

## **CORRELACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO DE PACIENTES CON ESCLEROSIS TUBEROSA DE LA COSTA CARIBE COLOMBIANA**

### **Nombres y apellidos**

**Aldo Tomás Caraballo Payares**

**C.C. No. 73167413**

**Código estudiantil: 2016120577621**

**Correo institucional: aldo.caraballo@unisimon.edu.co**

Trabajo de Investigación presentado como requisito para optar el título de:  
Magister en Genética

### **Tutoras:**

**Dayan Lozano Solano**

**Rita Ortega Ríos**

### **RESUMEN**

**Introducción:** El complejo esclerosis tuberosa (CET), es un trastorno neurocutáneo multisistémico (facomatosis) dentro del grupo de las enfermedades huérfanas. Presenta un patrón de herencia autosómico dominante, tiene una expresión fenotípica variable y con penetrancia casi completa. Se caracteriza por la presencia de hamartomas (crecimiento tumoral benigno progresivo) que originan alteraciones en la proliferación, migración y diferenciación celular, y que afectan cualquier órgano: cerebro, ojos, piel, boca, riñones, corazón, pulmones e hígado. Se debe principalmente a la mutación heterocigótica en uno de los dos genes supresores de tumor, localizado en 9q34, que codifica a la hamartina y el TSC2 localizado en 16p13, que codifica a la tuberina. Estas proteínas forman un complejo que controla el crecimiento celular a través de mecanismos que causan la inhibición de la vía de señalización de la diana de rapamicina en las células de mamífero (mTOR). Las lesiones se van presentando a través del tiempo. El diagnóstico es esencialmente

clínico, apoyado en estudios paraclínicos. El diagnóstico molecular es importante en los casos de inicio temprano, en los dudosos, en los sintomáticos leves y para el asesoramiento genético y familiar. La morbimortalidad que esta enfermedad conlleva durante toda la vida del paciente le condiciona una gran carga para él, su familia, la comunidad y el sistema de salud.

**Objetivo:** Correlacionar el genotipo-fenotipo de pacientes con CET que consultaron a un hospital neurológico de Cartagena de referencia regional desde 2011 a 2021.

**Materiales y métodos:** Este es un estudio descriptivo, transversal y retrospectivo. La muestra la conforman 12 sujetos que cumplieron los criterios de inclusión, a quienes se les actualizó el examen físico y se les solicitó la secuenciación NGS de los genes *TSC1* y *TSC2*, incluyendo áreas intrónicas adyacentes, cuyo resultado se expresó como variante patogénica o probablemente patogénica. El procesamiento de la información se realizó con las herramientas descriptivas de la hoja de cálculo de Office Excel 2020. El análisis de correlación de variables clínicas y la mutación encontrada se realizó mediante el programa R-CRAN determinado por análisis de correspondencia simple con una elipse de 95% de confianza.

**Resultados:** Todos los sujetos tienen el diagnóstico clínico definitivo de CET. Se obtuvo un resultado positivo de la prueba molecular en el 83,3%. El rango de edad fue de los 4 a 37 años (media de 14,9 años, una mediana de 14 años y una moda de 14 años). Ocho (66,6%) son menores de edad y cuatro (33,3%) son adultos. No hubo predominio de género. El inicio de síntomas fue antes del año de edad en el 50% de los casos. No tenían antecedentes familiares. Todos habitan en área urbana. El 25% no tienen formación académica. De los 17 criterios diagnósticos explorados, la frecuencia media estuvo entre un mínimo de 3 y un máximo de 9. En los sujetos con afectación del gen *TSC2* la frecuencia de criterios fue de  $5,9 \pm 1.8$ , en los afectados por el gen *TSC1* fue de  $5,5 \pm 0.7$  y en aquellos con Mutación No Identificada (MNI) fue de 4. De los 17 criterios, 5 (29,4%) estuvieron presentes en más del 50% de los sujetos, independiente del gen comprometido. Las manifestaciones neurológicas y dermatológicas fueron las más frecuentes. Las afectaciones renales, oculares y cardíacas fueron poco frecuentes. Las lesiones pulmonares no se detectaron. Entre las tres principales condiciones o

comorbilidades neurológicas secundarias, la epilepsia estuvo presente en 11 sujetos (91,6%), el retraso en el neurodesarrollo se registró en 10 (83,3%) y el autismo estuvo en 2 de ellos (16,6%). El gen *TSC2* fue el más afectado (66,6%). En 16,6% de los sujetos no se identificó una mutación. Todas las variantes detectadas corresponden a heterocigosis. El tipo de variante más frecuente fue nonsense (30%), seguido de missense, frameshift e interrupción del splicing con el 20% respectivamente; y mutación por delección (10%). Se hizo análisis de correspondencia simple entre las manifestaciones clínicas y las variantes patogénicas o probablemente patogénicas identificadas y se encontró que no existe una asociación entre estas dos variables.

