



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MONTES CLAROS - UNIMONTES  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE  
MESTRADO ACADÊMICO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

---



LEONARDO DE JESUS ARAÚJO

ESCLEROSE TUBEROSA – ASPECTOS FENOTÍPICOS DE UMA FAMÍLIA AFETADA POR  
ESTA SÍNDROME

MONTES CLAROS – MINAS GERAIS – BRASIL  
MARÇO DE 2010

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MONTES CLAROS - UNIMONTES  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE  
MESTRADO ACADÊMICO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE



---

LEONARDO DE JESUS ARAÚJO

ESCLEROSE TUBEROSA – ASPECTOS FENOTÍPICOS DE UMA FAMÍLIA AFETADA  
POR ESTA SÍNDROME

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Montes Claros - Unimontes, como parte das exigências para obtenção do título de mestre em Ciências da Saúde.

ORIENTADOR: PROF. DR. PAULO ROGÉRIO FERRETI BONAN

CO-ORIENTADOR: PROF. DR. HERCÍLIO MARTELLI JÚNIOR

MONTES CLAROS – MINAS GERAIS – BRASIL  
MARÇO DE 2010

A658e Araújo, Leonardo de Jesus.  
Esclerose tuberosa : aspectos fenotípicos de uma família afetada por esta síndrome. [manuscrito] / Leonardo de Jesus Araújo. – 2010.

74 f. : il.

Bibliografia : f. 67-73.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Montes Claros –  
Unimontes, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde/PPGCS,  
2010.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Rogério Ferreti Bonan.

Co-orientador: Prof. Dr. Hercílio Martelli Júnior.

1. Esclerose tuberosa. 2. Fenótipo. 3. Marcadores Biológicos. I. Bonan, Paulo Rogério Ferreti. II. Martelli Júnior, Hercílio. III. Universidade Estadual de Montes Claros. III. Título: Aspectos fenotípicos de uma família afetada por esta síndrome.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MONTES CLAROS – UNIMONTES

REITOR: PAULO CÉSAR GONÇALVES DE ALMEIDA

VICE-REITOR: JOÃO DOS REIS CANELA

PRÓ-REITORA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO: SÍLVIA NIETSCHE

COORDENADORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO: HERCÍLIO MARTELLI JÚNIOR

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

MESTRADO ACADÊMICO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

COORDENADOR: PAULO ROGÉRIO FERRETI BONAN

SUB-COORDENADOR: JOÃO FELÍCIO RODRIGUES NETO



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MONTES CLAROS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE



ALUNO: LEONARDO DE JESUS ARAÚJO

TÍTULO DO PROJETO: "ESCLEROSE TUBEROSA – ASPECTOS FENOTÍPICOS DE UMA FAMÍLIA AFETADA POR ESTA SÍNDROME".

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: SAÚDE BUCAL

LINHA DE PESQUISA: PATOLOGIA BUCAL

**BANCA (TITULARES)**

PROF. DR. PAULO ROGÉRIO FERRETI BONAN (ORIENTADOR)

PROF. DR. ALESSANDRA REJANE ERICSSON OLIVEIRA (UNIMONTES)

PROF. DR. SÍLVIO FERNANDO GUIMARÃES DE CARVALHO (UNIMONTES)

ASSINATURAS

**BANCA (SUPLENTE)**

PROF. DR. JOÃO FELÍCIO RODRIGUES NETO (UNIMONTES)

PROF. DR. SÉRGIO AVELINO MOTA NOBRE (UNIMONTES)

ASSINATURAS

APROVADA       REPROVADO

Hospital Universitário Clemente Faria - HUCF  
Av. Cula Mangabeira, 562 – Santo Expedito  
Caixa Postal nº 126 - Montes Claros / MG - Cep: 39.401-002  
<http://www.ppgcs.unimontes.br> – E-mail: [ppgcs@unimontes.br](mailto:ppgcs@unimontes.br)  
Telefone: (0xx38) 3224-8372 Fax: (0xx38) 3224-8372

*Dedico esse trabalho em ação de graças ao bom Deus, que é presença constante em minha vida. Aos meus pais, Ademar e Marilene, que tanto me ensinaram através do seu amor, exemplo e fidelidade. À minha esposa Emeline e ao meu filho João Artur, presentes de Deus, que tornaram esse momento ainda mais especial.*

## AGRADECIMENTOS

Venho por meio desse capítulo, agradecer de modo especial, a todos aqueles que possibilitaram tornar realidade mais esse sonho. Muitos foram aqueles que me forneceram suporte em meio à tempestade para que eu pudesse ir ao largo, avançando para "águas mais profundas". Convém recordar que tal caminho não começou nesse programa de pós-graduação, e sim, desde o início da minha existência. A todos os que passaram em minha vida, na pessoa dos citados *a posteriori*, eu agradeço...

...de modo especial à Santíssima Trindade, que sempre se fez luz para guiar o meu caminho.

À minha família, pais e irmãos, por ser suporte nos momentos difíceis e pela comunhão em prol da realização desse sonho.

Ao meu orientador, professor Paulo Rogério Ferreti Bonan, que acreditou em mim como pupilo e me ensinou com zelo, paciência, sabedoria e dedicação de maneira exemplar durante toda trajetória do mestrado.

Ao meu co-orientador, professor Hercílio Martelli Júnior, que com seu testemunho e acolhimento, mostrou-me ser possível viver o equilíbrio entre fé e ciência.

Ao professor Alfredo Maurício Batista de Paula que me adotou tal qual um filho desde o curso de graduação em Odontologia.

Novamente aos professores Paulo, Hercílio e Alfredo por participarem de forma brilhante da banca de qualificação desse trabalho.

Ao professor João Felício Rodrigues Neto, entusiasta e idealista para com a criação do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde e para com a capacitação docente.

Aos colegas e docentes do curso de especialização em Educação em Saúde (UNIMONTES/UNIFESP) por fomentarem em mim a realização desse empreendimento.

Aos colegas do Mestrado Acadêmico, Daniella, Pedro, Naiara, Lucyana, Ludmilla, Scheilla, Marcelo, Luíza e Maria Fernanda, pelos agradáveis momentos de convivência e de sabedoria. Aos colegas do Mestrado Profissional em Cuidados Primários e a todos os docentes do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde por trilharem junto comigo esse caminho de busca do conhecimento.

Às secretárias do PPGCS, Du Carmo e Kátia, pela competência e auxílio durante os diversos momentos do curso.

Aos "eternos" colegas de graduação Danilo Cangussu Mendes, Leonardo de Paula Miranda e Patrícia Helena Costa Mendes pelos momentos inesquecíveis de partilha, amizade e conhecimento.

Aos acadêmicos de iniciação científica Leonardo Santos Lima, Juliano Santos Lima e Lucyana Yamamoto de Almeida pelo aprendizado, esforço e dedicação.

Aos colegas cirurgiões-dentistas Anamaria Lima Laranjeira e Luís Antônio Nogueira dos Santos, pelo auxílio na área de imaginologia odontológica; e aos companheiros médicos Edmilson Santos, Simone Aires de Sá, Tassiana Mota Mourão Alvarenga e Luciana dos Mares Guia Ribeiro pelos suportes clínicos e técnico-científicos nas áreas de cardiologia, imaginologia médica, dermatologia e oftalmologia, respectivamente.

À Universidade Estadual de Campinas, na pessoa do professor Ricardo Della Coletta pelo suporte técnico-científico na área de genética e análises ultraestruturais.

À Universidade Estadual de Montes Claros, na pessoa do magnífico reitor Paulo César Gonçalves de Almeida, que propiciou tanto a infra-estrutura necessária como a excelência do programa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG, que viabilizou financeiramente a pesquisa através de fomento por meio do Edital de Demanda Universal (processo APQ-00898-08).

À família em estudo, a qual através de sua simplicidade mostrou-me que além de uma pesquisa, se encontra a amizade e a dignidade da pessoa humana.

Aos professores Paulo Rogério Ferreti Bonan, Alessandra Rejane Ericsson de Oliveira, Sílvio Fernando Guimarães de Carvalho, João Felício Rodrigues Neto e Sérgio Avelino Mota Nobre por aceitarem o convite para participarem como membros da banca de defesa da dissertação.

Aos acadêmicos dos cursos de Medicina, Odontologia e Biomedicina das Faculdades Unidas do Norte de Minas - FUNORTE que me ensinaram a amar e entender a docência como missão.

Aos irmãos da Comunidade Nova Vida pelas orações, pelo exercício da caridade e suporte espiritual.

Aos colegas de trabalho do consultório Flammarrion, Bráulio, Vilma e Enéias por entenderem meus momentos de ausência e pelo empenho para o exercício da Odontologia de qualidade.

À minha esposa Emelline e ao meu filho João Artur, razões do meu viver.

Enfim, a todos os supracitados, minha eterna gratidão...

*“Quando tocar a nossa última hora,  
teremos a indizível alegria de ver  
Àquele que em nosso trabalho apenas  
podemos pressentir”.*

Karl Friedrich Gauss  
Matemático, astrônomo e físico

## RESUMO

A Esclerose Tuberosa é uma doença genética, neurocutânea, de caráter autossômico dominante e expressividade variada. Dentre os seus principais achados destacam-se lesões de pele e anexos, sistema nervoso central, coração, rins e outros órgãos. A prevalência da síndrome é estimada em 1:6.000 nativos e cerca dois terços dos casos relatados não têm histórico familiar. Este trabalho objetiva: (1) retratar o perfil de uma extensa família acometida por essa síndrome através da caracterização dos aspectos clínicos, genéticos, imaginológicos e microscópicos; e (2) descrever o padrão de imunomarcção de MMP-1, MMP-10, TIMP-1,  $\alpha$ -SMA e TGF- $\beta$ 1 em angiofibromas orais e cutâneos de indivíduos afetados nesta família. Trata-se de um estudo de cunho descritivo-analítico envolvendo 4 gerações da família previamente citada. Os critérios utilizados para avaliação e manejo clínico dos pacientes nesse trabalho foram propostos por Roach e colaboradores (1998). O protocolo imaginológico incluiu a realização de ressonâncias magnéticas do encéfalo, tomografias computadorizadas de feixe cônico, fundoscopias, ultrassonografias abdominais e ecocardiogramas nos afetados. Análises microscópicas em hematoxilina-eosina e imunohistoquímica foram feitas para os marcadores MMP-1, MMP-10, TIMP-1,  $\alpha$ -SMA e TGF- $\beta$ 1 nas lesões previamente descritas. Alterações de dentes, pêlos e unhas foram analisadas em microscopia eletrônica de varredura. Dentre os 61 indivíduos examinados, foram identificados 6 sujeitos sindrômicos e 7 indivíduos com traços da doença. O padrão de herança demonstrou ter alta penetrância e grande variabilidade fenotípica com ausência de casamentos consangüíneos. Máculas hipomelanóticas, angiofibromas faciais e defeitos cavitados puntiformes de esmalte dentário foram os achados fenotípicos mais comuns dos portadores da síndrome. Quanto aos angiofibromas analisados, estes mostraram-se imunorreativos para MMP-1, MMP-10 e TGF- $\beta$ 1, com padrão de distribuição heterogêneo tanto entre os elementos teciduais analisados quanto na intensidade de marcação dos mesmos entre os espécimes. TIMP-1 exibiu reatividade predominantemente negativa nos espécimes analisados e  $\alpha$ -SMA apresentou-se restrito a regiões perivasculares e epiteliais dessas lesões. Em suma, neste estudo, enfatizamos a importância dos achados bucais, para o diagnóstico precoce e estabelecimento do completo padrão familiar da Esclerose Tuberosa.

Palavras-chaves: Esclerose Tuberosa. Fenótipo. Marcadores Biológicos.

## ABSTRACT

Tuberous sclerosis is a neurocutaneous genetic disease characterized by autosomal dominant trait and variable expressivity. Among the most important features can include skin lesions and annexes, alterations of central nervous system, heart, kidneys and other organs. The prevalence is estimated in 1:6.000 live births and two thirds of all cases have not familial history. This paper aims: (1) retrace the profile of a large family affected by this syndrome by characterizing its clinical, genetic, imaginological and microscopic aspects, and (2) analyze the pattern of immunolocalization of markers MMP-1, MMP-10, TIMP-1,  $\alpha$ -SMA and TGF- $\beta$ 1 in oral and facial angiofibromas of affected individuals in this family. This is a descriptive-analytical study involving 4 generations of the family previously cited. The criteria used for evaluation and clinical management of patients in this study were proposed by Roach and collaborators (1998). The imaginological protocol included magnetic resonance imaging of the brain, cone beam computed tomography, fundoscopies, abdominal ultrasound scans and echocardiograms in affected. Microscopical analyses on hematoxylin-eosin and immunohistochemistry were performed for the markers MMP-1, MMP-10, TIMP-1,  $\alpha$ -SMA and TGF- $\beta$ 1 in lesions previously described. Alterations of teeth, hair and nails were examined in scanning electron microscopy. Among the 61 individuals examined were identified 6 individuals syndromic and 7 subjects with traces of the disease. The inheritance pattern showed a high penetrance and wide variability in phenotype with absence of consanguineous marriages. Hypomelanotic macules, facial angiofibromas and enamel pits were the most common phenotypic findings of this syndrome. For the analyzed angiofibromas, these proved to be immunoreactive for MMP-1, MMP-10 and TGF- $\beta$ 1, with heterogeneous distribution pattern among both tissue elements analyzed in the intensity of marking the same among the specimens. TIMP-1 showed reactivity predominantly negative in the specimens analyzed and  $\alpha$ -SMA presented restricted to epithelial and perivascular regions of these lesions. In summary, this study emphasized the importance of oral findings for early diagnosis and complete establishment of Tuberous Sclerosis familial pattern.

**Keywords:** Tuberous Sclerosis. Phenotype. Biological Markers.

## LISTA DE SIGLAS

ACTH - Hormônio adrenocorticotrófico

AMPK - Adenosine Monophosphate-activated Protein Kinase

AKT - Protein Kinase B

CO<sub>2</sub> - Dióxido de carbono

ET - Esclerose Tuberosa

GTPase - Guanosina Trifosfato hidrolase

MAPK - Mitogen-activated Protein Kinase

MIM - Mendelian Inheritance in Man

MMP-1 – metaloproteinase da matriz 1

MMP-10 - metaloproteinase da matriz 10

mTOR/S6 - Mammalian Target of Rapamycin S6

OMIM – Online Mendelian Inheritance in Man

PKD1 - Polycystic Kidney Disease 1

Ras - Rat Sarcoma Proteins (Superfamília de GTPases envolvidas no controle de proliferação, divisão e apoptose celular)

Rab5 - Rabaptin 5

Rap1a - Ras-related protein 1a

Rheb - Ras homologue enriched in brain

$\alpha$ -SMA - alfa-actina de músculo liso

T1 - Tempo 1 de relaxamento

T2 - Tempo 2 de relaxamento

TDAH - transtorno de déficit de atenção e hiperatividade

TGF- $\beta$ 1 - fator de crescimento transformante-beta 1

TIMP-1 - inibidor tecidual de metaloproteinase 1

TSC1 - gene 1 do Complexo Esclerose Tuberosa

TSC2 - gene 2 do Complexo Esclerose Tuberosa

TSC2/PKD1 - gene 2 do Complexo Esclerose Tuberosa contíguo com gene 1 da doença renal policística

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1 Características gerais	11
1.2 Aspectos epidemiológicos	12
1.3 Etiopatogenia	13
1.4 Características clínicas	15
1.5 Diagnóstico	20
1.6 Prognóstico e tratamento	21
2. OBJETIVOS	26
2.1 Objetivo geral	26
2.2 Objetivos específicos	26
3. PRODUTOS	27
3.1 Artigo 1	27
3.2 Artigo 2	49
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	66
REFERÊNCIAS	66
ANEXO	74
ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa	74

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Características gerais

A Esclerose Tuberosa (ET) é uma doença genética, classificada como síndrome neurocutânea ou facomatose, com herança autossômica dominante e que apresenta alta penetrância e expressividade variada (1). Outras desordens desse grupo incluem neurofibromatoses do tipo 1 e 2, síndrome de Sturge-Weber, ataxia-telangectasia e doença de von Hippel-Lindau (2). É caracterizada por importantes envolvimento neurológicos, dermatológicos e torácico-viscerais (1). Sua terminologia refere-se a múltiplas massas escleróticas encontradas no encéfalo (3). Tal síndrome ocorre devido a disfunção dos genes TSC1 (9q34) e TSC2 (16p13.3), envolvidos no controle proliferativo celular (4).

A ET é também conhecida como síndrome de Bourneville, visto que esse autor foi quem pela primeira vez estabeleceu a relação entre as lesões cutâneas e o acometimento neurológico (5,6). Embora a síndrome já houvesse sido relatada por Friedrich Daniel Von Recklinghausen desde 1862, a sua descrição minuciosa deve-se ao neurologista francês Désiré Magloire Bourneville e ao dermatologista inglês John James Pringle (5,6).

Recklinghausen descreveu tumores cerebrais e cardíacos múltiplos identificados na necropsia de um recém-nascido (5,8,9). A correlação com sinais e sintomas neurológicos são creditados, no entanto, a Bourneville (5,7,8,9). Ele encontrou ilhotas grandes de esclerose nos giros corticais de dois pacientes que tiveram óbito em decorrência de epilepsia. Em um desses pacientes ele também detectou a presença de massas renais (5). Posteriormente, o acometimento sistêmico fora demonstrado por Vogt et al no seu clássico estudo da tríade epilepsia, deficiência mental e adenomas sebáceos (5,9,10,11,12). A ET era caracterizada anteriormente pelos 3 achados descritos *a priori*, sendo essa considerada a forma típica da doença (5,9). Com isso, surgiu o termo epilóia para designar a doença, contudo tal sinonímia vem sendo cada vez menos utilizada principalmente na literatura anglo-saxônica (6).

Van der Hoeve, que caracterizou os hamartomas de retina na síndrome, introduziu o termo facomatose (phakos "mancha" e oma "tumor"), compreendendo tanto ET e neurofibromatoses. Após as primeiras descrições de calcificações radiológicas, a introdução de exames de tomografia computadorizada e ressonância nuclear magnética melhoraram o processo diagnóstico (5). Gomez foi quem publicou primeiro sobre o espectro clínico e subclínico da ET em 1979 (5).

Estudos subseqüentes reconheceram a abundância do espectro clínico da doença, por evidenciar a sua natureza sistêmica (13,14). A base hereditária da ET foi mencionada já no

ano de 1913 (5). Entretanto, somente no final do século XX foram identificados os dois genes responsáveis pela doença. Uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento da síndrome, ainda deve ser alcançada (4,5)

São sinônimos da ET encontrados na literatura: complexo esclerose tuberosa (13,14,15), doença de Bourneville-Pringle (5), adenoma sebáceo de Bourneville, adenoma sebáceo de Pringle (9), doença de Bourneville-Brissaud, síndrome da hamartomatose sistêmica múltipla, neuromatose universal, esponglioblastose circunscrita e neurosponglioblastose difusa (7).

## 1.2 Aspectos epidemiológicos

A ET é uma doença de distribuição universal, uma vez que ocorre em todo o mundo, sem predileção para raça ou gênero (7,16,17,18). A prevalência da afecção pode ser tão alta quanto 1:5.800 nascidos vivos (19). Todavia, o que se verifica é que os dados referentes à prevalência da ET oscilam muito na literatura, variando de 1:100.000 até 1:1.000.000 (15). Estudos recentes sugerem que a prevalência é de 1:6.000 nativos (19,20). Essas diferenças podem ser explicadas por diferentes critérios de diagnóstico e pela apresentação de formas parciais da doença (15). A expressão fenotípica da ET é altamente variável (1) e, em alguns casos pode ser difícil estabelecer um diagnóstico clínico definitivo. Cerca de dois terços dos casos são esporádicos, ou seja não apresentam histórico familiar (21). A taxa de mutação estimada em 1:25.000, é considerada elevada (22,23).

Após a avaliação cuidadosa e detalhada de indivíduos conhecidos, acredita-se que a penetrância da síndrome está estimada em 100% (22). Casos raros de ausência de penetrância aparente foram relatados; no entanto, a existência da participação de dois genes distintos na etiopatogênese da síndrome (4,21,22) e a presença de mosaicismos genéticos podem explicar tais situações (22,24,25).

