

ASPECTOS GENÉTICOS E CLÍNICOS DA NEUROFIBROMATOSE 1

Daniela Ferreira de Jesus¹ e Catarina A. Miyamoto²

¹Graduanda em Biomedicina das Faculdades Integradas de Três Lagoas – AEMS

²Docente das Faculdades Integradas de Três Lagoas – AEMS, Doutora em Ciências Biológicas (Bioquímica) – USP, pós doutorado – Weill Medical College of Cornell University.

RESUMO

A neurofibromatose tipo 1 (NF1) é uma doença genética com estimativa de incidência de 1:3.000 indivíduos afetados no mundo. Esta patologia caracteriza-se pelo envolvimento sistêmico e progressivo principalmente do SNC, e deformidade física. Indivíduos afetados apresentam neoplasmas da glia (gliomas ópticos e astrocitomas malignos) e disfunção neuronal (desabilidade no aprendizado e déficit de atenção). O diagnóstico deve ser realizado o mais precoce possível, inicialmente com o histórico familiar seguido de exames clínicos e laboratoriais. O objetivo deste trabalho é discutir os aspectos genéticos, as manifestações clínicas e o diagnóstico da neurofibromatose 1.

Palavras- chave: facomatose, neurofibromina, Doença de Von Recklinghausen.

1. INTRODUÇÃO

Neurofibromatose 1 (NF1) corresponde a uma facomatose (grupo de doenças genéticas), de herança autossômica dominante, que afeta primeiramente os tecidos neurais embrionários, e posteriormente vários sistemas e órgãos. Duas formas distintas de Neurofibromatose são conhecidas: Neurofibromatose tipo 1 (NF1) e Neurofibromatose tipo 2 (NF2). Os dois tipos desta doença têm caráter autossômico dominante, embora haja raros casos de mosaicismo germinativo – mutações gênicas nas células embrionárias (óvulos e espermatozoides) (KORF, 2013).

A NF1, ou “Doença de Von Recklinghausen”, ocorre devido à mutação do gene da proteína neurofibromina, localizado no cromossomo 17q11.2 do genoma humano, e pode acometer crianças e adultos (GUTMANN et al, 2012). Os mesmos podem desenvolver tumores benignos e malignos no sistema nervoso periférico (SNP) e no sistema nervoso central (SNC) (GUTMANN et al, 2012). Quando o SNC é comprometido, podem ocorrer desabilidades cognitivas, problemas

comportamentais e motores (ISENBERG et al, 2012; SOUCY et al, 2012). Adultos com NF1 têm 50-100 vezes mais chances de desenvolver gliomas malignos (RASMUSSEN et al, 2001; GUTMANN et al, 2002). Embora estes tumores sejam raros, frequentemente são fatais e não respondem a terapias convencionais (GUTMANN et al, 2012).

O rastreamento de mutações no gene *NF1* é realizado através de (i) teste do truncamento de proteína (Protein Truncation Test – PTT), (ii) técnica de hibridização *in situ* fluorescente (Fluorescent *in situ* Hybridization – FISH) e (iii) verificação de mutação gênica pontual por reação em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction – PCR) seguida de sequenciamento de DNA (GELLER & BONALUMI, 2004).

Embora não haja cura para NF1, há tratamentos paliativos para amenizar as manifestações clínicas, e conseqüente melhora da qualidade de vida. O tratamento cirúrgico é indicado somente para casos em que a região afetada não coloque o paciente em risco de vida. Quando não há indicação de procedimento cirúrgico, o paciente é acompanhado através do controle da pressão arterial, de exames de audiometria e de ressonância magnética de imagem (RMI) da base do crânio. Este último é essencial para se observar o desenvolvimento do crescimento de tumores preexistentes e de neoplasias malignas (ROSSI, PINHO, 1999). O aconselhamento genético é recomendado para pacientes e familiares para que sejam orientados sobre a doença (MUNIZ, 1998).

O objetivo deste trabalho é descrever e discutir os aspectos genéticos, as manifestações clínicas e o diagnóstico da NF1.

