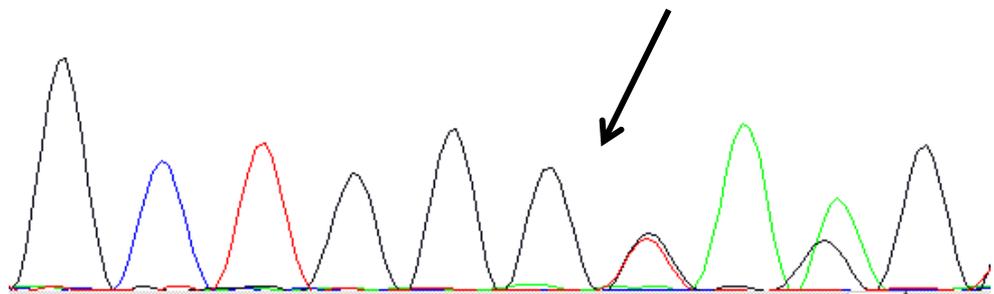
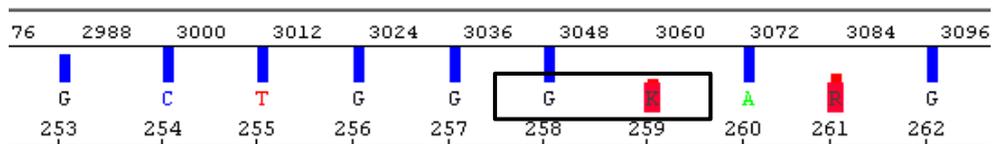


Figura 86. Secuenciación por Sanger en la que se aprecia la mutación en el exón 6.

Esta mutación produce una proteína truncada puesto que al desplazar el marco de lectura aparece un nuevo codón de parada tan sólo 31 aminoácidos tras el codón mutado, siendo por tanto esta variante patogénica.

c.618+2T>A (intrón 6)

Mutación en heterocigosis en el intrón 6 que produce un cambio de timina por adenosina en la posición +2 del cDNA que podría afectar al procesamiento de intrones y causar la enfermedad.

ALELO NORMAL

C A A G **G T G** A A T T

ALELO MUTADO

C A A G **G A G** A A T T

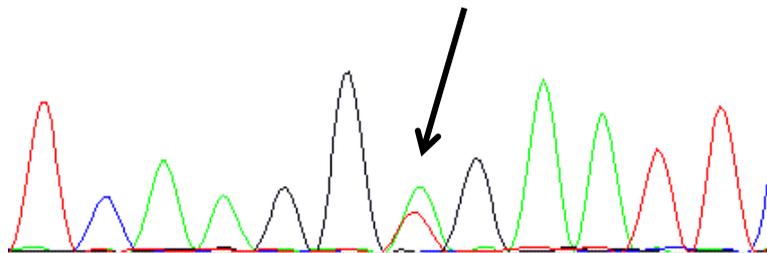
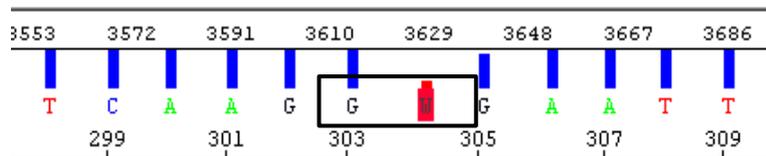


Figura 87. Secuenciación por Sanger en la que se aprecia la mutación en el intrón 6.

La mutación ya ha sido descrita por otros autores como causante del SBHD (6).

c.1042T>C (exón 9); p.Ser348Pro

Mutación en heterocigosis en el exón 9 que produce un cambio de timina por citosina en la posición 1042 del cDNA. En la proteína resultante, se sustituye una serina en la posición 348 por una prolina.

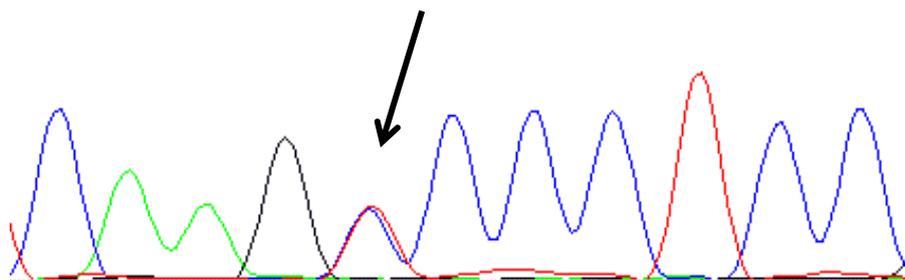
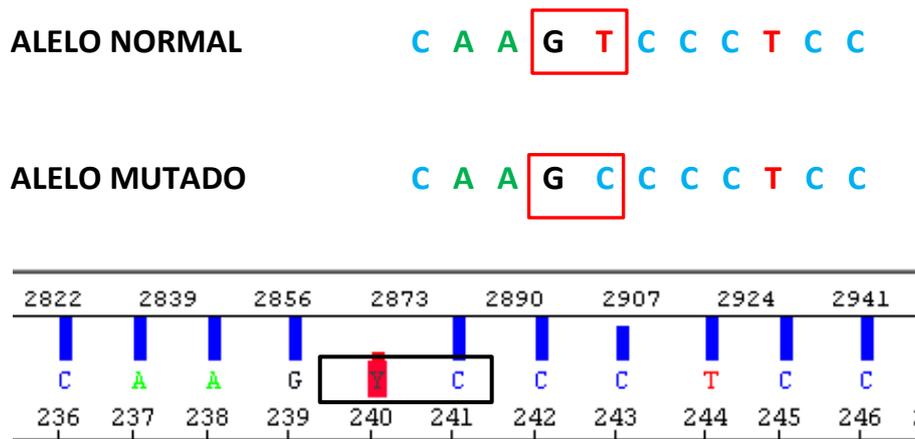


Figura 88. Secuenciación por Sanger en la que se aprecia la mutación en el exón 9.

Si se observa la puntuación de conservación con PolyPhen (figura 89), se comprueba que la mutación modifica en gran medida la proteína resultante, siendo por tanto muy probablemente patogénica.

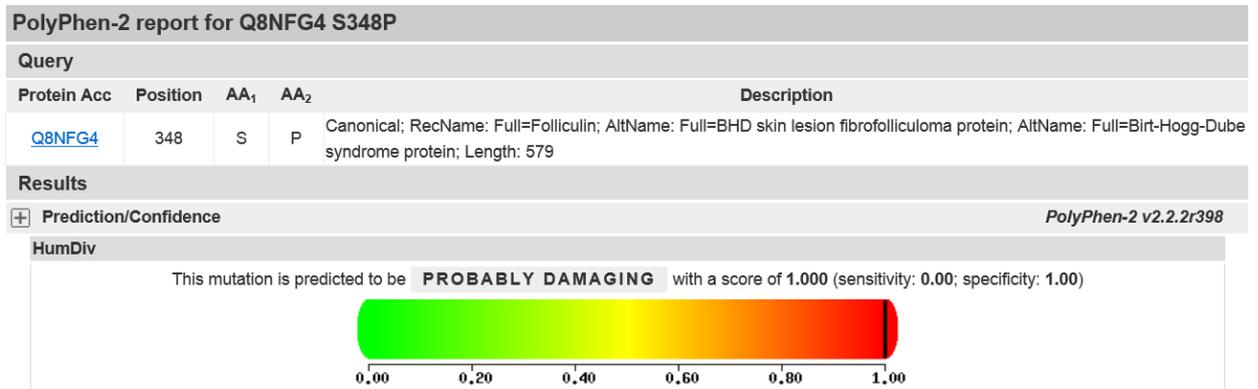


Figura 89. Predicción in silico realizada por el programa PolyPhen-2 del efecto funcional de la mutación c.1042T>C.

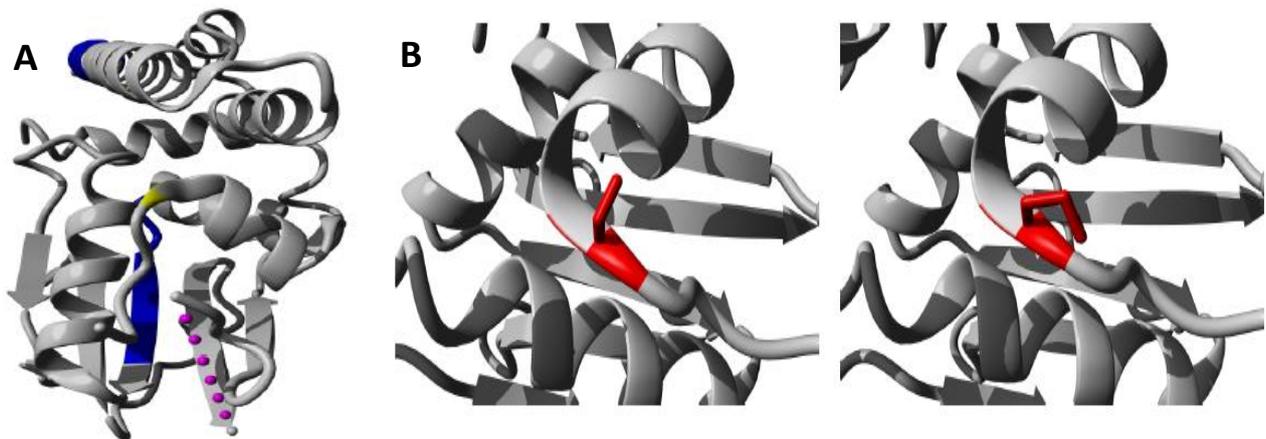


Figura 90. A) Representación de la estructura de la proteína foliculina donde se observa coloreado en amarillo la ubicación del residuo variante en estudio. B) Visualización molecular de los aminoácidos de la variante nativa (izquierda) y la variante mutante (derecha). Los residuos coloreados en rojo representa el tipo nativo (SER) y residuos de la variante mutante (PRO). Imagen obtenida de *SNPEffect 4.0 database*.

c.1286insC (exón 11); p.His429Profs*27

Mutación en heterocigosis en el exón 11 que produce una inserción de una citosina en la posición 1286 cDNA. En la proteína resultante, se sustituye una histidina en la posición 429 por una prolina con desplazamiento del marco de lectura que originaría un codón de parada temprano (posición 455) y la síntesis de una proteína errónea a partir de la posición 429, que tendría sólo 454 aminoácidos.

ALELO NORMAL

C C C C - A C G T G

ALELO MUTADO

C C C C C A C G T G

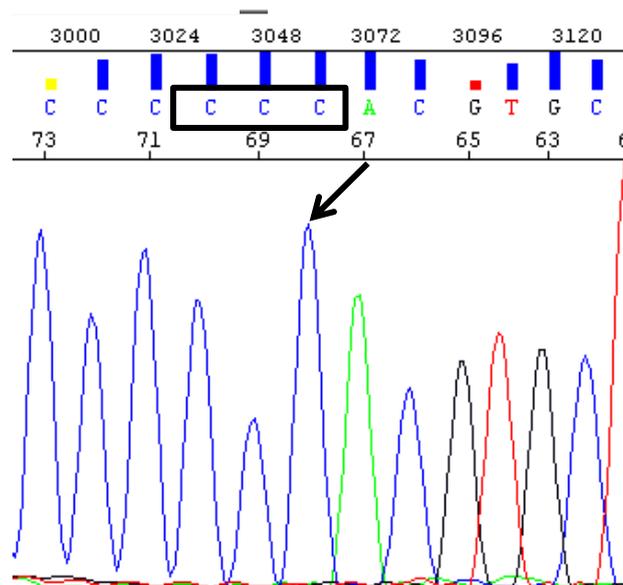


Figura 92. Secuenciación por Sanger en la que se aprecia la mutación en el intrón 6.

La mutación ya ha sido descrita por otros autores como causante del SBHD (4,42,74,153–157).

En las tablas 12-14, se recogen las principales características de las mutaciones en línea germinal del gen FLCN, así como la clínica de los pacientes que presentan dichas mutaciones.

Tabla 12. Tipo de mutaciones germinales encontradas en el gen FLCN

<i>TIPO DE MUTACIONES</i>	<i>FRECUENCIA</i>
NONSENSE	2
FRAMESHIFT	6
MISSENSE	2
SITIO DE SPLICING ALTERADO	4
DELECCIONES GENÓMICAS	0
Total de pacientes incluidos en el estudio	39
Nº sujetos con mutaciones	14
Porcentaje de mutaciones en pacientes con SBHD	66,6%

Tabla 13. Características de las mutaciones en línea germinal encontradas en el gen FLCN

<i>Paciente</i>	<i>Exón/intrón</i>	<i>Mutación</i>	<i>Tipo de mutación</i>	<i>Cambio de aa predicho</i>	<i>Condición</i>
2	Intrón 12	c.1433-1G>T	Splicesite	-----	Patogénica
3	Intrón 12	c.1433-1G>T	Splicesite	-----	Patogénica
4	Exón 11	c.1286insC	Frameshift	p.His429Prof*27	Patogénica
5	Exón 11	c.1286insC	Frameshift	p.His429Prof*27	Patogénica
6	Exón 5	c.323G>T	Missense	p.S108I	Patogénica
7	Exón 11	c.1286insC	Frameshift	p.His429Prof*27	Patogénica
10	Exón 11	c.1286insC	Frameshift	p.His429Prof*27	Patogénica
11	Intrón 6	c.618+2T>A	Splicesite	-----	Patogénica
19	Exón 9	c.1042T>C	Missense	p.S348P	Patogénica
26	Exón 6	c.573-574delGAinsT	Frameshift	p.Lys192Rfs*31	Patogénica
29	Exón 3	c.-93C>T	Nonsense	p.Cys31Ter	Patogénica
31	Intrón 6	c.618+2T>A	Splicesite	-----	Patogénica
38	Exón 10	c.1135A>T	Nonsense	p.R379X	Patogénica
39	Exón 11	c.1286insC	Frameshift	p.His429Prof*27	Patogénica

Tabla 14. Clínica de los pacientes con mutaciones en línea germinal en el gen FLCN

<i>Paciente</i>	<i>Edad</i>	<i>Sexo</i>	<i>Lesiones cutáneas</i>	<i>Patología pulmonar</i>	<i>Patología renal</i>	<i>Otras asociaciones</i>	<i>Mutación FLCN</i>
2	71	M	Sí	No	No	No	c.1433-1G>T
3	45	M	Sí	No	No	No	c.1433-1G>T
4	48	V	Sí	No	No	QR	c.1286insC
5	78	M	Sí	No	No	ADS, QR	c.1286insC
6	70	V	Sí	No	No	Cálculos renales	c.323G>T
7	23	V	Si	No	No	No	c.1286insC
10	49	M	Sí	No	No	Ca. colon	c.1286insC
11	44	V	Sí	No	No	No	c.618+2T>A
19	78	V	Sí	No	No	Ca. vesical	c.1042T>C
26	53	M	No	Sí	No	Ca. útero	c.573-574delGAinsT
29	45	V	No	Sí	No	No	c.-93C>T
31	73	V	Sí	Sí	Sí	QR	c.618+2T>A
38	79	V	Sí	No	No	Ca. colon	c.1135A>T
39	40	M	Sí	No	No	No	c.1286insC

M: mujer, V: varón, QR: quiste cortical renal, ADS: adenoma suprarrenal.

3.1.3.2. Mutaciones somáticas del gen FLCN

c.-93C>T (exón 3)

Mutación en heterocigosis en el exón 3 que produce un cambio de citosina por timina en la posición -93 en la región 5-UTR del gen FLCN que afectaría a la unión de un factor de transcripción.

c.16G>A (exón 4); p. Ala6Thr

Mutación en heterocigosis en el exón 4 que produce un cambio de una guanina por una adenina en la posición 16 del cDNA. En la proteína resultante, se sustituye una alanina en la posición 6 por una treonina.

Si se observa la puntuación de conservación con PolyPhen (figura 94), se comprueba que la mutación modifica en gran medida la proteína resultante, siendo por tanto muy probablemente patogénica. Lo mismo ocurre cuando se comprueba en Pmut y en SIFT.

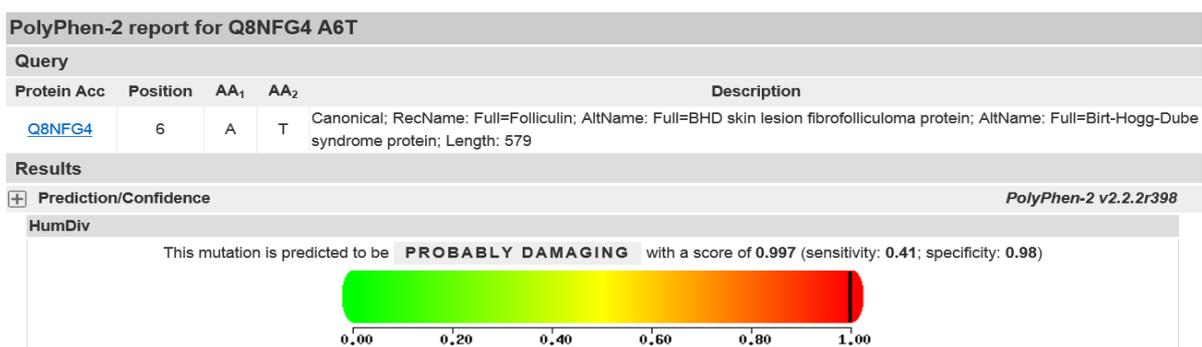


Figura 94. Predicción in silico del programa PolyPhen-2 de la mutación c.16G>A.

c.272G>A (exón 5); p.Gly91Glu

Mutación en heterocigosis en el exón 5 que produce un cambio de una guanina por una adenina en la posición 272 del cDNA. En la proteína resultante, se sustituye una glicina en la posición 91 por un ácido glutámico.

Si se observa la puntuación de conservación con PolyPhen (figura 95), se comprueba que la mutación modifica la proteína resultante, siendo por tanto probablemente dañina. Cuando se comprueba en Pmut y en SIFT está mutación es patológica.

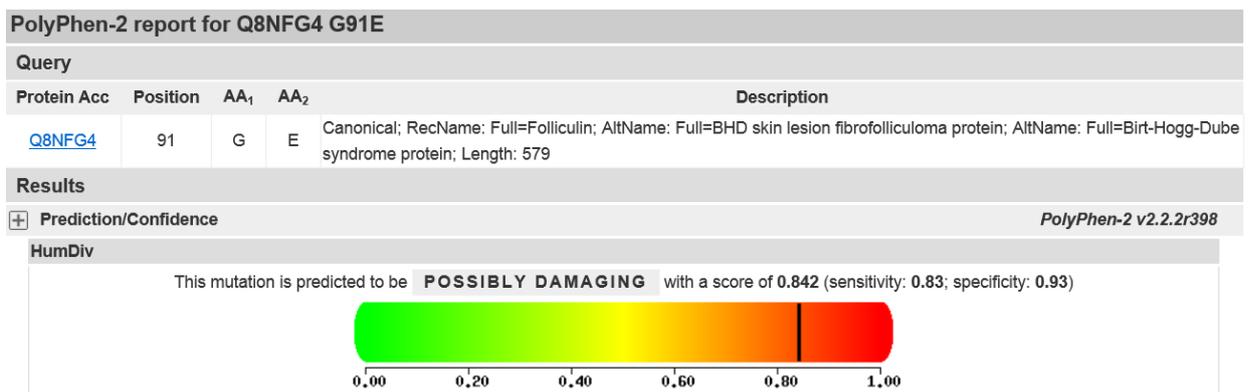


Figura 95. Predicción in silico realizada por el programa PolyPhen-2 del efecto funcional de la mutación c.272G>A.

c.323G>T (exón 5); p.Ser108Ile

Mutación en heterocigosis en el exón 5 que produce un cambio de una guanina por una timina en la posición 323 del cDNA. En la proteína resultante, se sustituye una serina en la posición 108 por una isoleucina.

