

Síndrome do gene contíguo TSC2/PKD1

Susana Nunes², Maria Sameiro Faria¹, Conceição Mota¹, Íris Maia¹,
Helena Silva², Maria José Jordão², Teresa Costa¹, Elói Pereira¹

¹Serviço Nefrologia Pediátrica do Hospital Maria Pia, Porto

²Serviço de Pediatria do Hospital São Marcos, Braga

RESUMO

A esclerose tuberosa é uma doença autossómica dominante com envolvimento multissistémico, que se caracteriza pelo desenvolvimento de hamartomas em diferentes órgãos e que resulta de mutações nos genes supressores tumorais *TSC1* e *TSC2*. O gene *TSC2*, que codifica a proteína tuberina, localiza-se no cromossoma 16p13.3 em posição adjacente ao gene *PKD1*, principal responsável pela doença renal poliquística autossómica dominante. Num subgrupo raro de doentes, a presença de uma deleção que afecta simultaneamente os genes *TSC2* e *PKD1*, resulta no aparecimento do síndrome do gene contíguo *TSC2/PKD1*, que se caracteriza pelo aparecimento em idade precoce de manifestações no contexto de doença renal poliquística autossómica dominante em combinação com expressões fenotípicas variadas de esclerose tuberosa.

Os autores apresentam o caso de uma criança do sexo masculino, filho de pais saudáveis, não consanguíneos, com hipertensão arterial desde os 8 meses de vida, de difícil contolo. A ecografia renal evidenciou rins aumentados de volume com quistos renais semelhantes aos observados na doença poliquística renal autossómica dominante. Aos 21 meses, no estudo de uma convulsão, foi efectuada ressonância cerebral que mostrou nódulos subependimários e astrocitomas de células gigantes. Estas alterações em conjunto com outros sinais clínicos presentes permitiram reunir os critérios para diagnóstico de esclerose tuberosa. A ausência de história familiar de doença renal e esta associação de fenótipos levantou a suspeita de se tratar de um síndrome do gene contíguo *TSC2/PKD1*, facto esse posteriormente confirmado por técnicas de hibridização fluorescente "in situ".

Palavras-chave: Doença renal poliquística autossómica dominante, esclerose tuberosa, síndrome do gene contíguo *TSC2/PKD1*.

Received for publication: 24/07/2006

Accepted in revised form: 24/10/2006

SUMMARY

TSC2/PKD1 CONTIGUOUS GENE SYNDROME

Tuberous sclerosis is an autosomal dominantly inherited multisystemic disease characterized by the development of hamartomas in different organs and is caused by mutations affecting either of the tumor-suppressor genes, *TSC1* and *TSC2*. The *TSC2* gene, which encodes the protein tuberlin, is localized on chromosome 16p13.3 and lies directly adjacent to the gene *PKD1*, the major responsible of autosomal dominant polycystic kidney disease. In a rare subgroup of patients, the presence of a deletion affecting both genes, results in the TSC2/ PKD1 contiguous gene syndrome, which is characterized by a particular form of severe early-onset autosomal dominant polycystic kidney disease in combination with highly variable tuberous sclerosis complex phenotypes.

We report the case of an 8 month old male child born of non consanguineous healthy parents, admitted with high blood pressure of difficult control. Kidney ultrasonography showed bilaterally enlarged kidneys with multiple cysts resembling those seen at autosomal dominant polycystic kidney disease. At 21 months, after a seizure, a magnetic resonance imaging of the brain showed subependymal nodules and a giant cell astrocytoma. These alterations together with other clinical signs allowed the diagnosis of tuberous sclerosis complex. The negative family history of renal disease and this phenotype association was highly suspicious of TSC2/ PKD1 contiguous syndrome, which was confirmed by fluorescent in *"situ"* hybridization.

Key Words: Autosomal dominant polycystic kidney disease; Tuberous sclerosis complex; TSC2/ PKD1 contiguous gene syndrome.