2. ASPECTOS GENÉTICOS E MOLECULARES DA NEUROFIBROMINA

A neurofibromatose 1 é uma síndrome com predisposição a tumor, causada por mutações que resultam na perda da função do gene *NF1*. É de herança autossômica dominante, em que todo indivíduo afetado possui mutação germinativa no gene *NF1* (KORF, 2013). Pode acometer crianças e adultos (GUTMANN et al., 2012) e estima-se que a incidência seja de 1:3.000 indivíduos no mundo todo (GELLER & Bonalumi, 2004).

O gene *NF1*, localizado no cromossomo 17q11.2 em humanos, contém 60 exons, abrange cerca de 280 kb do DNA genômico (KLOSE et al., 2008). O

transcrito primário pode sofrer *splicings* alternativos nos exons 9a, 23a e 48a (GELLER & Bonalumi, 2004). Os mRNAs resultantes (11-13 kb) codificam quatro isoformas da neurofibromina (GUTMANN et al., 1992). A isoforma tipo 1, expressa principalmente no SNC com predomínio no cérebro, não contém os aminoácidos codificados pelos exons 9a, 23a e 48a. A isoforma tipo 2, presente predominantemente nas células de Schwann, é produto da tradução do exon 23a. A isoforma tipo 3 é resultante do *splicing* do exon 48a, enquanto a isoforma tipo 4, dos exons 23a e 48a. As duas últimas isoformas são expressas na musculatura cardíaca, esquelética e lisa (GELLER & BONALUMI, 2004). O transcrito mais comum codifica uma proteína com 2818 resíduos de aminoácidos de 327 kDa (GELLER & BONALUMI, 2004). No entanto, a região com função conhecida que apresenta o domínio catalítico da proteína ativadora de GTPase Ras-específica (domínio GAP) contém 300 aminoácidos (XU et al., 1990).

No interior do intron 27b são encontrados três genes distintos: *OMGP*, *EV12A* e *EV12B*, cada um com dois exons, e transcritos em sentido oposto ao do gene *NF1* (O'CONNEL et al., 1990). Não está esclarecido se esses três genes exibem alguma função na expressão de *NF1*. Sabe-se apenas que o gene *OMGP* codifica a glicoproteína de mielina do oligodendrócito ("Oligodendrocyte myelin glycoprotein"), uma glicoproteína de membrana, expressa no SNC durante a mielinização (WANG et al, 2002). Os genes *EV12A* e *EV12B* têm significado biológico ignoto (WANG et al, 2002).

A neurofibromina é uma proteína citoplasmática, expressa em altos níveis no sistema nervoso, e em menores quantidades nos demais tecidos (PASCHOU M, 2012).

A neurofibromina regula de forma negativa a atividade da proteína Ras p21 (BASU et al, 1992; BOLLAG et al, 1996; DAVID et al, 2012; McCLATCHEY et al., 2012). Contém, em sua estrutura, o domínio da proteína ativadora de GTPase Ras-específica (domínio GAP), que ao se interagir com Ras, faz com que esta sofra mudança conformacional e a atividade GTPásica intrínseca da mesma é fortemente estimulada. Deste modo, GTP ligado a Ras (forma ativa) é rapidamente hidrolisado a GDP (forma inativa), e assim a via de sinalização mitogênica na célula é diminuída. Deste modo, a neurofibromina determina a diminuição da sinalização da proliferação celular, ou seja, é um regulador negativo da via de transdução de sinal mediada por Ras (DAVID H, 2012). Como a cascata Ras é crítica para o controle do crescimento

e diferenciação celular, a neurofibromina não funcional resulta em ativação constitutiva (não controlada) desta via central de sinalização e crescimento celular (HANNAN et al, 2006).

A neurofibromina também controla de modo positivo a atividade da adenilato ciclase (AC) e os níveis intracelulares de AMP cíclico (cAMP). Baixos níveis deste último em astrócitos e neurônios estão associados à ausência ou pequena expressão de neurofibromina, embora este mecanismo não esteja totalmente elucidado (TONG et al., 2002; DASGUPTA et al., 2003).

3. DIAGNÓSTICO CLÍNICO-LABORATORIAL DA NEUROFIBROMATOSE 1

As características clínicas da NF1 são manchas café-com-leite, neurofibromas dérmicos, subcutâneos e plexiformes, efélides axilares e inguinais, nódulos de Lisch, glioma do nervo óptico, anormalidades esqueléticas (tais como pseudo-artrose de tibia, escoliose, cifose, entre outras) e dificuldades na aprendizagem (MUNIZ et al., 2002).