Por pertencer ao grupo das síndromes neurocutâneas, também denominadas neuroectodermoses ou facomatoses, há relatos de casos em que se associa às neurofibromatoses 1 e 2, à síndrome de von Hippel-Lindau e à doença de Sturge-Weber (2,26,27). Essas síndromes representam distúrbios nos quais os indivíduos afetados desenvolvem neoplasias com elevada frequência (2,26,27). Os genes responsáveis por essas doenças apresentam características semelhantes e agem como supressores de tumor, embora levem a manifestações clínicas distintas (2,21,22).

### 1.3 Etiopatogenia

A etiopatogenia da ET ainda não é completamente conhecida (4,5), fato este que resulta em diferentes implicações de diagnóstico, prognóstico e tratamento. Contudo, sabe-se que tal entidade representa um modelo de herança autossômica dominante com alto grau de mutações espontâneas, que compõem cerca de dois terços de todos os casos (1,21,22,26). O comportamento da ET segue o modelo de Knudson (21,22) para a oncogênese envolvendo dois genes de *loci* distintos (22).

O primeiro gene denominado TSC1 (9q34) foi identificado em 1997 e codifica a hamartina, uma proteína que regula a adesão celular (21,22). O segundo gene TSC2 (16p13.3), identificado em 1993 (20), codifica a tuberina, uma proteína associada à regulação do transporte de vesículas do citoplasma para a membrana, também implicada nos mecanismos de regulação das mitoses e ativação do gene Ras (21,22) (Figura 1). Ambas também apresentam efeitos inibitórios sobre o crescimento, proliferação e migração celular, pois estimulam a entrada de células que se encontravam latentes na fase G0 do ciclo celular para fase S (21). No entanto, a maneira como essas duas proteínas se interagem ainda não está totalmente esclarecida (21).

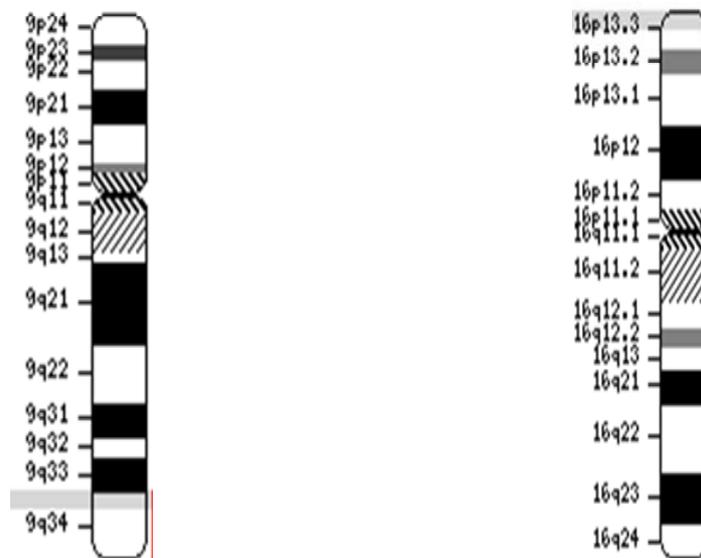


Figura 1 – Representações esquemáticas dos cromossomos envolvidos na etiopatogênese da Esclerose Tuberosa enfatizando os *loci* gênicos TSC1 (9q34) e TSC2 (16p13.3)

Fonte: OMIM, 2009.

A tuberina tem função de ativação da GTPase para pequenas proteínas-G (Rap1a e Rab5) (22,28,29) e funciona como um regulador principal da pequena proteína-G Rheb além de atuar na tradução protéica, crescimento e proliferação celular (22,30). A hamartina também regula o ciclo celular através de interação por via cinase ciclino-dependente (31). Hamartina e

tuberina formam heterodímeros, sugerindo que eles podem agir em conjunto para regular a proliferação celular (22). Mais recentemente, foi demonstrado que tuberina e hamartina são reguladores-chaves da via AKT, participando também em várias outras vias de sinalização incluindo a MAPK, AMPK,  $\beta$ -catenina, calmodulina, mTOR/S6 cinase, como também em outras vias do ciclo celular (22,31,32,33).

Todas as mutações envolvendo TSC1 ou TSC2 são preditivas à produção de produtos truncados não-funcionais, os quais falham na regulação da tradução protéica podendo levar a uma proliferação celular desordenada que resulta em lesões hamartomatosas e/ou neoplásicas (22,34). A variabilidade de fenótipos na ET pode ser explicada parcialmente, pela ocorrência de diferentes tipos de mutação nos genes que codificam hamartina e tuberina, sugeridas por estudos de correlação genótipo-fenótipo (22,35,36,37).

Au et al (38) realizaram análises em 325 indivíduos estabelecendo a definição do tipo de ET e do tipo de variante (TSC1 e TSC2). Os autores conseguiram identificar a variante de ET dos indivíduos acometidos por mutações *de novo* em 72% dos indivíduos (199 de 257) e em 77% dos casos com herança familiar (53 de 68). No total, 17% de mutações ocorreram no gene TSC1 e 50% em TSC2. Estes autores (38) mostraram nesse estudo que os pacientes com mutações em TSC2 parecem ter máculas significativamente mais hipomelanóticas e maiores dificuldades de aprendizagem, comparados com aqueles que apresentavam mutações em TSC1. Em uma metanálise incluindo seus dados e de outros dois grandes estudos da literatura (35, 37), Au et al (38) também encontraram correlações significativas para diversas características que estudos individuais não têm poder suficiente para concluir. Pacientes do sexo masculino, por exemplo, apresentaram maior frequência de achados neurológicos, afecções oftalmológicas, cistos renais e fibromas ungueais. A partir dos resultados de tais estudos, ainda concluiu-se que indivíduos com mutações em TSC2 parecem apresentar sinais e sintomas mais graves.

Corroborando com tais estudos (35,37,38) Al-Saleem et al (39) relataram um maior risco de câncer renal em indivíduos com mutações em TSC2. Jones et al (40,41) encontraram uma maior frequência de retardo mental em indivíduos com mutações em TSC2. Estes autores (40,41) ainda sugeriram haver uma diminuição ao longo dos anos da proporção de indivíduos com mutações em TSC1 entre aqueles que não têm histórico familiar de ET. Tal achado pode representar um verdadeiro fenômeno biológico ou a comprovação de que, isso acontece porque eles têm um fenótipo um menos grave. Autismo e espasmos infantis também são mais comuns em mutações de TSC2 (22,36).

#### 1.4 Características clínicas

A ET é uma doença multissistêmica, caracterizada em sua forma complexa por lesões hamartomatosas que atingem encéfalo, rins, pulmões, pele e outros órgãos (1,13,14,21,22). Esta entidade patológica apresenta também variabilidade em resultados de estudos clínicos, tanto intra como entre famílias e quaisquer órgãos podem estar envolvidos (9,22).

A pele é afetada em praticamente 100% dos indivíduos com ET. As lesões de pele incluem: máculas hipomelanóticas (87-100% dos casos), angiofibromas faciais (47-90%), placas de *Shagreen* (20-80%), placas fibrosas faciais e fibromas ungueais (17-87%) (21,22,42,43,44,45,46,47,48,49). Entre as lesões cutâneas, destacam-se os angiofibromas faciais por poderem causar maior desfiguração estética. Nenhuma das lesões dermatológicas resulta em sérios problemas médicos (22).

As manifestações cutâneas raramente surgem ao nascimento e aparecem no período da puberdade (50). O quadro cutâneo clássico refere-se aos múltiplos angiofibromas na face, também denominados erroneamente de adenomas sebáceos de Pringle (9,21,22,50), que surgem geralmente entre os três anos e a puberdade (50). Tratam-se de pequenos hamartomas localizados no interior da derme, comumente localizados na face, às vezes adotando a distribuição em “asa de borboleta” sobre a região nasomalar, de consistência mole, de cor róseo-pálida (9,50) que têm como diagnóstico diferencial acne vulgar, acne rosácea ou tricoepiteliomas múltiplos (22,50).

Fitzpatrick et al apontaram a utilidade diagnóstica de máculas hipomelanóticas em pacientes com ET. Estas estão, provavelmente, presentes ao nascimento na maioria dos casos permitindo o diagnóstico precoce e são mais bem identificadas com o auxílio da lâmpada de Wood (22,45,50). Tais lesões podem ser confundidas com vitiligo, *nevus* despigmentado, *nevus anemicus*, piebaldismo e com a síndrome de Vogt-Koyanagi-Harada (22). Dispostas de modo linear no tronco e membros, variam de tamanho de poucos milímetros a vários centímetros e podem ser poligonais ou em forma de pétalas acinzentadas (50).

Fibromas ungueais e/ou periungueais múltiplos, também descritos como tumores de Koenem, são formações pediculadas de coloração rosácea, que se originam na periferia das unhas e histologicamente parecem ser angiofibromas, tendo como diagnóstico diferencial cistos de inclusão epiteliais, verruga vulgar e fibromatose digital infantil (22). Eles são indicativos importantes de ET, e, em geral, surgem tardiamente entre os 15 e 60 anos de idade (9).

Placas de *Shagreen* são agrupamentos de hamartomas do tecido conjuntivo que ocorrem tipicamente no dorso, mais precisamente na região lombossacra, elevados e

circundados por halo eritematoso (9,22). Estes podem ser denominados também de *nevus* de tecido conectivo.

A ocorrência de neoplasias do sistema nervoso central é a principal causa de morbidade e mortalidade na ET (22). As lesões cerebrais de ET incluem nódulos subependimários, tubérculos corticais, astrocitomas subependimários de células gigantes e linhas de migração radial de substância branca, podendo estas ser distintas através de exames de neuroimagem. O cerebelo encontra-se envolvido em apenas 15% dos pacientes investigados, sendo raro o envolvimento da medula espinhal (21,22,26).

Nódulos subependimários gliais ocorrem em 90% dos indivíduos acometidos por ET e tubérculos corticais ou subcorticais em 70% (22). Os nódulos subependimários, geralmente localizadas no terceiro ventrículo, são compostos por células grandes e irregulares, densamente agregadas. Quando esses nódulos crescem e atingem mais de 3 cm de diâmetro, são denominados astrocitomas subependimários de células gigantes (52).

Os tubérculos corticais são lesões focais que predominam na estrutura cinzenta e são caracteristicamente pálidos e de consistência mais firme que a do cérebro. Microscopicamente, apresentam perda da citoarquitetura cortical normal, com a presença de células gliais gigantes e neurônios com morfologia anormal (53). Goodman et al. (51) sugeriram que a contagem de tubérculos corticais detectada em exames de ressonância nuclear magnética pode ser um marcador para prever a gravidade de disfunções neurológicas. Estes autores (51) encontraram em indivíduos pelo menos moderadamente afetados, chances cinco vezes maiores de se ter mais de sete tubérculos corticais detectados, do que em indivíduos portadores da síndrome com alterações neurológicas mais brandas.

Astrocitomas subependimários de células gigantes ocorrem em 6 a 14% de todos os indivíduos com ET. Tais lesões podem aumentar quanto ao tamanho, causando obstrução e hipertensão intracraniana resultando em significativa morbidade e mortalidade (22,52). Estes tumores em pacientes com ET, ocorrem mais comumente nos ventrículos laterais próximos ao forame de Monro (52,54). Apesar da forte correlação desse tumor com a ET há relatos de pacientes com a presença do mesmo, que não apresentavam nenhum estigma de ET (54). Essas neoplasias apresentam crescimento lento, podendo causar hidrocefalia obstrutiva grave e sinais neurológicos focais (52,54). À ressonância nuclear magnética, em geral são observadas lesões heterogêneas próximas ao forame de Monro com baixo sinal em T1, alto sinal nas imagens pesadas em T2 e realce heterogêneo pelo gadolínio (55,56).

Mais de 80% dos indivíduos com ET apresentam, em alguma fase da vida episódios convulsivos. Contudo, pela elevada prevalência, tal achado pode induzir a erro no diagnóstico

e na estimativa de gravidade da doença (22). A presença da ET é uma causa conhecida de espasmo infantil e hipsarritmia. Pelo menos 50% dos indivíduos têm atraso no desenvolvimento ou retardo mental (57). Um quadro que comumente é causa de morte prematura (32,5%) entre os indivíduos afetados é uma combinação de retardo mental grave, epilepsia e broncopneumonia (58).

Indivíduos portadores têm um grande risco de comprometimento do desenvolvimento neurológico e comportamental. Entre os distúrbios comportamentais e psiquiátricos comuns em ET pode-se destacar o transtorno global do desenvolvimento e o autismo (22). Duas revisões de literatura (59,60) sugerem que cerca de 25% dos indivíduos com ET têm autismo e 40%-50% preenchem critérios diagnósticos de transtornos do espectro autista, dependendo das ferramentas de diagnóstico utilizadas. Hiperatividade ou transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH), além de insociabilidade também são comumente observados em ET (59,60,61,62). Prather e de Vries observaram que os sistemas frontais do cérebro são os mais constantemente interrompidos por processos neuropatológicos relacionados à ET, resultando em anormalidades de regulação e alterações comportamentais direcionadas ao cumprimento de objetivos (63). Zaroff et al (64) ressaltaram que afecções neurológicas de início prematuro e o aumento do número de tubérculos corticais são fatores de risco para disfunções cognitivo-comportamentais. A avaliação e aplicação de intervenções terapêuticas precoces, incluindo controle de crises podem promover melhores resultados de tratamento (64). Um estudo em pacientes de ET com carga maior de lesões cerebrais no lobo temporal esquerdo demonstrou correlação positiva entre esses achados e escores neurológicos de maior gravidade (65).

Quaisquer formas de epilepsia que ocorrem na síndrome podem ser breves e passíveis de controle através de terapêutica anticonvulsivante convencional, exceto a síndrome de West. Movimentos coreoatéticos, síndrome piramidal, sinais cerebelares e hidrocefalia são raros (66).

Dentre as alterações pulmonares associadas destaca-se a linfangiomatose pulmonar, de prevalência estimada entre 1 a 6% dos indivíduos com ET e que atinge principalmente as mulheres entre as idades de 20 e 40 anos. Os indivíduos acometidos podem apresentar falta de ar ou hemoptise, além de pneumotórax e quilotórax. Radiografias de tórax revelam um padrão reticular difuso e exames de tomografia computadorizada mostram alterações intersticiais difusas, com infiltrados e alterações císticas. Alguns indivíduos podem evoluir para situações mais graves como quadros de insuficiência respiratória que podem culminar até em óbito (22). Hiperplasia micronodular multifocal pneumocística tem sido relatada em alguns indivíduos com ET (67).

As lesões de retina da ET são comumente hamartomas e manchas acrômicas (semelhante às lesões cutâneas hipocrômicas). Uma ou mais dessas lesões podem estar presentes em até 75% dos indivíduos portadores da doença e são geralmente assintomáticas (22). Todavia, Shields et al relataram o curso clínico e achados histopatológicos de quatro pacientes com ET que desenvolveram crescimento progressivo de hamartomas justapapilares astrocíticos, provocando posterior descolamento de retina secundário e glaucoma neovascular com necessidade de enucleação do olho afetado (68).

Afecções renais constituem a segunda principal causa de morte precoce (27,5%) em indivíduos com ET (58). Cerca de 80% das crianças com a doença apresentam alguma lesão renal identificável por volta de 10 anos (69). Cinco diferentes lesões renais ocorrem em ET: angiomiolipomas benignos (70%), cistos epiteliais (20-30%) (37), oncocitomas (hamartoma benigno adenomatoso) (<1%), angiomiolipomas malignos (<1%) e carcinoma de células renais (<3%) (70,71).

Angiomiolipomas benignos compreendem vasos sangüíneos anormais, camadas de músculo liso e tecido adiposo maduro. Em crianças, angiomiolipomas tendem a aumentar em tamanho ou número ao longo do tempo podendo causar hemorragias e substituição do parênquima renal funcional (22).

Cook et al (70) revisaram 139 pacientes com ET que apresentaram ausência de sintomas renais, mas tinham sido investigados por ultrassonografia. Lesões renais foram encontrados em 85 pacientes (61%); 40 tiveram angiomiolipomas, 17 tiveram apenas cistos e 28 apresentaram ambos. Os angiomiolipomas eram múltiplos em 91% dos casos e bilaterais em 84% dos pacientes. A prevalência de angiomiolipomas aumentou com a idade, porém a prevalência de cistos renais não pareceu estar relacionada com a idade nesse estudo. Em crianças menores de cinco anos, os cistos foram considerados as lesões mais comuns.

Embora raros, angiomiolipomas extra-renais foram relatados. Em um estudo retrospectivo de imagens de ultrassonografia e tomografia computadorizada, Fricke et al identificaram oito angiomiolipomas hepáticos em 62 indivíduos com ET (13%) (72).

Na literatura, há relatos de indivíduos que tem fenótipo combinado com características de TSC2 e doença autossômica dominante renal policística tipo 1 (PKD1) (73). Nestes indivíduos, o alargamento progressivo dos cistos pode comprimir o parênquima funcional e levar à insuficiência renal. Portadores da síndrome do gene contíguo TSC2/PKD1 também estão em risco de desenvolver complicações de PKD1, que incluem lesões císticas em outros órgãos (por exemplo, o fígado) e aneurismas de Berry (22).

Angiomiolipomas malignos e carcinomas de células renais podem resultar em óbito. Apesar de raros, esses dois tumores são muito mais comuns em ET do que na população geral. Cook et al relataram 3 casos de carcinoma de células renais em 139 indivíduos examinados (70). Patel et al identificaram apenas um carcinoma de células renais (0,5%) em 206 massas renais analisadas (71). Além dos processos neoplásicos já descritos (70,71), Grether et al descreveram um tumor de Wilms em uma criança de 20 meses de idade portador de ET (74).

Rabdomiomas cardíacos estão presentes em 47 a 67% dos indivíduos com ET (35,37,40,75). Diversos estudos afirmam que esses tumores tendem a regredir com o tempo e eventualmente desaparecem (24). A maior frequência desses tumores ocorre durante o período neonatal (22). Em uma metanálise da literatura, Verhaaren et al (76) concluíram que intervenções cirúrgicas logo após o nascimento só são necessárias quando ocorre obstrução do fluxo cardíaco, e que, se tal complicação não ocorre ao nascimento, provavelmente os sujeitos acometidos não virão a ter problemas de saúde correlacionados posteriormente. Freycon et al e Larbre et al relataram também casos de mortes devido à ruptura de aneurismas da aorta em crianças com ET (77,78).

Alterações ósseas também podem estar presentes incluindo lesões pseudocísticas de 1 a 3 mm, neoformação óssea periosteal e áreas de esclerose que acometem geralmente metacarpos, metatarsos ou resultam em áreas de hiperosteose. Fissuras palatinas e hiperosteoses alveolares também são achados descritos na literatura (16).

Em três crianças afetadas, duas das quais recém-nascidas, de Leon et al descreveram hamartomas olfativos. Eles sugeriram que hamartomas cardíacos e olfativos são particularmente característicos da ET em bebês e que o envolvimento olfativo não é surpreendente porque os hamartomas parecem surgir a partir da camada germinativa subependimária encefálica (79).

Fibromas gengivais e defeitos cavitados puntiformes no esmalte dentário constituem dois dos critérios menores para o diagnóstico de ET (13,14,21,22). Muitos estudos enfatizam a localização gengival dos fibromas, mas eles também podem ocorrer em outras localizações intraorais. Fibromas ou angiofibromas têm sido encontrados em dorso de língua, gengiva e palato. Em um estudo de série, com 58 pacientes, foi encontrada uma prevalência de 69% de fibromas gengivais em portadores da síndrome, sobretudo na região interdentária gengival, mucosas bucais e labiais. Além disso, 97% dos pacientes apresentaram múltiplas “lesões puntiformes” no esmalte dentário, que são encontrados em apenas 9% da população geral. Um crescimento gengival difuso também pode ser observado em pacientes com ET (80).

Termos utilizados no passado para descrever os achados da ET que agora estão desatualizados ou inadequados, mas ainda não foram eliminados da literatura incluem: adenoma sebáceo, que foi usado anteriormente para descrever as lesões faciais que são melhor caracterizados como angiofibromas faciais; miomas, substituído por termos mais precisos como rbdomiomas cardíacos e tubérculos corticais; e manchas foliares brancas, usado anteriormente para descrever as máculas hipomelanóticas visto que essas podem ser de qualquer formato ou tamanho. Máculas hipocrômicas de determinados tamanhos e formas não são atualmente, mais ou menos indicativas de uma associação com ET (22).