**Conclusión:** No se establecieron correlaciones genotipo-fenotipo específicas, pero confirmamos algunos los hallazgos descritos en otras poblaciones a nivel mundial. Este el primer estudio colombiano que intenta describirla. Al seguir incorporando nuevos pacientes, extendiéndolo a nivel multicéntrico y en varias ciudades, se podría lograr definir esta correlación para la población afectada por CET en nuestro país.

**Palabras clave:** Complejo de esclerosis tuberosa, genotipo, fenotipo, correlación.

## ABSTRACT

**Introduction:** Tuberous sclerosis complex (TSC) is a multisystemic neurocutaneous disorder (phakomatosis) within the group of orphan diseases. It presents an autosomal dominant inheritance pattern, has variable phenotypic expression, and almost complete penetrance. It is characterized by the presence of hamartomas (progressive benign tumor growth) that cause alterations in cell proliferation, migration, and differentiation, and affect any organ: brain, eyes, skin, mouth, kidneys, heart, lungs, and liver. It is mainly due to the heterozygous mutation in one of the two tumor suppressor genes, located at 9q34, which encodes hamartin, and *TSC2* located at 16p13, which encodes tuberin. These proteins form a complex that controls cell growth through mechanisms that cause inhibition of the mammalian

target of rapamycin (mTOR) signaling pathway. The lesions occur over time. The diagnosis is essentially clinical, supported by paraclinical studies. Molecular diagnosis is important in early-onset cases, in doubtful cases, in mildly symptomatic cases, and for genetic and family counselling. The morbidity and mortality that this disease entails throughout the patient's life places a great burden on him, his family, the community and the health system.

**Objective:** To correlate the genotype-phenotype of patients with TSC who consulted a regional reference neurological hospital in Cartagena from 2011 to 2021.

**Materials and methods:** This is a descriptive, cross-sectional and retrospective study. The sample is made up of 12 subjects who met the inclusion criteria, to whom the physical examination was updated and NGS sequencing of the TSC1 and TSC2 genes was requested, including adjacent intronic areas, the result of which was expressed as a pathogenic or probably pathogenic variant. . The information processing was carried out with the descriptive tools of the Office Excel 2020 spreadsheet. The correlation analysis of clinical variables and the mutation found was carried out using the R-CRAN program determined by simple correspondence analysis with an ellipse of 95% confidence.

**Results:** All subjects have the definitive clinical diagnosis of TSC. A positive result of the molecular test was obtained in 83.3%. The age range was from 4 to 37 years (mean 14.9 years, median 14 years, and mode 14 years). Eight (66.6%) are minors and four (33.3%) are adults. There was no gender predominance. The onset of symptoms was before one year of age in 50% of the cases. They had no family history. They all live in an urban area. 25% have no academic training. Of the 17 diagnostic criteria explored, the average frequency was between a minimum of 3 and a maximum of 9. In the subjects with TSC2 gene involvement the frequency of criteria was  $5.9 \pm 1.8$ , in those affected by the TSC1 gene it was  $5.5 \pm 0.7$  and in those with an Unidentified Mutation (NIM) it was 4. Of the 17 criteria, 5 (29.4%) were present in more than 50% of the subjects, regardless of the compromised gene. Neurological and dermatological manifestations were the most frequent. Renal, ocular and cardiac affectations were infrequent. Lung lesions were not detected. Among the three main secondary neurological conditions or comorbidities, epilepsy

was present in 11 subjects (91.6%), neurodevelopmental delay was recorded in 10 (83.3%) and autism was in 2 of them (16, 6%). The TSC2 gene was the most affected (66.6%). No mutation was identified in 16.6% of subjects. All variants detected correspond to heterozygosity. The most frequent type of variant was nonsense (30%), followed by missense, frameshift and splicing interruption with 20% respectively; and deletion mutation (10%). A simple correspondence analysis was carried out between the clinical manifestations and the identified pathogenic or probably pathogenic variants, and it was found that there is no association between these two variables.