O diagnóstico clínico da NF1 é baseado em critérios clínicos estabelecidos em uma conferência realizada no Instituto Nacional da Saúde, Bethesda, EUA – National Institute of Health (NIH), em 1987(GELLER & BONALUMI, 2004). Os critérios estabelecidos estão mostrados na tabela 1.

Tabela 1- Critérios para diagnóstico clínico da NF1, conforme NIH 1987:

-
- 1-Seis ou mais manchas café-com-leite com diâmetro >5 mm em indivíduos pré-púberes, ou > 15 mm em pós-púberes.
 - 2-Dois ou mais neurofibromas de qualquer tipo ou um neurofibroma plexiforme.
 - 3-Sardas ou efélides na região axilar e inguinal.
 - 4-Glioma do nervo óptico.
 - 5-Dois ou mais nódulos de Lisch.
 - 6-Lesões ósseas distintas, como a displasia fibrosa ou afilamento da cortical de ossos longos com ou sem pseudo-artrose.
 - 7-Parente em primeiro grau com NF1
-

O diagnóstico é confirmado se o paciente apresentar pelo menos duas ou mais das manifestações descritas na tabela 1 (GELLER & BONALUMI, 2004).

Exames complementares para diagnosticar a doença são também utilizados. Dentre estes, incluem-se tomografia computadorizada (angiografia, colonoscopia e broncoscopia), ressonância magnética de imagem (RMI), espectroscopia de prótons (EP) para avaliação dos metabólitos cerebrais, exames cutâneos da hiperpigmentação com lâmpada Wood, biópsias dos neurofibromas, exame oftalmológico, avaliação auditiva, teste de QI e análise psicológica (FERNER RE, 2013).

Testes genéticos moleculares para rastreamento de mutação no gene NF1 são realizados principalmente em gestantes. Entre os mesmos incluem-se: FISH, análise de polimorfismo conformacional de cadeia simples (SSCP) e de Heteroduplex, eletroforese em gel com gradiente de temperatura (TGGE) ou desnaturante (DGGE) e o teste de truncamento de proteína (PTT, protein truncation test). Este último é um dos métodos mais efetivos, pois detecta proteínas truncadas (DUNNEN, OMMEN, 1999). Neste método, o cDNA do paciente, preparado pela técnica de RT-PCR (reação da transcriptase reversa seguida da reação em cadeia da polimerase) (ROSSI, PINHO, 1999), é utilizado como molde para transcrição e tradução *in vitro*. Deste modo, é possível observar e identificar proteínas truncadas originadas de alelos nas quais as mutações produziram um códon de terminação. O teste FISH é eficiente para casos em que ocorre deleção total do gene em questão. Ou seja, o mesmo não se hibridiza com a sonda fluorescente (FERNER RE, 2013).

A realização dos testes de mutação só é possível mediante consentimento do paciente. O mesmo deve fazer a seguinte declaração de forma escrita: “Seu médico de referência fez o diagnóstico de NF1, porque você apresentou os critérios de diagnóstico do NIH. Mesmo assim, você gostaria de realizar os exames de análises de mutação”. Após confirmação do prognóstico positivo para NF1, o paciente terá acompanhamento regular do médico e apoio psicológico para si e para seus familiares (GELLER & BONALUMI, 2004).

Em casos de crianças, a Academia Americana de Pediatria (APP) sugere certas medidas específicas após diagnóstico. Os pais devem ser esclarecidos quanto à definição da doença desde a sua história, causa e suas manifestações, embora não seja possível prever local, gravidade das lesões e sua progressão (FERNER RE, 2013). A criança deve passar por consultas médicas regulares em que o exame clínico deve conter monitoração da pressão arterial e atenção ao desenvolvimento neural (GELLER & BONALUMI, 2004).

4. CONCLUSÃO

A neurofibromatose tipo 1 representa uma entidade clínica complexa que exige o envolvimento multidisciplinar ao longo de sua história natural. Os aspectos moleculares da doença teve melhor entendimento após isolamento e estudo das funções do gene *NF1*. Utilização de técnicas de alta sensibilidade, como PTT e FISH tem sido de grande valia para a detecção de mutações. Estas mesmas técnicas, além do seqüenciamento de DNA, podem ser empregadas parapesquisa de mutações ainda não identificadas.