Si se observa la puntuación de conservación con PolyPhen (figura 96), se comprueba que la mutación modifica en gran medida la proteína resultante, siendo por tanto muy probablemente patogénica. Lo mismo ocurre cuando se comprueba en Pmut y en SIFT.

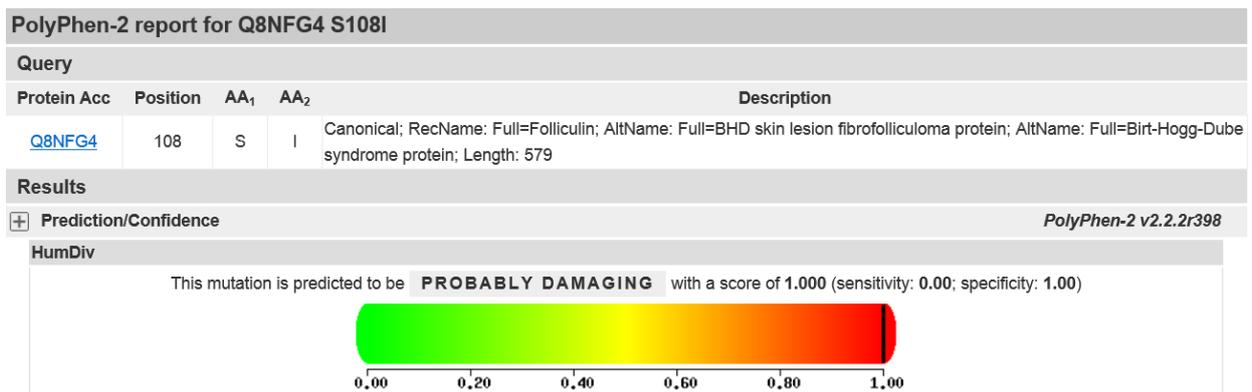


Figura 96. Predicción in silico realizada por el programa PolyPhen-2 del efecto funcional de la mutación c.323G>T.

c.346C>T (exón 5); p. Gln116Ter

Mutación en heterocigosis en el exón 5 que produce un cambio de una citosina por una timina en la posición 346 del cDNA. En la proteína resultante, se produce un cambio de una glutamina en la posición 116 por un nuevo codón stop. Esta mutación produce una proteína truncada al aparecer un nuevo codón de parada, siendo por tanto esta variante patogénica.

c.367C>T (exón 5); p. Gln123Ter

Mutación en heterocigosis en el exón 5 que produce un cambio de una citosina por una timina en la posición 367 del cDNA. En la proteína resultante, se sustituye una glutamina en la posición 123 por un nuevo codón parada. Esta mutación produce una proteína truncada al aparecer un nuevo codón de parada, siendo por tanto esta variante patogénica.

c.392G>A (exón 5); p. Cys131Tyr

Mutación en heterocigosis en el exón 5 que produce un cambio de una guanina por una adenina en la posición 392 del cDNA. En la proteína resultante, se sustituye una cisteína en la posición 131 por una tirosina.

Si se observa la puntuación de conservación con PolyPhen (figura 97), se comprueba que la mutación modifica en gran medida la proteína resultante, siendo por tanto muy probablemente patogénica. Lo mismo ocurre cuando se comprueba en Pmut y en SIFT.

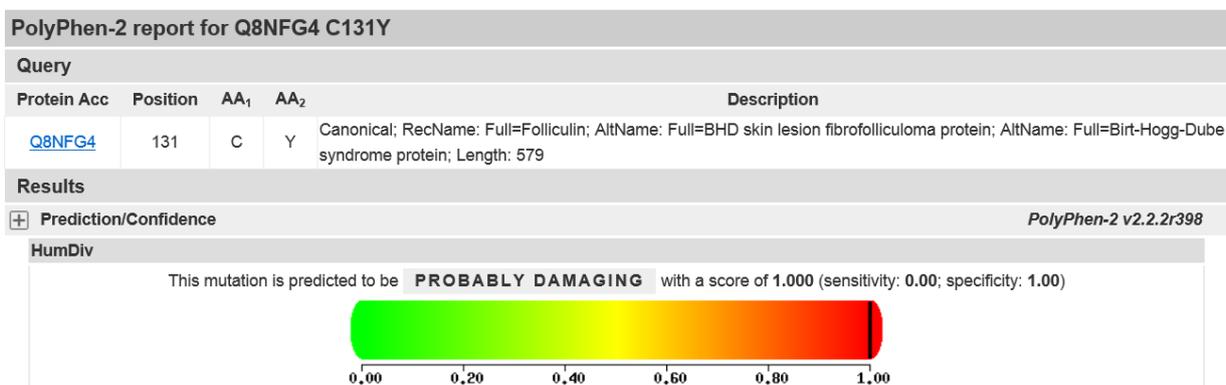


Figura 97. Predicción in silico del programa PolyPhen-2 de la mutación c.346C>T.

c.394G>A (exón 5); p. Glu132Lys

Mutación en heterocigosis en el exón 5 que produce un cambio de una guanina por una adenina en la posición 394 del cDNA. En la proteína resultante, se sustituye un ácido glutámico en la posición 132 por una lisina.

Si se observa la puntuación de conservación con PolyPhen (figura 98), se comprueba que la mutación modifica en gran medida la proteína resultante, siendo por tanto muy probablemente patogénica. Lo mismo ocurre cuando se comprueba en Pmut y en SIFT. Además, esta mutación ya ha sido descrita por otros autores como causante de la enfermedad (114).

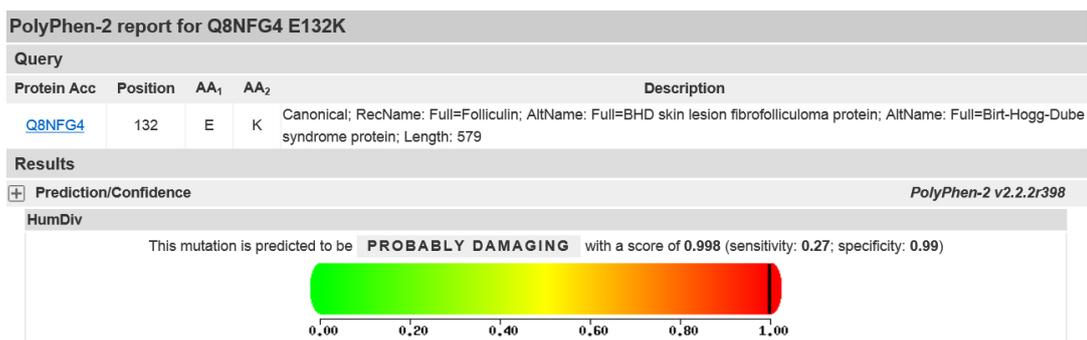


Figura 98. Predicción in silico del programa PolyPhen-2 de la mutación c.394G>A.

c.464C>T (exón 6)

Mutación en heterocigosis en el exón 6 que produce un cambio de una citosina por una timina en la posición 464 cDNA. En la proteína resultante, se sustituye una treonina en la posición 155 por una isoleucina.

Si se observa la puntuación de conservación con PolyPhen (figura 99), se comprueba que la mutación modifica en gran medida la proteína resultante, siendo por tanto muy probablemente patogénica. Lo mismo ocurre cuando se comprueba en Pmut.

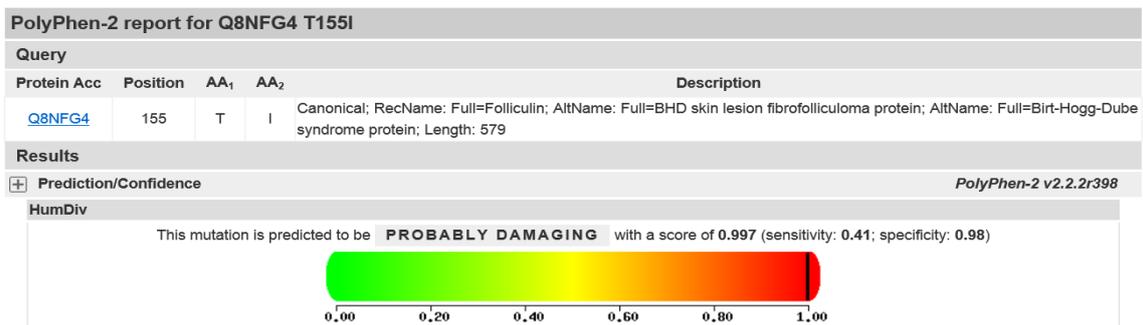


Figura 99. Predicción in silico del programa PolyPhen-2 de la mutación c.464C>T.

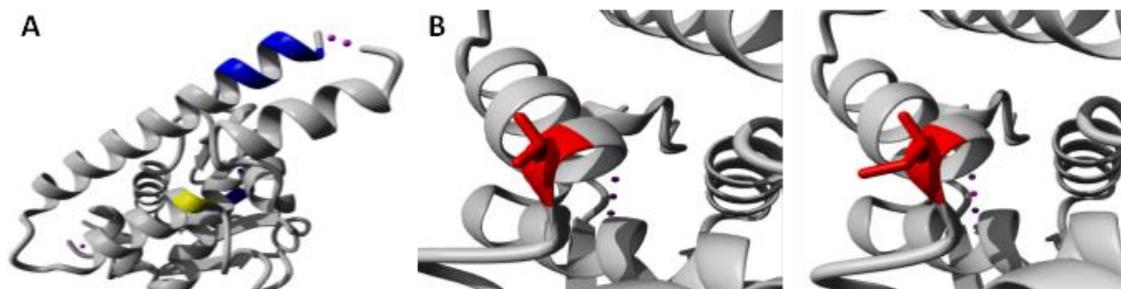


Figura 100. A) Representación de la estructura de la foliculina observándose en amarillo el residuo variante en estudio. **B)** Visualización molecular de los aminoácidos de la variante nativa (izquierda) y la variante mutante (derecha). Los residuos coloreados en rojo representan el tipo nativo (THR) y residuos de la variante mutante (ILE). Imagen obtenida de *SNPeffect 4.0 database*.

c.536G>A (exón 6); p.Arg179Gln

Mutación en heterocigosis en el exón 6 que produce un cambio de una guanina por una adenina en la posición 536 cDNA. En la proteína resultante, se sustituye una arginina en la posición 179 por una glutamina. Si se observa la puntuación de conservación con PolyPhen (figura 101), se comprueba que la mutación modifica en gran medida la proteína resultante, siendo por tanto muy probablemente patogénica. Lo mismo ocurre cuando se comprueba en Pmut.

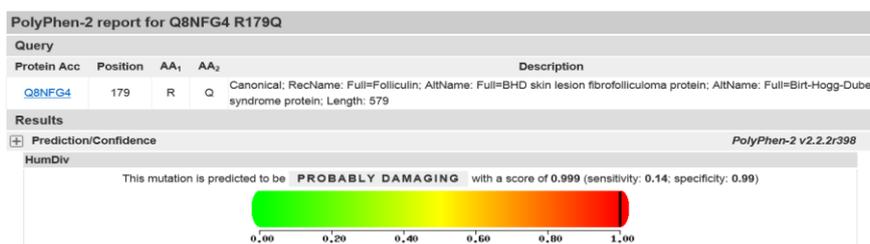


Figura 101. Predicción in silico del programa PolyPhen-2 de la mutación c.536G>A.

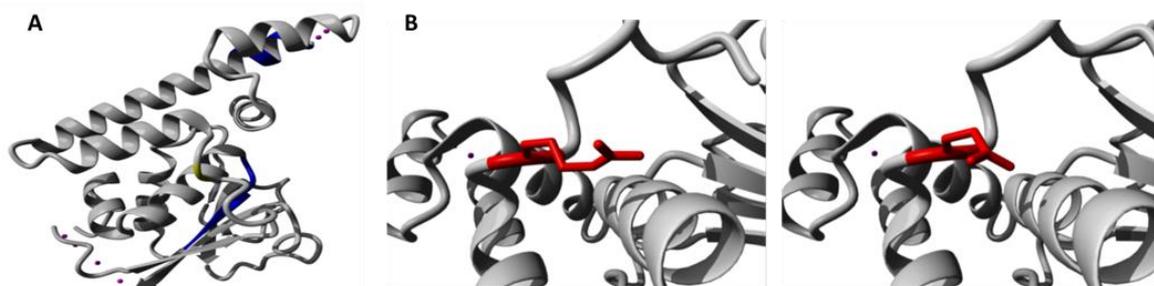


Figura 102. A) Representación de la estructura de la foliculina observándose en amarillo el residuo variante en estudio. **B)** Visualización molecular de los aminoácidos de la variante nativa (izquierda) y la variante mutante (derecha). Los residuos coloreados en rojo representan el tipo nativo (ARG) y residuos de la variante mutante (GLN). Imagen obtenida de *SNPeffect 4.0 database*.

c.563T>C (exón 6); p.Phe188Ser

Mutación en heterocigosis en el exón 6 que produce un cambio de una timina por una citosina en la posición 563 cDNA. En la proteína resultante, se sustituye una fenilalanina en la posición 179 por una serina.

Si se observa la puntuación de conservación con PolyPhen (figura 103), se comprueba que la mutación modifica en gran medida la proteína resultante, siendo por tanto muy probablemente patogénica. Lo mismo ocurre cuando se comprueba en Pmut y en SIFT.

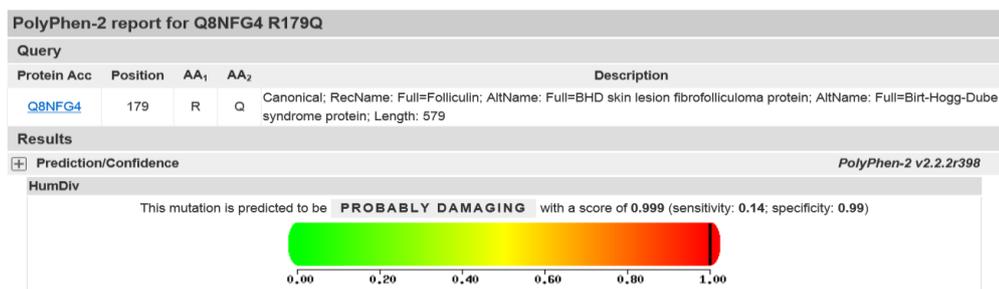


Figura 103. Predicción in silico del programa PolyPhen-2 de la mutación c.563T>C.

c.573_574delinsT (exón 6)

Mutación en heterocigosis en el exón 6 que produce una deleción de la adenina y guanina en la posición 573 y 574 del cDNA y una inserción de timina. En la proteína resultante, se sustituye una lisina en la posición 192 por una arginina con desplazamiento del marco de lectura a partir de dicho aminoácido originando en un codón de parada temprano que produciría una proteína más corta, de 195 aminoácidos (p.Lys192Rfs*31).

c.618+2T>A (intrón 6)

Mutación en heterocigosis en el intrón 6 que produce un cambio de timina por adenosina en la posición +2 del cDNA que podría afectar al procesamiento de intrones y causar la enfermedad.

Esta mutación ya ha sido descrita por otros autores como causante de la enfermedad (6).

c.833C>A (exón 8); p.Pro278Gln

Mutación en heterocigosis en el exón 8 que produce un cambio de una citosina por una adenina en la posición 833 cDNA. En la proteína resultante, se sustituye una prolina en la posición 278 por una glutamina.

Si se observa la puntuación de conservación con PolyPhen (figura 104), se comprueba que la mutación modifica en gran medida la proteína resultante, siendo por tanto muy probablemente patológica. Lo mismo ocurre cuando se comprueba en Pmut.

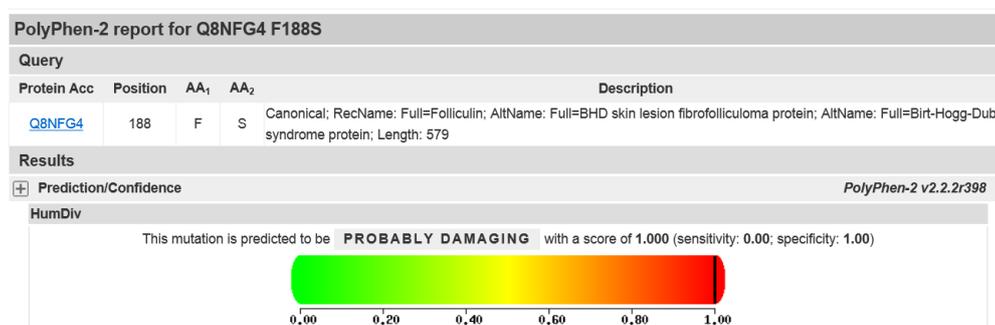


Figura 104. Predicción in silico del programa PolyPhen-2 de la mutación c.833C>A.

c.1042T>C (exón 9)

Mutación en heterocigosis en el exón 9 que produce un cambio de timina por citosina en la posición 1042 del cDNA. En la proteína resultante, se sustituye una serina en la posición 348 por una prolina.

c.1084C>T (exón 10);); p.Arg362Cys

Mutación en heterocigosis en el exón 10 que produce un cambio de una citosina por una timina en la posición 1084 del cDNA. En la proteína resultante, se sustituye una arginina en la posición 362 por una cisteína. Si se observa la puntuación de conservación con PolyPhen (figura 105), se comprueba que la mutación modifica en gran medida la proteína resultante, siendo por tanto muy probablemente patogénica. Lo mismo ocurre con Pmut y SIFT.

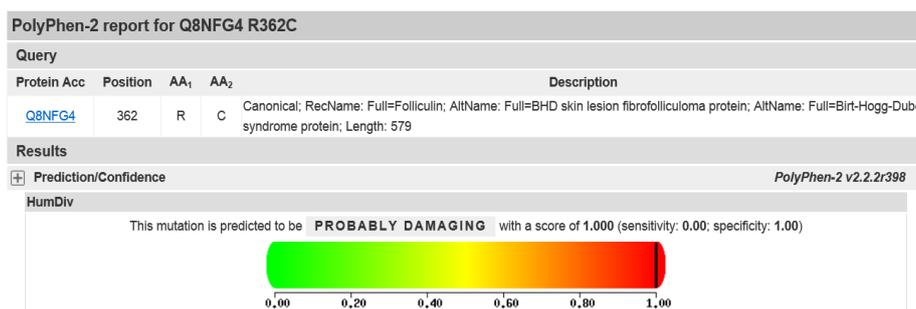


Figura 105. Predicción in silico del programa PolyPhen-2 de la mutación c.1084C>T.