INTRODUÇÃO

A esclerose tuberosa (ET) e a doença poliquística renal autossómica dominante (DPRAD) são doenças com transmissão autossómica dominante geneticamente heterogêneas¹. A ET é a segunda doença neurocutânea mais comum, com uma incidência aproximada de 1 em 10 000 nascimentos² e caracteriza-se pelo crescimento de hamartomas que se desenvolvem em vários tecidos e órgãos. Apenas um terço dos casos é familiar. Os restantes doentes com ET podem representar situações de mutação espontânea ou mosaicismo. Os genes *TSC1* e *TSC2*, são responsáveis pela maioria dos casos de ET. O gene *TSC1* localiza-se no cromossoma 9q34 e codifica a proteína hamartina. O gene *TSC2* localiza-se no cromossoma 16p13.3, em posição imediatamente adjacente ao gene da forma mais comum de DPRAD (*PKD1*) e codifica a proteína tuberina. Estas duas proteínas formam um complexo que poderá funcionar como regulador negativo do ciclo celular, pelo que estes genes são considerados supressores tumorais³. A ET apresenta penetração completa, mas a expressão clínica e gravidade da doença variam substancialmente nos indivíduos afectados. O diagnóstico da ET é clínico e assenta nos critérios definidos na "Tuberous Sclerosis Complex Consensus Conference"⁴ (Quadros I, II, III), podendo vários órgãos e sistemas estarem afectados: o sistema nervoso central (nódulos subependimários, hamartomas corticais, astrocitomas de células gigantes); os rins (angiomiolipomas, quistos, carcinoma de células renais), aparelho cardiovascular (rabdomiomas cardíacos), olhos (hamartomas retinianos) e a pele (manchas hipomelanóticas, angiofibromas faciais, fibromas ungueais). Os tumores do sistema nervoso central são a causa principal de morbilidade e mortalidade na ET. Mais de 80% dos doentes

Quadros I, II, III
Critérios de diagnóstico de esclerose tuberosa segundo
o “*Tuberous Sclerosis Complex Consensus Conference*”, July 1998 (Roach et al 1998)

• **Diagnóstico definitivo se:**

- 2 características “*major*” ou
 - 1 característica “*major*” e 2 “*minor*”
-

• **Diagnóstico provável se:**

- 1 característica “*major*” e 1 característica “*minor*”
-

• **Diagnóstico possível se:**

- 1 característica “*major*” ou
 - 2 ou mais características “*minor*”
-

Características “*major*”

- Angiofibromas faciais e placas frontais
 - Fibromas ungueais e peri-ungueais não traumáticos
 - Maculas hipomelanóticas (mais de 3)
 - “*Shagreen patch*” – nevos do tecido conectivo
 - Hamartomas nodulares retinianos múltiplos
 - Lesões tuberosas corticais^(a)
 - Astrocitomas de células gigantes subependimários
 - Rbdomiomas cardíacos, único ou múltiplos
 - Linfangiomatose^(b)
 - Angiomiolipoma renal^(b)
-

(a) Quando presente simultaneamente com a displasia cortical, devem ser consideradas com característica “*major*” única.

(b) Quando ambos presentes, outras características de esclerose tuberosa devem estar presentes para se fazer o diagnóstico definitivo.

Características “*minor*”

- Covas/fendas no esmalte dentário múltiplas, distribuídas de forma randomizada
 - Pólipos rectais hamartomatosos^(c)
 - Quistos ósseos^(d)
 - Linhas de migração da substância branca^{(a)(d)(e)}
 - Fibromas gengivais
 - Hamartoma não renal^(c)
 - Manchas acrómicas retinianas
 - Lesões cutâneas com a forma de “*confetti*”
 - Quistos renais múltiplos^(c)
-

(c) Sugere-se confirmação histológica.

(d) A confirmação radiológica é suficiente.

(e) Três ou mais linhas de migração radiais são necessárias para constituir característica “*major*”.

têm convulsões e pelo menos 50% têm atraso mental ou de desenvolvimento.

A nível renal os angiomiolipomas renais ocorrem em 75 a 80% dos pacientes com ET, enquanto que quistos epiteliais estão presentes em 20 a 47 % dos casos⁵. Muito menos frequente o carcinoma de células renais, que pode ser uma complicação de ET em 1 a 2 % dos doentes⁶.