As funções dos três genes contidos no gene *NF1* (*EVI2A*, *EVI2B* e *OMGP*) permanecem desconhecidas. Dessa forma, o estudo de suas funções, assim como a análise mutacional desses genes é também de grande interesse médico.

Estudos da evolução natural e um melhor entendimento molecular da *NF1* facilitarão as interpretações dos estudos clínicos terapêuticos, assim como o desenvolvimento de novas terapias para tratamento.

O aconselhamento genético para casais com *NF* é muito importante. O conselheiro deve esclarecer as dúvidas sobre a possibilidade de nascer um filho afetado. Caso um dos pais for afetado, o filho tem 75% de chance de nascer com a doença, porém trata-se de uma patologia com manifestações imprevisíveis. Outro fator importante é que, se a mãe for afetada, há grande chance de que a gravidez não transcorra naturalmente até o final (GELLER & BONALUMI, 2004). Em última análise, cabe ao casal decidir pela gravidez ou não.

5. Referências bibliográficas

CHISTI AH, Kim AC, Marfatia SM, Lutchman M, Hanspal M, Jindal H et al (1998) **The FERM domain: a unique module involved in the linkage of cytoplasmic proteins to the membrane.** *Trends Biochem Sci* 23: 281-2.

XU GF, Xu GF, O'Connell P, Viskochil D, Cawthon R, Robertson M, Culver M, Dunn D, Stevens J, Gesteland R, White R (1990) The neurofibromatosis type 1 gene encodes a protein related to GAP. *Cell* 62:599–608.

DAVID H, Parada LF, Silva AJ, Ratner N et al (2012) Neurofibromatosis Type 1: Modeling CNS Dysfunction. *The J. of Neuroscience* 32(41):14087–14093.

DEN DUNNEN JT & Van Ommen GJ (1999) The protein truncation test: A review. *Hum mutat* 14:95-102.

FERNER RE & GUTMANN DH (2013) Neurofibromatosis type 1 (NF1): diagnosis and management. *Handb. Clin. Neurol.* 115:939-55. doi: 10.1016/B978-0-444-52902-2.00053-9.

GELLER M, Bonalumi FA. (2004) Neurofibromatose:Clínica,Genética e Terapêutica. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.

GUTMAN DH, Collins FS. (1992) Recent progress toward understanding the molecular biologic of Von Recklinghausen neurofibromatosis. *Ann Neurol* 31:A5.

KLOSE A, Ahmadian MR ET AL. (1998) Selective disactivation of neurofibromin GAP activity in Neurofibromatosis type 1. *Hum Mol Genet* 7(8):1261-8.

KORF BR (2013) Neurofibromatose.*Handb Clin Neurol* 111:333-40.

MCCLATCHEY AI & Cichowski K. (2012) SPRED proteins provide a NF-ty link to Ras suppression. *Genes Dev.* 26 (14):1515-9.

MUNIZ MP (1998). Investigação radiológica de pacientes portadores de Neurofibromatose. Mestrado em Medicina. Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto.

MUNIZ MP, Almeida JRM, Aires AS, França FC, Goloni Bertollo EM. (2002) Prevalência de achados radiográficos da Neurofibromatose tipo 1.estudo de 82 casos. *Radiol. Bras.* 35: 65-70.

O'Connel, P. et al. (1990) The human homologo f murine Evi-2 lies between two Von Recklinghausen neurofibromatosis translocations. *Genomics* 7(4): 547- 554.

PASCHOU M, DOXAKIS E (2012) Neurofibromin 1 is a miRNA target in neurons. PLoS ONE 7(10): e46773. doi:10.1371/journal.pone.0046773

Rossi BM, Pinho M. (1999) Genética e Biologia Molecular para cirurgião, 1ª Ed.São Paulo,Ed.Lemar.

Wang, K. C. et al. (2002) Oligodendrocyte- myelin glycoprotein is a Nogo receptor ligand that inhibits neurite outgrowth. Nature 417 (6892):941- 944.