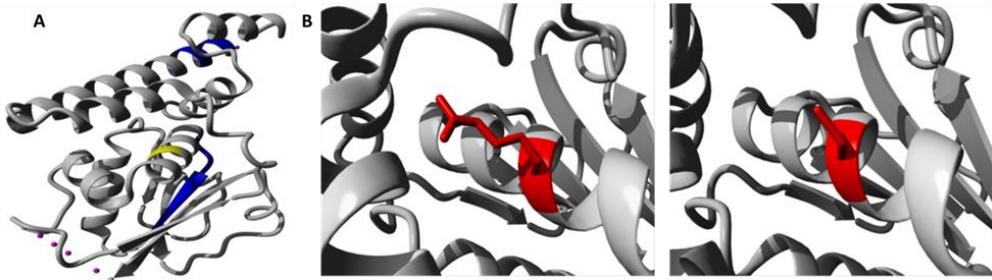


Figura 106. A) Representación de la estructura de la foliculina observándose en amarillo el residuo variante en estudio. **B)** Visualización molecular de los aminoácidos de la variante nativa (izquierda) y la variante mutante (derecha). Los residuos coloreados en rojo representan el tipo nativo (ARG) y residuos de la variante mutante (CYS). Imagen obtenida de *SNPeffect 4.0 database*.

c.1135A>T (exón 10); p.Arg379Ter

Mutación en heterocigosis en el exón 10 que produce un cambio de adenina por timina en la posición 1135 del cDNA. En la proteína resultante, se sustituye una arginina en la posición 379 por un codón de parada y por tanto daría lugar a una proteína más corta que no podría realizar correctamente su función. Esta mutación ya ha sido descrita por otros autores como causante de la enfermedad (34).

c.1157C>T (exón 10); p.Ser386Leu

Mutación en heterocigosis en el exón 10 que produce un cambio de una citosina por una timina en la posición 1157 cDNA. En la proteína resultante, se sustituye una serina en la posición 386 por una leucina.

Si se observa la puntuación de conservación con PolyPhen (figura 107), se comprueba que la mutación modifica en gran medida la proteína resultante,

siendo por tanto muy probablemente patogénica. Lo mismo ocurre cuando se comprueba en Pmut y SIFT.

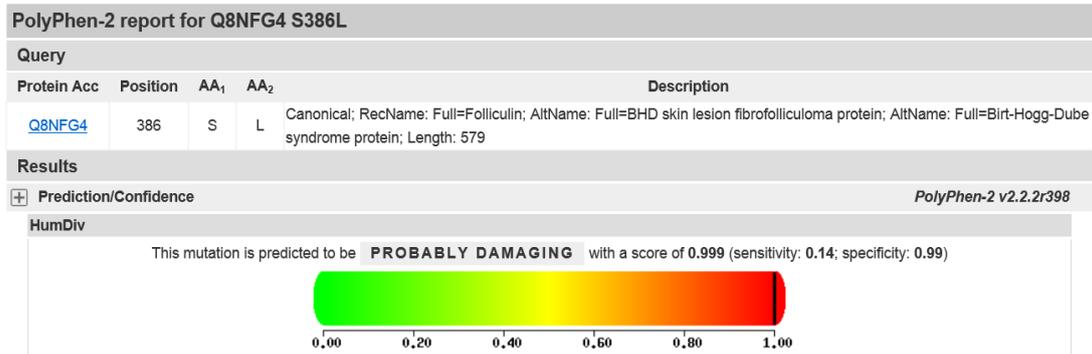


Figura 107. Predicción in silico realizada por el programa PolyPhen-2 del efecto funcional de la mutación c.1157C>T.

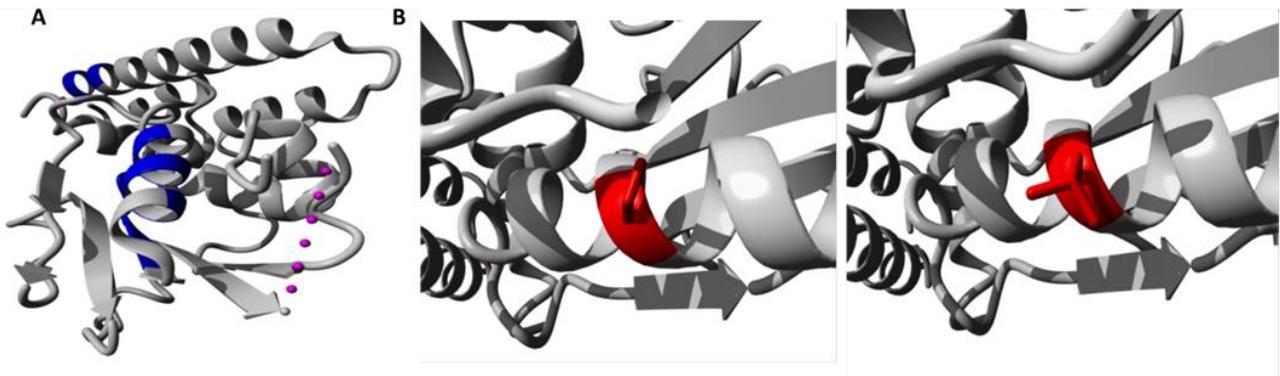


Figura 108. **A)** Representación de la estructura de foliculina donde se observa coloreado en azul la agregación proteica. **B)** Visualización molecular de los aminoácidos de la variante nativa (izquierda) y la variante mutante (derecha). Los residuos coloreados en rojo representa el tipo nativo (SER) y residuos de la variante mutante (LEU).

c.1286insC (exón 11); p.His429Profs*27

Mutación en heterocigosis en el exón 11 que produce una inserción de una citosina en la posición 1286 del cDNA. En la proteína resultante, se sustituye una histidina en la posición 429 por una prolina con desplazamiento del marco de lectura que originaría un codón de parada temprano (posición 455) y la síntesis de una proteína errónea a partir de la posición 429, que tendría sólo 454 aminoácidos.

La mutación ya ha sido descrita por otros autores como causante del SBHD (4,42,74,153–157).

c.1461_1462delAG>T (exón 13); p. Glu487Aspfs*33

Mutación en el exón 13 que produce una deleción de la posición 1461 y 1462 del cDNA. En la proteína resultante, se sustituye un ácido glutámico en la posición 487 por un ácido aspártico con desplazamiento del marco de lectura.

Esta mutación produce una proteína truncada puesto que al desplazar el marco de lectura aparece un nuevo codón de parada tan sólo 33 aminoácidos tras el codón mutado, siendo por tanto esta variante patogénica.

c.1615C>T (exón 14); p.Leu539Met

Mutación en heterocigosis en el exón 14 que produce un cambio de una citosina por una timina en la posición 1615 del cDNA. En la proteína resultante, se sustituye una leucina en la posición 539 por una metionina. Si se observa la puntuación de conservación con PolyPhen (figura 109), se comprueba que la

mutación modifica en gran medida la proteína resultante, siendo por tanto muy probablemente patogénica. Lo mismo ocurre cuando se comprueba en SIFT.

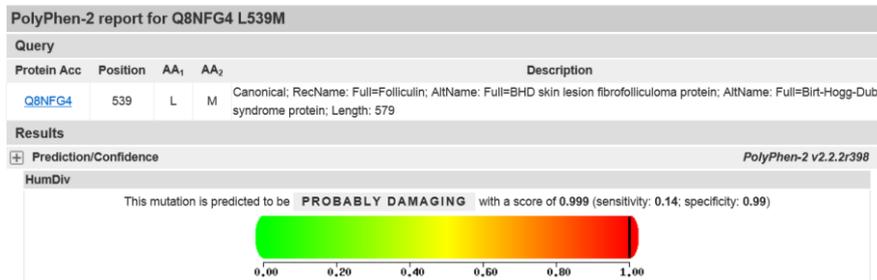


Figura 109. Predicción in silico del programa PolyPhen-2 de la mutación c.1615C>T.

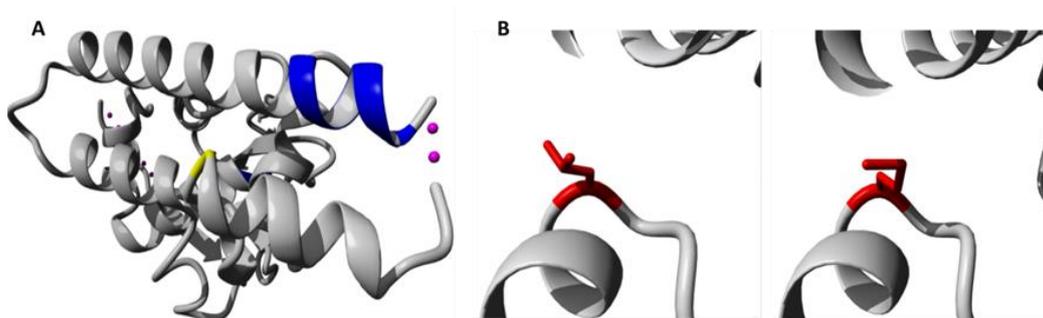


Figura 110. A) Representación de la estructura de la foliculina observándose en amarillo el residuo variante en estudio. **B)** Visualización molecular de los aminoácidos de la variante nativa (izquierda) y la variante mutante (derecha). Los residuos coloreados en rojo representan el tipo nativo (LEU) y residuos de la variante mutante (MET). Imagen obtenida de *SNPeffect 4.0 database*.

c.1630G>A (exón 14); p.Glu544Lys

Mutación en heterocigosis en el exón 14 que produce un cambio de una guanina por una adenina en la posición 1630 del cDNA. En la proteína resultante, se sustituye un ácido glutámico en la posición 544 por una lisina. Si se observa la puntuación de conservación con PolyPhen (figura 111), se comprueba que la mutación modifica en gran medida la proteína resultante, siendo por tanto muy probablemente patogénica. Lo mismo ocurre en SIFT.

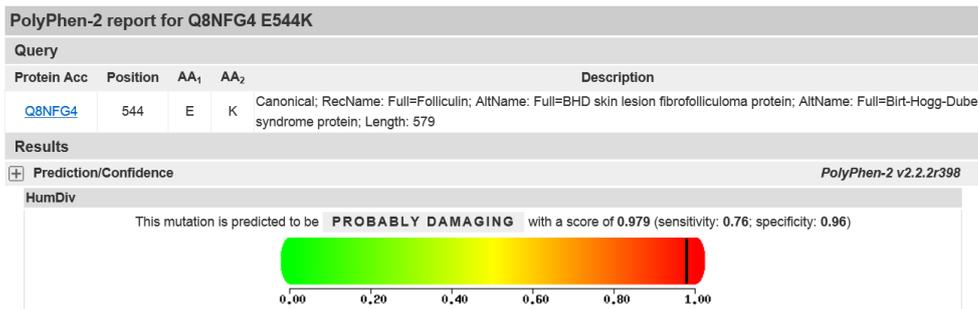


Figura 111. Predicción in silico del programa PolyPhen-2 de la mutación c.1630G>A.

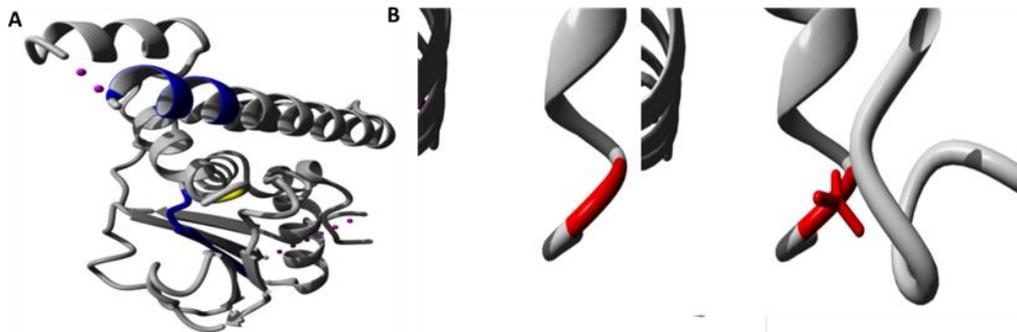


Figura 112. A) Representación de la estructura de la foliculina observándose en amarillo el residuo variante en estudio. B) Visualización molecular de los aminoácidos de la variante nativa (izquierda) y la variante mutante (derecha). Los residuos coloreados en rojo representan el tipo nativo (GLY) y residuos de la variante mutante (ASP). Imagen obtenida de *SNPeffect 4.0 database*.

c.1667G>A (exón 14); p.Gly556Asp

Mutación en heterocigosis en el exón 14 que produce un cambio de una guanina por una adenina en la posición 1667 del cDNA. En la proteína resultante, se sustituye una glicina en la posición 556 por una ácido aspártico. Si se observa la puntuación de conservación con PolyPhen (figura 113), se

comprueba que la mutación modifica en gran medida la proteína resultante, siendo por tanto muy probablemente patogénica. Lo mismo ocurre cuando se comprueba en Pmut y SIFT.

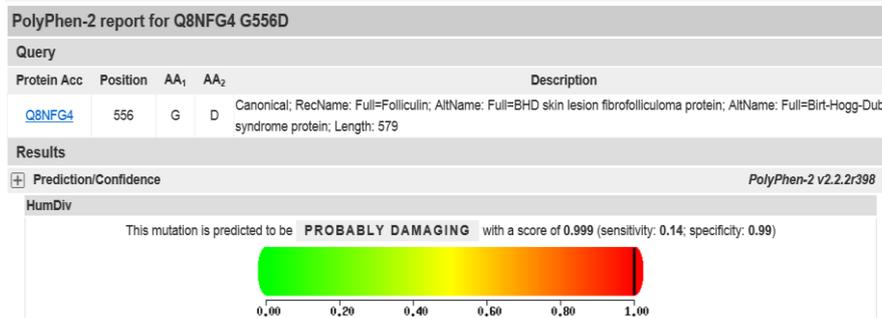


Figura 113. Predicción in silico del programa PolyPhen-2 de la mutación c.1667G>A.

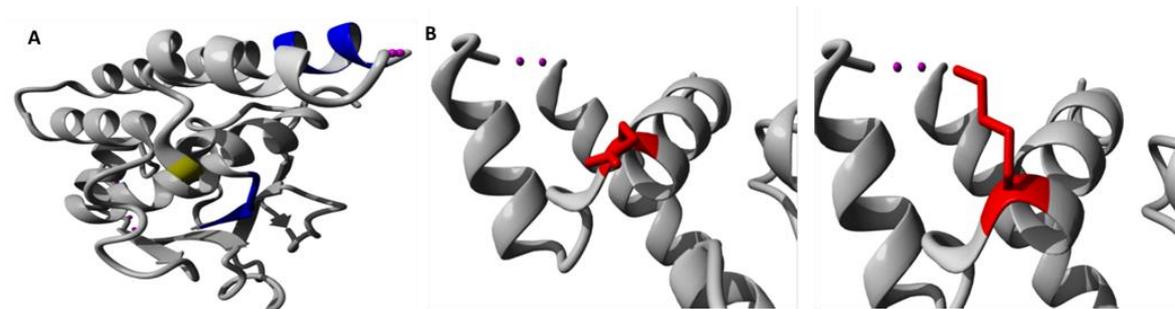


Figura 114. A) Representación de la estructura de la foliculina observándose en amarillo el residuo variante en estudio. **B)** Visualización molecular de los aminoácidos de la variante nativa (izquierda) y la variante mutante (derecha). Los residuos coloreados en rojo representan el tipo nativo (GLU) y residuos de la variante mutante (LYS). Imagen obtenida de *SNPeffect 4.0 database*.

c.1698G>A (exón 14); p.Met566Ile

Mutación en heterocigosis en el exón 14 que produce un cambio de una guanina por una adenina en la posición 1698 del cDNA. En la proteína resultante, se sustituye una metionina en la posición 566 por una isoleucina.

Si se observa la puntuación de conservación con PolyPhen (figura 115), se comprueba que la mutación modifica en gran medida la proteína resultante, siendo por tanto muy posiblemente patogénica. Lo mismo ocurre cuando se comprueba en SIFT.

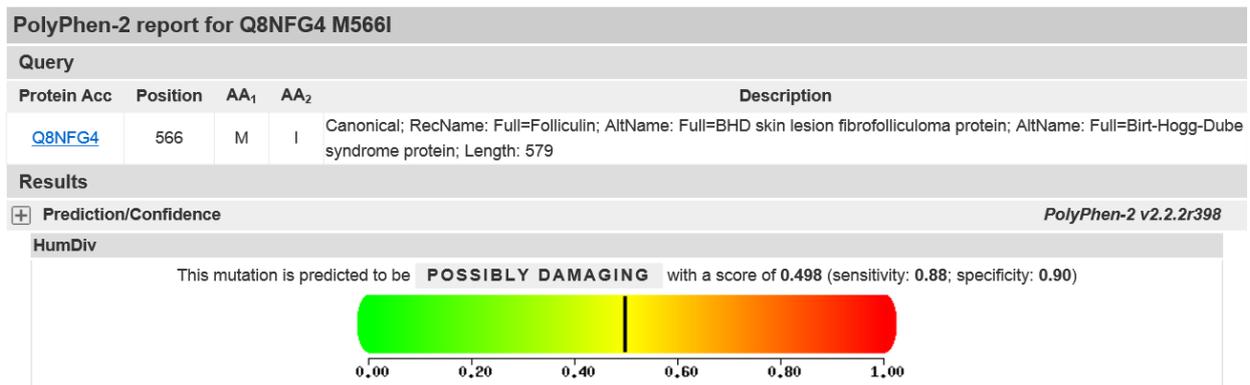


Figura 115. Predicción in silico realizada por el programa PolyPhen-2 del efecto funcional de la mutación c.1698G>A.

c.1700C>T (exón 14); p.Ser567Phe

Mutación en heterocigosis en el exón 14 que produce un cambio de una citosina por una timina en la posición 1700 del cDNA. En la proteína resultante, se sustituye una serina en la posición 567 por una fenilalanina.

Si se observa la puntuación de conservación con PolyPhen (figura 116), se comprueba que la mutación modifica en gran medida la proteína resultante, siendo por tanto muy probablemente patogénica. Lo mismo ocurre cuando se comprueba en Pmut y SIFT.

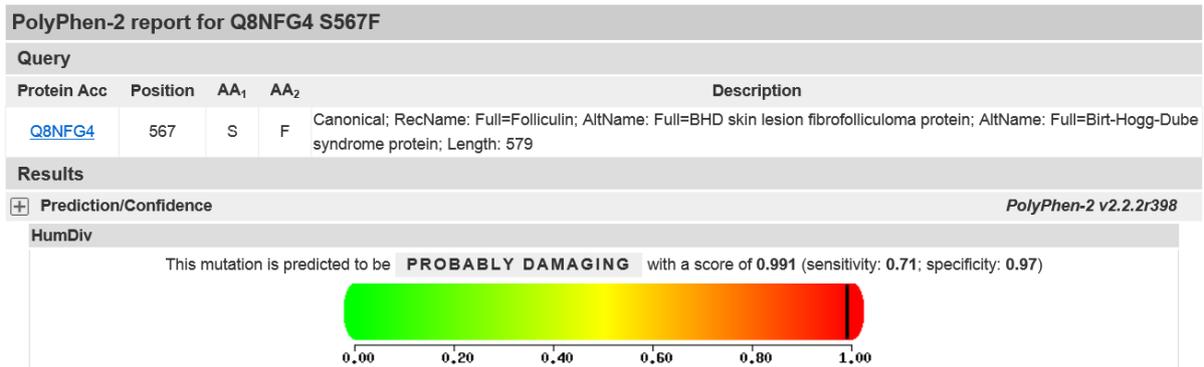


Figura 116. Predicción in silico realizada por el programa PolyPhen-2 del efecto funcional de la mutación c.1700C>T.

c.1732C>T (exón 14); p.Arg578Trp

Mutación en heterocigosis en el exón 14 que produce un cambio de una citosina por una timina en la posición 1732 del cDNA. En la proteína resultante, se sustituye una arginina en la posición 578 por un triptófano.

Si se observa la puntuación de conservación con PolyPhen (figura 117), se comprueba que la mutación modifica en gran medida la proteína resultante, siendo por tanto muy probablemente patogénica. Lo mismo ocurre cuando se comprueba en Pmut y SIFT.