**Conclusion:** Specific genotype-phenotype correlations were not established, but we confirmed some of the findings described in other populations worldwide.

This is the first Colombian study that attempts to describe it. By continuing to incorporate new patients, extending it to a multicenter level and in several cities, it could be possible to define this correlation for the population affected by TSC in our country.

**Key Words:** Tuberous sclerosis complex, genotype, phenotype, correlation.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Wilbur C, Sanguansermisri C, Chable H, Anghelina M, Peinhof S, Anderson K, Steinbok P, Singhal A, Datta A, Connolly MB. Manifestations of Tuberous Sclerosis Complex: The Experience of a Provincial Clinic. *Can J Neurol Sci.* 2017 Jan;44(1):35-43. doi: 10.1017/cjn.2016.311. PMID: 28004629.
2. Hodgson N, Kinori M, Goldbaum MH, Robbins SL. Ophthalmic manifestations of tuberous sclerosis: a review. *Clin Exp Ophthalmol.* 2017 Jan;45(1):81-86. doi: 10.1111/ceo.12806. Epub 2016 Sep 15. PMID: 27447981.
3. Cammarata-Scalisi F, Lacruz-Rengel M, Stock F, Vidales C, Callea M. Aspectos clínicos y genéticos del complejo esclerosis tuberosa. *Arch Venez Puer Ped.* 2017; Vol 80 (1): 27-33. Disponible en:

[http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0004-06492017000100007&lng=es](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06492017000100007&lng=es).

4. Monteiro T, Garrido C, Pina S, Chorão R, Carrilho I, Figueiroa S, et al. Esclerosis tuberosa: caracterización clínica e intento de correlación fenotipo/genotipo. *An Pediatr (Engl Ed)*. 2014; 81(5). DOI: 10.1016/j.anpedi.2014.03.022

5. Sahin M, Henske EP, Manning BD, Ess KC, Bissler JJ, Klann E, et al. Advances and future directions for tuberous sclerosis complex research: Recommendations from the 2015 strategic planning conference. Vol. 60, *Pediatric Neurology*. 2016. doi: 10.1016/j.pediatrneurol.2016.03.015. Epub 2016 Apr 2.

6. Torres V, Contreras GA, Serrano N, Páez MC, Guzmán MC. Complejo de la esclerosis tuberosa, revisión de tema y presentación de caso. *Rev asoc colomb dermatol* 2011; 19 (1):76-81. Disponible en:

<https://revista.asocolderma.org.co/index.php/asocolderma/article/view/390>

7. Orlova KA, Crino PB. The tuberous sclerosis complex. Vol. 1184, *Annals of the New York Academy of Sciences*. Blackwell Publishing Inc.; 2010. p. 87–105. doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.05117.x.

8. Curatolo P, Bombardieri R, Jozwiak S. Tuberous sclerosis. *Lancet*. 2008; 372:657–68. doi: 10.1016/S0140-6736(08)61279-9.

9. Rubilar C, López F, Troncoso M, Barrios A, Herrera L. Estudio clínico genético en pacientes con complejo de esclerosis tuberosa. *Rev Chil Pediatr*. 2017; 88(1). <http://dx.doi.org/10.1016/j.rchipe.2016.08.003>

10. Crino P, Nathanson K, Petri E. The tuberous sclerosis complex. *N Engl J Med*. 2006 Sep 28;355(13):1345–56. DOI: 10.1056/NEJMra055323

11. Al-Saleem T, Wessner LL, Scheithauer BW, Patterson K, Roach ES, Dreyer SJ, et al. Malignant Tumors of the Kidney, Brain, and Soft Tissues in Children and Young Adults with the Tuberous Sclerosis Complex. *Cancer* 1998 Nov 15; 83(10):2208-16. disponible en: <https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/>

12. Switon K, Kotulska K, Janusz-Kaminska A, Zmorzynska J, Jaworski J. Molecular neurobiology of mTOR. Vol. 341, *Neuroscience*. Elsevier Ltd; 2017. p. 112–53. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2016.11.017