A DPRAD é causada por dois diferentes tipos de alteração genética: um localizado no cromossoma 16p13.3-p13.1 (PKD1) que ocorre em 85% dos pacientes e outro, menos frequente, localizado no cromossoma 4q21-q23 (PKD2)⁷⁻⁹. Os genes *PKD1* e *PKD2* codificam as proteínas policistina 1 e 2, respectivamente. Algumas famílias com DPRAD parecem possuir uma alteração num terceiro gene (PKD3); contudo a existência desta mutação ainda não é consensual^{10,11}, sendo refutado por alguns autores.

A DPRAD atinge 0,1% da população¹² e é uma doença caracterizada por rins de tamanho aumentado com desenvolvimento progressivo de quistos renais e evolução para insuficiência renal crónica terminal (IRCT) durante a vida adulta do doente. Cerca de 50% dos doentes com DPRAD têm IRCT aos 60 anos^{13,14} e estima-se que a probabilidade de um doente necessitar de diálise abaixo dos 40 anos é inferior a 2%. A DPRAD apresenta também manifestações extra-renais, sendo frequentemente associado à doença renal, quistos em outros órgãos (mais frequentes no fígado, pâncreas, baço) e aneurismas cerebrais.

Os genes *TSC2* e *PKD1* estão situados no cromossoma 16p13.3 com uma orientação "tail-to-tail". A deleção de ambos os genes por uma única mutação originam o Síndrome do gene contíguo *TSC2-PKD1* o qual foi identificado por Brook-Carter *et al*¹⁵. Este síndrome é uma entidade rara que se caracteriza pelo aparecimento de lesões típicas de esclerose tuberosa e de

graves e precoces manifestações da doença poliquística renal autossómica dominante^{12,16,17}.

O isolamento do gene *PKD1* (9) foi feito numa família portuguesa com a coexistência de DPRAD e ET e os médicos portugueses contribuíram significativamente para a investigação genética da DPRAD. Contudo, nesta família o fenótipo ou era primariamente de *TSC2* ou de *PKD1* e secundário a uma translocação desequilibrada 16:22, o que é diferente do Síndrome de gene contíguo em que existe uma deleção simultânea de *TSC2* e *PKD1* em 16p13.3.

CASO CLÍNICO

Os autores descrevem o caso clínico de uma criança do sexo masculino, com 3 anos de idade, raça caucasiana, natural de Braga. Primeiro filho de pais não consanguíneos, saudáveis e sem antecedentes familiares relevantes. A gravidez foi viagiada, sem intercorrências e com ecografias pré-natais descritas como não apresentando alterações. Aos 8 meses de idade no contexto de estudo de distensão abdominal e tumefacção dos flancos foi diagnosticada hipertensão arterial grave (148/93mmHg, P> 99). A ecografia renal revelou rins volumosos, com diâmetro bipolar à direita de 129 mm e à esquerda de 133 mm, sem qualquer grau de diferenciação parenquimo-sinusal e com múltiplas formações quísticas em ambos os rins, de dimensões variáveis entre 5 mm e 5 cm. (Figura 1). No estudo analítico efectuado destacou-se: creatinina plasmática de 0.4mg/dl, ureia plasmática de 53mg/dl e depuração de creatinina de 80 ml/min/1,73m. A análise sumária de urina não mostrou a presença de hematúria, leucocitúria ou proteinúria. O doente obteve um razoável controlo tensional com terapêutica antihipertensora em combinação (captopril, propanolol e nifedipina). O rastreio ecográfico efectuado aos pais (pai com 34 anos e mãe com 33 anos de idade) foi negati-



Figura 1: Ecografia renal apresenta rins volumosos com perda da diferenciação parenquimo-sinusal e múltiplas formações quísticas de diferentes tamanhos.