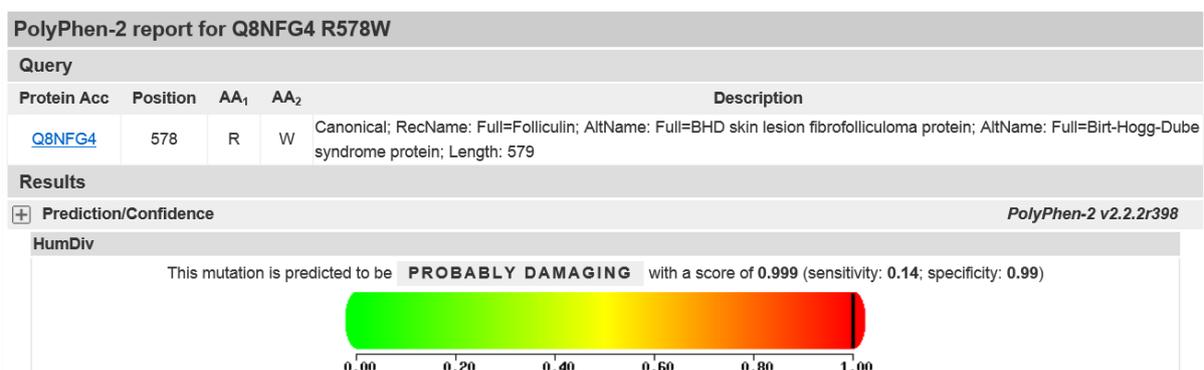


Figura 117. Predicción in silico realizada por el programa PolyPhen-2 del efecto funcional de la mutación c.1732C>T.

En la figura 118, se recogen todas las mutaciones encontradas tanto en línea germinal como las mutaciones somáticas.

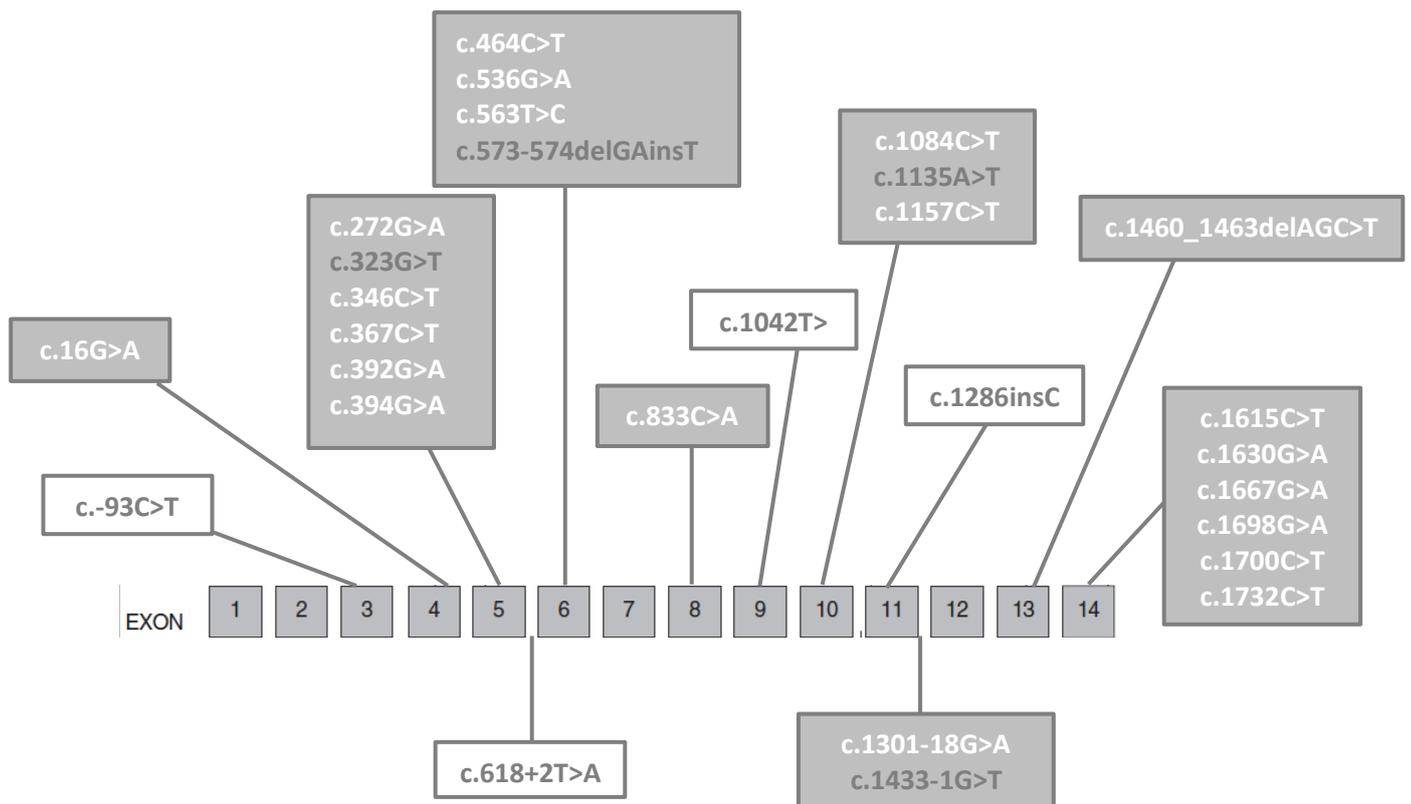


Figura 118. Mutaciones encontradas en nuestros pacientes. En gris, las mutaciones germinales. En blanco, las mutaciones somáticas.

3.1.3.3. Análisis de la presencia de inactivación bialélica

Uno de los objetivos de nuestro trabajo era analizar la presencia de inactivación bialélica del gen FLCN por mutación y/o deleción en las lesiones cutáneas. En las tablas 15-17, mostramos los resultados encontrados. Salvo que se especifique lo contrario, las muestras de sangre fueron estudiadas por Sanger y secuenciación masiva mientras que los resultados de las biopsias incluidas en parafina procedían esencialmente del estudio mediante secuenciación masiva.

Tabla 15. Mutaciones germinales y somáticas patogénicas de las muestras sanguíneas y tisulares.

ID	Mutación germinal	Mutación somática	Cambio aa	Ex/in	Cm %	PolyPhen	SIFT*	Pmut** (PI/R)	Resultado	Lesión	Presencia/ ausencia MS	Inactivación bialélica	
2	c.1433-1G>T intron 12	c.1433-1G>T	-----	I12	23,27	-----	-----	-----	Patog.	FF	A	NO	
		c.1433-1G>T	-----	I12	99,29	-----	-----	-----	Patog.	FF	A	NO	
		c.1433-1G>T	-----	I12	11,16	-----	-----	-----	Patog.	FF	A	NO	
		c.1433-1G>T	-----	I12	8,5	-----	-----	-----	Patog.				
3	c.1433-1G>T intron 12	c.1732C>T	p.Arg578Trp	E14	12,24	PP	0	P (0.9949/9)	Patog.	FF	P	SI	
		c.323G>T	p.Ser108Ile	E5	6,68	PP	0	P (0.6757/3)	Patog.				
		c.394G>A	p.Glu132Lys	E5	94,62	PP	0	P (0.5608/1)	Patog.	FF	P	SI	
4	c.1285insC p.His429Profs*27 exon 11	c.833C>A	p.Pro278Gln	E8	20	PP	0.11	P (0.7238/4)	Patog.	FF	P	SI	
		c.1285insC	p.His429Profs*27	E11	Sanger	-----	-----	-----	Patog.				
5	c.1285insC p.His429Profs*27 exon 11	c.464C>T	p.Thr155Ile	E6A	14,84	PP	0.57	P (0.5550/1)	Patog.	FF	P	NO CONCLUYENTE	
		c.536G>A	p.Arg179Gln	E6B	14,01	PP	0.23	P (0.5587/1)	Patog.				
		c.563T>C	p.Phe188Ser	E6B	14,22	PP	0.02	P (0.7794/5)	Patog.				
		c.323G>T	p.Ser108Ile	E5	68,61	PP	0	P (0.6757/3)	Patog.	FF	P	SI	
6	c.323G>T p.Ser108Ile exon 05	c.1615C>T	p.Leu539Met	E14	25,58	PP	0.02	N (0.0453/9)	Patog.				
		c.323G>T	p.Ser108Ile	E5	55,48	PP	0	P (0.6757/3)	Patog.				
		c.1461_1462delAG	p.Glu487Aspfs33	E13	9,95	-----	-----	-----	Patog.	FF	P	NO CONCLUYENTE	
13	NR (+)	c.1504C>T	p.Gln502Ter	E13	48,24	-----	-----	-----	Patog.				
		c.392G>A	p.Cys131Tyr	E5	16,83	PP	0.05	P (0.9606/9)	Patog.				
		c.272G>A	p.Gly91Glu	E5	18,32	PP	0.02	P (0.8458/6)	Patog.				
		c.346C>T	p.Gln116Ter	E5	11,72	-----	-----	-----	Patog.	Pu	P	SI	
		c.394G>A	p.Glu132Lys	E5	8,75	PP	0	P (0.5608/1)	Patog.				
		c.536G>A	p.Arg179Gln	E6A	97,23	PP	0.23	P (0.5587/1)	Patog.				
		c.1285insC	p.His429Profs*27	E11	18,6	-----	-----	-----	Patog.	TD	SI	SI	
		c.1084C>T	p.Arg362Cys	E10	99,74	PP	0.02	P (0.9170/8)	Patog.				

Tabla 16 (cont.).- Variantes no patogénicas

I26	c.1062+52G>A	-----	I9	99,38	-----	-----	PAS
	c.1300+1G>A	-----	I11	6,6	-----	-----	PAS
	c.1698G>A	p.Met566Ile	E14	10,31	PP	P (0.5112/0)	N
	c.1539-49C>T	-----	I13	36,77	-----	-----	N
	c.1062+6C>T	-----	I9	99,38	-----	-----	PAS
	c.1062+47G>A	-----	I9	99,38	-----	-----	PAS
I28	c.1282C>T	p.Pro428Ser	E11	16,25	B	P (0.5695/1)	N
	c.1442C>T	p.Thy481Ile	E13	22,64	B	P (0.8992/7)	N
	c.-41A>T	-----	E3	99,37	-----	-----	N
	c.1432+32T>C	-----	I12	61,7	-----	-----	PAS
I29	c.-93C>T		E8	18,67	B	N (0.0416/9)	N
	Exón 3	p.Lys288Arg					
I38	c.1135A>T						
	p.Arg379Ter	p. Val121Ile	E5	99,62	PP	N (0.0730/8)	PN
I39	c.1285insC						
	p.His429Profs*27	c.1539-24G>A	I13	19,3	-----	-----	PAS
	Exón 11						

B: benigna, E: exón, FF: fibroliculoma, I: intrón, N: neutra, PB: probablemente benigna, PAS: posible alteración del splicing, (+): exitus anterior al estudio.

* Se considera patológica si ≤ 0.05 y tolerable si > 0.05

P/F: Patogenicidad/fiabilidad

En aquellos pacientes con mutaciones en los intrones, habría que estudiar si el cambio de nucleótidos en estas áreas provoca modificaciones en la proteína.

Tabla 17. Detección de inactivación bialélica en las muestras cutáneas y pulmonares estudiadas.

<i>INACTIVACIÓN BIALÉLICA</i>	<i>PACIENTES</i>		<i>MUESTRAS</i>	
	Pulmón	Piel	Pulmón	Piel
Sí	1	5	1	5
Posible pero no concluyente	1	3	1	5
No	1	2	1	5
TOTAL	3	10	3	15

Al analizar la relación entre la inactivación bialélica y las características clínico-patológicas, inmunohistoquímicas y genéticas de los pacientes, encontramos que la inactivación bialélica se correlaciona de forma positiva con un mayor número de lesiones cutáneas ($p < 0.05$).

La evaluación del paciente 2 se realizó mediante el estudio de ADN en una muestra de sangre y en 4 biopsias procedentes de 4 fibrofoliculomas. Encontramos presente la mutación germinal en cada una de las muestras en diferentes proporciones, siendo muy baja (menor del 25%) en tres de ellas y de prácticamente el 100% en una. Estos resultados pusieron de manifiesto la pérdida del alelo con la mutación germinal en aquellas muestras que presentaban baja proporción de lecturas con la mutación. En el caso del primer fibrofoliculoma, prácticamente el 60% de las células de la muestra habrían perdido el alelo con la mutación germinal; mientras que en el caso del tercer

fibrofoliculoma, los resultados de secuenciación indicaron una pérdida importante del alelo mutado de lo que se deducía que, como máximo, un 20-25% de las células de la muestra eran normales.

En la última muestra analizada se habría perdido completamente el alelo con la mutación germinal y menos de un 20% del tejido de la muestra sería normal. Además, detectamos la presencia de 2 mutaciones patogénicas (p.Arg578Trp y p.Ser108Ile) en una baja proporción de lecturas. Estas dos mutaciones podrían presentarse en un solo alelo dado ya que al haberse perdido el alelo con la mutación germinal, la mutación p.Arg578Trp y la mutación p.Ser108Ile se produciría en el alelo restante en la totalidad y en el 50% de las células tumorales, respectivamente. La situación más probable es que cada mutación se hubiera producido en eventos diferentes y en células diferentes y que estas mutaciones se encontrasen en distintas poblaciones celulares tumorales. El resultado, en cualquier caso indica una inactivación bialélica de FLCN en dicha muestra (tabla 15).

En cuanto a las otras tres biopsias no se detectaron otras alteraciones adicionales que pudieran inactivar la copia restante del gen, si bien su presencia no pudo ser excluida totalmente ya que una parte del gen no pudo ser analizada debido a la cantidad y calidad del ADN.

El estudio del paciente 3 se llevó a cabo mediante el estudio en sangre y en una biopsia procedente de un fibrofoliculoma. La mutación germinal detectada en sangre no se encontró en la biopsia del fibrofoliculoma, y, sin embargo, sí que se halló la presencia de una nueva mutación somática en prácticamente el 100% de las lecturas. Estos datos indican la pérdida del alelo con la mutación germinal, y la aparición de la mutación somática en el alelo restante, y, por tanto, una inactivación bialélica.

El estudio del paciente 4 se llevó a cabo mediante el estudio de ADN en una muestra de sangre y en una biopsia procedente de un fibrofoliculoma. Al estudiar la muestra en parafina mediante secuenciación masiva no encontramos la mutación germinal. Sin embargo, hallamos la presencia de una mutación patogénica (p.Pro278Gln) no detectada en línea germinal en prácticamente el total de las células tumorales. Estos resultados indicarían pérdida del alelo con la mutación germinal y a la aparición de una segunda mutación en el alelo restante y, por tanto, inactivación bialélica.

El estudio del paciente 6 se llevó a cabo mediante el estudio de ADN en una muestra de sangre y en dos biopsias procedentes de dos fibrofoliculomas. En el primer tumor y apoyándonos en los datos procedentes de la propia mutación y de polimorfismos del gen, encontramos una pérdida del alelo sano en aproximadamente el 40% junto con la aparición de una mutación somática adicional en el 50% de las células de la muestra. Por tanto, al menos un 20% de las células tumorales, aproximadamente, presentarían la combinación de pérdida del alelo sano junto con esta segunda mutación somática. Así, la inactivación bialélica estaría presente en al menos este porcentaje de células tumorales. En el otro tumor, no se detectó una pérdida alélica si bien se detectaron algunas mutaciones patogénicas que prácticamente afectarían a todas las células tumorales en el caso de p.Gln502Ter y a un 20-30% en el caso de las mutación p.Glu487Asp533 que podrían provocar una pérdida de funcionalidad del gen FLCN. Al no poder confirmar en qué alelo se encuentran estas mutaciones somáticas, no podemos hablar de inactivación bialélica en esta muestra.

El estudio del paciente 13 se realizó mediante el estudio de ADN en dos biopsias procedentes de pleura y de un tricodiscoma, no pudiendo realizar el estudio en sangre porque el paciente había fallecido. Aunque no se pudo determinar la mutación en sangre, asumimos que tenía la mutación de su familiar (paciente 4)

(c.1285insC). En la muestra de pulmón, no encontramos la mutación germinal, lo cual podría explicarse por la pérdida del alelo con dicha mutación en la práctica totalidad de las células. Además, encontramos la presencia de 5 mutaciones patogénicas (p.Cys131Tyr, p.Gly91Glu, p.Gln116Ter, p.Glu132Lys, p.Arg179Gln) en diferentes proporciones de lectura que podrían producirse en el alelo restante, en el 85%, 90%, 55%, 45% y 100%, respectivamente. Con todo ello, podemos deducir que se habría producido la inactivación de ambos alelos. En el caso del tricodiscoma, encontramos la mutación germinal en la muestra en parafina y una mutación patogénica (p.Arg362Cys) en una proporción de lecturas de prácticamente el 100%. En este caso, los resultados de secuenciación indicarían una inactivación bialélica por la pérdida importante del alelo con la mutación germinal y la aparición sobre el alelo restante de la mutación somática p.Arg362Cys en prácticamente todas las células tumorales.

La evaluación del paciente 19 se realizó mediante el estudio de ADN en una muestra de sangre y en dos biopsias procedentes de un fibrofoliculoma y un adenoma sebáceo. En el caso del adenoma sebáceo, se identificó la mutación germinal en el 45% de las lecturas que afectaría a la práctica totalidad de las células, junto con otra mutación patogénica (p.Gly556Asp) que afectaría casi al 40% de las células tumorales pudiendo provocar una pérdida de funcionalidad del gen FLCN. En este caso, en el que no se detectó una pérdida alélica, con los resultados obtenidos no puede confirmarse una inactivación bialélica. En cuanto al fibrofoliculoma, no detectamos la mutación germinal en la muestra de parafina (ya que no se pudo secuenciar ese exón) pero encontramos dos mutaciones patogénicas (p.Arg362Cys y p.Ser386Leu) en aproximadamente el 100% de las células tumorales. De este modo, al igual que en el adenoma sebáceo, no se puede confirmar la presencia de inactivación bialélica ya que al no haber podido secuenciar el exón 9, no sabemos si el alelo con la mutación germinal está ausente o presente.

El paciente 26 se realizó mediante el estudio de ADN de una muestra de sangre y una biopsia procedente de pleura. Se encontró la mutación germinal en aproximadamente el 60% de las células de la muestra y la presencia de dos mutaciones patogénicas (p.Met566Ile y p.Gln123Ter) en una baja proporción de lecturas. Los resultados de secuenciación indicarían una pérdida del alelo con la mutación germinal en un 40% de células probablemente tumorales y la aparición de nuevas mutaciones somáticas, sin poder confirmar una inactivación bialélica al no saber en qué alelo se produce cada una de ellas.

La evaluación del paciente 27 se realizó mediante el estudio de ADN en una muestra de sangre y en una biopsia procedente de pulmón. En línea germinal, no encontramos ninguna mutación en el gen FLCN. Encontramos una mutación patogénica (p.Ala6Thr) que se presentó en un 26% de lecturas. Esta mutación afectaría a un 50% aproximadamente de las células. Por tanto, los datos disponibles no apoyan la inactivación bialélica.

El estudio del paciente 31 se llevó a cabo mediante el estudio de ADN en una muestra de sangre y en dos biopsias procedentes de una lesión renal y un fibrofoliculoma. En la lesión renal, encontramos la mutación germinal en aproximadamente el 70% de las lecturas, encontrando además la presencia de dos mutaciones patogénicas (p.Ser567Phe y p.Gln285Ter) en una baja proporción de lecturas. Estos datos indicarían probablemente la pérdida del alelo sano en el 40% de las células de la muestra y la aparición de nuevas mutaciones somáticas. En cuanto al fibrofoliculoma, encontramos la mutación c.618+2T>A en un 63% sugiriendo la pérdida del alelo sano en el 26% de las células de la muestra.