Por ser considerada uma facomatose ou síndrome neurocutânea (grupo que inclui neurofibromatose tipo 1 e 2, síndrome de von Hippel-Lindau, e doença de Sturge-Weber), devem-se observar características clínicas dessas síndromes (2,26,27).

### 1.5 Diagnóstico

O diagnóstico da ET é eminentemente clínico, embora existam atualmente até pesquisas de testagem genética e molecular. Alguns exames são úteis para complementar a pesquisa de lesões em órgãos ou sistemas, como radiografias de tórax e ossos, fundoscopia, ecocardiogramas, tomografia computadorizada, ressonância magnética de encéfalo, eletroencefalograma, ultrassonografia de abdômen, urografia excretora; além de exames de histopatologia e imunistoquímica em lesões cutâneas, orais, pulmonares, renais ou até mesmo do sistema nervoso central (13,14,22).

Atualmente, os critérios diagnósticos mais aceitos para a síndrome foram desenvolvidos na Conferência de Consenso sobre Esclerose Tuberosa, em julho de 1998 (13). Tais critérios são baseados na presença de achados clínicos e foram revisados recentemente (14). Critérios propostos para diagnóstico da síndrome incluem achados maiores e menores (13,14). Dois achados maiores ou um achado maior e dois menores definem a síndrome. Um achado maior e um menor constituem provável diagnóstico. Um achado maior ou dois menores demonstram possibilidade diagnóstica (22).

Os achados maiores incluem angiofibromas faciais, placas fibrosas na fronte, máculas hipomelanóticas (mais que três), placas de *Shagreen*, fibromas periungueais, múltiplos hamartomas de retina, tuberosidades corticais, nódulos subependimários, astrocitoma subependimário de células gigantes, rbdomiomas cardíacos, linfangiomiomatose pulmonar e angiomiolipomas renais (13,14,22). Dentre os achados menores pode-se destacar a presença de múltiplos defeitos no esmalte dentário, pólipos retais hamartomatosos, cistos ósseos, linhas de migração radial de substância branca cerebral, fibromas gengivais, hamartomas não renais,

placas acrômicas em retina, lesões tipo *confetti* e cistos renais múltiplos (13,14,22). Alguns achados necessitam de confirmação histológica e/ou imaginológica, o que requer uso de exames complementares diagnósticos (14).

A revisão dos critérios supracitados reconhece que os indivíduos com linfangiomatose isolada ou associada a angiomiolipomas renais somente, não têm diagnóstico de ET (14,22). Também (14) foram eliminados como características específicas da síndrome, achados inespecíficos tais como espasmos infantis mioclônicos, convulsões tônicas ou atônicas. Fibromas ungueais ou periungueais não traumáticos e a presença de três ou mais máculas hipomelanóticas têm sido confirmados como características mais específicas da síndrome (22). Displasias corticais cerebrais e linhas de migração radial de substância branca cerebral que ocorrerem em conjunto, devem ser contadas a partir de então (14), como um achado em vez de duas características da síndrome. Quando ambos linfangiomatose e angiomiolipomas renais estiverem presentes, outras características da ET devem estar presentes para o diagnóstico definitivo. Linhas de migração radial de substância branca e displasias corticais focais são notadas frequentemente em indivíduos com ET, porém são relativamente inespecíficas. A partir da revisão dos critérios diagnósticos tais lesões foram consideradas como achados menores. A confirmação histopatológica é sugerida para achados como pólipos retais hamartomatosos, múltiplos cistos renais e hamartomas não renais. A confirmação imaginológica é suficiente para cistos ósseos e linhas de migração radial de substância branca (14,22).

#### 1.6 Prognóstico e tratamento

O prognóstico da síndrome está diretamente relacionado com a ocorrência de tumores do sistema nervoso central, que é a principal causa de morbidade e mortalidade na ET e com a presença de afecções renais, segunda principal causa de morte precoce (22). O tratamento geralmente é multidisciplinar devido a expressividade fenotípica variada da doença e será específico para cada uma das diferentes manifestações clínicas que o paciente possui (9,14,22).

A avaliação sistemática para o diagnóstico inicial, no intuito de se estabelecer um prognóstico correto, é de fundamental importância (22). Dessa forma, recomenda-se (14) que os indivíduos suspeitos de ser acometidos por ET sejam submetidos a avaliação da história médica e familiar (com ênfase para achados da síndrome), exame físico com a utilização de uma lâmpada de Wood (luz ultravioleta) em uma sala escura dando atenção especial aos achados dermatológicos, realização de exames imaginológicos encefálicos como tomografia

computadorizada ou ressonância nuclear magnética, submissão à ultrassonografia abdominal ressaltando achados renais, execução de exames oftalmológicos, realização de eletrocardiograma e ecocardiograma (se os sintomas cardíacos indicam), eletroencefalografia (se as afecções neurológicas comportamentais estiverem presentes), avaliação psicológica e psiquiátrica, além de tomografia computadorizada de tórax para mulheres adultas (14).

O tratamento neurocirúrgico pode ser indicado para tumores cerebrais grandes, isolados, que estejam causando epilepsia, hipertensão intracraniana ou algum tipo de déficit motor (22). Nesse sentido, a identificação precoce de um astrocitoma de células gigantes permite a remoção do mesmo antes do aparecimento dos sintomas e antes que este se torne localmente invasivo (22). Weiner et al preconizam a realização de exames de imagem do encéfalo como rotina em crianças e adolescentes que apresentam nódulos subependiários documentados (81).

O tratamento médico terapêutico para crises epiléticas inclui diversas opções de medicamentos como ácido valpróico, ACTH, clonazepam, fenitoína, carbamazepina, fenobarbital, entre outros (9). No entanto, um avanço importante no tratamento da epilepsia em pacientes com ET foi a introdução da vigabatrina, um inibidor da enzima  $\gamma$ -aminobutírico-transaminase. Algumas pesquisas apontam que a vigabatrina parece ser eficaz no tratamento de espasmos infantis, apresentando menores efeitos colaterais (15,66). A eficácia de diferentes opções de tratamento de espasmos infantis varia entre os indivíduos. A epilepsia em ET pode ser resistente à terapia com múltiplas drogas anticonvulsivantes em alguns casos (22).

Uma série de pequenos estudos tem relatado excelentes resultados após procedimentos cirúrgicos para o tratamento de epilepsia (22,81,83). Jarrar et al constataram que apreensões cirúrgicas unifocais, em estágio inicial, não ocasionam distúrbios de desenvolvimento neurológico e têm prognóstico excelente (82). Romanelli et al descrevem o uso de técnicas para auxiliar o cirurgião nas ressecções de zonas epileptogênicas multifocais em indivíduos com ET como eletroencefalograma, técnicas de neuroimagem funcional e mapeamento cortical invasivo (83). Kagawa et al verificaram que o emprego de  $\alpha$ -metil-L-triptofano em varreduras identifica tubérculos epileptogênicos com 83% de precisão, aumentando assim a probabilidade de sucesso cirúrgico (84).

O autismo é frequentemente associado com a ET (15,85). Bolton et al relacionaram retardo mental e autismo ao número e distribuição de tuberosidades corticais em crianças com ET. Estes estudos apontam ainda que alterações no desenvolvimento do lobo temporal são um importante fator de risco no aparecimento dessa entidade patológica (86).

Alterações renais são freqüentes e constituem a segunda principal causa de morte precoce (27,5%) em indivíduos com ET (58). Angiomiolipomas e cistos renais estão presentes em aproximadamente 50% e 30% dos pacientes afetados, respectivamente. Vários investigadores determinaram que o tamanho de um angiomiolipoma é o melhor indicador de que esses tumores sejam susceptíveis a serem sintomáticos, isto é, possam causar dor e/ou hemorragia e, portanto, necessitem de intervenção. A dor geralmente resulta de hemorragia causada pelo tumor. Angiomiolipomas maiores que 3,5 a 4,0 cm de diâmetro apresentam maior risco de hemorragia. Recomenda-se nesses casos como possibilidade de intervenção, procedimentos de embolização arterial renal profilática, cirurgias renais de enucleação ou de nefrectomia parcial (87,88,89).

As manifestações cardíacas da ET estão entre os primeiros sinais da doença em pacientes diagnosticados e consistem na presença de tumores únicos ou múltiplos processos denominados rabiomios (15). A maior freqüência desses tumores ocorre durante o período neonatal (22), sendo que tais processos neoplásicos tendem a regredir com o tempo e eventualmente desaparecem (24). Taquicardia, arritmias paroxísticas, síndrome de Wolff-Parkinson-White, obstruções ou fenômenos de refluxo valvular são possíveis conseqüências de desenvolvimento de tumores intracardíacos (90,91,92).

Quanto às afecções pulmonares comuns na ET destaca-se a linfangiomatose (14,22,93). Em pacientes jovens do sexo feminino, a biópsia pulmonar torna-se quase indispensável para o diagnóstico correto (22,93). Os cuidados iniciais podem passar pelo manejo de complicações clínicas como pneumotórax, quilotórax e ascite quilosa. Além da drenagem torácica, as pacientes que apresentam pneumotórax de repetição podem ser submetidas à pleurodese (química ou cirúrgica). Contudo, considerando-se a necessidade futura de transplante pulmonar, a realização de pleurodese, sempre que possível deve ser evitada. A partir da constatação do acometimento quase exclusivo de mulheres em período reprodutivo (22), a tentativa de tratamentos anti-hormonais é realizada desde as descrições iniciais das doenças (93). Apesar do tratamento hormonal, a progressiva deterioração da função pulmonar ocorre na maioria das pacientes. Sendo assim, o transplante pulmonar acaba sendo uma alternativa terapêutica nos casos mais graves (93). As indicações de transplante na linfangiomatose são semelhantes às de outras doenças respiratórias terminais, porém no acompanhamento pós-operatório, além das complicações infecciosas decorrentes da imunossupressão e da possibilidade de rejeição, existem relatos de recidiva da doença no pulmão transplantado (93). A evolução para situações de maior gravidade incluindo quadros de insuficiência respiratória e de letalidade também foram relatados (22).

Em princípio, nenhuma das lesões da pele resulta em sérios problemas médicos (22). Contudo, os angiofibromas faciais podem necessitar de tratamento por poderem causar maior desfiguração estética. Vários tratamentos cosméticos têm sido descritos incluindo curetagem das lesões, excisão cirúrgica convencional, criocirurgia e eletrocirurgia. Dermoabrasão, laser pulsátil e laser de CO<sub>2</sub> também podem ser efetivos para tais lesões, todavia, as taxas de recorrência desses tratamentos ainda são altas (50).

Considerando-se os aspectos odontológicos em particular, para o adequado manejo clínico de pacientes acometidos por ET, devem-se considerar os aspectos genéticos da doença, bem como possíveis alterações do coração, rins, pele, olhos, face, ossos, pulmões, estômago e do sistema nervoso central (9,15). A possível presença de uma afecção sistêmica associada com a ET exige exaustiva avaliação médica dos pacientes, especialmente quando o tratamento odontológico deve ser realizado sob sedação e/ou anestesia geral. A ocorrência de fibromas em vários sítios, de defeitos puntiformes de esmalte dentário (9,13,14,15,22,80) e de uma higiene oral extremamente deficitária, principalmente em casos de pacientes com deficiência mental, são os achados mais freqüentes em indivíduos com ET (15). A instrumentação em odontologia deve ser utilizada com cautela, no intuito de se evitarem lesões devido a possíveis crises epiléticas (94). Próteses dentárias removíveis são contra-indicadas devido ao risco de fraturas e possíveis aspirações em caso de episódios convulsivos. Diques de borracha também podem ser contra-indicados dependendo de cada caso. Parece razoável supor que o processo de desenvolvimento da cárie ao longo dessas lesões de esmalte típicas da síndrome seja mais provável, apesar do acúmulo de placa ser pouco significativo principalmente em molares. Nesse sentido, procedimentos restauradores estéticos e próteses dentárias fixas estão mais indicados (15). Intervenções periódicas preventivas também são indicadas, juntamente com instruções sobre higiene oral adequadas, tratamento e reabilitação desses indivíduos. A presença de importantes distúrbios comportamentais torna o tratamento odontológico de determinados pacientes por vezes mais complexo, fazendo da sedação e anestesia geral, medidas às vezes necessárias (9,15).

O desenvolvimento de hamartomas de retina (22), nasoangiofibromas (79) e cistos ósseos faciais (9,15,16) podem desencadear processos periódicos de sinusite e obstrução do canal lacrimal. Esses achados patológicos juntamente com poliposes intestinais são complicações adicionais que podem estar associadas com ET (14,15).

O monitoramento periódico para indivíduos acometidos por ET inclui: ecografia renal para todos variando de um a três anos, exames de tomografia computadorizada renal ou ressonância nuclear magnética (se as lesões renais forem grandes ou múltiplas e detectadas

por ultrassonografia renal), ecografia renal semestral em angiomiolipomas de indivíduos menores que 3,5 a 4,0 cm, exames de tomografia computadorizada ou ressonância nuclear magnética de encéfalo no ínterim de um a três anos para crianças e adolescentes, eletroencefalografia para o manejo de crises epiléticas, avaliações cognitivo-comportamentais e de desenvolvimento neurológico, ecocardiografia (se existem sinais ou sintomas cardíacos) e tomografia computadorizada de tórax (se sinais e sintomas pulmonares indicarem). Como as lesões de retina da ET raramente desenvolvem perda visual progressiva, as avaliações oftalmológicas não necessitam de cuidados além daqueles para acompanhamento de rotina. Avaliações dermatológicas de rotina são desnecessárias para a maioria dos indivíduos (9,14,22).

O aconselhamento genético é necessário e trata-se do processo de prestação de informações aos indivíduos e famílias sobre a natureza, a herança e implicações das desordens genéticas no intuito de auxiliar os envolvidos a tomar decisões médicas e pessoais. Os indivíduos afetados pela ET devem ser orientados com relação à descendência e lenta progressão da doença (9,22). A ET é transmitida de forma autossômica dominante e cerca de dois terços dos indivíduos afetados têm ET como o resultado de uma mutação espontânea (1,13,14,21,22). No entanto, os descendentes de um indivíduo afetado têm um risco estimado em 50% de herdar alterações genéticas da síndrome. Exames pré-natais utilizando técnicas de genética molecular estão disponíveis se algum alelo causador da doença for identificado em um membro da família afetada para se estabelecer o prognóstico da síndrome (22).

Diante do exposto, verifica-se que a ET é uma condição genética rara, especialmente considerando-se casos familiares, de importante interface interdisciplinar resultante da alta variabilidade de expressão fenotípica, bem como pelas possíveis implicações de morbidade e mortalidade envolvidas. Embora existam alguns relatos enfatizando características genéticas e sistêmicas, há uma escassez de estudos avaliando a importância dos achados bucais em pacientes sindrômicos acometidos pelo padrão familiar (16,18,24,25,27). Dessa forma, torna-se de fundamental importância investigar a etiopatogenia do padrão familiar da síndrome a fim de conhecer melhor seu comportamento, visando o aperfeiçoamento de estratégias de manejo dos indivíduos acometidos e de suas famílias. Assim, esta pesquisa destinou-se a avaliação minuciosa das características da síndrome em quatro gerações de uma extensa família portadora de ET, diagnosticada inicialmente através de achados orais.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Analisar as características fenotípicas de uma extensa família acometida por Esclerose Tuberosa.

### 2.2 Objetivos específicos

- Descrever as características clínicas dos portadores de Esclerose Tuberosa em uma extensa família.
- Analisar o padrão de herança genética da família afetada.
- Descrever achados imagiológicos dos indivíduos acometidos na referida família.
- Realizar avaliação ultraestrutural descritiva de espécimes de pêlos, unhas e dentes dos sujeitos acometidos.
- Avaliar o padrão de marcação de MMP-1, MMP-10, TIMP-1,  $\alpha$ -SMA e TGF- $\beta$ 1 em amostras de angiofibromas bucais e cutâneos de indivíduos síndrômicos.

### 3. PRODUTOS

Como resultados da pesquisa foram elaborados dois artigos científicos que serão apresentados individualmente, a seguir, respeitando-se as normas exigidas pelos periódicos em que os mesmos foram submetidos para publicação.

#### 3.1 Artigo 1

##### **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**

##### **Oral and neurocutaneous phenotypes of familial tuberous sclerosis**

Leonardo de Jesus Araújo<sup>a</sup>, Leonardo Santos Lima<sup>b</sup>, Tassiana Mota Mourão Alvarenga<sup>c</sup>, Hercílio Martelli-Júnior<sup>d</sup>, Ricardo Della Coletta<sup>e</sup>, Sibeles Nascimento de Aquino<sup>f</sup>, Paulo Rogério Ferreti Bonan<sup>d</sup>

<sup>a</sup> DDS, MSc, Stomatology Clinic, Dental School, State University of Montes Claros, Montes Claros, MG, Brazil.

<sup>b</sup> MD, Faculty of Medicine, State University of Montes Claros, Montes Claros, MG, Brazil.

<sup>c</sup> MD, MSc, Faculty of Medicine, State University of Montes Claros, Montes Claros, MG, Brazil.

<sup>d</sup> DDS, PhD, Stomatology Clinic, Dental School, State University of Montes Claros, Montes Claros, MG, Brazil.

<sup>e</sup> DDS, PhD, Department of Oral Diagnosis, School of Dentistry, State University of Campinas, Piracicaba, SP, Brazil.

<sup>f</sup> DDS, Department of Oral Diagnosis, School of Dentistry, State University of Campinas, Piracicaba, SP, Brazil

**Keywords:** Genetics, Tuberous Sclerosis, Neurocutaneous Syndromes, Diagnosis, Dentistry

## **Abstract**

**Objective:** The objective of this study is to describe the pattern of inheritance and the clinical features in a large family with tuberous sclerosis (TS) focusing the general diagnosis afterwards the initial oral examination.

**Study design:** To characterize the pattern of inheritance and the clinical features, 61 familial members were systematically evaluated, including dermatologic, ophthalmologic and orofacial examination. Imaging exams such as abdomen ultrasonography, echocardiogram, fundoscopy, cranial cone beam computed tomography and brain magnetic resonance were performed. Hematoxylin and eosin stain and scanning electronic microscopy were performed to characterize TS-associated alterations in the teeth, nails and hairs.

**Results:** The pedigree of the family was constructed including the 4 last generations and revealed nonconsanguineous marriages and an autosomal dominant mode of TS transmission. We identified 13 family members affected by TS, with 6 of them completely fulfilling the diagnostic criteria of this disorder. Hypomelanotic macules in the skin, facial angiofibromas and dental enamel pits were the most common features of affected patients. Central nervous system alterations were identified in 5 family members, whereas cardiac and renal alterations were found in 1 member each.

**Conclusion:** We emphasized, in this study, the importance of oral findings such as dental enamel pits and gingival angiofibromas in the early diagnosis of familial TS which led to complete familial profile and pattern of inheritance establishment.

## Introduction

Tuberous sclerosis (TS) (MIM 191100) is a dominantly inherited disease, characterized by skin lesions, central and peripheral nervous system tumors, brain malformations, with mental and psychiatric symptoms.<sup>1</sup> Neurological manifestations range from slight or even inexistent to extremely severe symptoms. The most common neurological findings are seizures, however other manifestations such as mental retardation in different degrees, epilepsy, learning difficulties, behavioral problems, autism and obstructive hydrocephaly secondary are frequently seen.<sup>2</sup>

The other main TS clinical manifestations include possible alterations of the heart, kidneys, eyes, face, bones, lungs, stomach and dentition.<sup>1,3</sup> The reported incidence of tuberous sclerosis varies greatly, depending on the authors, ranging from 1 in 10,000 to 1 in 1,000,000. These differences may be explained in terms of diagnostic criteria and presentation of partial forms of the disease.<sup>4</sup> The phenotypic expression of TSC is highly variable and in some cases it can be difficult to establish a definitive clinical diagnosis. In this sense, the criteria proposed by Roach and collaborators,<sup>3,5</sup> which categorized the clinical TS-associated alterations in minor and major features, is useful in the establishment of appropriate diagnosis. Most studies suggest that the prevalence is 1 in 6,000-10,000 live births, with no ethnic clustering, and *de novo* mutations have been implicated in two-thirds of all cases.<sup>6,7</sup>

Familial cases were first reported in 1910, and an autosomal dominant pattern of inheritance was recognized in 1935.<sup>7</sup> Males and females are equally affected, and the chance to transmit it to the offspring is of 50%.<sup>1</sup> In some cases, intrafamilial phenotype variation may be explained by genetic mosaicism. It is thus important to consider the familial background of patients who have been diagnosed with TS.<sup>4</sup> Although many reports lead with diagnosis, genetic and systemic characteristics of TS, there are few studies evaluating the importance of oral features in the TS familial pattern. Given the above, the aim of this study is to describe

the pattern of inheritance and the clinical features of one large family affected by this disorder, spanning four generations, diagnosed initially from oral findings.