vo para DPRAD. Aos 21 meses de idade o doente apresentou convulsão não febril. No exame objectivo foram encontradas mais de três manchas cutâneas hipomelanóticas. Realizou TAC cerebral que revelou lesões compatíveis com ET e ressonância magnética cerebral que mostrou a existência de nódulos subependimários e duas lesões nos buracos de Monro sugerindo astrocitoma de células gigantes (Figuras 2,3). O electroencefalograma apresentava actividade paroxística frontotemporal bilateral, com predomínio frontal direito em vigília e com electroestimulação intermitente. O exame oftalmológico revelou a existência de hamartoma retiniano. O TAC abdominal confirmou a presença de rins grandes com múltiplos quistos de dimensões variadas, mas não foram evidentes angiomiolipomas a nível renal (Figura 4). O ecocardiograma excluiu a presença de rabdomiossarcomas cardíacos. O rastreio familiar de ET foi negativo. A presença neste doente de mais de 2 critérios “major” de esclerose tuberosa em associação com doença renal poliquística com manifestações severas em idade precoce, conduziu à suspeita de Síndrome do gene contíguo TSC2-PKD1. O cariótipo de alta resolução foi nor-

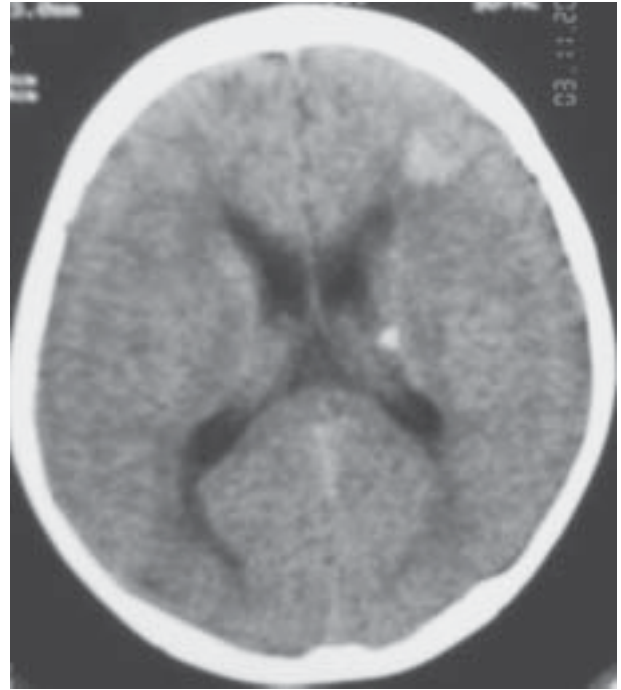


Figura 2: TAC cerebral com lesões hipodensas sugestivas de esclerose tuberosa.

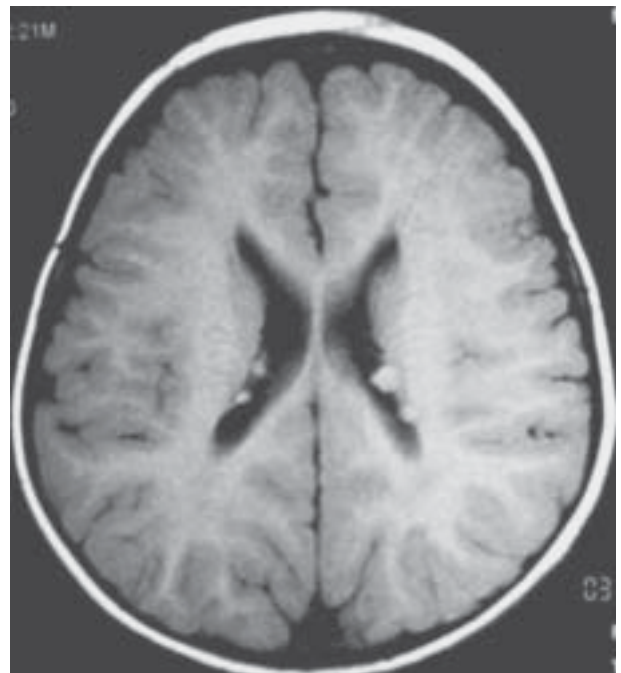


Figura 3: Ressonância magnética cerebral com nódulos subependimários nos ventrículos laterais.