El estudio del paciente 38 se realizó mediante el estudio de ADN en una muestra de sangre y en una biopsia procedente de un fibrofoliculoma. Los datos encontrados sugieren una pérdida del alelo sano en aproximadamente el 30%

de las células al encontrar la mutación germinal en un 67% de las lecturas realizadas.

El estudio del paciente 39 y del paciente 5 se llevó a cabo mediante el estudio de ADN en una muestra de sangre y en una biopsia procedente de un fibrofoliculoma, respectivamente. Encontramos la mutación germinal en la muestra en parafina junto con la presencia de mutaciones somáticas en bajas proporciones de lectura. Con los resultados obtenidos no podemos concluir que exista inactivación bialélica, ya que desconocemos en que alelos se producen cada una de las mutaciones.

De los 19 pacientes con SBHD, encontramos mutación en línea germinal en 14 pacientes (73,7%). De todas las muestras sanguíneas y tisulares que fueron secuenciadas mediante secuenciación masiva, se obtuvo un grupo de 14 pacientes y 20 biopsias (excluyendo el tumor renal control del paciente nº 31) en los que se detectaron mutaciones en línea germinal y/o mutaciones somáticas consideradas variantes patogénicas del gen FLCN. De los 12 pacientes con diagnóstico SBHD, 9 de ellos presentaban mutaciones somáticas en alguna de sus biopsias (75%), excluyendo el paciente con la lesión renal (nº 31). En 8 de ellos se encontraron mutaciones somáticas en todas las muestras tisulares estudiadas (66,7%). En 1 paciente (excluyendo el nº 31), al menos una de las muestras presentaba mutaciones somáticas (8,3%) y en otros 3 no se halló ninguna mutación somática añadida (25%). Al analizar la presencia de mutaciones somáticas en las 18 biopsias de los pacientes con SBHD, se observa la presencia de 2 o más mutaciones somáticas en una misma muestra en 6 de ellas (33,3%), encontrando al menos una en 6 de las piezas analizadas (33,3%), y hasta cinco en 1 muestra. No se encontró ninguna mutación somática otro tercio de las muestras.

En cuanto a la inactivación bialélica, se encontró su presencia en 5 de los pacientes estudiados (41,7%). En las lesiones cutáneas, la inactivación bialélica estuvo presente en 5 de los 12 pacientes incluidos (41,7%) y en 5 de las 15 muestras (33,33%). Y en un tercio adicional de las lesiones no es descartable totalmente que exista inactivación bialélica aunque no hemos podido confirmarla de forma concluyente. Por tanto, sólo un tercio de las lesiones no presenta con seguridad inactivación bialélica. En las lesiones pulmonares, en un tercio de los pacientes se encontró inactivación bialélica. En uno de los pacientes no se ha podido concluir su presencia de forma concluyente. Por tanto, como mínimo un tercio de estos presentaría inactivación bialélica aunque, igual que ocurre con las lesiones cutáneas, su porcentaje real podría ser mayor. Se detectó la pérdida del alelo con la mutación germinal en 5 pacientes (41,7%) y en 8 de las muestras recogidas (44,4%), 2 pulmonares (11,1%) y 6 cutáneas (33,3%). La pérdida del alelo sano se halló en 4 pacientes (33,3%) y en 4 muestras cutáneas (22,2%).

3.2. DESARROLLO ARGUMENTAL

En nuestro trabajo hemos recogido un total de 39 pacientes de familias con SBHD, encontrando lesiones cutáneas en 28 pacientes (71,8%), 15 mujeres y 13 varones, con edades por encima de los 26 años, presentándose generalmente con más de 100 lesiones. 13 de ellos (46,4%) presentaban múltiples pápulas a nivel facial, incluyendo nariz, surcos nasogenianos, mejillas y frente. 13 de ellos (46,4%) en el cuello y 9 (32,1%) en el tronco. A nivel clínico, estas lesiones se presentan como múltiples pápulas blanquecinas o amarillentas, de aspecto cupuliforme, superficie lisa, de escasos milímetros de diámetro. Se observaron acrocordones en el 60,71% de los pacientes localizados principalmente en las axilas, cuello, párpados e ingles y en el 47% de los casos se encontraban asociadas a fibrofolliculomas o tricodiscomas. Dos de los pacientes diagnosticados de SBHD y clínica cutánea se presentaba con menos de 5 lesiones hamartomatosas características (tricodiscomas o fibrofolliculomas) por lo que es importante descartar este síndrome en pacientes que se presenten con las lesiones típicas aunque su número sea inferior a los criterios internacionalmente aceptados.

Como ya comentábamos, a pesar de que las lesiones cutáneas constituyen la clave para el diagnóstico de este síndrome, existen algunos pacientes con diagnóstico confirmado de SBHD que se presentan sin dichas lesiones. En nuestra serie, 4 de los pacientes incluidos (21%) fueron diagnosticados de SBHD en ausencia de lesiones cutáneas hamartomatosas típicas. El diagnóstico del SBHD aun sin la presencia de lesiones cutáneas ya se había descrito en la literatura con anterioridad (53). Maffé y cols. encuentran que en un 33% de los pacientes con mutaciones en el gen FLCN y diagnóstico de SBHD las lesiones cutáneas están ausentes (53). Este porcentaje llega hasta el 70% en la serie descrita por Kunogi y cols. en la que observan la presencia de síndrome Birt-

Hogg-Dubé y neumotórax sin lesiones cutáneas ni alteraciones renales en este elevado porcentaje de pacientes (61). En relación con esto, Maffé y cols (53) señalan que ninguno de los pacientes con SBHD y sin lesiones cutáneas presentaba mutación germinal de FLCN. Nuestros resultados indican que pacientes sin lesiones hamartomatosas típicas también pueden presentar la mutación germinal, lo que está en consonancia con los resultados de Kunogi y cols. (61).

En nuestra serie, junto a las lesiones clásicas del síndrome, hemos encontrado la presencia de múltiples angiofibromas faciales en 2 de los pacientes incluidos: un varón de 70 años con afectación cutánea sin patología pulmonar ni renal asociada y con mutación en el exón 5 (c.323G>T); y una mujer de 45 años con afectación cutánea como única manifestación y mutación en el intrón 12 (c.1433-1G>T). Schaffer y cols. también describen la asociación de angiofibromas faciales en un varón de 40 años con múltiples lesiones en nariz, mejillas y cuello (23). Al realizar el estudio genético del gen FLCN encuentran la mutación c.1733insC en el exón 11 y el paciente es diagnosticado de SBHD.

Se ha observado que los fibrofoliculomas y los tricodiscomas del síndrome Birt-Hogg-Dubé y los angiofibromas del complejo esclerosis tuberosa presentan rasgos comunes. En el síndrome Birt-Hogg-Dubé, una mutación en el gen FLCN provocaría el desarrollo de múltiples fibrofoliculomas y tricodiscomas; mientras que en el complejo esclerosis tuberosa sería la alteración en los genes TS-1 y TS-2 la causante de la aparición de los angiofibromas. A pesar de que la asociación con la vía mTOR no está clara, nuestros datos también apoyarían que las proteínas implicadas tanto en el SBHD como en la esclerosis tuberosa podrían formar parte de una misma vía, la mTOR, a través de la cual se desarrollarían las lesiones cutáneas, renales y pulmonares características de ambos síndromes.

A pesar de que se han descrito lesiones en mucosa oral, en nuestra serie no encontramos afectación ni en labios, mucosa yugal ni gingival.

Encontramos la presencia de un melanoma cutáneo en uno de los pacientes incluidos en la serie. El mecanismo patogénico responsable de la aparición de melanoma en estos pacientes parece ser similar al responsable del desarrollo de los tumores típicos del SBHD. Estudios recientes han demostrado que la foliculina interacciona con la proteína FINP₁ y su homólogo, FINP₂, los cuales a su vez interaccionan con la proteína cinasa activada por el AMPK, regulando negativamente la diana de la rapamicina, clave en el crecimiento celular y el desarrollo tumoral. Una mutación en la foliculina y la consiguiente disregulación en la vía mTOR impediría este control negativo, con el consiguiente crecimiento incontrolado de las células, similar al que ocurre en los tumores benignos y malignos que se observan en el SBHD, incluyendo el melanoma. Sin embargo, al encontrar sólo un único caso, no podemos aportar más datos entre la asociación de este tumor al SBHD como sugieren otros autores (2,74,76–78,130).

En cuanto a los hallazgos pulmonares, encontramos neumotórax en 15 de los pacientes recogidos (38,5%). El número medio de episodios es 2,4. El número mínimo de episodios es 1 y el máximo es 5. Los neumotórax son de localización unilateral y bilateral en 12 y 3 pacientes, respectivamente. La localización más frecuente de los neumotórax es el pulmón izquierdo (n=7, 46,7%), seguido del pulmón derecho (n=5, 33,3%) y de ambos pulmones (n=2, 13,3%). El 38,4% presentan historia de neumotórax, siendo en 73,3% de los casos neumotórax de repetición. La edad media de presentación del neumotórax es de 43,27 años. El paciente más joven presenta el primer neumotórax a los 22 años y la edad máxima de presentación es de 65 años. Las lesiones quísticas están presentes en el 43% siendo de localización subpleural y basal en el 50% de los casos. Se

encuentra hábito tabáquico en el 87,5% de los pacientes estudiados. De los pacientes con SBHD, se encontró patología pulmonar en el 26,3% de los casos.

En la serie de Toro y cols. en la que estudian 89 individuos de 51 familias, 37 varones y 52 mujeres con una edad media de 54 años, encuentran quistes pulmonares, múltiples y bilaterales en el 84% con desarrollo de neumotórax en el 53% de los casos (52). Estos mismos autores, en una serie más amplia en la que recogen un total de 198 pacientes de edades comprendidas entre los 22 y 77 años, encuentran quistes pulmonares en el 89% de los casos incluidos, con historia de neumotórax en el 24%, con edad media de aparición de 38 años, siendo el número medio de episodios de 2 en el 75% de los casos y el pulmón derecho el más afectado (42). El 67% de los pacientes son fumadores.

En la serie publicada por Schmidt y cols. que recoge un total de 219 individuos (110 mujeres y 109 varones) afectados del síndrome, el 32% presentaba historia de neumotórax espontáneo, presentando uno o más quistes pulmonares en las pruebas de imagen en el 85% de ellos (60). Kunogi y cols. estudian 36 pacientes japoneses (14 varones y 22 mujeres) con múltiples quistes pulmonares de causas indeterminadas (61). En el 70% la afectación pulmonar se presenta sin lesiones cutáneas. Los neumotórax son de repetición en el 86.2% de los casos, con una media de episodios de 3, sin predisposición por ningún pulmón. Maffé y cols. estudian 19 pacientes con clínica pulmonar y/o renal típica del SBHD, encontrando mutaciones en el gen FLCN en el 47% de los casos, preferentemente en el exón 11, aunque encuentran también mutaciones en el exón 5, 10 y 12. De los pacientes con mutaciones en el gen FLCN, 3 de ellos presentan afectación de los 3 tejidos (piel, pulmón y riñón), 4 en 2 de ellos y 2 sólo afectación pulmonar o renal. Se encuentran lesiones cutáneas en el 56% de los pacientes con alteración en el gen FLCN. Mientras que los pacientes con mutación en el gen FLCN presentan afectación en 2 o 3 de los tejidos diana, la

mayoría de los que no presentan mutación se manifiestan sólo con afectación pulmonar o renal, con la excepción de dos casos (53).

Se ha observado que pacientes con determinadas mutaciones presentan un riesgo de desarrollar lesiones quísticas de mayor tamaño y en mayor número. Así, la mutación en el exón 9 confiere un incremento en el riesgo de desarrollar mayor número de quistes y; mutaciones en el exón 9 y 12, quistes de mayores dimensiones (41,53). En nuestra serie, no hemos encontrado dicha asociación. Nuestra serie presenta una incidencia menor de desarrollo de quistes pulmonares. Las series descritas hasta la fecha muestran una incidencia en torno al 80% (42,61). El número medio de episodios y la edad media de presentación es similar a la de otras series. Sin embargo, el pulmón que con mayor frecuencia se afecta en las distintas series suele ser el derecho a diferencia de nuestros pacientes que presentan predilección por el izquierdo.

Con respecto a la asociación a pólipos colorrectales y a cáncer de colon, en nuestra serie hemos encontrado 3 casos de carcinoma colorrectal. La asociación del SBHD al cáncer de colon es controvertida. La serie más amplia descrita hasta la fecha por Zbar y cols. que incluye 223 pacientes de 33 familias con SBHD no puede establecer dicha relación (36). Cuando estudian el riesgo de desarrollar cáncer de colon encuentran 3 casos y 1 caso en el grupo afecto y no afecto de SBHD, respectivamente, sin mostrar diferencia estadísticamente significativa. En cuanto a los pólipos en colon, encuentran una afectación del 8% en ambos grupos, sin mostrar una diferencia estadísticamente significativa, por lo que concluyen que los pacientes con SBHD no presentan mayor riesgo de sufrir cáncer de colon ni pólipos colorrectales (36). Sin embargo, parece ser que para otros autores existe un riesgo más elevado de desarrollar cáncer de colon en los pacientes con mutación en el punto caliente del exón 11 (mutación c.1285dupC) en comparación con aquellos que presentan alguna otra mutación (42,73). En nuestra serie, en 2 de los casos incluidos que presentan cáncer de colon se

detecta mutación en línea germinal en el exón 11 (mutación c.1286insC). Este dato podría apoyar la mayor incidencia de este tipo de carcinoma en aquellos pacientes con SBHD y mutación en dicho exón aunque son necesarios más estudios.

El hallazgo clínico de angiomiolipomas renales y angiofibromas faciales característicos de la esclerosis tuberosa en pacientes con SBHD muestra la relación de la vía mTOR en ambos síndromes (23,25,65,66,92). En nuestra serie, además de los dos pacientes con múltiples angiofibromas faciales, hemos encontrado un angiomiolipoma renal derecho en una paciente de 73 años con afectación cutánea como única manifestación de SBHD y antecedentes familiares del síndrome.

En cuanto a la inmunotinción de las piezas estudiadas, encontramos un predominio de inmunotinción nuclear, y particularmente nucleolar, para la foliculina en las lesiones cutáneas y pulmonares, sin pérdida de inmunotinción citoplasmática, lo que contrasta con los tumores renales. Este hallazgo concuerda con lo descrito en la literatura (89).

En lo referente a las mutaciones en el gen FLCN, todos los exones se pueden ver mutados en este síndrome como observamos en la figura 34 del apartado 1.3.6 del apartado de introducción.

La tasa de aparición de mutaciones en pacientes con SBHD oscila del 56 al 85% según las series (42,53,60,61). En nuestra serie, el 73,7% de los pacientes con SBHD presentan mutación en línea germinal en el gen FLCN. Aproximadamente, el 50% de las mutaciones en línea germinal son inserciones o deleciones de una citosina en un tracto de ocho citosinas en el exón 11. En nuestra serie, encontramos esta mutación (c.1286insC) en un 66,6% de los pacientes diagnosticados de SBHD. Además, encontramos mutaciones en los exones 3, 5, 6, 9 y 10. La mayor parte de las mutaciones son mutaciones frameshift que

consisten en la inserción o delección de un nucleótido que genera un cambio en el marco de lectura de los tripletes. Las siguientes mutaciones por orden de frecuencia en nuestro trabajo han sido mutaciones que afectan a la maduración del ARNm (splicing), missense y mutaciones nonsense.

Aunque no existe una clara correlación geno-fenotípica entre el tipo de mutación y la clínica encontrada, parece ser que aquellos pacientes con una c-delección en este punto presentan menor riesgo de desarrollar un cáncer renal que aquellos con una c-inserción (42).

En lo que refiere a la clínica pulmonar, la mutación que se ha encontrado con mayor frecuencia en la literatura en pacientes con historia de neumotórax y/o lesiones pulmonares y SHBD es la c.1733ins/delC localizada en el exón 11. Además, parece ser que la mutación en el exón 9 y 12 confiere un incremento en el riesgo de desarrollar mayor número de quistes, e incluso, de mayor tamaño (52). En nuestra serie, la mutación más frecuente en pacientes con afectación pulmonar difiere de las series publicadas en la literatura y se localizan en los exones 3, 5, 6 y en el intrón 11.

En cuanto a la clínica cutánea y la asociación a mutaciones en el gen FLCN no se ha encontrado una relación entre el exón afecto ni la presencia de lesiones cutáneas, número, tamaño ni tipo histológico. Nosotros tampoco hemos encontrado una correlación geno-fenotípica entre la mutación encontrada y la clínica manifiesta.

En cuanto al estudio de metilación, nuestros datos muestran resultados similares a los publicados en la literatura y en ninguno de los casos estudiados encontramos metilación del gen FLCN (121).

La alteración del gen FLCN produce a nivel cutáneo, como hemos descrito con anterioridad, lesiones hamartomatosas a modo de fibrofoliculomas y/o tricodiscomas, principalmente. Actualmente, se venía aceptando que la

inactivación de un único alelo era suficiente para el desarrollo tanto de los hamartomas cutáneos como de las lesiones pulmonares (33). En otras palabras, parecía que la haploinsuficiencia podía ser suficiente para la formación de las lesiones cutáneas y pulmonares. Sin embargo, la patogénesis implicada en su desarrollo podría ser más compleja de lo que se venía pensando hasta ahora. Al revisar la literatura encontramos una comunicación al 4º Simposio Internacional de BHD de Toro y cols. en la cual, en sus resultados preliminares (todavía no publicados) encuentran en varios fibrofoliculomas estudiados un elevado porcentaje de casos con alteraciones genéticas en el segundo alelo del gen FLCN, con delección del alelo nativo y presencia del alelo con la mutación germinal y, por tanto, inactivación bialélica (154). Así, la formación de estas lesiones cutáneas podría ser consecuencia de una inactivación bialélica que conllevaría la alteración de la vía mTOR, de forma similar a la situación en los tumores renales, en los que tras una primera mutación en línea germinal se produciría la inactivación del segundo alelo (por mutación somática, delección o metilación), lo que iniciaría la transformación neoplásica.

En nuestra serie, se encontró inactivación bialélica en al menos un fibrofoliculoma o tricodiscoma en el 41,7% de pacientes y en un tercio de las lesiones pulmonares. Llama la atención que el paciente que presenta inactivación bialélica en la lesión pulmonar también la presenta en un tricodiscoma. Este porcentaje podría haber sido superior si hubiéramos podido determinar en todos los casos con mutaciones somáticas si éstas aparecían en el mismo alelo o en alelos diferentes y, si hubiéramos podido secuenciar todos los exones del gen FLCN en todos los casos. La falta de secuenciación de algunos exones en alguna muestra de nuestro estudio podría explicarse por la dificultad en la obtención de suficiente ADN de calidad a partir de alguna de las lesiones cutáneas debido a su pequeño tamaño. Teniendo en cuenta este aspecto, podemos especular que el porcentaje de casos con inactivación bialélica en las

lesiones cutáneas de nuestra serie serían superiores al detectado, e incluso podrían aproximarse al descrito en la literatura en los tumores renales, que es aproximadamente del 70% (34).

Cuando analizamos los casos de inactivación bialélica, encontramos un 41,7% de pacientes en los que esta inactivación se produce por la delección del alelo con la mutación germinal y la aparición de mutaciones somáticas adicionales en el alelo nativo y, un 33,3% de pacientes en los que esta inactivación se produce por la pérdida del alelo nativo conservando el alelo con la mutación germinal. Esto hace pensar que la delección en uno u otro alelo es frecuente en las lesiones cutáneas de estos pacientes.