### **Patients and Methods**

The proband (family member IV-5), a 9 year-old boy, was identified during routine clinical examination at the Stomatology Clinic of the Dental School, State University of Montes Claros, Brazil. He complained of gingival enlargement and lobular growths in the vestibular face of anterior teeth. He presented facial, ungueal and gingival angiofibromas, enamel pits in deciduous teeth and hypomelanotic spots on back, leading to diagnosis of TS. During the initial examination, the familial trait of the disease was referred. To characterize the pattern of inheritance and the TS features, 61 members of his family were examined clinically, representing four generations. Only those patients screened who exhibited a pre-defined set of clinical TS conditions were submitted a full battery of tests posteriorly listed.

The evaluation and management used in this study, with few adaptations, was developed at the Tuberous Sclerosis Consensus Conference in July 1998<sup>3</sup> and revised.<sup>5</sup> Subjects were examined between December 2007 and July 2009. The affected patients were aged from 9 to 90 years (mean of 48.6 years). Initial protocol of evaluation included identification data and detailed medical history, which were collected at the time of the physical examination. Clinical assessment included dermatologic evaluation under Wood light, ophthalmologic and orofacial examination, and photographs. Imaging analysis, including abdomen ultrasonography, echocardiograms, fundoscopy, cranial cone beam computed tomography and brain magnetic resonance imaging (MRI) at a 1.5T scanner studies including T1, T2 and FLAIR, were performed. Oral biopsies were taken from supposed angiofibromas for histopathologic examination. We evaluated 7 lesions from 4 affected family members. Tissues were fixed in 10% formalin, embedded in paraffin, and sections were subjected to hematoxylin and eosin stain. Scanning electronic microscopy at 14 kV (in a

Jeol JSM 5600) was performed to characterize the ultrastructural alterations on teeth, nails and hairs of TS patients.

Ethical approval was obtained from the Ethic Committee of our University. Informed consent was obtained from all participants prior to inclusion in the study.

## Results

The physical analysis of the last 4 family generations (n=61) revealed clinical features of TS in 13 subjects. No patients had known consanguineous weddings. The family pedigree revealed an autosomal dominant pattern of transmission (Figure 1). The clinical and imaging features of the TS subjects are depicted on Table 1. Six members (2 males and 4 females) fulfilled the complete diagnostic criteria of TS (family members II-2, III-1, III-4, III-6, III-9 and IV-5), whereas 7 (2 males and 5 females) presented partial forms of TS (I-2, II-3, II-5, II-17, III-12, IV-8 and IV-9). To fulfill the complete diagnostic criteria of TS is necessary either 2 major features or 1 major feature with 2 minor features depicted on Table 1.<sup>3</sup>

The first generation presented 1 individual (member I-2) with dermatologic phenotypes of TS, who transmitted the trait to 4 family members (II-2, II-3, II-5 and II-17) out of 9 descendents. Member II-2 showed complete penetrance of the disease and multiple TS-associated lesions, including facial angiofibromas, ungual and periungual fibromas, hypomelanotic macules, shagreen patches, subependymal giant cell astrocytoma, renal angiomyolipoma and dental enamel pits. Other affected members of this generation demonstrated partial forms of TS. Member II-3 presented hypomelanotic macules, member II-5 showed several facial angiofibromas, whereas member II-17 was affected by facial angiofibromas and dental enamel pits. Member II-2 transmitted TS trait to 5 descendents (III-1, III-4, III-6, III-9 and III-12), with 4 of them showing features sufficient to fulfill the complete diagnostic criteria of TS. On the third generation, 2 affected members (III-4 and III-9) transmitted TS to their descendents, whereas the other 2 (III-1 and III-12) did not

transmitted. The fourth generation presented 1 member (IV-5) that fulfilled the complete diagnostic criteria and 2 members (IV-8 and IV-9) demonstrated features of TS.

Dermatological features identified in the affected members were hypomelanotic macules (n=10, 77%), facial angiofibromas (n=9, 69.2%), "confetti" skin lesions (n=6, 46.2%), nontraumatic unguual or periungual fibromas (n=5, 38.5%) and shagreen patches (n=2, 15.4%) (Figure 2 and Table 1). Neurological features detected by imaging analysis were suggestive of cerebral white matter radial migration lines (n=5, 38.5%), subependymal giant cell astrocytoma (n=3, 23.1%), cortical tuber (n=2, 15.4%) and subependymal nodule (n=1, 7.7%) (Figure 3 and Table 1). Cardiac and renal alterations were detected in 1 patient each (7.7%). Ophthalmologic examination revealed normality in all family members (Table 1).

Three family members reported mental or psychiatric symptoms. Three TS affected patients had a history of epileptic crises (II-2, III-1 and IV-5). Only 2 were receiving antiepileptic medication at the time of the study, and 1 patient had not had convulsions for the past 10 years. The 2 patients on antiepileptic medication (III-1 and IV-5) received carbamazepine and phenobarbital, respectively. Actually, the family member III-1 also presents a slight cognitive deficit.

Cone beam computed tomography revealed normality of orofacial structures in all affected individuals. The main oral features were enamel pits (n=7, 53.8%, family members II-2, III-1, III-4, III-6, III-9, IV-5,) and gingival angiofibroma (n=4, 30.8%), which were confirmed by histopathological examination. Lingual (III-2), buccal (III-1) and lip fibroma/angiofibroma (II-2) were also observed. The histopathologic features of the angiofibromas were very similar among affected family members. Lesions were composed by a fibrous connective tissue containing numerous dilated capillaries surrounded by a fibroblastic proliferation and scattered large, pleomorphic and stellate-shaped cells (Figure 4). Ultrastructural examination revealed cuticular dysmorphology of the hairs, nail dysplasia with

irregular keratin plaques disposition, and irregular deep dental enamel pits (Figure 5). Actually, the family is under dental treatment and oral lesions were removed. Multiprofessional approach was requested due to neurological, dermatological and renal lesions (actually under consultation and follow up).

## **Discussion**

TS is one of a group of related disorders known as neurocutaneous syndromes.<sup>8</sup> Besides TS, the other major disorders of this group include types 1 and 2 neurofibromatosis, Sturge-Weber syndrome, ataxia-telangiectasia, and von Hippel-Lindau disease.<sup>9</sup> The term TS refers to multiple sclerotic masses scattered throughout the cerebrum.<sup>10</sup> TS was described first by Von Recklinghausen in 1862, and more recent reports by Bourneville, Pringle, and Vogt.<sup>9</sup>

Mutations in TSC1 (9q34) and TSC2 (16p13.3) genes, which encode the proteins hamartin and tuberin respectively, are associated with TS.<sup>7</sup> Both proteins have been reported to interact as a complex negatively regulating cell growth and proliferation.<sup>11-13</sup> The products of the TSC1 and TSC2 genes, hamartin and tuberin, form a dimer,<sup>12,13</sup> which mediates a key step in the phosphoinositide 3-kinase (PI3K) signalling pathway.<sup>14</sup> Binding of extracellular growth factors including insulin to their cell membrane receptors leads through a series of steps to phosphorylation of tuberin. This reduces the inhibitory action that the hamartin/tuberin complex exerts via the small GTPase Rheb (Ras homologue enriched in brain) on the mammalian target of rapamycin (mTOR). Activation of mTOR results in increased phosphorylation of two of its downstream targets, ribosomal S6 kinase (S6K) and eukaryotic initiation factor 4E binding protein 1 (4EBP1) both of which lead to increased protein translation. Other signaling pathways influence the activity of the hamartin/tuberin complex which appears to have a key role in integrating information on growth stimuli, cellular energy levels, nutrient availability and hypoxia, and through mTOR regulating protein synthesis and cell growth.<sup>15</sup> Functions for hamartin and tuberin independent of the complex

have been suggested by evidence of their binding to a variety of other proteins, but it is uncertain whether these interactions have any physiological significance. Mutations in TSC1 or TSC2 that impair the inhibitory function of the hamartin/tuberin complex lead to greatly increased activity of mTOR. As the name implies, mTOR is inhibited by the immunosuppressant drug rapamycin, which opens up exciting prospects for therapy. In TSC1 and TSC2 null cell lines, rapamycin restores phosphorylation downstream of mTOR to normal levels, and in rodent models of TS rapamycin and its analogues can inhibit the growth of hamartomas.<sup>16,17</sup>

The presence of 2 major features or 1 major and 2 minor features is necessary to fulfill the complete diagnostic criteria of TS.<sup>3</sup> There are cases that the patient does not fulfill completely the diagnostic criteria, and are considered to have the partial, incomplete form of the disease. The most common features of TS include facial angiofibromas, hypomelanotic cutaneous macule, shagreen patches in the lumbar area, cerebral cortical tubers, subependymal nodules, subependymal giant cell astrocytomas, cardiac rhabdomyomas and renal angiomyolipomas.<sup>3,18</sup> Minor features may include hamartomatous rectal polyps, non-renal hamartomas, and multiple renal and bone cysts.<sup>3,5,7,19,20,21</sup> Nevin et al, in a classical study with TS patients, described angiofibromas in the nasolabial folds and lumbar shagreen patches in 83% of patients. Areas of skin discoloration were found in 61% of the patients, whereas periungual and subungual fibromas were observed in few TS patients.<sup>18</sup> In agreement, this report found hypomelanotic spots, facial angiofibromas, periungual and subungual fibromas, and shagreen patches as the most prevalent dermatologic lesions.

Oral manifestations of TS are quite frequent and are characterized mainly by fibrous hyperplasia, angiofibroma and dental enamel pitting.<sup>22</sup> Fibrous hyperplasias and angiofibromas are frequently localized in the anterior portions of the gingiva, but they are not rare on the lips, tongue, and palate.<sup>23,24</sup> Those lesions may be normal-colored or red and

typically appear in late childhood.<sup>25</sup> Although a prevalence of 11% has been reported, the true frequency of those lesions may be significantly greater. Lygidakis and Lindenbaum found oral fibromas in 56% of the TS patients.<sup>26</sup> In this report, angiofibromas were observed in 5 patients and affected the anterior region of the gingiva, dorsal tongue, buccal mucosa and lip. Besides TS, other syndromes may have facial and oral papules/nodules in their clinical spectrum of alterations, including Cowden syndrome, Birt-Hogg-Dubé syndrome and multiple endocrine neoplasia type 1.<sup>27</sup> These disorders can be distinguished from TS by absence of dental enamel pits, dermatologic lesions other than fibroma/angiofibroma, and abdominal alterations, including those of the heart and kidneys. Oral manifestations of Cowden syndrome are typically more extensive than TS, but can be clinically and histologically similar.<sup>28</sup> Histopathology reveals a dome-shaped papule with elongated rete, fibrosis, prominent fibroblasts, increased vascularity and scattered large, pleomorphic and stellate-shaped cells underlying thickened epithelium. Usually, the lesions analyzed did not contain calcifications or areas of ulceration and presented significant collagenization.<sup>28</sup>

Dental enamel pitting is observed in up to 100% of patients with TS. Dental pits can also be observed in the general population, but at lower frequency and with fewer lesions than in TS.<sup>29</sup> Enamel pits are also observed in pitted hypoplastic amelogenesis imperfecta, vitamin D-dependent rickets, pseudo-hypoparathyroidism, and junctional epidermolysis bullosa.<sup>27</sup> The occurrence of pits in healthy individuals and other diseases translocates this sign to the minor feature level of the TS diagnosis.<sup>3,5,8,29</sup> All TS affected members of this study showed enamel pits. The presence of enamel pitting was detected by direct visualization after applying 1 or 2 drops of dental plaque-disclosing stain on the facial surfaces of the suspect teeth; this generates intense staining that allows us to identify even very small cavities. These findings were detected in the deciduous teeth of the proband (family member IV-5), a 9 year-old boy, and permanent dentition of five TS affected adults (II-2, III-1, III-4, III-6 and III-9).

Brain alterations in TS range from increased number of cortical tuberosities and formation of white matter radial migration lines to a more complex phenotype such as tumors. Furthermore, epilepsy which is accompanied by learning disorders or abnormal behavior is a common manifestation of TS.<sup>4</sup> Three TS affected patients had a history of epileptic crises. Only 2 were receiving antiepileptic medication at the time of the study, and 1 patient had not had convulsions for the past 10 years. In this context, the risk of an epileptic episode during dental treatment and the possible adverse effects of antiepileptic drugs must be taken into consideration in the management of dental patients with TS.<sup>4</sup> TS patients also demonstrate renal alterations, including angiomyolipomas or polycystic lesions. Approximately 30% of TS patients reveal cardiac rhabdomyomas that are associated with a high risk of death during the first year of life. Indeed, approximately 75% of the TS patients die before they reach the age of 25 years, usually as a result of cardiac insufficiency, secondary infections, or malignant disease.<sup>22</sup> In the reported family, imaging studies revealed white matter radial migration lines in 5 patients, subependymal giant cell astrocytoma in 3 patients, increased number of cortical tuber in 2 patients, and subependymal nodule in 1 patient. Interestingly, there is a lack of symptoms in all affected patients. However, patients are on regular medical follow up. Approximately 50% of TS patients exhibit retinal hamartomas,<sup>10</sup> but curiously not found in this report.

Scarce familial reports are mentioned in the literature such as the study with a nuclear family where 3 persons in 2 generations were diagnosed as having TS with multiple hypomelanotic dermal patches and epilepsy. Computerized tomography showed subependymal calcifications and ophthalmological investigations indicated phakomas as retinal involvement in all of them.<sup>30</sup> Khare *et al* reported a four-generation family with mild physical features of tuberous sclerosis, but in which there was significant clustering of neuropsychiatric disorders including mood disorder, anxiety disorder, and autism among

affected individuals. In the second family from the same geographic region also had mild physical features of tuberous sclerosis, but no neuropsychiatric assessment had been performed.<sup>31</sup> Ruggieri *et al* described a family in which all 4 sibs, born to consanguineous, healthy, asymptomatic parents, had a severe form of tuberous sclerosis.<sup>32</sup> Three of these infants had a course that was rapidly fatal in the neonatal period. In a study conducted by Sampson *et al* with TS familial emphasis, 35 patients were members of families with more than one affected subject. In one family four generations were affected, in four families three generations, and in seven families two generations.<sup>33</sup> In these families TS was inherited as an autosomal dominant trait and no skipped generations were seen. Great variation in expression was evident within as well as between families. Sub-grouping of clinical features among these families, which might suggest heterogeneity, was not noted. In our studied family, the wide phenotypical heterogeneity and a dominant trait were evident. Finally, we showed one large familial TS with neurocutaneous and oral phenotypes affecting 13 familial members with 6 diagnosed spanning in four generation.

### **Acknowledgments**

This work was supported by grants from The Minas Gerais State Research Foundation-FAPEMIG, Brazil (APQ-00898-08). H Martelli-Júnior and RD Coletta are supported by National Council for Scientific and Technological Development-CNPq, Brazil and PRF Bonan is supported by The Minas Gerais State Research Foundation-FAPEMIG, Brazil.

### **Conflict of interest**

There is no conflict of interest.

### **Author contributions**

LJ Araújo, TMM Alvarenga, SN Aquino and LS Lima were responsible for clinical analysis and interpretation of the data. LJ Araújo was responsible for the sample collection, manuscript

preparation and revisions. H Martelli-Junior, PRF Bonan, RD Coletta and were responsible for the research design, manuscript preparation and revisions.

## References

1. Napolioni V, Curatolo P. Genetics and molecular biology of tuberous sclerosis complex. *Curr Genomics* 2008;9:475-87.
2. Carvalho-Neto A, Bruck I, Antoniuk SA, Marchiori E, Gasparetto EL. Proton MR spectroscopy of the foramen of Monro region in patients with tuberous sclerosis complex. *Arq Neuropsiquiatr* 2008;66:303-7.
3. Roach ES, Gomez MR, Northrup H. Tuberous sclerosis complex consensus conference: revised clinical diagnostic criteria. *J Child Neurol* 1998;13:624-8.
4. Cutando A, Gil JA, López J. Oral health management implications in patients with tuberous sclerosis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2000;89:430-5.
5. Roach ES, Sparagana SP. Diagnosis of tuberous sclerosis complex. *J Child Neurol* 2004;19:643-9.
6. Halley DJ. Tuberous sclerosis: between genetic and physical analysis. *Acta Genet Med Gemellol (Rome)* 1996;45:63-75.
7. Narayanan V. Tuberous sclerosis complex: genetics to pathogenesis. *Pediatr Neurol* 2003;29:404-9.
8. Roach ES, Miller VS. *Neurocutaneous disorders*. Cambridge: Cambridge University Press: 2004; p. 36-41.
9. Korol UB, Schoor R, Nanda V, Almas K, Phelan JA. Gingival enlargement as a manifestation of tuberous sclerosis: case report and periodontal management. *J Periodontol* 2008;79:759-63.
10. Gorlin RJ, Cohen Jr MM, Hennekan RCM. *Syndromes of head and neck*. Oxford: Oxford University Press: 2001; p. 488-93.

11. Tee AR, Fingar DC, Manning BD, Kwiatkowski DJ, Cantley LC, Blenis J. Tuberous sclerosis complex-1 and -2 gene products function together to inhibit mammalian target of rapamycin (mTOR)-mediated downstream signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002 Oct 15;99:13571-6.
12. van Slegtenhorst M, Nellist M, Nagelkerken B, Cheadle J, Snell R, van den Ouweland A *et al.* Interaction between hamartin and tuberin, the TSC1 and TSC2 gene products. *Hum Mol Genet* 1998;7:1053-7.
13. Plank TL, Yeung RS, Henske EP. Hamartin, the product of the tuberous sclerosis 1 (TSC1) gene, interacts with tuberin and appears to be localized to cytoplasmic vesicles. *Cancer Res* 1998;58:4766-70.
14. Manning BD, Cantley LC. Rheb fills a GAP between TSC and TOR. *Trends Biochem Sci* 2003;28:573-6.
15. Kwiatkowski DJ, Manning BD: Tuberous sclerosis: a GAP at the crossroads of multiple signaling pathways. *Hum Mol Genet* 2005;14:251-8.
16. Kenerson H, Dundon TA, Yeung RS. Effects of rapamycin in the Eker rat model of tuberous sclerosis complex. *Pediatr Res* 2005;57:67-75.
17. Lee L, Sudentas P, Donohue B, Asrican K, Worku A, Walker V *et al.* Efficacy of a rapamycin analog (CCI-779) and IFN-gamma in tuberous sclerosis mouse models. *Genes Chromosomes Cancer* 2005;42:213-27.
18. Nevin NC, Pearce WG. Diagnostic and genetical aspects of tuberous sclerosis. *J Med Genet* 1968;5:273-80.
19. Butterworth T, Wilson MJ. Dermatologic aspects of tuberous sclerosis. *Arch Dermatol* 1941;43:1-41.
20. Smith DC, Porter SR, Scully C. Gingival and other oral manifestations in tuberous sclerosis: a case report. *Periodontal Clin Investig* 1993;15:13-6.