13. Hernandez O, Way S, McKenna J, Gambello MJ. Generation of a conditional disruption of the Tsc2 gene. *Genesis*. 2007; 45(2). DOI: 10.1002/dvg.20271
14. Chipaux M, Chiron C, Touraine R, Ouss L, Dulac O, Nabbout R. Tuberous sclerosis: current practices and news. *Epilepsies*. 2009 Jan; 21(1):34–40. 10.1684/epi.2009.0220
15. Dabora SL, Kwiatkowski DJ, Franz DN, Roberts PS, Nieto A, Chung J, et al. 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(1). doi: 10.1086/316951.
16. Roach ES. Applying the Lessons of Tuberous Sclerosis: The 2015 Hower Award Lecture. Vol. 63, *Pediatric Neurology*. 2016. DOI: 10.1016/j.pediatrneurol.2016.07.003
17. Macaya A, Torra R. Recommendations for the multidisciplinary management of tuberous sclerosis complex. *Med Clin (Barc)*. 2016 May; 147(5):211–6. DOI: 10.1016/j.medcli.2016.04.004
18. Lacruz-Rengel MA, Jiménez MG, Cammarata-Scalisi F. Epilepsia en niños con esclerosis tuberosa: experiencia en el instituto autónomo hospital universitario de los Andes. *Arch venez pueric pediatr*. 2011; 74(3). Disponible en: [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0004-06492011000300006&lng=es](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06492011000300006&lng=es).
19. Núñez E, Bonilla Y, Valera D. Actualización de métodos diagnósticos en el Complejo de Esclerosis Tuberosa. *Revista Mexicana de Neurociencia*. 2016; 17(4). <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=69100>
20. Medina-Malo C, Carreño O, Vélez A, Lizcano LA, Ortíz LD, Becerra H, et al. Complejo esclerosis tuberosa. Bogotá; 2012 Mar; 28(1):11-23. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/262449207\\_Tuberous\\_sclerosis\\_complex](https://www.researchgate.net/publication/262449207_Tuberous_sclerosis_complex)
21. López MF. Complejo esclerosis tuberosa: aspectos moleculares y genéticos. Actualización. *Revista Chilena de Epilepsia*. 2012; 12(1):105–10.
22. Quesada JF, Alonso MC. Complejo esclerosis tuberosa, caso clínico. *Ed Cont Lab Clín*. Madrid, 2016; 27: 25-39. Disponible en:

<https://www.seqc.es/download/tema/9/3875/9175045/1912513/cms/tema-3-complejo-esclerosis-tuberosa.pdf/>

23. Northrup H, Krueger DA, Roberds S, Smith K, Sampson J, Korf B, et al. Tuberous sclerosis complex diagnostic criteria update: Recommendations of the 2012 international tuberous sclerosis complex consensus conference. *Pediatr Neurol*. 2013; 49(4). DOI: 10.1016/j.pediatrneurol.2013.08.001

24. Boronat S. Sábado C. Vendrell T. Complejo Esclerosis Tuberosa. Grupo de Trabajo sobre Cáncer en Síndromes Genéticas Polimalformativos (2015 GT-CSGP). Barcelona – España. Disponible en: [https://www.orpha.es/data/patho/Cpg/es/ComplejoEsclerosisTuberosa\\_ES-es\\_CPG\\_ORPHA805.pdf](https://www.orpha.es/data/patho/Cpg/es/ComplejoEsclerosisTuberosa_ES-es_CPG_ORPHA805.pdf)

25. Falsafi P, Taghavi-Zenouz A, Khorshidi-Khiyavi R, Nezami N, Mehrdad &, Estiar A, et al. A Case of Tuberous Sclerosis Without Multiorgan Involvement. *Glob J Health Sci*. 2015; 7(5). doi: 10.5539/gjhs.v7n5p124

26. Sorokin I, Cecilia Remes Lenicov M, Pereira V, Raffaelli R, Nave G, Pereyra Ramos G, et al. Complejo Esclerosis Tuberosa: diagnóstico en la edad adulta. Vol. 65, *Arch. Argent. Dermatol*. Buenos Aires; 2015. Disponible en: <http://www.archivosdermato.org.ar/wp-content/uploads/2019/10/104Sorokin-Complejo-esclerosis-tuberosa.pdf>

27. Henske EP, Józwiak S, Kingswood JC, Sampson JR, Thiele EA. Tuberous sclerosis complex. *Nat Rev Dis Primers*. 2016; 2:16035. doi: 10.1038/nrdp.2016.35.