Nuestros hallazgos apoyarían la hipótesis de que estas lesiones se iniciarían como consecuencia de la pérdida de funcionalidad del gen FLCN secundaria a la combinación de mutaciones germinales, somáticas y/o delecciones, lo que condiciona una inactivación bialélica en un porcentaje significativo de pacientes con SBHD y que sería responsables del desarrollo de las lesiones cutáneas, situación que se aproximaría a la actualmente aceptada para el desarrollo de los tumores renales. Sin embargo, la inactivación bialélica sería un fenómeno menos frecuente en las lesiones pulmonares.

Llama la atención la elevada frecuencia de mutaciones somáticas adicionales (75%), siendo múltiples en el 50% de los casos. Y en aquellos casos en los que no hemos podido confirmar la presencia de inactivación bialélica, se podría sugerir que la acumulación de mutaciones tanto germinales como somáticas en un único alelo podría provocar una mayor alteración en la funcionalidad del gen FLCN aun dentro del concepto de haploinsuficiencia. La aparición de este gran número de mutaciones somáticas adicionales es equiparable a la situación descrita en los tumores renales asociados al SBHD. Así, Vocke y cols. encuentran que el 70% de los tumores renales presentan bien una mutación somática en el

alelo no afecto por la mutación germinal (53%) o bien pérdida de heterocigosidad (17%), siendo necesaria la inactivación de las dos copias del gen para el desarrollo del cáncer renal (34). Estos autores observaron que un mismo paciente puede presentar múltiples tumores renales con diferentes subtipos histológicos y cada uno de ellos puede presentar mutaciones somáticas adicionales diferentes. Gatalica y cols. encuentran en tres tumores renales de un mismo paciente con SBHD, una mutación en línea germinal en el intrón 9 y distintas mutaciones somáticas adicionales en cada uno de los diferentes subtipos histológicos presentes en el mismo riñón (40). En el paciente 31 de nuestra serie, el estudio mediante secuenciación masiva del carcinoma renal pone de manifiesto la presencia de una mutación germinal junto a 2 mutaciones somáticas adicionales, reafirmando los datos publicados hasta ahora en la literatura. La identificación de distintos segundos impactos mutacionales somáticos en múltiples tumores del mismo paciente, sugiere que los tumores renales múltiples en un único riñón de un paciente con SBHD aparecen como eventos clonales independientes. Podría ser que el número de mutaciones y deleciones pudiera explicar que en un paciente se desarrolle una lesión hamartomatosa o tumoral.

Revisando la literatura, llama la atención el trabajo de Tyburczy y cols. en el que analizan 29 pacientes con esclerosis tuberosa y encuentran mediante secuenciación masiva la presencia de mutación germinal en el gen TSC en el 82% de los pacientes junto con mutaciones somáticas adicionales en el 50% de ellos. Estos autores sugieren que las lesiones características de la esclerosis tuberosa se producirían por la aparición de una mutación en línea germinal del gen TSC y la aparición de segundas mutaciones somáticas en el segundo alelo (158). Crino y cols. apoyan también la hipótesis del desarrollo de los tubers cerebrales a partir de una inactivación bialélica del gen TSC1 o TSC2 a través de

la combinación de una mutación germinal y varias mutaciones somáticas en diferentes alelos (159).

Sin embargo, en lo referente al SBHD, transcurridos ya dos años desde la comunicación preliminar de Toro y cols., al revisar la literatura no hemos encontrado ningún artículo publicado en revistas indexadas sobre la detección de inactivación bialélica en las lesiones cutáneas del SBHD. Nuestros hallazgos estarían en consonancia con lo descrito por estos autores en el año 2013 y sería el primer trabajo en una serie de pacientes con SBHD que pondría de manifiesto que la inactivación bialélica podría ser necesaria para el desarrollo de las lesiones hamartomatosas cutáneas que aparecen en el síndrome Birt-Hogg-Dubé de forma similar a la situación actualmente aceptada para los carcinomas renales (34,127).

4. CONCLUSIONES

1. En uno de cada cinco pacientes con el SBHD las lesiones cutáneas hamartomatosas típicas están ausentes, y uno de cada cuatro presenta afectación pulmonar.
2. En las lesiones cutáneas y pulmonares, a diferencia de los tumores renales, no existe pérdida de inmunotinción citoplasmática para la foliculina, predominando la inmunotinción nuclear, y particularmente nucleolar.
3. Se encuentra mutación en línea germinal en el gen FLCN en la mayoría (74%) de pacientes con SBHD, siendo la mutación más frecuente la c.1286insC.
4. En tres de cada cuatro pacientes con el SBHD existen mutaciones somáticas patogénicas del gen FLCN en al menos una de las muestras estudiadas.
5. Existe evidencia de inactivación bialélica en al menos un fibrofoliculoma o tricodiscoma en el 41% de pacientes con SBHD, y en un tercio de las lesiones, tanto cutáneas como pulmonares, de estos pacientes, todas ellas con delección de un alelo. En otro tercio, los hallazgos no son concluyentes.
6. No se detecta metilación del gen FLCN en ninguna de las muestras cutáneas ni pulmonares estudiadas.
7. En contraposición a la hipótesis actualmente aceptada de la haploinsuficiencia como único mecanismo patogénico para el desarrollo de las lesiones cutáneas y pulmonares en el SBHD, nuestros resultados indicarían que la inactivación bialélica, por mecanismos distintos de la metilación, y con presencia de delección alélica, es un fenómeno frecuente en las lesiones cutáneas y, en menor medida, las pulmonares, y podría por tanto representar un mecanismo patogénico análogo al aceptado para los tumores renales de este síndrome.

5. BIBLIOGRAFÍA

1. Birt AR, Hogg GR, Dubé WJ. Hereditary multiple fibrofolliculomas with trichodiscomas and acrochordons. *Arch Dermatol.* 1977;113:1674–7.
2. Toro JR, Glenn G, Duray P, Darling T, Weirich G, Zbar B, et al. Birt-Hogg-Dube Syndrome. A novel marker of kidney neoplasia. *Arch Dermatol.* 1999;135:1995–1202.
3. Sattler EC, Lang MU, van Steensel M a M, van Geel M, Schneider JJ, Flaig MJ, et al. Late onset of skin manifestations in Birt-Hogg-Dubé syndrome with FLCN mutation p.W260X. *Acta Derm Venereol.* 2012;92:187–8.
4. Nickerson ML, Warren MB, Toro JR, Matrosova V, Glenn G, Turner ML, et al. Mutations in a novel gene lead to kidney tumors, lung wall defects, and benign tumors of the hair follicle in patients with the Birt-Hogg-Dubé syndrome. *Cancer Cell.* 2002;2:157–64.
5. Menko FH, Steensel MAM Van, Giraud S, Friis-hansen L, Richard S, Ungari S, et al. Birt-Hogg-Dubé syndrome : diagnosis and management. *Lancet Oncol.* 2009;10:1199–206.
6. Kluger N, Giraud S, Coupier I, Avril MF, Dereure O, Guillot B, et al. Birt-Hogg-Dubé syndrome: Clinical and genetic studies of 10 French families. *Br J Dermatol.* 2010;162:527–37.
7. Schulz T, Ebschner U, Hartschuh W. Localized Birt-Hogg-Dubé Syndrome With Prominent Perivascular Fibromas. *Am J Dermatopathol.* 2001;23:149–53.
8. Cho E, Lee JD, Cho SH. A solitary fibrofolliculoma on the concha of the ear. *Int J Dermatol.* 2012;51:616–7.
9. Scully K, Bargman H, Assaad D. Solitary fibrofolliculoma. *J Am Acad Dermatol.* 1984;11:361–3.

10. Starink TM, Brownstein MH. Fibrofolliculoma: solitary and multiple types. *J Am Acad Dermatol.* 1987;17:493–6.
11. Chang J-K, Lee D-C, Chang M-H. A solitary fibrofolliculoma in the eyelid. *Korean J Ophthalmol.* 2007;21:169–71.
12. Jarret R, Walker L, Side L, Bowling J. Dermoscopic Features of Birt-Hogg-Dube Syndrome. *Arch Dermatol.* 2009;145:1208.
13. Pinkus H, Coskey R, Burgess GH. Trichodiscoma. A benign tumor related to haarscheibe (hair disk). *J Invest Dermatol.* 1974;63:212–8.
14. Schulz T, Hartschuh W. Birt-Hogg-Dubé syndrome and Hornstein-Knickenberg syndrome are the same. Different sectioning technique as the cause of different histology. *J Cutan Pathol.* 1999;26:55–61.
15. Ackerman A, Reddy V, Soyer H. Fibrofolliculoma/Trichodiscoma. Neoplasms with follicular differentiation. Philadelphia; 2001. p. 221–44.
16. Lopez-Garcia DR, Teague D, Landis ET, Sanguenza OP. Morphological diversity of trichodiscomas and fibrofolliculomas. *Am J Dermatopathol.* 2014;36:734–40.
17. De la Torre C, Ocampo C, Doval IG, Losada A, Cruces MJ. Acrochordons are not a component of the Birt-Hogg-Dubé syndrome: does this syndrome exist? Case reports and review of the literature. *Am J Dermatopathol.* 1999;21:369–74.
18. Balus L, Fazio M, Sacerdoti G, Morrone A, Marmo W. [Fibrofolliculoma, trichodiscoma and acrochordon. The Birt-Hogg-Dubé syndrome]. *Ann Dermatol Venereol.* 1983;110:601–9.
19. Vernooij M, Claessens T, Luijten M, van Steensel MAM, Coull BJ. Birt-Hogg-Dubé syndrome and the skin. *Fam Cancer.* 2013;12:381–5.

20. Croyle MJ, Lehman JM, O'Connor AK, Wong SY, Malarkey EB, Iribarne D, et al. Role of epidermal primary cilia in the homeostasis of skin and hair follicles. *Development*. 2011;138:1675–85.
21. Merrill BJ, Gat U, DasGupta R, Fuchs E. Tcf3 and Lef1 regulate lineage differentiation of multipotent stem cells in skin. *Genes Dev*. 2001;15:1688–705.
22. Polakis P. Wnt signaling in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012;4(5).
23. Schaffer J V., Gohara M a., McNiff JM, Aasi SZ, Dvoretzky I. Multiple facial angiofibromas: A cutaneous manifestation of Birt-Hogg-Dubé syndrome. *J Am Acad Dermatol*. 2005;53:S108–11.
24. Baba M, Hong S-B, Sharma N, Warren MB, Nickerson ML, Iwamatsu A, et al. Folliculin encoded by the BHD gene interacts with a binding protein, FNIP1, and AMPK, and is involved in AMPK and mTOR signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:15552–7.
25. Misago N, Narisawa Y. Fibrofolliculoma in a patient with tuberous sclerosis complex. *Clin Exp Dermatol*. 2009;34:892–4.
26. Hartman TR, Nicolas E, Klein-Szanto A, Al-Saleem T, Cash TP, Simon MC, et al. The role of the Birt-Hogg-Dubé protein in mTOR activation and renal tumorigenesis. *Oncogene* . 2009;28:1594–604.
27. Gijzen LMC, Vernooij M, Martens H, Oduber CEU, Henquet CJM, Starink TM, et al. Topical rapamycin as a treatment for fibrofolliculomas in Birt-Hogg-Dubé syndrome: a double-blind placebo-controlled randomized split-face trial. *PLoS One*. 2014;9:e99071.
28. Benusiglio PR, Giraud S, Deveaux S, Méjean A, Correas J-M, Joly D, et al. Renal cell tumour characteristics in patients with the Birt-Hogg-Dubé cancer

susceptibility syndrome: a retrospective, multicentre study. *Orphanet J Rare Dis.* 2014;9:163.

29. Hudon V, Sabourin S, Dydensborg a. B, Kottis V, Ghazi a., Paquet M, et al. Renal tumour suppressor function of the Birt-Hogg-Dube syndrome gene product folliculin. *J Med Genet.* 2010;47:182–9.

30. Pavlovich CP, Walther MM, Eyler RA, Hewitt SM, Zbar B, Linehan WM, et al. Renal Tumors in the Birt-Hogg-Dubé Syndrome. *Am J Surg Pathol.* 2002;26:1542–52.

31. Kuroda N, Furuya M, Nagashima Y, Gotohda H, Kawakami F, Moritani S, et al. Review of renal tumors associated with Birt-Hogg-Dubé syndrome with focus on clinical and pathobiological aspects. *Pol J Pathol.* 2014;65:93–9.

32. Hornstein OP, Knickenberg M. Perifollicular fibromatosis cutis with polyps of the colon--a cutaneo-intestinal syndrome sui generis. *Arch Dermatol Res.* 1975;253:161–75.

33. Roth JS, Rabinowitz AD, Benson M, Grossman ME. Bilateral renal cell carcinoma in the Birt-Hogg-Dubé syndrome. *J Am Acad Dermatol.* 1993;29:1055–6.

34. Vocke CD, Yang Y, Pavlovich CP, Schmidt LS, Nickerson ML, Torres-Cabala C a, et al. High frequency of somatic frameshift BHD gene mutations in Birt-Hogg-Dubé-associated renal tumors. *J Natl Cancer Inst.* 2005;97:931–5.

35. Toro JR, Glenn G, Hou L, Duray P, Clark B, Merino M, et al. Facial papules, spontaneous pneumothorax, and renal tumors. *J Am Acad Dermatol.* 2003;48:111–4.

36. Zbar B, Alvord WG, Glenn G, Turner M, Pavlovich CP, Schmidt L, et al. Risk of Renal and Colonic Neoplasms and Spontaneous Pneumothorax in the Birt-Hogg-Dube. *Cancer Epidemiol biomarkers Prev.* 2002;11:393–400.
37. Johannesma PC, van den Borne BEEM, Gille JJP, Nagelkerke AF, van Waesberghe JTM, Paul M a, et al. Spontaneous pneumothorax as indicator for Birt-Hogg-Dubé syndrome in paediatric patients. *BMC Pediatr.* 2014;14:171.
38. Stavrakoglou A, Dubrey SW, Dorkins H, Coutts I. The Birt-Hogg-Dube syndrome: dermatological features and internal malignancies. *QJM.* 2010;103:987–90.
39. Adley BP, Smith ND, Nayar R, Yang XJ. Birt-Hogg-Dubé syndrome: clinicopathologic findings and genetic alterations. *Arch Pathol Lab Med.* 2006;130:1865–70.
40. Gatalica Z, Lilleberg SL, Vranic S, Eyzaguirre E, Orihuela E, Velagaleti G. Novel intronic germline FLCN gene mutation in a patient with multiple ipsilateral renal neoplasms. *Hum Pathol.*; 2009;40:1813–9.
41. Kumasaka T, Hayashi T, Mitani K, Kataoka H, Kikkawa M, Tobino K, et al. Characterization of pulmonary cysts in Birt-Hogg-Dubé syndrome: histopathological and morphometric analysis of 229 pulmonary cysts from 50 unrelated patients. *Histopathology.* 2014;65:100–10.
42. Toro JR, Wei M-H, Glenn GM, Weinreich M, Toure O, Vocke C, et al. BHD mutations, clinical and molecular genetic investigations of Birt-Hogg-Dubé syndrome: a new series of 50 families and a review of published reports. *J Med Genet.* 2008;45:321–31.
43. Graham RB, Nolasco M, Peterlin B, Garcia CK. Nonsense mutations in folliculin presenting as isolated familial spontaneous pneumothorax in adults. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005;172:39–44.

44. West JB. Distribution of mechanical stress in the lung, a possible factor in localisation of pulmonary disease. *Lancet*. 1971;1:839–41.
45. Withers JN, Fishback ME, Kiehl PV, Hannon JL. Spontaneous pneumothorax. Suggested etiology and comparison treatment methods. *Am J Surg*. 1964;108:772–6.
46. Warren MB, Torres-Cabala C a, Turner ML, Merino MJ, Matrosova VY, Nickerson ML, et al. Expression of Birt-Hogg-Dube gene mRNA in normal and neoplastic human tissues. *Mod Pathol*. 2004;17:998–1011.
47. Massaro GD, Massaro D. Postnatal lung growth: evidence that the gas-exchange region grows fastest at the periphery. *Am J Physiol*. 1993;265:L319–22.
48. Furuya M, Tanaka R, Koga S, Yatabe Y. Syndrome : Pulmonary Cysts of Birt-Hogg-Dube A Clinicopathologic and Immunohistochemical Study of 9 Families. *Am J Surg Pathol*. 2012;36:589–600.
49. Agarwal PP, Gross BH, Holloway BJ, Seely J, Stark P, Kazerooni E a. Thoracic CT findings in Birt-Hogg-Dube syndrome. *AJR Am J Roentgenol*. 2011;196:349–52.
50. Bessis D, Giraud S, Richard S. A novel familial germline mutation in the initiator codon of the BHD gene in a patient with Birt-Hogg-Dubé syndrome. *Br J Dermatol*. 2006;155:1067–9.
51. Gunji Y, Akiyoshi T, Sato T, Kurihara M, Tominaga S, Takahashi K, et al. Mutations of the Birt Hogg Dube gene in patients with multiple lung cysts and recurrent pneumothorax. *J Med Genet*. 2007;44:588–93.

52. Toro JR, Pautler SE, Stewart L, Glenn GM, Weinreich M, Toure O, et al. Lung cysts, spontaneous pneumothorax, and genetic associations in 89 families with Birt-Hogg-Dubé syndrome. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007;175:1044–53.
53. Maffé a., Toschi B, Circo G, Giachino D, Giglio S, Rizzo a., et al. Constitutional FLCN mutations in patients with suspected Birt-Hogg-Dubé syndrome ascertained for non-cutaneous manifestations. *Clin Genet.* 2011;79:345–54.
54. Furuya M, Nakatani Y. Birt-Hogg-Dube syndrome: clinicopathological features of the lung. *J Clin Pathol.* 2013;66:178–86.
55. Hong S-B, Oh H, Valera VA, Stull J, Ngo D-T, Baba M, et al. Tumor suppressor FLCN inhibits tumorigenesis of a FLCN-null renal cancer cell line and regulates expression of key molecules in TGF-beta signaling. *Mol Cancer.* 2010;9:160.
56. Basten SG, Willekers S, Vermaat JS, Slaats GG, Voest EE, van Diest PJ, et al. Reduced cilia frequencies in human renal cell carcinomas versus neighboring parenchymal tissue. *Cilia.* 2013;2:2.
57. Sanford LP, Ormsby I, Gittenberger-de Groot AC, Sariola H, Friedman R, Boivin GP, et al. TGFbeta2 knockout mice have multiple developmental defects that are non-overlapping with other TGFbeta knockout phenotypes. *Development.* 1997;124:2659–70.
58. Thompson HGR, Mih JD, Krasieva TB, Tromberg BJ, George SC. Epithelial-derived TGF-beta2 modulates basal and wound-healing subepithelial matrix homeostasis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2006;291:L1277–85.
59. Dal Sasso AA, Belém LC, Zanetti G, Souza CA, Escuissato DL, Irion KL, et al. Birt-Hogg-Dubé syndrome. State-of-the-art review with emphasis on pulmonary involvement. *Respir Med.* 2014;55:1–8.