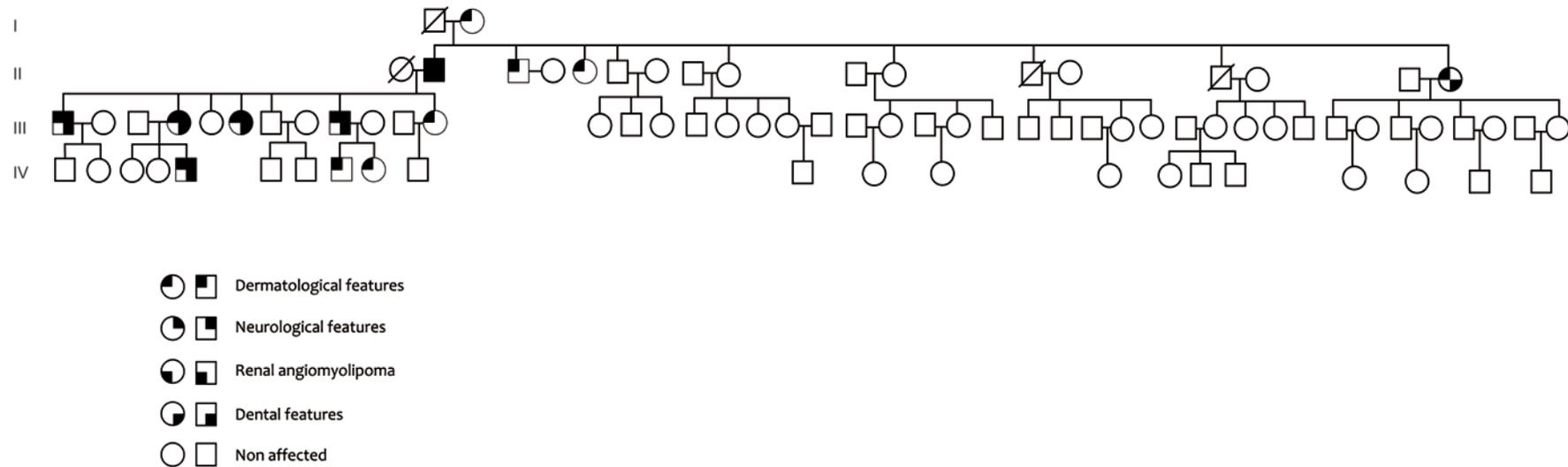
21. Weedon D, Strutton G, editors. Skin pathology. Edinburgh: Churchill Livingstone: 2002; p. 118-9.
22. Scully C. Orofacial manifestations in tuberous sclerosis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1977; 44:706-16.
23. López E, Escovich L, Vigna A. Tuberous sclerosis: presentation of a clinical case with oral manifestation. *Med Oral* 2003;8:122-8.
24. Webb DW, Clarke A, Fryer A, Osborne JP. The cutaneous features of tuberous sclerosis: a population study. *Br J Dermatol* 1996;135:1-5.
25. Damm DD, Tomich CE, White DK, Drummond JF. Intraosseous fibrous lesions of the jaws. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1999;87:334-40.
26. Lygidakis NA, Lindenbaum RH. Oral fibromatosis in tuberous sclerosis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1989;68:725-8.
27. Sparling MAJ, Hong CH, Brahim JS, Moss J, Darling TN. Oral findings in 58 adults with tuberous sclerosis complex. *J Am Acad Dermatol* 2007;56:786-90.
28. Salem OS, Steck WD. Cowden's disease (multiple hamartoma and neoplasia syndrome). A case report and review of the English literature. *J Am Acad Dermatol* 1983;8:686-96.
29. Flanagan N, O'Connor WJ, McCartan B, Miller S, McMenamin J, Watson R. Developmental enamel defects in tuberous sclerosis: a clinical genetic marker? *J Med Genet* 1997;34:637-9.
30. Elçioğlu N, Karatekin G, Elçioğlu M, Nuhoğlu M, Cenani A. Tuberous sclerosis: clinical evaluation in a family and implications for genetic counseling. *Genet Couns* 1998;9:131-8.
31. Khare L, Strizheva GD, Bailey JN, Au KS, Northrup H, Smith M *et al.* A novel missense mutation in the GTPase activating protein homology region of TSC2 in two large families with tuberous sclerosis complex. *J Med Genet* 2001;38:347-9.

32. Ruggieri M, Carbonara C, Magro G, Migone N, Grasso S, Tinè A *et al.* Tuberous sclerosis complex: neonatal deaths in three of four children of consanguineous, non-expressing parents. *J Med Genet* 1997;34:256-60.
33. Sampson JR, Scahill SJ, Stephenson JB, Mann L, Connor JM. Genetic aspects of tuberous sclerosis in the west of Scotland. *J Med Genet* 1989;26:28-31.

## Legends

**Table 1.** Clinical features of the Tuberous Sclerosis individuals of this study and revised diagnostic criteria for TS. To fulfill the diagnostic criteria is necessary either 2 major features or 1 major feature with 2 minor features.

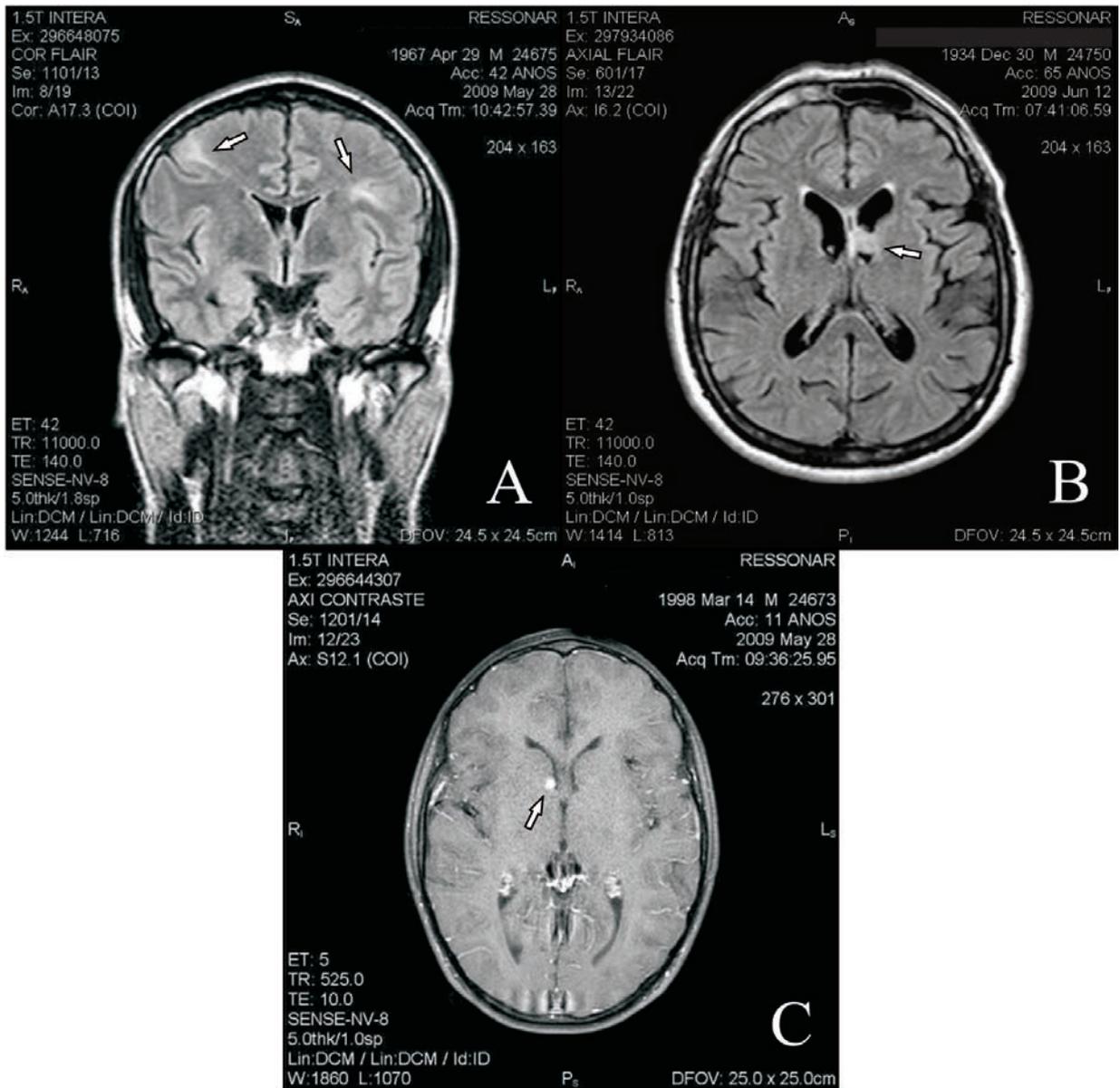
Clinical findings of Tuberous Sclerosis Complex	IV-5	III-1	III-4	III-6	III-9	II-2	IV-8	IV-9	III-12	II-3	II-5	II-17	I-2
<b>Major Features</b>													
Facial angiofibromas	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+
Nontraumatic unguial or periungual fibromas	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Hypomelanotic macules	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Shagreen patch	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Multiple retinal nodular hamartomas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cortical tubers	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Subependymal nodule	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Subependymal giant cell astrocytoma	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Cardiac rhabdomyoma, single or multiple	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lymphangiomyomatosis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Renal angiomyolipoma	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<b>Minor Features</b>													
Dental enamel pits	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-
Hamartomatous rectal polyps	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bone cysts	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cerebral white matter radial migration lines	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Gingival angiofibromas	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Nonrenal hamartoma	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Retinal achromic patch	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
"Confetti" skin lesions	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+
Multiple renal cysts	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Tuberous Sclerosis Complex</b>	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-



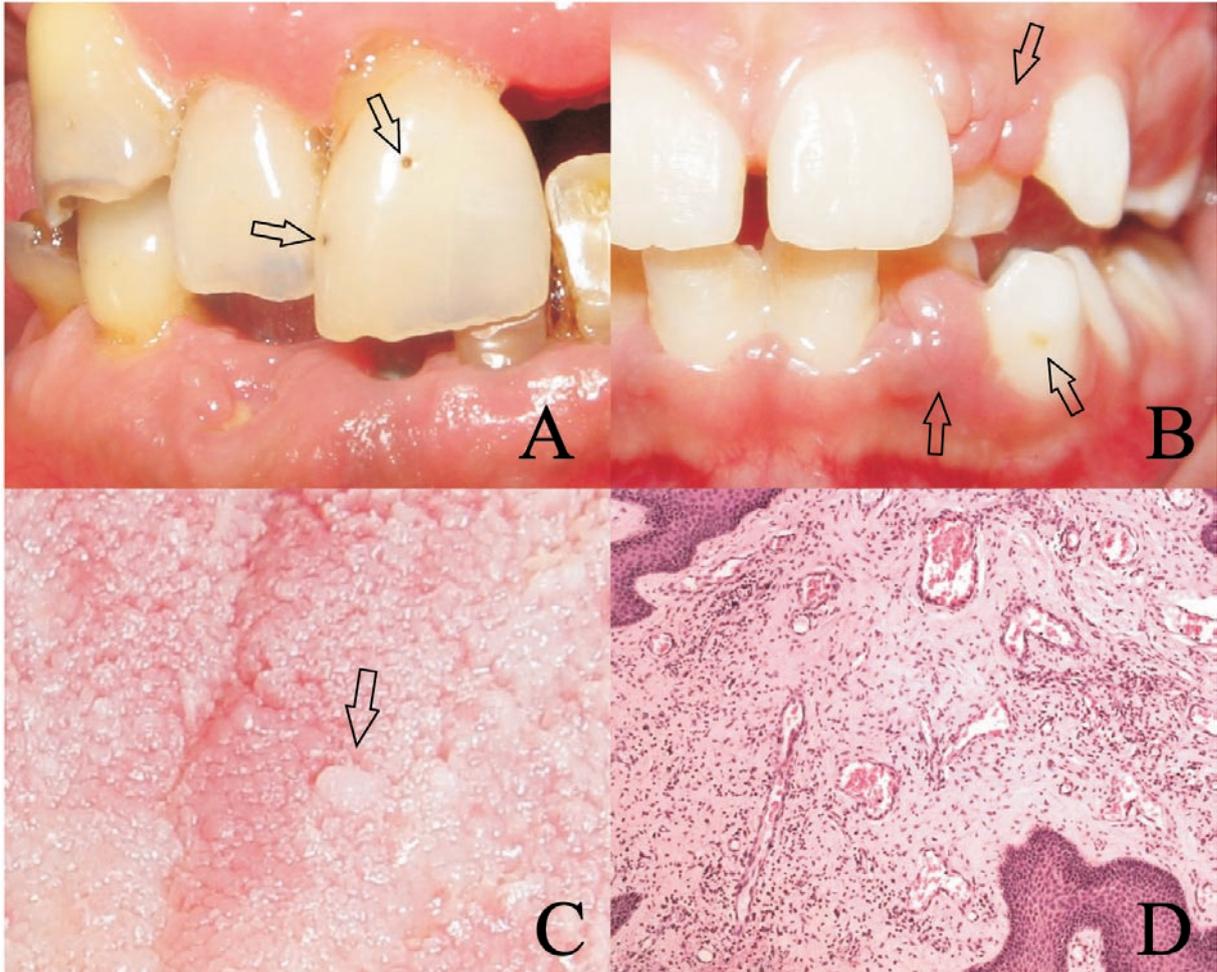
**Figure 1.** Familial pedigree revealed nonconsanguineous marriages and an autosomal dominant pattern of transmission affecting 6 individuals with TS (II-2, III-1, III-4, III-6, III-9 and IV-5), whereas 7 presented partial forms of disease (I-2, II-3, II-5, II-17, III-12, IV-8 and IV-9), emphasizing dermatological, neurological, renal and dental features. Circles and squares indicate females and males, respectively. A slash through a symbol denotes a deceased individual and clear symbols indicate no signs or symptoms of TS. No case was derived from spontaneous mutations in four generations of this family.



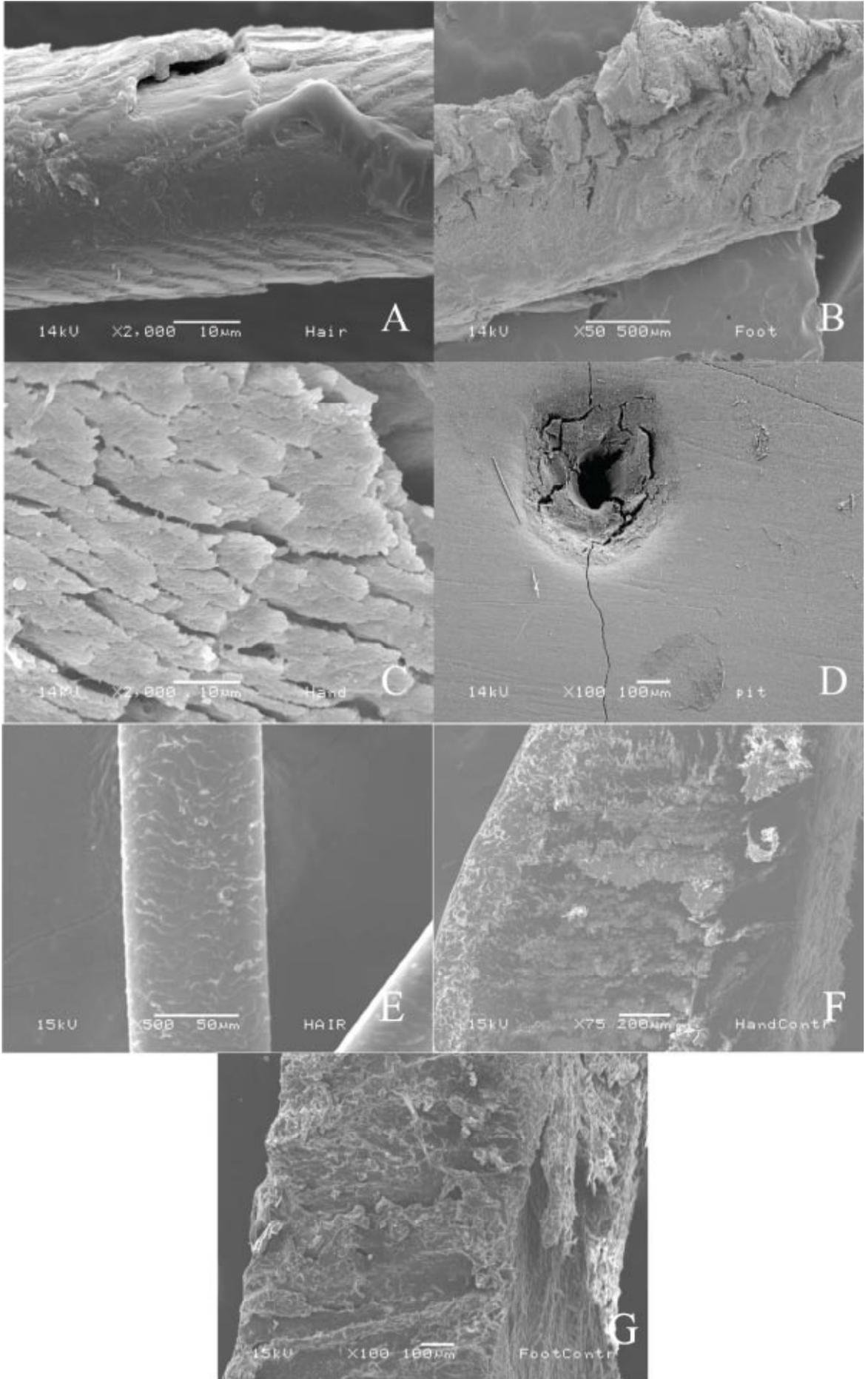
**Figure 2.** Dermatological features identified in the TS affected members. (A) Multiple facial papules affecting the entire forehead and the nose compatible with angiofibromas (III-4). Nontraumatic unguual or periungual fibromas on the hand (III-4) and foot (II-2), respectively (B and D). Presentation of a connective nevus tissue called Shagreen patch (II-2) (C).



**Figure 3.** Neurological TS features detected by magnetic resonance imaging (MRI) at a 1.5T scanner studies. Coronal FLAIR MRI (III-1) presenting lesions indicated by arrows were suggestive of cerebral white matter radial migration lines and cortical tubers (A). Axial FLAIR MRI (II-2) post-contrast with administration of gadolinium (GdDTPA) demonstrates strong enhancement of the Monro foramen nodule compatible with subependymal giant cell astrocytoma (B). Axial FLAIR image (IV-3) after GdDTPA show a hyperintense subependymal nodule (C).



**Figure 4.** The main TS oral features were enamel pits in the permanent tooth (II-2) (A), gingival angiofibromas and enamel pits in the deciduous tooth (IV-3) (B), and lingual fibromas (III-4) (C). (D) Histopathology reveals a dome-shaped gingival lesion (IV-3) was composed by a fibrous connective tissue containing numerous dilated capillaries surrounded by a fibroblastic proliferation and scattered large, pleomorphic and stellate-shaped cells underlying thickened epithelium. The lesion analyzed did not contain calcifications or areas of ulceration and presented significant collagenization (HE, X 100, low magnification).



**Figure 5.** Ultrastructural examination in a Jeol JSM 5600 scanning electronic microscopy at 14 kV revealed cuticular alterations of the hair (A), nail dystrophy with irregular keratin plaques disposition on foot and hand respectively (B,C), and irregular deep dental enamel pit with an increase in the striations around the cavity affect the labial surfaces of the central incisor (D). Ultrastructural images of comparative control of hair and nails from unaffected family individuals (E, F and G).

### 3.2 Artigo 2

#### **Anais Brasileiros de Dermatologia**

#### **Avaliação de MMP-1, MMP-10, TIMP-1, $\alpha$ -SMA e TGF- $\beta$ 1 em angiofibromas de Esclerose Tuberosa**

#### **Evaluation of MMP-1, MMP-10, TIMP-1, $\alpha$ -SMA e TGF- $\beta$ 1 in angiofibromas of Tuberous Sclerosis**

Leonardo de Jesus Araújo<sup>1</sup>, Luciana Yamamoto de Almeida<sup>2</sup>, Juliano Santos Lima<sup>3</sup>, Hercílio Martelli-Júnior<sup>4</sup>, Paulo Rogério Ferreti Bonan<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Cirurgião-dentista, mestrado em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Montes Claros, Montes Claros, Minas Gerais, Brasil

<sup>2</sup>Acadêmica do Curso de Odontologia, bolsista de iniciação científica - FAPEMIG, Universidade Estadual de Montes Claros, Montes Claros, Minas Gerais, Brasil

<sup>3</sup>Acadêmico da Faculdade de Medicina, bolsista de iniciação científica - FAPEMIG, Universidade Estadual de Montes Claros, Montes Claros, Minas Gerais, Brasil

<sup>4</sup>Professor doutor, Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Montes Claros, Minas Gerais, Brasil

Trabalho realizado no Hospital Universitário Clemente de Faria, Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Laboratório de Pesquisa em Saúde, Universidade Estadual de Montes Claros (Unimontes), Minas Gerais, Brasil. Nenhum conflito de interesse esteve presente nesse estudo. A presente pesquisa obteve fomento para sua execução através do Edital de Demanda Universal da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG (processo APQ-00898-08).