28. Morrison PJ, Donnelly DE. How common is tuberous sclerosis complex? . *Br J Dermatol*. 2016 Jun; 174(6):1184–5. <https://doi.org/10.1111/bjd.14592>

29. Caban C, Khan N, Hasbani DM, Crino PB. Genetics of tuberous sclerosis complex: Implications for clinical practice. *Appl Clin Genet* 2016 Dec 21; 10:1-8. DOI: 10.2147/TACG.S90262

30. Jozwiak J, Jozwiak S, Wlodarski P. Possible mechanisms of disease development in tuberous sclerosis. *Lancet Oncol*. 2008 Jan; 9(1): 73-9. DOI: 10.1016/S1470-2045(07)70411-4

31. Brook-Carter PT, Peral B, Ward CJ, Thompson P, Hughes J, Maheshwar MM. Deletion of the TSC2 and PKD1 genes associated with severe infantile polycystic



kidney disease--a contiguous gene syndrome. *Nat Genet.* 1994 Dec; 8(4):328–32.

DOI: 10.1038/ng1294-328

32. Sampson JR, Maheshwar MM, Aspinwall R, Thompson P, Cheadle JP, Ravine D, et al. Renal cystic disease in tuberous sclerosis: Role of the polycystic kidney disease 1 gene. *Am J Hum Genet.* 1997; 61(4). DOI: 10.1086/514888

33. Napolioni V, Curatolo P. Genetics and Molecular Biology of Tuberous Sclerosis Complex. *Curr Genomics.* 2008; 9(7). DOI: 10.2174/138920208786241243

34. Mozaffari M, Hoogeveen-Westerveld M, Kwiatkowski D, Sampson J, Ekong R, Povey S, et al. Identification of a region required for TSC1 stability by functional analysis of TSC1 missense mutations found in individuals with tuberous sclerosis complex. *BMC Med Genet.* 2009; 10. doi: 10.1186/1471-2350-10-88

35. Osborne JP, Merrifield J, O'Callaghan FJK. Tuberous sclerosis - What's new? Vol. 93, *Archives of Disease in Childhood.* 2008. p. 728–31. DOI:10.1136/adc.2006.094938

36. Crino PB. The pathophysiology of tuberous sclerosis complex. In: *Epilepsia* 2010 Feb; 51 Suppl 1: 27-9. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2009.02438.x>

37. Meng XF, Yu JT, Song JH, Chi S, Tan L. Role of the mTOR signaling pathway in epilepsy. *J Neurol Sci.* 2013 Sep; 332(1–2):4–15. DOI: 10.1016/j.jns.2013.05.029

38. Au KS, Williams AT, Roach ES, Batchelor L, Sparagana SP, Delgado MR, et al. Genotype/phenotype correlation in 325 individuals referred for a diagnosis of tuberous sclerosis complex in the United States. *Genetics in Medicine.* 2007 Feb;9(2):88–100. <https://doi.org/10.1097/GIM.0b013e31803068c7>

39. Barboza M, Bermúdez I, Diaz D. Trastorno generalizado del desarrollo y esclerosis tuberosa, Presentación de caso clínico. *Acta Neurol Colomb.* 2014 Oct; 30(4):331–6. Disponible en: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/biblio-949568>

40. Curi MM, Cardoso CL, Ikuta CRS, Koga DH, Zardetto C. Tuberous Sclerosis: A Case Report with Oral Manifestation. *International journal of odontostomatology.* 2014; 8(2). <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-381X2014000200006>

41. Garcia NG, de Carli ML, Oliveira DT, Soares CT, Ribeiro Júnior NV, Sperandio FF, et al. Tuberous Sclerosis with Severe Cutaneous Manifestation and Multiples

Facial Angiofibromas. *Head Neck Pathol.* 2016; 10(4). DOI: 10.1007/s12105-016-0723-8

42. Sodhi S, Dang R, Brar G. Tuberosus sclerosis with oral manifestations: A rare case report. *Int J Appl Basic Med Res.* 2016; 6(1). doi: 10.4103/2229-516X.174018

43. Docampo J, Cabrini M, Bruno C, Morales YC. Esclerosis tuberosa: Evaluación de las lesiones intracraneanas. *Revista Argentina de Radiología.* 2013; 77(4). Disponible en: [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1852-99922013000400004&lng=es](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1852-99922013000400004&lng=es).