60. Schmidt LS, Nickerson ML, Warren MB, Glenn GM, Toro JR, Merino MJ, et al. Germline BHD-mutation spectrum and phenotype analysis of a large cohort of families with Birt-Hogg-Dubé syndrome. *Am J Hum Genet.* 2005;76:1023–33.
61. Kunogi M, Kurihara M, Ikegami TS, Kobayashi T, Shindo N, Kumasaka T, et al. Clinical and genetic spectrum of Birt-Hogg-Dube syndrome patients in whom pneumothorax and/or multiple lung cysts are the presenting feature. *J Med Genet.* 2010;47:281–7
62. Takagi Y, Kobayashi T, Shiono M, Wang L, Piao X, Sun G, et al. Interaction of folliculin (Birt-Hogg-Dubé gene product) with a novel Fnip1-like (FnipL/Fnip2) protein. *Oncogene.* 2008;27:5339–47.
63. Hasumi H, Baba M, Hong S-B, Hasumi Y, Huang Y, Yao M, et al. Identification and characterization of a novel folliculin-interacting protein FNIP2. *Gene.* 2008;415:60–7.
64. Pavlovich CP, Grubb RL, Hurley K, Glenn GM, Toro J, Schmidt LS, et al. Evaluation and management of renal tumors in the Birt-Hogg-Dubé syndrome. *J Urol.* 2005;173:1482–6.
65. Byrne M, Mallipeddi R, Pichert G, Whittaker S. Birt-Hogg-Dubé syndrome with a renal angiomyolipoma: further evidence of a relationship between Birt-Hogg-Dubé syndrome and tuberous sclerosis complex. *Australas J Dermatol.* 2012;53:151–4.
66. Tobino K, Seyama K. Birt-Hogg-Dubé Syndrome with Renal Angiomyolipoma. *Intern Med.* 2012;51:1279–80.
67. Benusiglio PR, Gad S, Massard C, Carton E, Longchamp E, Faudot T, et al. Case Report: Expanding the tumour spectrum associated with the Birt-Hogg-Dubé cancer susceptibility syndrome. *F1000Research.* 2014;3:159.

68. Liu V, Kwan T, Page EH. Parotid oncocytoma in the Birt-Hogg-Dubé syndrome. *J Am Acad Dermatol.* 2000;43:1120–2.
69. Seifert G. [New pathohistologic WHO classification of salivary gland adenomas]. *Pathologe.* 1992;13:322–35.
70. Lindor NM, Kasperbauer J, Lewis JE, Pittelkow M. Birt-Hogg-Dube syndrome presenting as multiple oncocytic parotid tumors. *Hered Cancer Clin Pract. Hereditary Cancer in Clinical Practice;* 2012;10:13.
71. Raymond V, Long J, Everett J, Caoili E, Gruber S, Stoffe E, et al. An oncocytic adrenal tumour in a patient with Birt-Hogg-Dubé syndrome. *Clin Endocrinol.* 2014;8:925–8.
72. Thibodeau SN, French AJ, Cunningham JM, Tester D, Burgart LJ, Roche PC, et al. Microsatellite Instability in Colorectal Cancer: Different Mutator Phenotypes and the Principal Involvement of hMLH1. *Cancer Res.* 1998;58:1713–8.
73. Nahorski MS, Lim DHK, Martin L, Gille JJP, McKay K, Rehal PK, et al. Investigation of the Birt-Hogg-Dube tumour suppressor gene (FLCN) in familial and sporadic colorectal cancer. *J Med Genet.* 2010;47:385–90.
74. Khoo SK, Giraud S, Kahnoski K, Chen J, Motorna O, Nickolov R, et al. Clinical and genetic studies of Birt-Hogg-Dubé syndrome. *J Med Genet.* 2002;39:906–12.
75. Kahnoski K, Nassif N, Chen J, GP L, Segelov E, Teh BT. Alterations of the Birt-Hogg-Dubé gene (BHD) in sporadic colorectal tumours. *J Med Genet.* 2003;40:511–5.
76. Cocciolone R, Crotty K, Andrews L, Haass N, Moloney F. Multiple desmoplastic melanomas in Birt-Hogg-Dube Syndrome and a proposed signaling

link between folliculin, the mTOR pathway, and melanomas susceptibility. *Arch Dermatol.* 2010;146:1316–7.

77. Fontcuberta IC, Salomão DR, Quiram PA, Pulido JS. Choroidal melanoma and lid fibrofolliculomas in Birt-Hogg-Dubé syndrome. *Ophthalmic Genet.* 2011;32:143–6.

78. Mota-Burgos A, Acosta EH, Márquez FV, Mendiola M, Herrera-Ceballos E. Birt-Hogg-Dubé syndrome in a patient with melanoma and a novel mutation in the FCLN gene. *Int J Dermatol.* 2013;52:323–6.

79. Khoo SK, Bradley M, Wong FK, Hedblad MA, Nordenskjöld M, Teh BT. Birt-Hogg-Dubé syndrome: mapping of a novel hereditary neoplasia gene to chromosome 17p12-q11.2. *Oncogene.* 2001;20:5239–42.

80. Schmidt LS, Warren MB, Nickerson ML, Weirich G, Matrosova V, Toro JR, et al. Birt-Hogg-Dubé syndrome, a genodermatosis associated with spontaneous pneumothorax and kidney neoplasia, maps to chromosome 17p11.2. *Am J Hum Genet.* 2001;69:876–82.

81. Painter JN, Tapanainen H, Somer M, Tukiainen P, Aittomäki K. A 4-bp deletion in the Birt-Hogg-Dubé gene (FLCN) causes dominantly inherited spontaneous pneumothorax. *Am J Hum Genet.* 2005;76:522–7.

82. Schmidt L. FLCN (folliculin gene). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol.* 2007;11:188–91.

83. Nookala RK, Langemeyer L, Pacitto A, Ochoa-Montaña B, Donaldson JC, Blaszczyk BK, et al. Crystal structure of folliculin reveals a hidDENN function in genetically inherited renal cancer. *Open Biol.* 2012;2:120071.

84. Wei M-H, Blake PW, Shevchenko J, Toro JR. The folliculin mutation database: an online database of mutations associated with Birt-Hogg-Dubé syndrome. *Hum Mutat.* 2009;30:E880–90.
85. Liu W, Chen Z, Ma Y, Wu X, Jin Y, Hou S. Genetic characterization of the *Drosophila birt-hogg-dubé* syndrome gene. *PLoS One.* 2013;8:e65869.
86. Baba M, Furihata M, Hong S-B, Tessarollo L, Haines DC, Southon E, et al. Kidney-targeted Birt-Hogg-Dubé gene inactivation in a mouse model: Erk1/2 and Akt-mTOR activation, cell hyperproliferation, and polycystic kidneys. *J Natl Cancer Inst.* 2008;100:140–54.
87. Chen J, Futami K, Petillo D, Peng J, Wang P, Knol J, et al. Deficiency of FLCN in mouse kidney led to development of polycystic kidneys and renal neoplasia. *PLoS One.* 2008;3:e3581.
88. Hasumi Y, Baba M, Ajima R, Hasumi H, Valera V a, Klein ME, et al. Homozygous loss of BHD causes early embryonic lethality and kidney tumor development with activation of mTORC1 and mTORC2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106:18722–7.
89. Gaur K, Li J, Wang D, Dutta P, Yan SJ, Tsurumi A, et al. The Birt-Hogg-Dubé tumor suppressor folliculin negatively regulates ribosomal RNA synthesis. *Hum Mol Genet.* 2013;22:284–99.
90. Goncharova E a., Goncharov D a., James ML, Atochina-Vasserman EN, Stepanova V, Hong SB, et al. Folliculin Controls Lung Alveolar Enlargement and Epithelial Cell Survival through E-Cadherin, LKB1, and AMPK. *Cell Rep.* 2014;7:412–23.
91. Linehan WM, Srinivasan R, Schmidt LS. The genetic basis of kidney cancer: a metabolic disease. *Nat Rev Urol.* 2010;7:277–85.

92. Spring P, Fellmann F, Giraud S, Clayton H, Hohl D. Syndrome of Birt – Hogg – Dube With Similarities to Tuberous Sclerosis : A Report of Three Cases. *Am J Dermatopathol*. 2013;35:241–5.
93. Van Kempen LCLT, Ruiter DJ, van Muijen GNP, Coussens LM. The tumor microenvironment: a critical determinant of neoplastic evolution. *Eur J Cell Biol*. 2003;82:539–48.
94. Nahorski MS, Seabra L, Straatman-Iwanowska A, Wingenfeld A, Reiman A, Lu X, et al. Folliculin interacts with p0071 (plakophilin-4) and deficiency is associated with disordered RhoA signalling, epithelial polarization and cytokinesis. *Hum Mol Genet*. 2012;21:5268–79.
95. Preston RS, Philp A, Claessens T, Gijzen L, Dydensborg AB, Dunlop EA. Absence of the Birt – Hogg – Dubé gene product is associated with increased hypoxia-inducible factor transcriptional activity and a loss of metabolic flexibility. *Oncogene*. 2013;30:1159–73.
96. Gascue C, Katsanis N, Badano JL. Cystic diseases of kidney: ciliary dysfunction and cystogenic mechanisms. *Pediatr Nephrol*. 2011;26:1181–95.
97. Badano JL, Mitsuma N, Beales PL, Katsanis N. The ciliopathies: an emerging class of human genetic disorders. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2006;7:125–48.
98. Cardenas-Rodriguez M, Badano JL. Ciliary biology: understanding the cellular and genetic basis of human ciliopathies. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2009;151C:263–80.
99. Christensen ST, Pedersen SF, Satir P, Veland IR, Schneider L. The primary cilium coordinates signaling pathways in cell cycle control and migration during development and tissue repair. *Curr Top Dev Biol* . 2008;85:261–301.

100. Gerdes JM, Katsanis N. Ciliary function and Wnt signal modulation. *Curr Top Dev Biol.* 2008;85:175–95.
101. Haycraft CJ, Serra R. Cilia involvement in patterning and maintenance of the skeleton. *Curr Top Dev Biol.* 2008;85:303–32.
102. Nauli SM, Alenghat FJ, Luo Y, Williams E, Vassilev P, Li X, et al. Polycystins 1 and 2 mediate mechanosensation in the primary cilium of kidney cells. *Nat Genet.* 2003;33:129–37.
103. Montani M, Heinemann K, von Teichman A, Rudolph T, Perren A, Moch H. VHL-gene deletion in single renal tubular epithelial cells and renal tubular cysts: further evidence for a cyst-dependent progression pathway of clear cell renal carcinoma in von Hippel-Lindau disease. *Am J Surg Pathol.* 2010;34:806–15.
104. Kim J, Dabiri S, Seeley ES. Primary cilium depletion typifies cutaneous melanoma in situ and malignant melanoma. *PLoS One.* 2011;6:e27410.
105. Van Asselt SJ, de Vries EG, van Dullemen HM, Brouwers AH, Walenkamp AM, Giles RH, et al. Pancreatic cyst development: insights from von Hippel-Lindau disease. *Cilia.* 2013;2:3.
106. Bezginov A, Clark GW, Charlebois RL, Dar V-N, Tillier ERM. Coevolution reveals a network of human proteins originating with multicellularity. *Mol Biol Evol.* 2013;30:332–46.
107. Egeberg DL, Lethan M, Manguso R, Schneider L, Awan A, Jørgensen TS, et al. Primary cilia and aberrant cell signaling in epithelial ovarian cancer. *Cilia.* 2012;1:15.
108. Esteban MA, Harten SK, Tran MG, Maxwell PH. Formation of primary cilia in the renal epithelium is regulated by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *J Am Soc Nephrol.* 2006;17:1801–6.

109. Hartman TR, Liu D, Zilfou JT, Robb V, Morrison T, Watnick T, et al. The tuberous sclerosis proteins regulate formation of the primary cilium via a rapamycin-insensitive and polycystin 1-independent pathway. *Hum Mol Genet.* 2009;18:151–63.
110. Luijten MNH, Basten SG, Claessens T, Vernooij M, Scott CL, Janssen R, et al. Birt-Hogg-Dube syndrome is a novel ciliopathy. *Hum Mol Genet.* 2013;22:4383–97.
111. Lim DHK, Rehal PK, Nahorski MS, Macdonald F, Claessens T, Van Geel M, et al. A new locus-specific database (LSDB) for mutations in the folliculin (FLCN) gene. *Hum Mutat.* 2010;31:E1043–51.
112. Ren H-Z, Zhu C-C, Yang C, Chen S-L, Xie J, Hou Y-Y, et al. Mutation analysis of the FLCN gene in Chinese patients with sporadic and familial isolated primary spontaneous pneumothorax. *Clin Genet.* 2008;74:178–83.
113. Woodward ER, Ricketts C, Killick P, Gad S, Morris MR, Kavalier F, et al. Familial non-VHL clear cell (conventional) renal cell carcinoma: clinical features, segregation analysis, and mutation analysis of FLCN. *Clin Cancer Res.* 2008;14:5925–30.
114. Fröhlich BA, Zeitz C, Mátyás G, Alkadhi H, Tuor C, Berger W, et al. Novel mutations in the folliculin gene associated with spontaneous pneumothorax. *Eur Respir J.* 2008;32:1316–20.
115. Hoebeek J, van der Luijt R, Poppe B, De Smet E, Yigit N, Claes K, et al. Rapid detection of VHL exon deletions using real-time quantitative PCR. *Lab Invest.* 2005;85:24–33.
116. Damgaard D, Nissen PH, Jensen LG, Nielsen GG, Stenderup A, Larsen ML, et al. Detection of large deletions in the LDL receptor gene with quantitative PCR methods. *BMC Med Genet.* 2005;6:15.

117. Benhammou JN, Vocke CD, Santani A, Schmidt LS, Baba M, Seyama K, et al. Identification of intragenic deletions and duplication in the FLCN gene in Birt-Hogg-Dubé syndrome. *Genes Chromosom Cancer*. 2011;50:466–77.
118. Babaei Jandaghi A, Daliri S, Kikkawa M, Khaledi M, Soleimanifar N, Alizadeh A, et al. The discovery of a Persian family with a form of Birt-Hogg-Dubé syndrome lacking the typical cutaneous stigmata of the syndrome. *Clin Imaging*; 2013;37:111–5.
119. Da Silva NF, Gentle D, Hesson LB, Morton DG, Latif F, Maher ER. Analysis of the Birt-Hogg-Dubé (BHD) tumour suppressor gene in sporadic renal cell carcinoma and colorectal cancer. *J Med Genet*. 2003;40:820–4.
120. Nagy A, Zoubakov D, Stupar Z, Kovacs G. Lack of mutation of the folliculin gene in sporadic chromophobe renal cell carcinoma and renal oncocytoma. *Int J Cancer*. 2004;109:472–5.
121. Khoo SK, Kahnoski K, Sugimura J, Petillo D, Chen J, Shockley K, et al. Inactivation of BHD in sporadic renal tumors. *Cancer Res*. 2003;63:4583–7.
122. Schwerdtle RF, Störkel S, Neuhaus C, Brauch H, Weidt E, Brenner W, et al. Allelic losses at chromosomes 1p, 2p, 6p, 10p, 13q, 17p, and 21q significantly correlate with the chromophobe subtype of renal cell carcinoma. *Cancer Res*. 1996;56:2927–30.
123. Yamamoto H, Sawai H, Perucho M. Frameshift somatic mutations in gastrointestinal cancer of the microsatellite mutator phenotype. *Cancer Res*. 1997;57:4420–6.
124. Fujii H, Jiang W, Matsumoto T, Miyai K, Sashara K, Ohtsuji N, et al. Birt-Hogg-Dubé gene mutations in human endometrial carcinomas with microsatellite instability. *J Pathol*. 2006;209:328–35.

125. Shin J-H, Shin Y-K, Ku J-L, Jeong S-Y, Hong S-H, Park S-Y, et al. Mutations of the Birt-Hogg-Dubé (BHD) gene in sporadic colorectal carcinomas and colorectal carcinoma cell lines with microsatellite instability. *J Med Genet.* 2003;40:364–7.
126. Shapiro SD, Ingenito EP. The pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease: advances in the past 100 years. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2005;32:367–72.
127. Toro J, S K, Glenn G. The Fourth Birt–Hogg–Dubé Symposium, Cincinnati, USA, 28th–30th March, 2012. *Fam Cancer.* 2013;12:133–40.
128. Vincent A, Farley M, Chan E, James WD. Birt-Hogg-Dubé syndrome: A review of the literature and the differential diagnosis of firm facial papules. *J Am Acad Dermatol.* 2003;49:698–705.
129. Gupta N, Seyama K, McCormack FX. Pulmonary manifestations of Birt-Hogg-Dubé syndrome. *Fam Cancer.* 2013;12:387–96.
130. Welsch MJ, Kronic A, Medenica MM. Birt–Hogg–Dubé Syndrome. *Int J Dermatol.* 2004;44:668–73.
131. López V, Jordá E, Monteagudo C. Actualización en el síndrome Birt-Hogg-Dubé. *Actas Dermosifiliogr.* 2012;103:198–206.
132. Farooq A, Walker LJ, Bowling J, Audisio RA. Cowden syndrome. *Cancer Treat Rev.* 2010;36:577–83.
133. Borkowska J, Schwartz RA, Kotulska K, Jozwiak S. Tuberous sclerosis complex: tumors and tumorigenesis. *Int J Dermatol.* 2011;50:13–20.
134. Allende I, Truchuelo MT, Alcántara J, Boixeda P. Carbon dioxide-laser treatment of trichoepitheliomas in Brooke-Spiegler syndrome. *Actas Dermosifiliogr.* 2011;102:76–7.

135. Van Steensel MA, Jaspers NG, Steijlen PM. A case of Rombo syndrome. *Br J Dermatol.* 2001;144:1215–8.
136. Ashinoff R, Jacobson M, Belsito D V. Rombo syndrome: a second case report and review. *J Am Acad Dermatol.* 1993;28:1011–4.
137. Mills O, Thomas LB. Basaloid follicular hamartoma. *Arch Pathol Lab Med.* 2010;134:1215–9.
138. Doherty SD, Barrett TL, Joseph AK. Brooke-Spiegler Syndrome: Report of a case of multiple cylindromas and trichoepitheliomas. *Dermatol Online J.* 2008;14(7).
139. Ha DUC, Yadav R, Mazzone PJ. Cystic lung disease : Systematic , stepwise diagnosis. *Cleve Clin J Med.* 2015;82:115–27.
140. Pritchard SE, Mahmoudizad R, Parekh PK. Successful treatment of facial papules with electrodesiccation in a patient with Birt-Hogg-Dubé syndrome. *Dermatol Online J.* 2014;20(7).
141. Farrant PBJ, Emerson R. Letter: hyfrecation and curettage as a treatment for fibrofolliculomas in Birt-Hogg-Dube syndrome. *Dermatol Surg.* 2007;33:1287–8.
142. Gambichler T, Wolter M, Altmeyer P, Hoffman K. Treatment of Birt-Hogg-Dubé syndrome with erbium:YAG laser. *J Am Acad Dermatol.* 2000;43:856–8.
143. Jacob CI, Dover JS. Birt-Hogg-Dube syndrome: treatment of cutaneous manifestations with laser skin resurfacing. *Arch Dermatol.* 2001;137:98–9.
144. Korge B, Smola H, Schulze H. Multiple perifollicular fibromas, fibrofolliculomas, trichodiscomas, and association with scars of choriorretinitis and colon polyps (Hornstein-Birt-Hogg-Dubé-syndrome). *Z Hautkr.* 1996;71:129–31.