## RESUMO

### FUNDAMENTOS

A Esclerose Tuberosa é uma síndrome neurocutânea caracterizada pelo envolvimento de múltiplos órgãos tais como cérebro, rins, coração, olhos, pulmões e pele.

### OBJETIVO E MÉTODOS

Através de reações de imunistoquímica foram analisados angiofibromas orofaciais objetivando descrever o padrão de marcação de MMP-1, MMP-10, TIMP-1,  $\alpha$ -SMA e TGF- $\beta$ 1.

### RESULTADOS

Foi detectada positividade para MMP-1, MMP-10 e TGF- $\beta$ 1, além de negatividade para TIMP-1 e  $\alpha$ -SMA, excetuando marcação perivascular e epitelial para este. Quanto à intensidade, predominou uma marcação forte para MMP-1 na camada basal do epitélio, sendo discreta a positividade nas camadas suprabasais. Já a MMP-10 foi expressa discretamente em todas as camadas epiteliais. O tecido conjuntivo exibiu reatividade leve a moderada para MMP-1 e MMP-10. TIMP-1 demonstrou marcação de leve a moderada nas diversas camadas de uma única lesão e TGF- $\beta$ 1 demonstrou variada expressividade na intensidade de marcação tanto entre as lesões como entre as camadas teciduais.

### CONCLUSÃO

MMP-1, MMP-10 e TGF- $\beta$ 1 exibiram reatividade em angiofibromas orais e cutâneos com padrão de distribuição heterogêneo tanto entre os elementos teciduais analisados quanto na intensidade de marcação dos mesmos entre os espécimes. TIMP-1 exibiu reatividade predominantemente negativa nos espécimes analisados e  $\alpha$ -SMA apresentou marcação restrita a regiões perivasculares e epiteliais.

**PALAVRAS-CHAVES:** Esclerose Tuberosa, Síndromes Neurocutâneas, Marcadores Biológicos

## ABSTRACT

### FUNDAMENTS

Tuberous Sclerosis is a neurocutaneous syndrome characterized by affect multiple organs such as brain, kidneys, heart, eyes, lungs and skin.

### OBJECTIVE AND METHODS

Through immunohistochemistry reactions was analyzed the imunolocalization of MMP-1, MMP-10, TIMP-1,  $\alpha$ -SMA and TGF- $\beta$ 1 in orofacial angiofibromas.

### RESULTS

Reactivity was observed for MMP-1, MMP-10 and TGF- $\beta$ 1, in addition to negative for TIMP-1 and  $\alpha$ -SMA, except perivascular and epithelial staining for this. Concerning the intensity, predominated a strong marking for MMP-1 in the basal layer of the epithelium, and slight positivity in the suprabasal layers. MMP-10 was slightly expressed in all epithelial layers. The connective tissue showed slight to moderate reactivity for MMP-1 and MMP-10. TIMP-1 demonstrated of slight to moderate marking in the various layers of a single lesion and to TGF- $\beta$ 1 expression showed varied in intensity staining both between lesions and between tissue layers.

### CONCLUSION

MMP-1, MMP-10 and TGF- $\beta$ 1 exhibited reactivity in oral and cutaneous angiofibromas with heterogeneous distribution pattern among both tissue elements analyzed in the intensity of marking the same among the specimens. TIMP-1 showed reactivity predominantly negative in the specimens analyzed and  $\alpha$ -SMA presented restricted to epithelial and perivascular regions of these lesions.

**KEYWORDS:** Tuberous Sclerosis, Neurocutaneous Syndromes, Biological Markers

## INTRODUÇÃO

A Esclerose Tuberosa (ET) é uma síndrome neurocutânea (MIM 191100) de caráter autossômico dominante, com elevada prevalência de novas mutações e expressividade variada.<sup>1</sup> Dentre as alterações relatadas destacam-se lesões de pele e anexos, sistema nervoso central, coração, rins e outros órgãos.<sup>1,2</sup> A prevalência é estimada em 1:6.000 nativos<sup>3</sup> e cerca dois terços dos casos relatados não têm histórico familiar.<sup>2</sup> Também são frequentemente encontrados crescimentos hamartomatosos na face<sup>1,2</sup> e em cavidade bucal<sup>4</sup> denominados angiofibromas,.

Vários mediadores moleculares são responsáveis pelo controle do metabolismo celular. Metaloproteinases da matriz (MMPs), por exemplo, constituem um importante grupo de enzimas proteolíticas zinco-dependentes, responsáveis pela degradação de matriz extracelular e membranas basais.<sup>5</sup> As enzimas são secretadas em uma forma latente e se tornam ativadas no ambiente pericelular, sendo relacionadas a diversos processos fisiológicos e patológicos.<sup>5,6</sup> A atividade das MMPs é regulada por diversas vias; sendo um deles por controle através de mediadores conhecidos como inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs).<sup>5</sup> A alfa-actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA) é conhecida pela sua localização em células-tronco e células precursoras de vários tecidos.<sup>7</sup> Esta é expressa predominantemente por miofibroblastos, que são células caracterizadas pela presença de um aparato contrátil tipicamente encontrado em estruturas vasculares.<sup>8</sup> O marcador molecular fator de crescimento transformante-beta 1 (TGF- $\beta$ 1) parece mediar muitos eventos importantes no crescimento e desenvolvimento normais.<sup>9</sup> Além disso este tem um grande número de efeitos em diferentes sistemas, incluindo induções fibróticas.<sup>10</sup>

O objetivo desse estudo foi analisar a imunomarcação de MMP-1, MMP-10, TIMP-1,  $\alpha$ -SMA e TGF- $\beta$ 1 em angiofibromas faciais e bucais associados à ET.

## MATERIAL E MÉTODOS

Trata-se de um estudo descritivo envolvendo indivíduos que foram avaliados clinicamente por especialistas médicos e cirurgiões-dentistas, diagnosticados com ET considerando-se critérios propostos por Roach e colaboradores<sup>11</sup>. Foram obtidas seis amostras teciduais de lesões com diagnóstico provisório de angiofibromas, confirmadas microscopicamente através de procedimentos histopatológicos convencionais. Tais lesões foram provenientes da face ou da cavidade bucal desses indivíduos. Dessa forma, posteriormente foram realizados procedimentos de imunistoquímica conforme protocolo descrito a seguir, enfocando os marcadores MMP-1, MMP-10, TIMP-1,  $\alpha$ -SMA e TGF- $\beta$ 1.

Resumidamente, o material coletado recebeu fixação em formol a 10%, sendo embebido em parafina e cortado com micrótomo na espessura de 3 ou 5  $\mu$ m e estendidos em lâminas de vidro previamente tratadas com organosilato (Sigma<sup>®</sup>). Para o diagnóstico histopatológico das lesões, os cortes de 5  $\mu$ m foram corados com a técnica convencional de hematoxilina e eosina. As reações de imunistoquímica foram realizadas pelo método indireto com sistema de amplificação LSAB. Os cortes foram diafanizados em xilol por 30 minutos em estufa a 37°C, à temperatura ambiente por mais 30 minutos e hidratados em concentrações decrescentes de etanol. Os cortes em seguida foram lavados com água destilada e incubados em solução aquosa de peróxido de hidrogênio a 10%, com 5 trocas de 5 minutos para bloquear a possível ação de peroxidase endógena. Para recuperação antigênica, os cortes histológicos foram incubados com anticorpos primários sendo previamente submetidos a tratamento com 10 mM de ácido cítrico com pH de 6,0 e aquecimento no microondas em 2 ciclos de 12 minutos. Em seguida, os cortes foram incubados com anticorpos primários por 18 horas em solução de 1% de albumina sérica bovina em PBS. Após incubação com anticorpo primário, os cortes foram lavados com PBS e incubados com anticorpo secundário conjugado à biotina na diluição de 1:500 por 30 minutos a 37°C. Após nova lavagem em PBS, os cortes

foram incubados com complexo estreptavidina-biotina na diluição de 1:500 por 30 minutos a 37°C (Kit Duet–StrepABC Complex/HRP, Dako Corporation). A reação foi revelada com solução aquosa de 3,3 diaminobenzidina tetrahidroclorato (DAB, Sigma, St. Louis, MO, EUA) na concentração de 120 mg/ml acrescida de 0,01% de peróxido de hidrogênio e 0,01% dimetil sulfóxido. Após lavagem em água corrente, os cortes foram contra-corados com hematoxilina de Carazzi. Controles negativos foram realizados com a omissão do anticorpo primário.

As reações histopatológicas e imunoistoquímicas foram analisadas ao microscópio de luz e avaliadas por dois patologistas de forma independente e quando ocorriam discrepâncias, tais casos eram discutidos. As últimas reações foram classificadas quanto à presença de marcação e intensidade de reação aos anticorpos para determinação da característica predominante nos tecidos avaliados. A marcação imunoistoquímica foi avaliada usando cinco graus escalares semi-quantitativos expressos nos escores da Tabela 1. Para a comparação dos achados imunoistoquímicos foram realizadas as mesmas imunomarcações em placenta e hiperplasias fibrosas reativas que serviram de controle analítico externo.

TABELA 1 – Critério para avaliação da intensidade de imunomarcação utilizado nesse estudo

Imunomarcação		
Marcação negativa	Ausência de marcação	-
Marcação positiva	Intensidade fraca	+
Marcação positiva	Intensidade leve	++
Marcação positiva	Intensidade moderada	+++
Marcação positiva	Intensidade forte	++++

Este trabalho foi executado de acordo com os preceitos determinados pela resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Montes Claros (nº 1047/08). Todos os envolvidos participaram do estudo mediante termo de consentimento livre e esclarecido prévio.

## RESULTADOS

Seis espécimes ao todo foram obtidos em gengiva (n=2, 33.3%), pele (n=1, 16.6%), mucosa jugal (n=1, 16.6%) e lábio inferior (n=1, 16.6%) de cinco indivíduos afetados em uma família com ET. O espécime 4 foi obtido de um caso isolado de ET não familiar (n=1, 16.6%). Estes foram compostos por tecido conectivo fibroso contendo numerosos capilares dilatados amplamente dispersos rodeados por proliferações fibroblásticas, pleomórficas, além de células em forma estrelada. As características histopatológicas mostraram-se muito semelhantes entre as lesões analisadas incluindo quadro compatível com angiofibroma. A análise descritiva amostral do estudo está retratada na Tabela 2, ressaltando que os espécimes 2 e 6 foram obtidos do mesmo indivíduo.

TABELA 2 – Análise descritiva do perfil dos espécimes avaliados no presente estudo

Espécime	Idade do paciente	Gênero	Local
1	35	Feminino	Gengiva vestibular
2	65	Masculino	Pele da face
3	9	Masculino	Gengiva vestibular
4	18	Masculino	Pele da face
5	41	Masculino	Mucosa jugal
6	65	Masculino	Mucosa de lábio inferior

A imunoistoquímica mostrou de modo geral reatividade para os marcadores MMP-1 (100%, n=6), MMP-10 (83.3%, n=5) e TGF- $\beta$ 1 (50.0%, n=3); e baixa reatividade para TIMP-1 (16.6%, n=1), mas negatividade para  $\alpha$ -SMA no conjuntivo de todos os espécimes avaliados, excetuando-se regiões perivasculares e epiteliais dos mesmos.

Avaliando a intensidade, predominou uma marcação de moderada a forte para MMP-1 nas camadas basais e suprabasais do epitélio e de moderada a forte para fibroblastos e infiltrado celular. Já a MMP-10 foi expressa basicamente de forma discreta, ou seja, com escore variando entre ausência de marcação e intensidade leve em todas as camadas epiteliais e do conjuntivo, exceto para os espécimes 5 (epitélio basal e pericitos vasculares) e 6 (pericitos vasculares) que exibiram marcação moderada. TIMP-1 apresentou-se expresso

somente no espécime 2 (único espécime de pele analisado na família acometida), sendo tal reatividade predominantemente discreta tanto no epitélio quanto no conjuntivo. TGF- $\beta$ 1 nos espécimes imunorreativos apresentou marcação de intensidade leve a moderada no tecido epitelial com reatividade mais intensa nas camadas basais e discreta marcação no tecido conectivo. Os resultados da análise imunoistoquímica estão sumarizados na Tabela 3. O padrão de marcação está ilustrado na Figura 1, conforme o critério expresso na Tabela 1.

TABELA 3 – Análise imunoistoquímica dos marcadores biológicos MMP-1, MMP-10, TIMP-1,  $\alpha$ -SMA e TGF- $\beta$ 1 em angiofibromas orais e cutâneos

	Espécimes	MMP-1	MMP-10	TIMP-1	$\alpha$ -SMA	TGF- $\beta$ 1
<b>Tecido epitelial</b>						
Basal/parabasal	1	+	-	-	+	-
	2	+++	++	++	+++	+++
	3	++	+	-	++	+++
	4	++	++	-	++	-
	5	++++	+++	-	++++	-
	6	++++	+	-	++++	+++
Suprabasal	1	+++	-	-	+++	-
	2	++++	+	+++	++++	+
	3	+	-	-	+	++
	4	+++	+	-	+++	-
	5	+++	+	-	+++	-
	6	+	-	-	+	+
<b>Tecido conjuntivo</b>						
Fibroblastos	1	+++	-	-	-	-
	2	+++	+	++	-	-
	3	++++	++	-	-	-
	4	+	+	-	-	-
	5	+++	++	-	-	-
	6	++	++	-	-	-
Pericitos vasculares	1	+	-	-	++++	-
	2	++	+	+	+++	++
	3	+	+	-	++++	-
	4	+	-	-	+	-
	5	++	+++	-	++++	-
	6	++	+++	-	++++	++
Infiltrado celular Inflamatório	1	+	-	-	-	-
	2	++	+	++	-	+
	3	+++	+	-	-	-
	4	+++	+	-	-	-
	5	++++	++	-	-	-
	6	++++	+	-	-	++

## DISCUSSÃO

A ET é uma síndrome genética<sup>1,12</sup> que ocorre devido a disfunção dos genes TSC1 (9q34) e TSC2 (16p13.3), envolvidos no controle proliferativo celular.<sup>13,14,15</sup> O quadro cutâneo clássico inclui múltiplos angiofibromas na face, que são lesões hamartomatosas cujas localizações preferenciais são os sulcos nasogenianos, regiões malares (onde costumam apresentar-se simetricamente em forma de “asas de mariposa”), nariz e mento.<sup>16</sup> O diagnóstico diferencial dos angiofibromas faciais inclui acne vulgar e dermatose papulosa nigra.<sup>17,18</sup>

Webb et al estimaram, em pacientes ingleses acometidos por ET, que a prevalência dessas lesões pode variar entre 81 a 88% dos afetados, sendo freqüente em pacientes após a puberdade.<sup>19</sup> A idade dos pacientes portadores desse achado fenotípico na família, em nosso estudo, variou entre 9 e 65 anos. Exames histopatológicos de angiofibromas faciais revelam lesões em forma de cúpula, compostas por uma ampla proliferação de vasos sanguíneos, presença de infiltrado mono e multinuclear, além de um estroma rico em fibroblastos.<sup>18</sup> Tal padrão histopatológico é compatível com a apresentação dos espécimes desse estudo, que foram obtidos em região zigomática e sulco nasogeniano. Vários tratamentos cosméticos têm sido descritos incluindo curetagem das lesões, excisão cirúrgica, criocirurgia, eletrocirurgia, dermoabrasão, além da utilização de laser pulsátil e laser de CO<sub>2</sub>. Todavia, as taxas de recorrência desses tratamentos são consideradas altas.<sup>17,20</sup>

Angiofibromas orais são múltiplos em número e afetam mais frequentemente as regiões anteriores da gengiva, não sendo raros em lábios, língua e palato.<sup>16</sup> Eles podem ser de coloração semelhante à mucosa ou avermelhada e tipicamente ocorrem no final da infância.<sup>21,22</sup> Como diagnóstico diferencial clínico-patológico devem ser considerados fibromas, papilomas, hiperplasias fibrosas focais, hamartomas, cistos gengivais e exostoses.<sup>16</sup> No presente estudo, angiofibromas orais estiveram associados com tecidos hiperplásicos

afetando as regiões anteriores da gengiva, dorso de língua, mucosa jugal e lábios, com aparente ausência de fatores traumáticos. As características histopatológicas mostraram-se muito semelhantes entre as lesões analisadas, sendo os espécimes compostos por tecido conjuntivo fibroso contendo numerosos capilares dilatados amplamente dispersos circundados por proliferações fibroblásticas e pleomórficas.

Algumas doenças genéticas também podem apresentar múltiplas pápulas faciais e orais como a síndrome de Cowden, síndrome de Birt-Hogg-Dubé e neoplasia endócrina múltipla do tipo I. Tais condições podem ser distintas de Esclerose Tuberosa pela ausência de defeitos no esmalte dentário, pelas lesões de pele características e pelos achados internos associados. Manifestações orais da síndrome de Cowden, por exemplo, são tipicamente mais extensas que na ET, embora sejam clínica e histologicamente similares.<sup>4</sup>

As MMPs têm sido relacionadas a importantes doenças, como artrite reumatóide, osteoartrites, aneurisma aórtico abdominal, infarto agudo do miocárdio e câncer.<sup>5,6</sup> Esses marcadores também participam de processos de remodelação fisiológicos embrionários, na involução uterina pós-parto, na ovulação e reparo tecidual.<sup>5,6</sup> Em odontologia, as MMPs destacam-se por participarem ativamente na reabsorção óssea que ocorre na doença periodontal, em lesões periapicais crônicas e desordens temporomandibulares.<sup>5</sup> Estas estão envolvidas ainda na gênese inicial de tumores, no desenvolvimento dentário, na modulação da proliferação celular, em processos apoptóticos e na angiogênese.<sup>5</sup> A enzima MMP-1 denominada de collagenase têm como substrato específico a proMMP-9. MMP-10 é também chamada de estromelina-2 e atua no metabolismo da fibronectina, laminina, elastina, proteoglicanas e colágeno dos tipos IV, V, IX e X.<sup>5</sup> No presente estudo, o MMP-1 foi o marcador que apresentou maior intensidade de imunopositividade, considerando-se os marcadores biológicos avaliados, tanto nas diversas camadas epiteliais quanto no tecido conjuntivo sugerindo que este esteja envolvido de alguma forma na etiopatogênese dos

angiofibromas. MMP-10 teve marcação de forma mais discreta em todas as camadas epiteliais e do conjuntivo com escores variando entre ausência de marcação e intensidade leve (Tabela 3).

O equilíbrio entre a produção de MMPs e a de TIMPs representa um ponto principal para manter a homeostase da matriz extracelular.<sup>5,6</sup> É conhecido que um processo patológico da matriz extracelular pode se instalar quando houver excesso de atividade das MMPs nos tecidos.<sup>5</sup> Por essa razão, há um grande interesse em desenvolver inibidores sintéticos das MMPs que possam ser usados em terapias médicas e odontológicas.<sup>5</sup> Kenney et al detectaram que córneas com ceratocone apresentaram uma diminuição de 1,8 vezes em TIMP-1 e de 2,8 vezes em comparação com sua proporção fisiológica.<sup>23</sup> Matthews et al estudaram os efeitos de TIMP-1 sobre a viabilidade das células do estroma e concluíram que sua hiperprodução ou adição exógena impediu o supercrescimento dessas células, alterou sua morfologia e reduziu a extensão da apoptose.<sup>24</sup> Em nosso trabalho, a predominante ausência de marcação de TIMP-1 nos espécimes analisados sugere que este possa estar implicado no controle das MMPs avaliadas, em especial MMP-1, que nas diversas camadas teciduais de todos os espécimes teve marcação evidente (Tabela 3).