44. Salgado AG, Belaunzarán A, Gandini A. Esclerosis tuberosa: hallazgos radiológicos en SNC y riñones: A propósito de un caso. *Revista del Hospital Privado de Comunidad.* Córdoba, 2013; 16 (1): 25-8. Disponible en: <https://hpc.org.ar/wp-content/uploads/905-6-Salgado1.pdf>

45. Krueger DA, Wilfong AA, Mays M, Talley CM, Agricola K, Tudor C, et al. Long-term treatment of epilepsy with everolimus in tuberous sclerosis. *Neurology.* 2016; 87(23). DOI: 10.1212/WNL.0000000000003400

46. Jeong A. Tuberous Sclerosis Complex: A Roadmap for Future Research. *Pediatr Neurol Briefs.* 2016; 30(7). doi: 10.15844/pedneurbriefs-30-7-1

47. Yates JRW, MacLean C, Higgins JNP, Humphrey A, le Maréchal K, Clifford M, et al. The tuberous sclerosis 2000 study: Presentation initial assessments and implications for diagnosis and management. *Arch Dis Child.* 2011; 96(11). DOI: 10.1136/adc.2011.211995

48. Padilla-Vázquez F, Mendizábal-Guerra R, Ayala AA, et al. Esclerosis tuberosa. *Arch Neurocienc.* 2012; 17(2):132-137. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/arcneu/ane-2012/ane122i.pdf>

49. Warncke JC, Brodie KE, Grantham EC, Catarinicchia SP, Tong S, Kondo KL, et al. Pediatric Renal Angiomyolipomas in Tuberous Sclerosis Complex. *Journal of Urology.* 2017; 197(2). DOI: 10.1016/j.juro.2016.09.082

50. Kingswood JC, Bissler JJ, Budde K, Hulbert J, Guay-Woodford L, Sampson JR, et al. Review of the Tuberous Sclerosis Renal Guidelines from the 2012 Consensus Conference: Current Data and Future Study. *Nephron* 2016; 134(2):51-58. DOI: 10.1159/000448293

51. Johnson SR, Taveira-DaSilva AM, Moss J. Lymphangi leiomyomatosis. Clin Chest Med. 2016 Sep 1; 37(3):389–403. DOI: 10.1016/j.ccm.2016.04.002
52. Koc G, Sugimoto S, Kuperman R, Kammen BF, Karakas SP. Pancreatic tumors in children and young adults with tuberous sclerosis complex. Pediatr Radiol. 2017; 47(1). DOI: 10.1007/s00247-016-3701-0
53. Kingswood JC, Crawford P, Johnson SR, Sampson JR, Shepherd C, Demuth D, et al. The economic burden of tuberous sclerosis complex in the UK: A retrospective cohort study in the Clinical Practice Research Datalink. J Med Econ 2016; 19(11): 1087–98. DOI: 10.1080/13696998.2016.1199432
54. Sancak O, Nellist M, Goedbloed M, Elfferich P, Wouters C, Maat-Kievit A, et al. 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. European Journal of Human Genetics. 2005; 13(6). DOI: 10.1038/sj.ejhg.5201402
55. Rosset C, Vairo F, Bandeira IC, Correia RL, de Goes FV, da Silva RTB, et al. Molecular analysis of TSC1 and TSC2 genes and phenotypic correlations in Brazilian families with tuberous sclerosis. PLoS One. 2017; 12(10). doi: 10.1371/journal.pone.0185713. PMID: 28968464; PMCID: PMC5624610
56. Ruiz-Falcó Rojas ML. Actualización terapéutica en el complejo esclerosis tuberosa: el papel de los inhibidores de la vía mTOR. Rev Neurol. 2012; 54(S03). 10.33588/rn.54S03.2012244.
57. Jeong A, Wong M. mTOR Inhibitors in Children: Current Indications and Future Directions in Neurology. Curr Neurol Neurosci Rep 2016 Dec; 16(12): 102. DOI: 10.1007/s11910-016-0708-8
58. Capal JK, Franz DN. Profile of everolimus in the treatment of tuberous sclerosis complex: An evidence-based review of its place in therapy. Neuropsychiatr Dis Treat 2016 Aug 25; 12: 2165-72. DOI: 10.2147/NDT.S91248
59. van Karnebeek CDM, Bowden K, Berry-Kravis E. Treatment of Neurogenetic Developmental Conditions: From 2016 into the Future. Pediatric Neurology 2016; 65: 1-13. DOI: 10.1016/j.pediatrneurol.2016.07.010

