

ALESSANDRA BERNADETE TROVÓ

Análise Molecular de Pacientes com Lesões  
Clínicas de Neurofibromatose Tipo 1

UNESP  
FACULDADE DE  
CIÊNCIAS

1910001010



**ALESSANDRA BERNADETE TROVÓ**

**ANÁLISE MOLECULAR DE PACIENTES COM SINAIS  
CLÍNICOS DE NEUROFIBROMATOSE TIPO 1**

**Dissertação apresentada para  
obtenção do Grau de Mestre em  
Genética.**

---

**São José do Rio Preto - SP  
2001**



**ALESSANDRA BERNADETE TROVÓ**

**ANÁLISE MOLECULAR DE PACIENTES COM SINAIS  
CLÍNICOS DE NEUROFIBROMATOSE TIPO 1**



T1010/01

Dissertação apresentada para  
obtenção do Grau de Mestre em  
Genética.

Orientadora: Profa. Dra. Eloiza Helena Tajara da Silva

Co-orientadora: Profa. Dra. Eny Maria Goloni-Bertollo

---

São José do Rio Preto-SP

2001



575  
T.862a

Genética

Assunto CAPES:

2.02.05.00-7-Genética Humana e Médica

O Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas,  
Área de Concentração em Genética, passou a denominar-se  
Programa de Pós-Graduação em Genética pela Resolução  
UNESP nº RU. 10/01 de 08/03/2001, DOE de 09/03/2001.

Trovó, Alessandra Bernadete.

Análise molecular de pacientes com sinais clínicos de  
neurofibromatose tipo 1 / Alessandra Bernadete Trovó. – São José do Rio  
Preto : [s.n.], 2001.

128 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Eloiza Helena Tajara da Silva

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista. Instituto de  
Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Neurofibromatose tipo 1. 2. Mutações. 3. Gene *NF1*. 4. Leucemia.  
5. PCR-SSCP. I. Silva, Eloiza Helena Tajara da. II. Universidade  
Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III.  
Título.

CDU - 575

**ALESSANDRA BERNADETE TROVÓ**

**ANÁLISE MOLECULAR DE PACIENTES COM SINAIS  
CLÍNICOS DE NEUROFIBROMATOSE TIPO 1**

**COMISSÃO JULGADORA**

**DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE**

Presidente e Orientador: .....

2º Examinador .....

3º Examinador .....

São José do Rio Preto, 22/06/2001.



O presente trabalho foi realizado no Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE) de São José do Rio Preto, da Universidade Estadual Paulista (UNESP), sob orientação da Profa. Dra. Eloiza Helena Tajara da Silva e co-orientação da Profa. Dra. Eny Maria Goloni Bertollo, com auxílio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).



## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho*

*À minha família: meus amados pais, João Walcyr e Norma, que deram muito de si para minha formação pessoal e profissional, muitas vezes deixando de realizar os seus sonhos para realizar os meus e ao meu irmão Alam que mesmo de longe sempre se mostrou interessado e presente em meu trabalho.*

*Ao meu namorado Júnior pela paciência e por todos os momentos de renúncia.*



## AGRADECIMENTOS

Muitos foram os que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho. A todos, meus mais sinceros agradecimentos.

À Profa. Dra. Eloiza Helena Tajara da Silva, modelo de pesquisadora, pela orientação segura, amizade, bem como pela confiança em mim depositada desde o início deste trabalho.

À Profa. Dra. Eny Maria Goloni-Bertollo, pela co-orientação e principalmente pela convivência amigável nestes dois anos.

Ao Prof. Dr. Paulo Alberto Otto, pela atenção e análise da pró-forma, por todas as sugestões e pela disponibilidade em contribuir para o enriquecimento do mesmo.

À Profa. Dra. Ana Elizabete Silva, pela análise minuciosa da pró-forma, a qual foi feita com extremo carinho e por estar novamente presente em mais uma etapa de minha vida.

À Dra. Claudete Esteves Klumb do Instituto Nacional do Câncer (INCA), RJ, por ter cedido gentilmente as amostras de pacientes com leucemia.

À Profa. Dra. Maria Elisabete Jorge Amaral, pela facilidade de acesso e utilização dos equipamentos do Laboratório de Mapeamento Bovino.

À Profa. Dra. Érica C. Pavarino-Bertelli, que me proporcionou com muita paciência e dedicação o aprendizado das técnicas básicas de biologia molecular, e pela amizade inestimável dispensada.

Aos Profs. do Curso de Pós-Graduação do IBILCE-UNESP pelos preciosos ensinamentos.