A superfamília TGF- $\beta$  é caracterizada por ser multifuncional visto que controla proliferação, diferenciação e outras funções em vários tipos de células. A desregulação da ativação e sinalização pode resultar em apoptose além de diversos processos patológicos.<sup>9</sup> Dickinson et al apontaram que altos níveis de TGF- $\beta$ 1 estão presentes no desenvolvimento de cartilagens, ossos e pele, sugerindo um papel no crescimento e diferenciação desses tecidos.<sup>25</sup> Bernasconi et al concluíram que a expressão de TGF- $\beta$ 1 nas fases iniciais das distrofias musculares de Duchenne e de Becker pode ser crítica para a iniciação dessas entidades.<sup>26</sup> Derynck et al ainda ressaltam o papel do TGF- $\beta$  na carcinogênese, com destaque para TGF- $\beta$ 1.<sup>27</sup> Métodos de bloqueio da síntese de TGF- $\beta$ 1 vem sendo testados como forma de

tratamento de doenças causadas por fibroses intersticiais.<sup>28</sup> Apesar de ser esperado aumento evidente do TGF- $\beta$ 1 devido ao caráter hamartomatoso dos angiofibromas, no presente estudo este fator esteve presente em concentração de intensidade fraca a moderada nos espécimes avaliados (Tabela 3).

O mediador  $\alpha$ -SMA é expresso predominantemente por miofibroblastos, que são células caracterizadas pela presença de um aparato contrátil tipicamente encontrado em estruturas vasculares e também associado a proteínas como miosina e fibras do estresse, localizadas em tecidos de granulação durante os processos de cicatrização além de numerosos processos patológicos, incluindo quelóides e fibromatoses.<sup>8</sup> Existem evidências de que a produção de colágeno por fibroblastos, estimulados por TGF- $\beta$ 1, seja consequência da diferenciação em miofibroblastos, que é a aquisição fenotípica necessária para o aumento da produção de colágeno.<sup>29</sup> Fan et al demonstraram que o tratamento com TGF- $\beta$ 1 é acompanhado pela expressão de  $\alpha$ -SMA.<sup>30</sup> No presente estudo, a marcação mais expressiva desse marcador se deu em estruturas vasculares e células epiteliais (controle interno positivo), sugerindo que tal marcador, em princípio, não parece ter papel marcante na dinâmica dessas lesões. Os nossos achados corroboram ainda com os autores supracitados visto que a ausência de expressão de  $\alpha$ -SMA no tecido conjuntivo esteve acompanhada pela de TGF- $\beta$ 1 nos espécimes avaliados (Tabela 3).

Sabe-se que os marcadores biológicos vêm sendo amplamente estudados, devido a sua intensa participação nos diversos processos fisiológicos e patológicos. O elucidar da ação desses mediadores nos angiofibromas orais e cutâneos requer a necessidade de pesquisas adicionais a fim de se estabelecer o possível envolvimento dessas citocinas além de outros marcadores na etiopatogenia dessas lesões. Deste modo, através de terapias em nível molecular, espera-se que será possível aperfeiçoar o manejo clínico dos pacientes afetados por ET, sobretudo em relação a tais lesões.

## CONCLUSÃO

A avaliação dos marcadores biológicos, nesse estudo, demonstrou a presença de MMP-1, MMP-10 e TGF- $\beta$ 1 em angiofibromas orais e cutâneos, com padrão de distribuição heterogêneo tanto entre os elementos teciduais analisados quanto na intensidade de marcação dos mesmos entre os espécimes. Observou-se também reatividade predominantemente negativa quanto ao marcador TIMP-1 e marcação restrita a regiões perivasculares e epiteliais para  $\alpha$ -SMA.

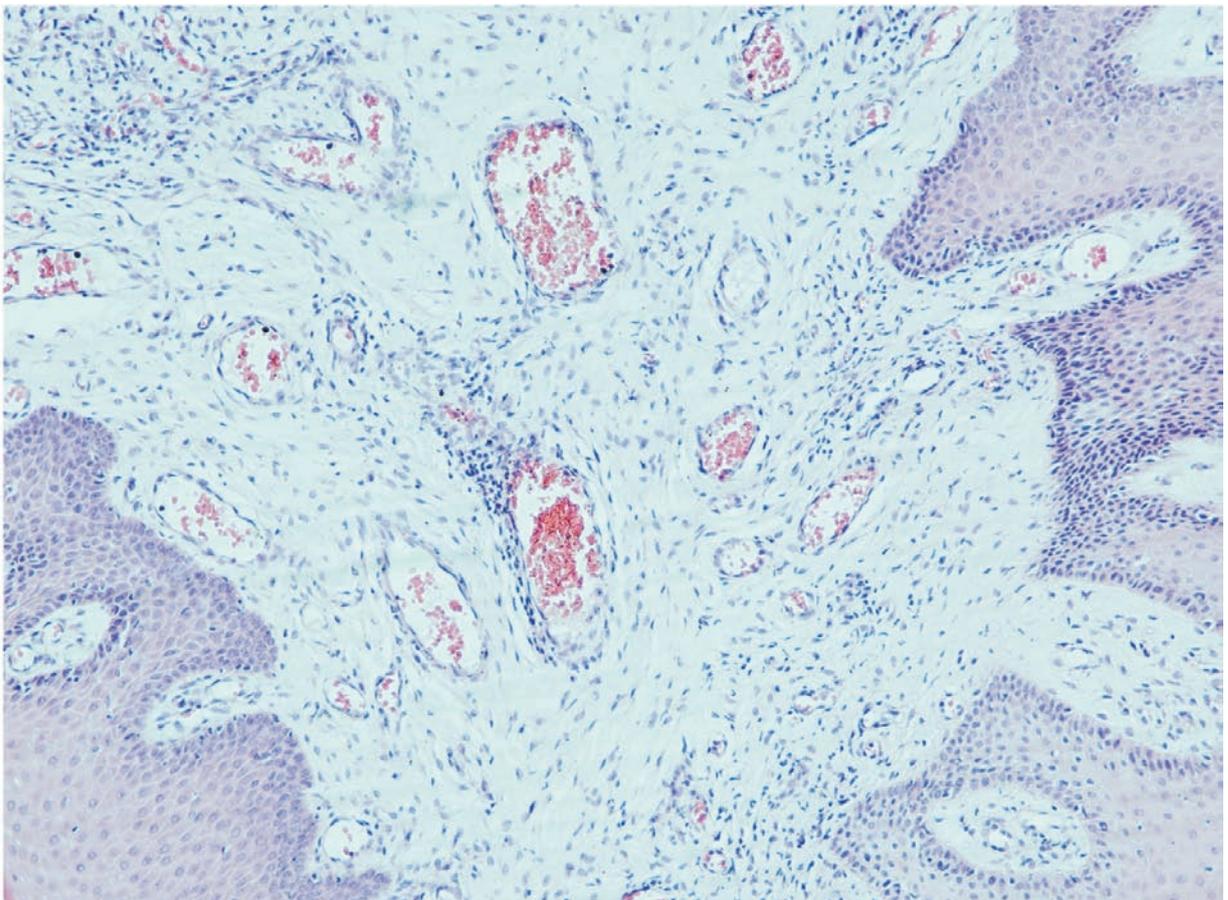


FIGURA 1 - Espécime de angiofibroma apresentando numerosos vasos congestos, fibroblastos e infiltrado inflamatório mononuclear. (HE, 100X)

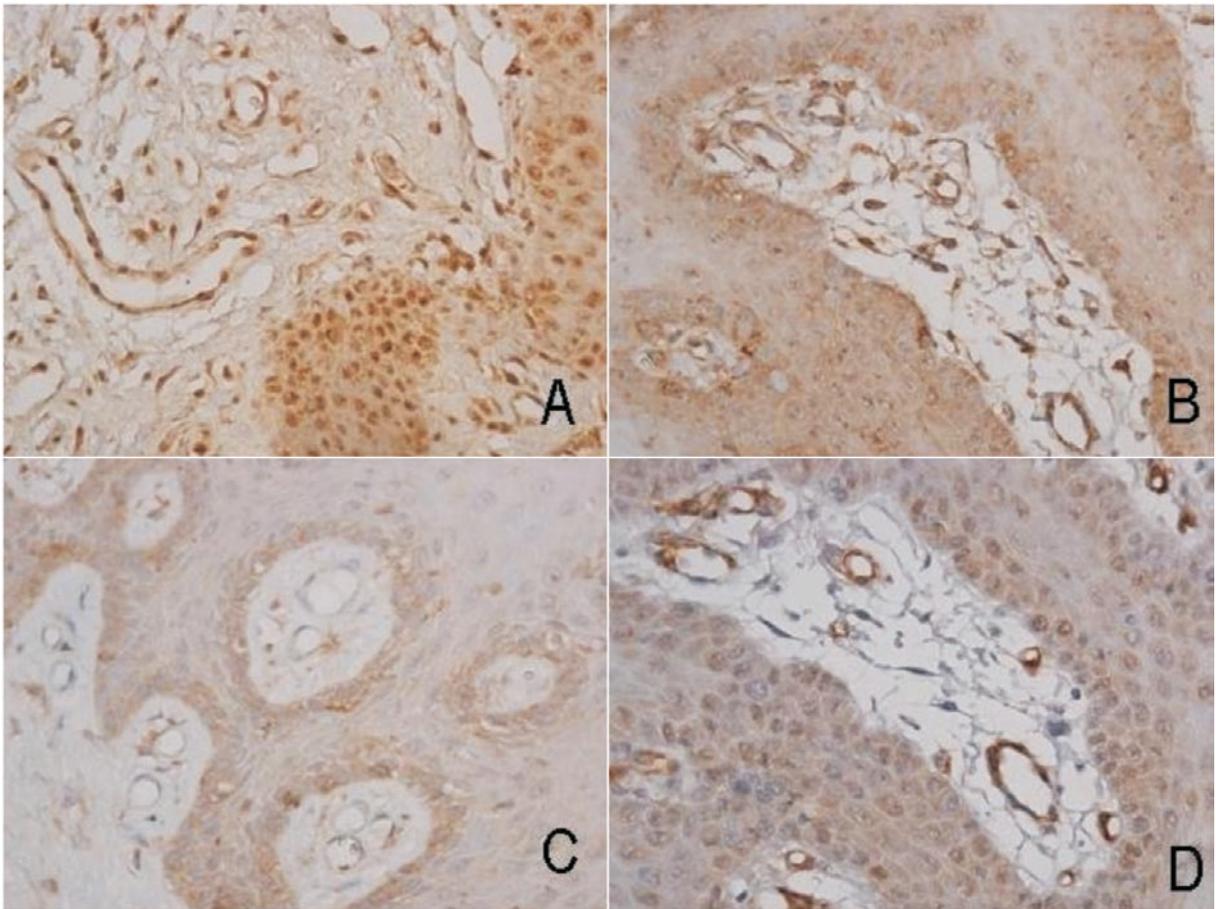


FIGURA 2 - Imunomarcção de intensidade forte em epitélio, região perivascular e fibroblastos para MMP-1 (A). Marcação leve observada em epitélio e moderada em estruturas vasculares e fibroblastos para MMP-10 (B). Reatividade geral menos evidente (marcação fraca) envolvendo o marcador TGF- $\beta$ 1 (C). Positividade epitelial moderada e perivascular forte (controle interno positivo) para  $\alpha$ -SMA (D). (Imunoperoxidase, 100X)

## REFERÊNCIAS

1. Roach ES, Miller VS. Neurocutaneous disorders. Cambridge, UK. University Press; 2004:36-41.
2. Narayanan V. Tuberous sclerosis complex: genetics to pathogenesis. *Pediatr Neurol* 2003 Nov;29(5):404-9.
3. Osborne JP, Fryer A, Webb D. Epidemiology of tuberous sclerosis. *Ann N Y Acad Sci* 1991;615:125-7.
4. Sparling MAJ, Hong CH, Brahim JS, Moss J, Darling TN. Oral findings in 58 adults with tuberous sclerosis complex. *J Am Acad Dermatol* 2007 May;56(5):786-90.
5. Navarro VP, Nelson-Filho P, Silva LAB, Freitas AC. A participação das metaloproteinases da matriz nos processos fisiopatológicos da cavidade bucal. *Rev Odontol UNESP* 2006;35(4):233-8.
6. Murphy G, Knauper V. Relating matrix metalloproteinase structure to function: Why the hemopexin domain? *Matrix Biol* 1997;15:511-8.
7. Hosoya A, Nakamura H, Ninomiya T, Yoshida K, Yoshida N, Nakaya H et al. Immunohistochemical localization of alpha-Smooth muscle actin during rat molar tooth development. *J Histochem Cytochem* 2006 Dec;54(12):1371-8. Epub 2006 Aug 21.
8. Desmouliere A, Chaponnier C, Gabbiani G. Tissue repair, contraction, and the myofibroblast. *Wound Repair Regen* 2005; 13:7-12.
9. Massague J. The transforming growth factor-beta family. *Annu Rev Cell Biol* 1990; 6: 597-641.
10. Sporn MB, Roberts AB. Transforming growth factor-beta: Recent progress and new challenges. *Cell Biol* 1992; 119: 1017-21.
11. Roach ES, Gomez MR, Northrup H. Tuberous sclerosis complex consensus conference: revised clinical diagnostic criteria. *J Child Neurol* 1998 Dec;13(12):624-8.

12. Korol UB, Schoor R, Nanda V, Almas K, Phelan JA. Gingival enlargement as a manifestation of tuberous sclerosis. Case report and periodontal management. *J Periodontol* 2008; 79:759-63.
13. Gorlin RJ, Cohen MM, Hennekan RC. *Syndromes of head and neck*. 4th ed. New York: Oxford University Press; 2001:488-93.
14. Barron RP, Kainulainen V CR, Krafchik B, Mock D, Sandor GK. Tuberous sclerosis: clinicopathological features and review of the literature. *J Craniomaxillofac Surg* 2002; 30:361-6.
15. Gomez MR. History of the tuberous sclerosis complex. *Brain Dev* 1995;17:55-7.
16. López-López J, Rodríguez de Rivera Campillo E, Marques-Soares MS, Finestres-Zubeldia F, Chimenos Küstner E, Roselló-Llabrés X. Esclerosis tuberosa y manifestaciones orales. Caso clínico. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2004;9:216-23.
17. Tuberous Sclerosis Association, UK [homepage on the Internet]. TS Scan Facts: The dermatological features of tuberous sclerosis and their treatment. [updated 2000; cited 2009 Jul 9] Available from: <http://www.tuberous-sclerosis.org>.
18. Wee SA, Fangman B. Tuberous sclerosis. *Dermatol Online J* 2007;13(1):22.
19. Webb DW, Clarke A, Fryer A, Osborne JP. The cutaneous features of tuberous sclerosis: a population study. *Br J Dermatol* 1996 Jul;135(1):1-5.
20. Scully C. Orofacial manifestations in tuberous sclerosis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1977; 44:706-16.
21. Lygidakis NA, Lindenbaum RH. Oral fibromatosis in tuberous sclerosis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1989; 68:725-8.
22. Bouquot JE, Gundlach KK. Oral exophytic lesions in 23,616 white Americans over 35 years of age. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1986; 62:284-91.

23. Kenney MC, Chwa M, Atilano SR, Tran A, Carballo M, Saghizadeh M, et al. Increased levels of catalase and cathepsin V/L2 but decreased TIMP-1 in keratoconus corneas: evidence that oxidative stress plays an role in this disorder. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46: 823-32.
24. Matthews FJ, Cook SD, Majid MA, Dick AD, Smith VA. Changes in the balance of the tissue inhibitor of matrix metalloproteinases (TIMPs)-1 and -3 may promote keratocyte apoptosis in keratoconus. *Exp Eye Dis* 2007;84:1125-34.
25. Dickinson ME, Kobrin MS, Silan CM, Kingsley DM, Justice MJ, Miller DA et al. Chromosomal localization of seven members of the murine TGF-beta superfamily suggests close linkage to several morphogenetic mutant loci. *Genomics* 1990;6:505-20.
26. Bernasconi P, Torchiana E, Confalonieri P, Brugnoli R, Barresi R, Mora M, et al. Expression of transforming growth factor-beta-1 in dystrophic patient muscles correlates with fibrosis: pathogenetic role of a fibrogenic cytokine. *J Clin Invest* 1995;96:1137-44.
27. Derynck R, Akhurst RJ, Balmain A. TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nature Genet* 2001;29:117-29.
28. Gressner AM, Weiskirchen R, Breitkopf K, Dooley S. Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. *Front Biosci* 2002;7:793-807.
29. Phan SH. Biology of fibroblasts and myofibroblasts. *Proc Am Thorac Soc* 2008;3:334-7.
30. Fan JM, Ng YY, Hill PA, Mu W, Atkins RC. Transforming growth factor beta regulates tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation in vitro. *Kidney Int* 1999;56:1455-67.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando-se os objetivos propostos no presente estudo, pode-se concluir que um amplo espectro fenotípico além de um traço autossômico dominante foram evidentes na família estudada. O padrão de herança demonstrou ainda ter alta penetrância, achados fenotípicos moderados e ausência de casamentos consanguíneos.

Verificou-se também a significativa importância dos achados clínicos bucais para o diagnóstico precoce da ocorrência familiar de ET, os quais podem contribuir de forma decisiva no estabelecimento do perfil completo familiar e estimativa do modelo de transmissão da doença.

A avaliação imunoistoquímica dos marcadores biológicos, nesse estudo, demonstrou a presença de MMP-1, MMP-10 e TGF- $\beta$ 1 em angiofibromas orais e cutâneos, com padrão de distribuição heterogêneo tanto entre os elementos teciduais analisados quanto ao que se refere à intensidade de marcação dos mesmos entre os espécimes. Observou-se também reatividade predominantemente negativa quanto ao marcador TIMP-1 e marcação restrita a regiões perivasculares e epiteliais para  $\alpha$ -SMA.

O número relativamente restrito de indivíduos acometidos com diagnóstico definitivo da afecção, talvez seja a principal limitação desse estudo, visto que tal síndrome é rara e que o padrão familiar somente está presente em cerca de um terço de todos os casos resultando em número estrito de lesões para realização de estudos moleculares. Outros estudos devem ser realizados no intuito de se elucidar melhor o papel de marcadores moleculares possivelmente implicados na etiopatogênese dos diversos achados fenotípicos da síndrome, enfatizando também a possível influência de fatores epigenéticos no padrão familiar, considerando que tais resultados poderiam possivelmente aperfeiçoar estratégias para o manejo adequado dos sujeitos acometidos.

Em suma, o diagnóstico de um paciente sindrômico deve levar à completa investigação dos seus familiares para uma possível detecção de outros sujeitos acometidos por ET, a exemplo de nosso estudo. Nesse sentido, os indivíduos afetados e seus familiares devem ser orientados com relação à herança genética, natureza, implicações, diagnóstico, prognóstico, monitoramento, tratamento e lenta progressão da doença.

## REFERÊNCIAS

1. Roach ES, Miller VS. Neurocutaneous disorders. Cambridge, UK. University Press; 2004:36-41.
2. Korol UB, Schoor R, Nanda V, Almas K, Phelan JA. Gingival enlargement as a manifestation of tuberous sclerosis. Case report and periodontal management. *J Periodontol* 2008; 79:759-63.
3. Gorlin RJ, Cohen MM, Hennekan RC. Syndromes of head and neck. 4th ed. New York: Oxford University Press; 2001:488-93.
4. Barron RP, Kainulainen V CR, Krafchik B, Mock D, Sandor GK. Tuberous sclerosis: clinicopathological features and review of the literature. *J Craniomaxillofac Surg* 2002; 30:361-6.
5. Jansen FE, van Nieuwenhuizen O, van Huffelen AC. Tuberous sclerosis complex and its founders. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2004 May;75(5):770.
6. Short MP, Adams RD. Neurocutaneous diseases. In: Fitzpatrick T, Eisen AZ, Wolff K, Freedberg IM, Austen KR, editors. *Dermatology in general medicine*. 4th ed. New York: McGraw-Hill;1993. p. 2249-90.
7. Józwiak S, Schwartz RA, Janniger CK, Michałowicz R, Chmielik J. Skin lesions in children with tuberous sclerosis complex: their prevalence, natural course, and diagnostic significance. *Int J Dermatol* 1998;37:911-7.
8. Scully C. Orofacial manifestations in tuberous sclerosis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1977; 44:706-16.
9. López-López J, Rodríguez-de-Rivera-Campillo E, Marques-Soares MS, Finestres-Zubeldia F, Chimenos-Küstner E, Roselló-Llabrés X. Esclerosis tuberosa y manifestaciones orales. Caso clínico. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2004;9:216-23.
10. Miyamoto Y, Satomura K, Rikimaru K, Hayashi Y. Desmoplastic fibroma of the mandible associated with tuberous sclerosis. *J Oral Pathol Med* 1995;24: 93-6.
11. Rubin MM, Delgado DB, Cozzi GM, Palladino VS. Tuberous sclerosis complex and a calcifying epithelial odontogenic tumor of the mandible. *Oral Sur Oral Med Oral Pathol* 1987;64:207-11.
12. Harrison MG, O'Neil ID, Chadwich BL. Adolescent with tuberous sclerosis. *J Oral Pathol Med* 1997; 26:339-41.
13. Roach ES, Gomez MR, Northrup H. Tuberous Sclerosis Complex consensus conference: revised clinical diagnostic criteria. *J Child Neurol* 1998;13:624-8.
14. Roach ES, Sparagana SP. Diagnosis of tuberous sclerosis complex. *J Child Neurol* 2004 Sep;19(9):643-9.