60. Ding Y, Wang J, Zhou S, Zhou Y, Zhang L, Yu L, et al. Genotype and Phenotype Analysis of Chinese Children With Tuberous Sclerosis Complex: A Pediatric Cohort Study. *Front Genet.* 2020 Mar 10;11. doi: 10.3389/fgene.2020.00204.
61. Georgieva B, Koleva M, Todorov T, Bojinova V, Deneva D, Glushkova M, et al. Molecular-genetic characteristics and genotype-phenotype correlations in Bulgarian patients with tuberous sclerosis complex. *Acta Medica Bulgarica.* 2021; 48(2). <https://doi.org/10.2478/amb-2021-0020>
62. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in Medicine.* 2015 May 8; 17(5): 405–24. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>
63. van Slegtenhorst M, Verhoef S, Tempelaars A, Bakker L, Wang Q, Wessels M, et al. Mutational spectrum of the TSC1 gene in a cohort of 225 tuberous sclerosis complex patients: No evidence for genotype-phenotype correlation. *J Med Genet.* 1999; 36(4). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10227394/>
64. Jones AC, Shyamsundar MM, Thomas MW, Maynard J, Idziaszczyk S, Tomkins S, et al. Comprehensive mutation analysis of TSC1 and TSC2 - And phenotypic correlations in 150 families with tuberous sclerosis. *Am J Hum Genet.* 1999; 64(5). DOI: 10.1086/302381
65. Alsowat D, Whitney R, Hewson S, Jain P, Chan V, Kabir N, et al. The Phenotypic Spectrum of Tuberous Sclerosis Complex: A Canadian Cohort. *Child Neurol Open.* 2021; 8. doi:10.1177/2329048X211012817
66. Muto Y, Sasaki H, Sumitomo M, Inagaki H, Kato M, Kato T, et al. Genotype-phenotype correlation of renal lesions in the tuberous sclerosis complex. *Hum Genome Var.* 2022; 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41439-022-00181-1>.
67. Luo, C., Zhang, Y., Zhang, Ys. et al. Renal phenotypes correlate with genotypes in unrelated individuals with tuberous sclerosis complex in China. *Orphanet J Rare Dis* 2022; 17, 288. <https://doi.org/10.1186/s13023-022-02443-1>
68. Tyburczy ME, Dies KA, Glass J, Camposano S, Chekaluk Y, Thorner AR, et al. Mosaic and Intronic Mutations in TSC1/TSC2 Explain the Majority of TSC Patients

with No Mutation Identified by Conventional Testing. PLoS Genet. 2015 Nov 1; 11(11). DOI: 10.1371/journal.pgen.1005637

69. Treichel AM, Hamieh L, Nathan NR, Tyburczy ME, Wang J an, Oyerinde O, et al. Phenotypic distinctions between mosaic forms of tuberous sclerosis complex. Genetics in Medicine 2019 Nov; 21(11): 2594-2604. DOI: 10.1038/s41436-019-0520-3

70. Giannikou K, Lasseter KD, Grevelink JM, Tyburczy ME, Dies KA, Zhu Z, et al. Low-level mosaicism in tuberous sclerosis complex: prevalence, clinical features, and risk of disease transmission. Genetics in Medicine 2019 Nov; 21(11): 2639-2643. DOI: 10.1038/s41436-019-0562-6

71. Dibble CC, Elis W, Menon S, Qin W, Klekota J, Asara JM, et al. TBC1D7 Is a Third Subunit of the TSC1-TSC2 Complex Upstream of mTORC1. Mol Cell 2012 Aug; 47(4): 535–46. DOI: 10.1016/j.molcel.2012.06.009

72. Jones AC, Daniells CE, Snell RG, Tachataki M, Idziaszczyk SA, Krawczak M, et al. Molecular genetic and phenotypic analysis reveals differences between TSC1 and TSC2 associated familial and sporadic tuberous sclerosis. Hum Mol Genet 1997; 6(12). DOI: 10.1093/hmg/6.12.2155

73. Jansen FE, Vincken KL, Algra A, Anbeek P, Braams O, Nellist M, et al. Cognitive impairment in tuberous sclerosis complex is a multifactorial condition. Neurology. 2008; 70 (12). DOI: 10.1212/01.wnl.0000280579.04974.c0.