Figura 4: TAC abdominal apresenta rins de grandes dimensões e múltiplos quistos de dimensões variadas.

mal (46,XY). O estudo genético de hibridização fluorescente “*in situ*” (FISH) (Institute of Human Genetics – University de Heidelberg), confirmou a existência da síndrome do gene contíguo TSC2-PKD1. A evolução clínica desta criança, caracterizou-se por um ligeiro atraso de desenvolvimento psicomotor, mais notório ao nível da linguagem. Mantém alguns episódios convulsivos, apesar de se encontrar medicado com valproato de sódio e a hipertensão arterial está controlada com captopril e propranolol. O último controlo analítico e imagiológico realizado, aos 2 anos e 9 meses de idade, apresentava uma depuração de creatinina de 68 ml/min/1,73m² e rins com diâmetro bipolar à direita de 137mm e à esquerda de 141mm, com múltiplos quistos renais bilaterais.

DISCUSSÃO

O termo síndrome do gene contíguo, descreve o atingimento de dois genes adjacentes causado por uma única mutação. A hipótese de que a associação da DPRAD e ET poderia ser causada por uma deleção na zona de transição dos genes PKD1 e TSC2 foi provada por Brook-Carter *et al.*¹⁵

Estes autores demonstraram a presença em 6 doentes com a associação de DPRAD e ET, de deleções submicroscópicas no cromossoma 16p13.3, envolvendo os genes TSC2 e PKD1. Em todos os doentes analisados a doença apresentou-se precocemente na infância com rins poliquísticos de grandes dimensões. O síndrome do gene contíguo TSC2/PKD1 foi confirmada por Sampson *et al.* o qual observou a presença da deleção, em 22 dos 27 doentes com a associação de ET e DPRAD. Em 17 doentes com mutação, a idade média de apresentação da doença foi aos 6 meses (1 mês a 10 anos), e em 83% dos casos tinham massas abdominais e distensão franca devido à presença de quistos renais de grandes dimensões. A doença renal poliquística era moderada nos doentes sem a deleção TSC2/PKD1¹².

O diagnóstico de DPRAD é geralmente estabelecido numa criança com história familiar de DPRAD e ecografia renal revelando rins bilateralmente aumentados de volume e presença de quistos¹⁸⁻²¹. Sessenta por cento das crianças com idade inferior a 5 anos apresentam quistos renais detectáveis por ecografia²².

O diagnóstico diferencial de rins de grande volume com quistos no recém-nascido e lactente, na ausência de doença poliquística nos pais, prende-se essencialmente com a doença poliquística renal autossómica recessiva (DPRAR). Os quistos renais na DPRAR são geralmente de menores dimensões dos que os encontrados no nosso doente e estão localizados aos tubulos colectores. Contudo, na infância estas duas entidades podem parecer similares nos achados ecográficos¹.

Por outro lado, a ausência de envolvimento pela doença nos progenitores e após exclusão de não paternidade, não leva à exclusão desse diagnóstico num filho, quando existem alterações ecográficas renais sugestivas de DPRAD, dado a possibilidade de estarmos em presença de uma mutação *de novo*. Não podemos deixar

de equacionar que a DPRAD sem envolvimento do gene TSC é uma importante entidade clínica na criança e muito mais frequente que o síndrome de gene contíguo TSC2/PKD1.

Neste síndrome, um efeito sinérgico ou aditivo resultante da deleção dos genes envolvidos poderá ser responsável pela gravidade das manifestações clínicas observadas^{1,15,23}. Ambas as doenças, ET e DPRAD apresentam quistos renais e é ainda difícil definir a contribuição de cada gene na doença renal do síndrome de gene contíguo TSC2/PKD1¹. O prognóstico da doença renal parece ser mais adverso nos doentes com deleção TSC2/PKD1 do que em doentes com mutações PKD1 ou PKD2 isoladas, apresentando IRCT numa idade mais precoce. Este facto parece dever-se às lesões renais adicionais provocadas pelos angiomiolipomas e quistos, que “*per se*” podem levar a insuficiência renal. A HTA pode também ser mais grave, resultando na aceleração da progressão para IRCT^{15,16,23}. Vários estudos mostram que a DPRAD precoce e grave na infância, parece estar restrita ao chamado síndrome do gene contíguo¹. Contudo, Smulders et al²⁴ sugere que a doença poliquística juvenil severa não é uma característica constante no síndrome do gene contíguo TSC2/PKD1 e recentemente foram descritos adultos com esta síndrome sem manifestações importantes da doença renal na infância²⁵.