145. Junkins-Hopkins JM, Cooper PH. Multiple perifollicular fibromas: report of a case and analysis of the literature. *J Cutan Pathol.* 1994;21:467–71.
146. Wee JS, Chong H, Natkunarajah J, Mortimer PS, Moosa Y. Familial multiple discoid fibromas: unique histological features and therapeutic response to topical rapamycin. *Br J Dermatol.* 2013;169:177–80.
147. Mutizwa MM, Berk DR, Anadkat MJ. Treatment of facial angiofibromas with topical application of oral rapamycin solution (1mgmL(-1)) in two patients with tuberous sclerosis. *Br J Dermatol .* 2011;165:922–3.
148. Foster RS, Bint LJ, Halbert AR. Topical 0.1% rapamycin for angiofibromas in paediatric patients with tuberous sclerosis: a pilot study of four patients. *Australas J Dermatol.* 2012;53:52–6.
149. Pimenta SP, Baldi BG, Nascimento ECT do, Mauad T, Kairalla RA, Carvalho CRR. Birt-Hogg-Dubé syndrome: metalloproteinase activity and response to doxycycline. *Clinics.* 2012;67:1501–4.
150. Chung AWY, Yang HHC, Radomski MW, van Breemen C. Long-term doxycycline is more effective than atenolol to prevent thoracic aortic aneurysm in marfan syndrome through the inhibition of matrix metalloproteinase-2 and -9. *Circ Res.* 2008;102:e73–85.
151. Moses MA, Harper J, Folkman J. Doxycycline treatment for lymphangioliomyomatosis with urinary monitoring for MMPs. *N Engl J Med.* 2006;354:2621–2.
152. Collins GL, Somach S, Morgan MB. Histomorphologic and immunophenotypic analysis of fibrofolliculomas and trichodiscomas in Birt-Hogg-Dube syndrome and sporadic disease. *J Cutan Pathol.* 2002;29:529–33.

153. Kawasaki H, Sawamura D, Nakazawa H, Hattori N, Goto M, Sato-Matsumura KC, et al. Detection of 1733insC mutations in an Asian family with Birt-Hogg-Dubé syndrome. *Br J Dermatol*. 2005;152:142–5.
154. Lamberti C, Schweiger N, Hartschuh W, Schulz T, Becker-Wegerich P, Küster W, et al. Birt-Hogg-Dubé Syndrome: Germline Mutation in the (C) 8 Mononucleotide Tract of the BHD Gene in a German Patient. *Acta Derm Venereol*. 2005;105:1–1.
155. Murakami T, Sano F, Huang Y, Komiya A, Baba M, Osada Y, et al. Identification and characterization of Birt – Hogg – Dub e associated renal carcinoma. *J Pathol*. 2007;211:524–31.
156. Van Steensel M a M, Verstraeten VLRM, Frank J, Kelleners-Smeets NWJ, Poblete-Gutiérrez P, Marcus-Soekarman D, et al. Novel mutations in the BHD gene and absence of loss of heterozygosity in fibrofolliculomas of Birt-Hogg-Dubé patients. *J Invest Dermatol*. 2007;127:588–93.
157. Ren H-Z, Zhu C-C, Yang C, Chen S-L, Xie J, Hou Y-Y, et al. Mutation analysis of the FLCN gene in Chinese patients with sporadic and familial isolated primary spontaneous pneumothorax. *Clin Genet*. 2008;74:178–83.
158. Tyburczy ME, Wang J-A, Li S, Thangapazham R, Chekaluk Y, Moss J, et al. Sun exposure causes somatic second-hit mutations and angiofibroma development in tuberous sclerosis complex. *Hum Mol Genet*. 2014;23:2023–9.
159. Crino PB, Aronica E, Baltuch G, Nathanson KL. Biallelic TSC gene inactivation in tuberous sclerosis complex. *Neurology*. 2010 ;74:1716–23.

6. SUMMARY AND CONCLUSIONS

6.1. INTRODUCTION

In 1977, Birt et al. described a series of patients with multiple papular skin-colored, dome-shaped lesions located on the face, neck, and trunk. Histologically, these lesions corresponded to fibrofolliculomas, trichodiscomas and soft fibromas. This was the first description of what later came to be known as Birt-Hogg-Dubé syndrome, a genodermatosis that exhibits autosomal dominant inheritance. More than 20 years later, its association with renal carcinoma and/or pulmonary lesions was discovered.

The skin manifestations of Birt-Hogg-Dubé syndrome essentially comprise fibrofolliculomas and/or trichodiscomas that usually appear in individuals in their 20s or 30s. Trichofolliculomas, trichodiscomas and acrochordons traditionally considered as the characteristic triad of Birt-Hogg-Dubé syndrome appear to belong to the histopathologic and clinical spectrum of fibrofolliculoma. Clinically, these lesions are practically indistinguishable from one another and present as multiple whitish papules, with a dome-shaped appearance, a few millimeters in diameter, located mainly on the nose, forehead and cheeks, although they can also appear on the neck and trunk. Histologically, fibrofolliculoma is typically vertical or perpendicular to the epidermis, as it forms around a hair follicle. It is characterized by the presence of long, thin, mantle-like epithelial cords, which sometimes terminate in mature sebaceous glands, with surrounding fibrovascular stroma containing a variable myxoid component. Unlike fibrofolliculomas, trichodiscomas are oriented horizontally, that is, parallel to the epidermis, and are composed exclusively of

stroma identical to that of fibrofolliculomas, surrounded at the base by hair follicle units. Trichodiscoma is considered a late form of fibrofolliculoma.

In addition to these characteristic lesions, the presence of facial angiofibromas has occasionally been reported, and has the involvement of oral mucosa in the form of multiple papules on the lips and buccal and gingival mucosa.

In addition to skin lesions, patients with Birt-Hogg-Dubé syndrome may present a series of extracutaneous lesions. In recent years, it has been shown that these patients are at a greater risk of developing renal cancer and spontaneous pneumothorax. In 1993, Roth et al. described the first case of renal cancer in a patient with Birt-Hogg-Dubé syndrome. Toro et al. subsequently described Birt-Hogg-Dubé syndrome as a marker of renal cancer. Further studies providing confirmation have since been published. It was reported that patients with Birt-Hogg-Dubé had a 7-fold higher risk of renal cancer, with a predilection for men and an age of onset between 20 and 55 years, presenting bilaterally and with multifocal lesions with 5 different histologic types: oncocytic---chromophobe hybrid carcinoma (50%), purely chromophobe carcinomas (34%), purely oncocytic carcinomas (5%), clear cell carcinomas (3%), and papillary carcinomas (2%).

Up to 80% of patients with Birt-Hogg-Dubé syndrome have lung cysts, which may be asymptomatic for years. The number and size of the lesions varies from patient to patient, ranging from small cysts to bullae measuring several centimeters across, located mainly in the lung bases and at the subpleural level. A relationship between size and volume of the cysts and the risk of pneumothorax has been reported, the larger the volume the greater the risk. The mean age of presentation is 38 years, with no clear predilection for either sex. Some studies suggest that male sex is a risk factor for spontaneous pneumothorax, whereas others report no such risk. Among patients presenting

lung cysts, approximately 20-30% has a history of pneumothorax, with a mean of 2 prior episodes. In addition, when patients with a history of pneumothorax are studied, the vast majority have multiple cysts. The right lung is more frequently affected, although both lungs can be involved in up to 23% of cases. In patients with Birt-Hogg-Dubé syndrome, the risk of pneumothorax is 50 times greater than in the normal population. Patients with certain mutations are at risk of developing larger and more numerous cystic lesions. Thus, the mutation in exon 9 confers a risk of developing a greater number of cysts, whereas mutations in exon 9 and 12 are associated with larger cysts. The pathophysiology of lung cysts is unknown but it may be that haploinsufficiency is enough to induce the development of these lesions.

In 2002, the FLCN gene was identified as being associated with Birt-Hogg-Dubé syndrome. This gene, located on chromosome 17p11.2 and comprising 14 exons, encodes a 64 kDa protein, folliculin, which is expressed in most tissues including the skin and its appendages, the lungs (type 1 pneumocytes) and the kidney (distal nephron). The exact function of this protein has not yet been elucidated, but it seems to be implicated in the adenosinemonophosphate-activated protein kinase and mTOR pathways. Although mutations can occur anywhere in the FLCN gene, including exons and introns, to date 50% of the mutations reported are frameshifts caused by insertions or deletions at the mutational hotspot in the cytosine 8 nucleotide of exon 11. The loss of FLCN expression observed in almost all histologic subtypes of renal carcinoma implicates this gene in the pathogenesis of this type of tumor and provides further support for its function as a tumor suppressor gene. A second somatic mutation is necessary for renal cancer in patients with Birt-Hogg-Dubé syndrome to develop; this mutation leads to loss of mRNA expression of FLCN in these tumors. Contrary to what occurs in renal tumors, no loss of heterozygosity had been detected in skin or lung lesions. However, in the Fourth Birt-Hogg-

Dubé Symposium in 2012, Toro et al. obtained DNA from fibrofolliculomas of patients with BHDS finding loss of heterozygosity at the FLCN locus in most of the stromal tissue samples. In every case of LOH, the germline FLCN mutation was retained, and the wild-type sequence was lost suggesting that biallelic inactivation could be implicated in the development of cutaneous lesions.

6.2. HYPOTHESIS AND OBJECTIVES

Hypothesis

- A group of patients with germline mutations in FLCN present without fibrofolliculomas or trichodiscoma.
- In a group of patients, spontaneous and/or bilateral pneumothorax is the presenting feature of Birt-Hogg-Dubé syndrome.
- Biallelic inactivation in FLCN may be implicated in the development of skin and/or lung lesions.

Objectives

- Detection of germline mutations in FLCN in patients with fibrofolliculomas and/or trichodiscomas.
- Detection of germline mutations in FLCN in patients with spontaneous pneumothorax and/or lung cysts.
- Evaluation of biallelic inactivation in FLCN in lung and skin lesions.
- Evaluation of somatic mutations in FLCN in skin and lung samples of these patients.

- Evaluation of BHD promoter methylation status in patients with fibrofolliculomas or trichodiscomas, and/or spontaneous pneumothorax.
- Evaluation of mRNA expression of FLCN in fibrofolliculomas and trichodiscomas, and in lung and renal lesions.
- Evaluation of skin and/or lung lesions and germline and somatic mutations in FLCN in first-degree relative with Birt-Hogg-Dubé syndrome.

6.3. MATERIAL AND METHODS

Materials

A retrospective, descriptive study of the clinic, histologic and immunohistochemical characteristics in patients diagnosed of fibrofolliculomas and/or trichodiscomas and/or bilateral spontaneous pneumothorax in the Hospital Clínico Universitario of Valencia from 1995 to 2012 was performed. The study included a total of 39 patients (22 males and 17 females).

Approval from the Hospital Clinico Ethics (Medical Research) Committee and informed consent was obtained from participants.

Methods

All participants were subjected to dermatological investigation, chest X-rays or high-resolution computerized tomography scan and abdominal ultrasonography. Analysis of the FLCN gene was performed on genomic DNA extracted from peripheral leukocytes. PCR and direct sequencing for the detection of mutations in coding exons and adjacent flanking intronic regions were performed with Sanger and next generation sequencing.

In addition, FLCN gene analysis was performed in fibrofolliculomas, trichodiscomas and lung lesions. DNA was obtained from macrodissected paraffin-embedded tumor samples and then subjected to direct sequencing.

The direct sequencing of the FLCN exon was established for genetic testing. For each PCR, pairs of primer set were designed. Candidate gene exons were amplified from a panel representing patients included in the study. PCR products were generated using standard conditions. Double-stranded sequencing reactions using Big Dye Terminators were purified and electrophoresed on an ABI Prism 310 genetic analyzer. The results were evaluated using sequencing analysis.

Multiplex-PCR is a powerful technique that allows the amplification of two or more fragments in one single PCR reaction tube. Multiplex-PCR reactions were performed using Qiagen Multiplex-PCR kit and following the manufacturer guidelines. To simultaneously test several samples in a single sequencing run, each sample library was constructed with a specific adaptor, which has a different sequence of nucleotide (MID) to distinguish each sample after sequencing. The DNA libraries from each sample were then pooled so they could be clonally amplified through emulsion PCR and sequenced with the GS 454 Junior Platform (Roche) in accordance with the manufacturer's protocols. Next generation sequencing generates a huge quantity of sequence variations. Hence, various in silico bioinformatics tools (SIFT, pMUT and Polyphen) have been used to predict the probable pathogenicity of sequence variations. A mutation was considered to be pathogenic when at least two of these tools considered the variation as pathogenic.

Immunohistochemistry of paraffin-embedded fibrofolliculomas, trichodiscomas, lung samples, renal carcinomas and normal kidney was performed for demonstrating the presence and location of folliculin using the rabbit polyclonal

antibody (FL-342) against folliculin. The antibody-antigen interaction was then visualized using fluorescence microscopy.

DNA methylation consists on the addition of a methyl group to the fifth carbon position of the cytosine pyrimidine ring via a methyltransferase enzyme. The majority of DNA methylation in mammals occurs in 5'-CpG-3' dinucleotides. In fact, about 80 percent of all 5'-CpG-3' dinucleotides in mammalian genomes are found to be methylated, whereas the majority of the twenty percent that remain unmethylated are within promoters or in the first exons of genes. The most common technique used today is the bisulfite conversion method. This technique involves treating methylated DNA with bisulfite, which converts unmethylated cytosines into uracil. Methylated cytosines remain unchanged during the treatment. Once converted, the methylation profile of the DNA can be determined by PCR amplification followed by DNA sequencing. Germline methylation of FLCN was performed according to manufacturer's instructions (Zymo Research) with the available EZ-96 DNA Methylation-Gold™ Kit™.

6.4. RESULTS

Our study included a total of 39 individuals. There were 22 men and 17 women with a median age of 53,26 years. A family history of BHDS was present in 46,15% of patients. Seventy-two percent of participants had multiple white or skin colored papules over the axilla, face, neck, scalp, groin, upper extremities, trunk and/or lower extremities histologically confirmed as fibrofolliculomas or trichodiscomas.

Sixty percent of patients had fibrofolliculomas, followed by trichodiscomas in 3,6%. Other histologically confirmed dermatologic conditions included: angiofibroma (two patients), basal cell carcinoma (two patients) and malignant melanoma (1 patient). Twenty-one percent of patients with BHDS were devoid of cutaneous lesions.

Forty-one percent of BHDS patients had lung cysts on CT imaging with bilateral cysts, left lung and right lung cyst in 33,3%, 13% and 2,56%, respectively. The left lung had the highest frequency of pneumothorax (46,7%). Approximately 40% of patients had a pneumothorax in the right lung only, and 13,3% of patients had a pneumothorax in both the right and the left lungs at different times. The earliest reported age of initial pneumothorax was 22 years (range, 22-65 yr) and the median age was 43,27 years. The average number of pneumothoraces per patient was two, and 13,33% experienced five separate pneumothoraces. Seventy-three percent of patients had pneumothorax repeatedly. Incidence of pneumothorax was higher in men than in women, at a ratio of 3:1. In patients diagnosed of BHDS, lung manifestations were present in a 26,3% of cases.

Fifty-three percent of BHD patients had kidney cysts involving both kidneys in a 50% of cases, and affecting left or right kidney in a 37,5% and 12,7%, respectively. Three of the patients presented renal carcinoma with 2 different histologic types: purely chromophobe carcinoma (67%) and purely oncocytic carcinomas (33%).

In addition to the results described above, other associations have been described in patients with Birt-Hogg-Dubé syndrome. We found breast cancer in four patients, colorectal cancer in three patients, esophageal cancer in one patient and gynecologic cancers (cervical, ovarian and uterine) in three patients.

We carried out immunostaining in cells from kidney carcinomas, lung cysts and fibrofolliculomas/trichodiscomas using specific antibodies raised against human FLCN. In immunoperoxidase staining, we found that in cutaneous and lung lesions FLCN immunostaining was retained in the cytoplasm but was stronger in the nucleus, predominantly localized in the nucleolus, whereas FLCN immunoreactivity was virtually absent in both cytoplasm and nucleus of kidney carcinomas, and present exclusively in the cytoplasm in normal kidney tubules.

Germline BHD mutations were present in 73,7% of patients with Birt-Hogg-Dubé syndrome. Germline mutations were found in 66,6% of patients with cutaneous lesions, and in all of the patients with lung cysts and/or pneumothorax. Mutation c.1286insC in exon 11 was the most frequent site of mutation, accounting for 35,7% of all the mutations detected. Regarding, somatic mutations, the exon 14 was the most frequent site of somatic mutations, followed by exons 5 and 6, accounting for 23% , 19% and 19% of all mutations detected, respectively. There was no association between BHD mutation status, mutation types, or location, lung cyst features, pneumothorax or cutaneous findings. The germline mutation most frequently found in patients with lung involvement was located in the exons 3, 5, 6 and intron 11.

Overall, 39 patients were included in the study. Next Generation Sequencing from samples of blood, skin and lung detected germline and/or somatic mutations in 14 of them and in a total of 20 samples (excluding one from a renal carcinoma). Nine of 12 (75%) patients diagnosed of BHDS had somatic mutations in at least one of their biopsies. Eight of 12 (66,7%) had somatic mutations in all of the samples studied. One of 12 (8,3%) had somatic mutations in one or more biopsied. In 3 cases (25%), no somatic mutation was identified.

In 12 (66,7%) specimens, at least one somatic mutation was found in the sample. In 6 of 18 (33,3%) specimens, two or more somatic mutations were

found in the same sample, finding at least one in 6 of them (33,3%) and 5 in 1 of them. In 6 (33,3%) samples, somatic mutation was absent.

Five of 12 (41,7%) patients with BHDS showed biallelic FLCN gene inactivation. In regard to cutaneous biopsies, biallelic inactivation was found in 5 of 12 (41,7%) patients and 5 of 15 (33,3%) samples. In regard to lung biopsies, a third of samples showed biallelic FLCN gene inactivation.

In five (41,7%) of 12 patients and eight (44,4%) of 18 samples, the germline mutation was retained, and the wild-type sequence was lost, all of them from skin lesions. Moreover, in 4 (33,3%) of 12 patients and 4 (22,2%) obtained from skin lesions, the wild-type sequence was retained, while the germline mutation was lost.

BHD promoter methylation status was examined by a methylation-specific PCR array of all of the samples included in our study. No methylation of the FLCN/BHD promoter was found in any of the samples.

6.5. CONCLUSIONS

1. Skin lesions are missing in one-fifth of patients with BHDS. In a quarter of patients, pneumothorax and/or multiple lung cysts are present.
2. In cutaneous and pulmonary lesions, and in contrast to renal tumors, folliculin immunostaining is retained in the cytoplasm but is stronger in the nucleus, and particularly in the nucleolus.
3. Germline mutations are present in most of the patients with BHDS (74%), being mutation c.1286insC located in exon 11 the most frequent.
4. FLCN somatic pathogenic mutations are found in three-quarters of patients in at least one of the samples studied.

5. FLCN biallelic inactivation is present in at least one fibrofolliculoma or trichodiscoma in 41% of patients with BHDS, and in one-third of skin and lung lesions from these patients, all of them with loss of one allele. In another third of patients, results are not conclusive.
6. No methylation of the FLCN/BHD promoter was found in any cutaneous or lung samples.
7. In contrast with the currently accepted hypothesis of haploinsufficiency as the only pathogenic mechanism for the development of cutaneous and pulmonary lesions in the BHDS, our results indicate that FLCN biallelic inactivation, by mechanisms other than metilation, with allelic loss, is a common phenomenon in cutaneous lesions, and to a lesser extent in lung lesions, may represent an analogous pathogenic mechanism to that already accepted for renal tumors in this syndrome.