15. Cutando A, Gil JA, López J. Oral health management implications in patients with tuberous sclerosis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2000;89:430-5.
16. Louis DN, von Deimling A. Hereditary tumor syndromes of the nervous system: overview and rare syndromes. *Brain Pathol* 1995;5:145-51.
17. Lendvay TS, Marshall FF. The tuberous sclerosis complex and its highly variable manifestations. *J Urol* 2003;169:1635-42.
18. Short MP, Richardson EPJ, Haines JL, Kwiatkowski DJ. Clinical, neuropathological and genetic aspects of the tuberous sclerosis complex. *Brain Pathol* 1995;5:173-9.
19. Osborne JP, Fryer A, Webb D. Epidemiology of tuberous sclerosis. *Ann N Y Acad Sci* 1991;615:125-7.
20. Halley DJ. Tuberous sclerosis: between genetic and physical analysis. *Acta Gen Med Gemellol* 1996;45:63-75.
21. Narayanan V. Tuberous sclerosis complex: genetics to pathogenesis. *Pediatr Neurol* 2003 Nov;29(5):404-9.
22. Northrup H, Au KS. Tuberous Sclerosis Complex [homepage on the Internet] [updated 5 Dec 2005; cited 2009 Jul 9]. Available from: [www.genetests.org](http://www.genetests.org).
23. Sampson JR, Scahill SJ, Stephenson JB, Mann L, Connor JM. Genetic aspects of tuberous sclerosis in the west of Scotland. *J Med Genet* 1989;26:28-31.
24. Connor JM, Stephenson JB, Hadley MD. Non-penetrance in tuberous sclerosis. *Lancet* 1986;2:1275
25. Webb DW and Osborne JP. Non-penetrance in tuberous sclerosis. *J Med Genet* 1991;28:417-9.
26. Lin DD, Barker PB. Neuroimaging of phakomatoses. *Semin Pediatr Neurol* 2006 Mar;13(1):48-62.
27. Santos MLL, Dinato SLM, Moraes JM, Nakanishi CP, Dinato MM. Manifestação clínica familiar em pacientes com defeito neuromesoectodérmico. *Arq Neuro-Psiquiatr* 2006 Set;64(3b):798-801.
28. Wienecke R, König A, DeClue JE. Identification of tuberin, the tuberous sclerosis-2 product. Tuberin possesses specific Rap1GAP activity. *J Biol Chem* 1995;270:16409-14.
29. Xiao GH, Shoarinejad F, Jin F, Golemis EA, Yeung RS. The tuberous sclerosis 2 gene product, tuberin, functions as a Rab5 GTPase activating protein (GAP) in modulating endocytosis. *J Biol Chem* 1997;272:6097-100.
30. Inoki K, Li Y, Xu T, Guan KL. Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. *Genes Dev* 2003;17:1829-34.

31. Astrinidis A, Senapedis W, Coleman TR, Henske EP. Cell cycle-regulated phosphorylation of hamartin, the product of the tuberous sclerosis complex 1 gene, by cyclin-dependent kinase 1/cyclin B. *J Biol Chem* 2003;278:51372-9.
32. Kozma SC and Thomas G. Regulation of cell size in growth, development and human disease: PI3K, PKB and S6K. *Bioessays* 2002;24:65-71.
33. El-Hashemite N, Zhang H, Henske EP, Kwiatkowski DJ. Mutation in TSC2 and activation of mammalian target of rapamycin signalling pathway in renal angiomyolipoma. *Lancet* 2003;361:1348-9.
34. Au KS, Williams AT, Gambello MJ, Northrup H. Molecular genetic basis of tuberous sclerosis complex: from bench to bedside. *J Child Neurol* 2004;19:699-709.
35. Dabora SL, Jozwiak S, Franz DN, Roberts PS, Nieto A, Chung J, Choy YS, Reeve MP, Thiele E, Egelhoff JC, Kasprzyk-Obara J, Domanska-Pakiela D, Kwiatkowski DJ. Mutational analysis in a cohort of 224 tuberous sclerosis patients indicates increased severity of TSC2, compared with TSC1, disease in multiple organs. *Am J Hum Genet* 2001;68:64-80.
36. Lewis JC, Thomas HV, Murphy KC, Sampson JR. Genotype and psychological phenotype in tuberous sclerosis. *J Med Genet* 2004;41:203-7.
37. Sancak O, Nellist M, Goedbloed M, Elfferich P, Wouters C, Maat-Kievit A, Zonnenberg B, Verhoef S, Halley D, van den Ouweland A. Mutational analysis of the TSC1 and TSC2 genes in a diagnostic setting: genotype--phenotype correlations and comparison of diagnostic DNA techniques in Tuberous Sclerosis Complex. *Eur J Hum Genet* 2005;13:731-41.
38. Au, K. S.; Williams, A. T.; Roach, E. S.; Batchelor, L.; Sparagana, S. P.; Delgado, M. R.; Wheless, J. W.; Baumgartner, J. E.; Roa, B. B.; Wilson, C. M.; Smith-Knuppel, T. K.; Cheung, M.-Y. C.; Whittemore, V. H.; King, T. M.; Northrup, H. Genotype/phenotype correlation in 325 individuals referred for a diagnosis of tuberous sclerosis complex in the United States. *Genet Med* 2007;9:88-100.
39. Al-Saleem T, Wessner LL, Scheithauer BW, Patterson K, Roach ES, Dreyer SJ, Fujikawa K, Bjornsson J, Bernstein J, Henske EP. Malignant tumors of the kidney, brain, and soft tissues in children and young adults with the tuberous sclerosis complex. *Cancer* 1998;83:2208-16.
40. Jones AC, Daniells CE, Snell RG, Tachataki M, Idziaszczyk SA, Krawczak M, Sampson JR, Cheadle JP. Molecular genetic and phenotypic analysis reveals differences between TSC1 and TSC2 associated familial and sporadic tuberous sclerosis. *Hum Mol Genet* 1997;6:2155-61.
41. Jones AC, Shyamsundar MM, Thomas MW, Maynard J, Idziaszczyk S, Tomkins S, Sampson JR, Cheadle JP. Comprehensive mutation analysis of TSC1 and TSC2-and phenotypic correlations in 150 families with tuberous sclerosis. *Am J Hum Genet* 1999;64:1305-15.

42. Butterworth T, Wilson M. Dermatologic aspects of tuberous sclerosis. *Arch Dermatol Syph (Chic)* 1941;43:1-41.
43. Nickel WR, Reed WB. Tuberous sclerosis. Special reference to the microscopic alterations in the cutaneous hamartomas. *Arch Dermatol* 1962;85:209-26.
44. Lagos JC and Gomez MR. Tuberous sclerosis: reappraisal of a clinical entity. *Mayo Clin Proc* 1967;42:26-49.
45. Fitzpatrick TB. History and significance of white macules, earliest visible sign of tuberous sclerosis. *Ann N Y Acad Sci* 1991;615:26-35.
46. Nevin NC, Pearce WG. Diagnostic and genetical aspects of tuberous sclerosis. *J Med Genet* 1968;5:273-80.
47. Rogers III RS. Dermatologic manifestations. In: Gomez MR. *Tuberous Sclerosis*, 2 ed. Raven Press, New York, 1988;111-31.
48. Gomez MR. Phenotypes of the tuberous sclerosis complex with a revision of diagnostic criteria. *Ann N Y Acad Sci* 1991;615:1-7.
49. Haines JL, Short MP, Kwiatkowski DJ, Jewell A, Andermann E, Bejjani B, Yang CH, Gusella JF, Amos JA. Localization of one gene for tuberous sclerosis within 9q32-9q34, and further evidence for heterogeneity. *Am J Hum Genet* 1991;49:764-72.
50. Tuberous Sclerosis Association, UK [homepage on the Internet]. TS Scan Facts: The dermatological features of tuberous sclerosis and their treatment. [updated 2000; cited 2009 Jul 9] Available from: <http://www.tuberous-sclerosis.org>.
51. Goodman M, Lamm SH, Engel A, Shepherd CW, Houser OW, Gomez MR. Cortical tuber count: a biomarker indicating neurologic severity of tuberous sclerosis complex. *J Child Neurol* 1997;12:85-90.
52. Carvalho-Neto, Bruck I, Antoniuk SA, Marchiori E, Gasparetto EL. Proton MR spectroscopy of the foramen of Monro region in patients with tuberous sclerosis complex. *Arq Neuropsiquiatr* 2008;66(2b).
53. Reis-Filho JS, Montemor MR Netto, Loyola JG Netto, Araujo JC, Antoniuk S, Torres LF. Tuberous sclerosis: case report with histopathological and ultrastructural study. *Arq Neuropsiquiatr* 1998;56:671-6.
54. Carvalho-Neto A, Gasparetto EL, Bruck I. Subependymal giant cell astrocytoma with high choline/creatine ratio on proton MR spectroscopy. *Arq Neuropsiquiatr* 2006;64(3b):877-80.
55. Kauffmann E, Randrianaivo H, Boumahni B, Roman H, Laffitte A, Dumas H, Barau G, Fourmaintraux A. IRM cérébrale post mortem: une substitution à l'examen anatomo-pathologique dans la sclérose tubéreuse de Bourneville du fœtus ? *J Gynecol Obstet Biol Reprod* 2004;33:245-7.

56. Adamsbaum C, Merzoug V, Kalifa G. Imagerie cérébrale de la sclérose tubéreuse de Bourneville chez l'enfant. *J Neuroradiol* 2005;32:204-9.
57. Gomez MR. *Tuberous Sclerosis*, 2 ed. Raven Press, New York; 1988.
58. Shepherd CW, Gomez MR, Lie JT, Crowson CS. Causes of death in patients with tuberous sclerosis. *Mayo Clin Proc* 1991;66:792-6.
59. Curatolo P, Porfirio MC, Manzi B, Seri S (2004) Autism in tuberous sclerosis. *Eur J Paediatr Neurol* 2004;8:327-32.
60. Wiznitzer M. Autism and tuberous sclerosis. *J Child Neurol* 2004;19:675-9.
61. Baker P, Piven J, Sato Y. Autism and tuberous sclerosis complex: prevalence and clinical features. *J Autism Dev Disord* 1998;28:279-85.
62. Gutierrez GC, Smalley SL, Tanguay PE. Autism in tuberous sclerosis complex. *J Autism Dev Disord* 1998;28:97-103.
63. Prather P and de Vries PJ. Behavioral and cognitive aspects of tuberous sclerosis complex. *J Child Neurol* 2004;19:666-74.
64. Zaroff CM, Devinsky O, Miles D, Barr WB. Cognitive and behavioral correlates of tuberous sclerosis complex. *J Child Neurol* 2004;19:847-52.
65. Chou IJ, Lin KL, Wong AM, Wang HS, Chou ML, Hung PC, Hsieh MY, Chang MY. Neuroimaging correlation with neurological severity in tuberous sclerosis complex. *Eur J Paediatr Neurol* 2008 Mar;12(2):108-12.
66. Rotta NT, Silva AR, Ohlweiler L, Riesgo R. Vigabatrin in the treatment of epilepsy in patients with West syndrome and tuberous sclerosis. *Arq Neuropsiquiatr* 2003;61:988-90.
67. Kobayashi T, Satoh K, Ohkawa M (2005) Multifocal micronodular pneumocyte hyperplasia associated with tuberous sclerosis. *Acta Radiol* 2005;46:37-40.
68. Shields JA, Eagle RCJ, Shields CL, Marr BP. Aggressive retinal astrocytomas in 4 patients with tuberous sclerosis complex. *Arch Ophthalmol* 2005;123:856-63.
69. Ewalt DH, Sheffield E, Sparagana SP, Delgado MR, Roach ES (1998) Renal lesion growth in children with tuberous sclerosis complex. *J Urol* 1998;160:141-5.
70. Cook JA, Oliver K, Mueller RF, Sampson J. A cross sectional study of renal involvement in tuberous sclerosis. *J Med Genet* 1996;33:480-4.
71. Patel U, Simpson E, Kingswood JC, Saggarr-Malik AK. Tuberous sclerosis complex: analysis of growth rates aids differentiation of renal cell carcinoma from atypical or minimal-fat-containing angiomyolipoma. *Clin Radiol* 2005;60:665-73.

72. Fricke BL, Donnelly LF, Casper KA, Bissler JJ. Frequency and imaging appearance of hepatic angiomyolipomas in pediatric and adult patients with tuberous sclerosis. *Am J Roentgenol* 2004;182:1027-30.
73. Martignoni G, Bonetti F, Pea M, Tardanico R, Brunelli M, Eble JN. Renal disease in adults with TSC2/PKD1 contiguous gene syndrome. *Am J Surg Pathol* 2002;26:198-205.
74. Grether P, Carnevale A, Pasquel P. Wilms' tumor in an infant with tuberous sclerosis. *Ann Genet* 1987;30:183-5.
75. Jozwiak S, Kawalec W, Dluzewska J, Daszkowska J, Mirkowicz-Malek M, Michalowicz R. Cardiac tumours in tuberous sclerosis: their incidence and course. *Eur J Pediatr* 1994;153:155-7.
76. Verhaaren HA, Vanakker O, De Wolf D, Suys B, Francois K, Matthys D. Left ventricular outflow obstruction in rhabdomyoma of infancy: meta-analysis of the literature. *J Pediatr* 2003;143:258-63.
77. Freycon F, Mollard PC, Hermier M, Guibaud P, Chazalotte JP, Weill B, Flattot M, Jeune M. Aneurysme de l'aorte abdominale au cours d'une sclerose tubereuse de Bourneville. *Pediatric* 1971;26:421-7.
78. Larbre, F, Loire R, Guibaud P, Lauras B, Weill B. Observation clinique et anatomique d'un aneurysme de l'aorte au cours d'une sclerose tubereuse de Bourneville. *Arch Franc Pediat* 1971;28: 975-84.
79. de Leon GA, Zaeri N, Foley CM. Olfactory hamartomas in tuberous sclerosis. *J Neurol Sci* 1988;87:187-94.
80. Sparling MAJ, Hong CH, Brahim JS, Moss J, Darling TN. Oral findings in 58 adults with tuberous sclerosis complex. *J Am Acad Dermatol* 2007 May;56(5):786-90.
81. Weiner DM, Ewalt DH, Roach ES, Hensle TW. The tuberous sclerosis complex: a comprehensive review. *J Am Coll Surg* 1998;187:548-61.
82. Jarrar RG, Buchhalter JR, Raffel C. Long-term outcome of epilepsy surgery in patients with tuberous sclerosis. *Neurology* 2004;62:479-81.
83. Romanelli P, Najjar S, Weiner HL, Devinsky O. Epilepsy surgery in tuberous sclerosis: multistage procedures with bilateral or multilobar foci. *J Child Neurol* 2002; 17:689-92.
84. Kagawa K, Chugani DC, Asano E, Juhasz C, Muzik O, Shah A, Shah J, Sood S, Kupsky WJ, Mangner TJ, Chakraborty PK, Chugani HT. Epilepsy surgery outcome in children with tuberous sclerosis complex evaluated with alpha-[11C]methyl-L-tryptophan positron emission tomography (PET). *J Child Neurol* 2005;20:429-38.
85. Reich M, Lenoir P, Malvy J, Perrot A, Sauvage D. Bourneville's tuberous sclerosis and autism. *Arch Pediatr* 1997;4:170-5.

86. Bolton PF, Griffiths P. Association of tuberous sclerosis of temporal lobes with autism and atypical autism. *Lancet* 1997;349:392-5.
87. Oesterling JE, Fishman EK, Goldman SM, Marshall FF. The management of renal angiomyolipoma. *J Urol* 1986;135:1121-4.
88. Steiner MS, Goldman SM, Fishman EK, Marshall FF. The natural history of renal angiomyolipoma. *J Urol* 1993;150:1782-6.
89. van Baal JG, Smits NJ, Keeman JN, Lindhout D, Verhoef S. The evolution of renal angiomyolipomas in patients with tuberous sclerosis. *J Urol* 1994;152:35-8.
90. Enbergs A, Borggreffe M, Kurlleman G, Fahrenkamp A, Scheld HH, Jehle J, et al. Ventricular tachycardia caused by cardiac rhabdomyoma in a young adult with tuberous sclerosis. *Am Heart J* 1996;132:1263-5.
91. Wu CT, Chen MR, Hou SH. Neonatal tuberous sclerosis with cardiac rhabdomyomas presenting as fetal supraventricular tachycardia. *Jpn Heart J* 1997;38:133-7.
92. Bosi G, Lintermans JP, Pellegrino PA, Svaluto-Moreolo G, Vliers A. The natural history of cardiac rhabdomyoma with and without tuberous sclerosis. *Acta Paediatr* 1996;85:928-31.
93. Medeiros-Júnior P, Carvalho CRR. Linfangioleiomiomatose pulmonar. *J Bras Pneumol* 2004;30(1).
94. Johnson CD, Matt MK, Dennison D, Brown RS, Koh S. Preventing factitious gingival injury in an autistic patient. *J Am Dent Assoc* 1996;127:244-7.

## ANEXO

## ANEXO A – Parecer favorável do Comitê de Ética em Pesquisa

	<b>UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MONTES CLAROS</b> <b>COMITÊ DE ÉTICA</b>	
---	---	---

**PARECER CONSUBSTANCIADO**

Montes Claros, 20 de junho de 2008.

Processo N°1047

Título do Projeto: Esclerose Tuberosa – aspectos clínicos, genéticos e imaginológicos de uma família afetada por esta condição genética.

Coordenador: Prof. Paulo Rogério Ferreti Bonan

Relator: Prf. Carlos Caixeta de Queiroz

**Histórico:**  
A pesquisa tem como objetivo descrever o perfil de uma família portadora de esclerose tuberosa, com pelo menos quatro gerações de indivíduos afetados, no município de Montes Claros – MG. Trata-se de um estudo descritivo: clínico, imaginológico, microscópico e genético, envolvendo uma família portadora de esclerose tuberosa, que foi identificada na Clínica de Estomatologia do Curso de Odontologia da Universidade Estadual de Montes Claros – Unimontes, em novembro de 2007. Todos os membros desta família, afetados e não afetados serão avaliados clinicamente por médicos e dentistas em ambientes clínicos e ambulatoriais da Unimontes. A pesquisa faz parte da continuidade das investigações, realizados pelos proponentes, sobre condições de doenças genéticas e será realizada de agosto de 2008 a fevereiro de 2010.

**Mérito:**  
A pesquisa se justifica pela importância de se conhecer e de se estudar uma doença genética “autossômica dominante, com elevada incidência de nova mutação e que se expressa através de manifestações clínicas variáveis”.

**Parecer:**  
O Comitê de Ética em Pesquisa da Unimontes analisou o processo 1047 e entende que o mesmo está completo e dentro das normas do Comitê e das Resoluções do Conselho Nacional da Saúde/Ministério da Saúde. Sendo assim, somos pela **APROVAÇÃO** do projeto.

  
\_\_\_\_\_  
*Prof.ª Vânia Silva Vilas Boas Vieira Lopes*  
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa da Unimontes

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)