As manifestações renais neste síndrome podem surgir mais precocemente que os estigmas que levam ao diagnóstico de ET, como no nosso doente. Convulsões e atraso mental podem aparecer nos casos graves de ET. O seguimento neurológico destas crianças e uma optimização do controlo dos espasmos infantis poderão melhorar o seu estado cognitivo.

A hibridização fluorescente “*in situ*” foi efectuada de acordo com a descrição de Litcher and Cremer²⁶. A região 16p13.3 é uma das regiões críticas para a ET. Para o rastreio da deleção foram usadas uma sonda cosmídea (313F2, localizada

distalmente ao gene TSC2) e uma sonda plasmídea (cw23, abrangendo a região 3’ do gene TSC2 e a região 3’ do gene PKD1). Estas sondas foram hibridizadas com células do doente em metafase. Foi também hibridizada uma sonda de referência para o braço curto ou longo do cromossoma 16 (pcp-16p/pcp-16q). De um total de 27 metafases analisadas, a sonda cw23 mostrou em 24 mitoses apenas um sinal de hibridização específico em 16p13. Foram observados dois sinais de hibridização para a sonda cw23 em 3/27 mitoses. A sonda cosmídea (313F2) mostrou dois sinais de hibridização no total de 10 metafases analisadas. A análise de FISH detectou uma deleção no gene TSC2 confirmando o diagnóstico de ET. Os resultados de hibridização tornam possíveis duas explicações: mosaicismo com células normais em 3/27 “*spreads*” metafase observadas, ou um “*breakpoint*” localizado na região abrangida pela sonda cw23, na qual puderam ser observados 2 sinais em 3/27 mitoses analisadas. A intensidade dos sinais observados, torna a segunda hipótese mais provável. Através deste estudo genético foi possível confirmar o nosso diagnóstico clínico de síndrome do gene contíguo TSC2/PKD1.

CONCLUSÃO

O síndrome do gene contíguo TSC2/PKD1 é uma entidade rara, que deve ser equacionada na avaliação clínica de crianças com ET associada a DPRAD e de forma mais geral na avaliação de todos os doentes com DPRAD que desenvolvem IRCT antes da quarta década de vida. Nestes, lesões cutâneas sugestivas de ET e outros estigmas da doença deverão ser procurados, os quais num exame menos cuidadoso do doente poderão passar despercebidas.

Uma detecção precoce da doença poderá levar a uma intervenção oportuna do ponto de vista nefrológico através de um bom controlo

tensional e da utilização de inibidores de enzima de conversão da angiotensina e/ou inibidores dos receptores da angiotensina 2, o que poderá atrasar a progressão da doença renal. Por outro lado, a terapêutica precoce e adequada dos espasmos infantis em crianças com ET poderá melhorar o prognóstico cognitivo.

Finalmente, os autores destacam a importância do aconselhamento genético, dado que o mosaicismo da linha germinal pode ocorrer em 10-25% dos casos. Os pais sem evidência de critérios “*minor*” ou “*major*” de ET e que têm um filho com esta doença deverão receber aconselhamento genético.

Referências

1. Laass MW, Spiegel M, Jauch A *et al.* Tuberous sclerosis and polycystic kidney disease in a 3-month-old infant. *Pediatr Nephrol* 2004;19:602-608.
2. Osborne JP, Fryer A, Webb D. Epidemiology of tuberous sclerosis. *Ann N Y Acad Sci.* 1991;615:125-127.
3. Jones AC, Shyamsundar MM, Thomas MW *et al.* Comprehensive mutation analysis of TSC1 and TSC2-and phenotypic correlations in 150 families with tuberous sclerosis. *Am J Hum Genet* 1999;64:1305-1315.
4. Roach ES, Gomez MR, Northrup H. Tuberous sclerosis complex consensus conference: revised clinical diagnostic criteria. *J Child Neurol.* 1998;13:624-628.
5. Ewalt DH, Sheffield E, Sparagana SP *et al.* Renal lesion growth in children with tuberous sclerosis complex. *J Urol* 1998;160:141-145.
6. Shepherd CW, Gomez MR, Lie JT *et al.* Causes of death in patients with tuberous sclerosis. *Mayo Clin Proc* 1991;66:792-796.
7. Rossetti S, Strmecki L, Gamble V *et al.* Mutation analysis of the entire PKD1 gene: genetic and diagnostic implications. *Am J Hum Genet* 2001;68:46-63.
8. Gabow PA. Autosomal dominant polycystic kidney disease. *N Engl J Med* 1993;329:332-342.
9. The polycystic kidney disease 1 gene encodes a 14 kb transcript and lies within a duplicated region on chromosome 16. The European Polycystic Kidney Disease Consortium. *Cell* 1994;77(6):881-894.
10. McConnell RS, Rubinsztein DC, Fannin TF *et al.* Autosomal dominant polycystic kidney disease unlinked to the PKD1 and PKD2 loci presenting as familial cerebral aneurysm. *J Med Genet* 2001;38:238-240.
11. Paterson AD, Pei Y. Is there a third gene for autosomal dominant polycystic kidney disease? *Kidney Int* 1998;54:1759-1761.
12. Sampson JR, Maheshwar MM, Aspinwall R *et al.* Renal cystic disease in tuberous sclerosis: role of the polycystic kidney disease 1 gene. *Am J Hum Genet* 1997;61:843-851.
13. Murcia NS, Woychik RP, Avner ED. The molecular biology of polycystic kidney disease. *Pediatr Nephrol* 1998;12:721-726.
14. O'callaghan FJ. Tuberous sclerosis. *BMJ* 1999;318:1019-1020.
15. Brook-Carter PT, Peral B, Ward CJ *et al.* Deletion of the TSC2 and PKD1 genes associated with severe infantile polycystic kidney disease—a contiguous gene syndrome. *Nat Genet* 1994;8:328-332.
16. Sperandio M, Weber L, Jauch A *et al.* Cutaneous white spots in a child with polycystic kidneys: a clue to TSC2/PKD1 gene mutation. *Nephrol Dial Transplant* 2000;15:909-912.
17. Griffin MD, Gamble V, Milliner DS *et al.* Neonatal presentation of autosomal dominant polycystic kidney disease with a maternal history of tuberous sclerosis. *Nephrol Dial Transplant* 1997;12:2284-2288.
18. Cole BR, Conley SB, Stapleton FB. Polycystic kidney disease in the first year of life. *J Pediatr* 1987;111:693-699.
19. Kaariainen H, Jaaskelainen J, Kivisaari L *et al.* Dominant and recessive polycystic kidney disease in children: classification by intravenous pyelography, ultrasound, and computed tomography. *Pediatr Radiol* 1988;18:45-50.
20. Journal H, Guyot C, Barc RM *et al.* Unexpected ultrasonographic prenatal diagnosis of autosomal dominant polycystic kidney disease. *Prenat Diagn* 1989;9:663-671.
21. Fick-Brosnahan G, Johnson AM, Strain JD *et al.* Renal asymmetry in children with autosomal dominant polycystic kidney disease. *Am J Kidney Dis* 1999;34:639-645.
22. Gabow PA, Kimberling WJ, Strain JD *et al.* Utility of ultrasonography in the diagnosis of autosomal dominant polycystic kidney disease in children. *J Am Soc Nephrol* 1997;8:105-110.
23. Ong AC, Harris PC, Davies DR *et al.* Polycystin-1 expression in PKD1, early-onset PKD1, and TSC2/PKD1 cystic tissue. *Kidney Int* 1999;56:1324-1333.
24. Smulders YM, Eussen BH, Verhoef S *et al.* Large deletion causing the TSC2-PKD1 contiguous gene syndrome without infantile polycystic disease. *J Med Genet* 2003;40(2):E17.
25. Martignoni G, Bonetti F, Pea M *et al.* Renal disease in adults with TSC2/PKD1 contiguous gene syndrome. *Am J Surg Pathol* 2002;26:198-205.
26. Lichter P, Cremer T. Chromosome analysis by non-isotopic in situ hybridization. In: Rooney DE, Czepulkowski BH (eds) *Human cytogenetics: a practical approach*, vol 1. Oxford University Press, 1992, pp 157-192