*Aos pacientes portadores de Neurofibromatose Tipo 1, pela pronta colaboração e disponibilidade de comparecer sempre com muita simpatia e boa vontade as diversas convocações.*

*Aos profissionais do CEPAN (Centro de Pesquisas e Atendimento em Neurofibromatose), especialmente aos psicólogos Marcos e Nelson pela disponibilidade e amizade dispensada neste período.*

*Aos funcionários do Departamento de Biologia e da Seção de Pós-Graduação, especialmente à Simone e Rosana pela colaboração na execução dos diversos trabalhos e ao amigo Josué.*

*A bibliotecária Elza pela colaboração na aquisição dos artigos científicos.*

*Aos funcionários da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP) Ana, Eliana e especialmente ao Celso pela disponibilidade e dedicação na execução de serviços de edição final do texto.*

*À Profa. Dra. Paula Rahal por todas as sugestões e amizade e ao "pessoal do genoma" Janaína, Míriam, Gustavo e Nelson por sua contribuição no seqüenciamento e na parte computacional.*

*Ao Prof. Raghuvir C. Arni do Departamento de Física deste Instituto, que incentivou meus primeiros passos na carreira científica.*

*Aos amigos do Departamento de Física pelos primeiros ensinamentos das técnicas de laboratório.*

*Aos queridos amigos Lucimari, Marcos e Mariangela por compartilharem comigo os bons e maus momentos, as minhas vitórias e derrotas e por todo carinho, apoio e conselhos.*

*Aos estimados amigos do Laboratório de Biologia Molecular, em especial Flávia, Sylvia, Ana Cristina, Fernanda, Giovana, Paola, Jucimara, Fabrício, Ulisses e os do Curso de Pós-Graduação,*

*especialmente Alessandra Laranja, Luciane, Juliana pelo apoio e convivência agradável.*

*À direção do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, IBILCE-UNESP, pela infra-estrutura de ensino e pesquisa.*

*À FAPESP – Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, pela concessão da bolsa e apoio financeiro para a realização deste trabalho.*

*A toda minha família que sempre me apoiou.*

*Desejo, sobretudo, agradecer nesse momento meus pais, João Walcyr e Norma, que sempre estiveram ao meu lado, incentivando e apoiando-me , e que me deram sempre o seu amor incondicional.*

*A meu irmão Alam, pela amizade, carinho e apoio, que foram essenciais em minha trajetória.*

*A meu namorado Junior, pelo carinho, paciência e compreensão nas várias vezes que abri mão de sua companhia em função dos estudos.*

*Aqueles que por ventura não foram citados aqui, mas que contribuíram de alguma forma, o meu muito obrigado.*

*E a Deus por tudo.*

*“ O homem erudito é um descobridor de fatos que já existem, mas o homem sábio é um criador de valores que não existem e que ele faz existir ”.*

*Albert Einstein*

*“ É muito melhor arriscar coisas grandiosas, alcançar triunfo e glória, mesmo expondo-se à derrota, do que formar fila com os pobres de espírito, que nem sofrem muito, nem gozam muito, porque vivem nesta penumbra cinzenta que não conhecem a vitória nem a derrota”.*

*Frankilin Rossevelt*



## SUMÁRIO

|                                                                           |            |
|---------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>I. INTRODUÇÃO.....</b>                                                 | <b>10</b>  |
| <b>II. OBJETIVOS .....</b>                                                | <b>25</b>  |
| <b>III. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>                                      | <b>26</b>  |
| III. 1. Caracterização dos pacientes .....                                | 26         |
| III. 2. Métodos .....                                                     | 40         |
| a) Extração de DNA .....                                                  | 40         |
| b) Amplificação do DNA .....                                              | 41         |
| c) Análise do polimorfismo conformacional de cadeia simples de DNA..      | 44         |
| d) Seqüenciamento automático .....                                        | 45         |
| <b>IV. RESULTADOS .....</b>                                               | <b>48</b>  |
| IV.1. Avaliação clínica dos pacientes.....                                | 48         |
| IV.2. Extração, amplificação por PCR e análise pela técnica de SSCP ..... | 49         |
| <b>V. DISCUSSÃO .....</b>                                                 | <b>73</b>  |
| <b>VI. CONCLUSÕES .....</b>                                               | <b>86</b>  |
| <b>VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>                              | <b>88</b>  |
| <b>VIII. APÊNDICE .....</b>                                               | <b>107</b> |
| <b>IX. RESUMO .....</b>                                                   | <b>127</b> |
| <b>X. ABSTRACT .....</b>                                                  | <b>128</b> |

## I. INTRODUÇÃO

### a) Aspectos Gerais e Principais Características

A neurofibromatose compreende um grupo de síndromes neurocutâneas de etiologia genética, que foram classificadas por Riccardi (1982) em oito tipos distintos: a neurofibromatose clássica (NF1), a acústica (NF2) e os tipos misto (NF3), variante (NF4), segmentar (NF5), mancha café-com-leite familiar (NF6), de início tardio (NF7) e não-especificado (NF8). Destas, somente a NF1 e NF2 são entidades clínicas bem definidas (Ars *et al.*, 1998) e tiveram seus genes identificados nos cromossomos 17 (Barker *et al.*, 1987) e 22 (Trofatter *et al.*, 1993), respectivamente.

A neurofibromatose tipo 1 (NF1) ou doença de von Recklinghausen compreende cerca de 90% dos casos diagnosticados de síndromes neurocutâneas (Goloni-Bertollo, 1994). É uma das doenças autossômicas mais comuns, com incidência de 1 em 3000-4000 indivíduos (Robinson *et al.*, 1995) e, embora seja sistêmica, o sistema nervoso e a pele são mais afetados (Serra *et al.*, 1997).

O critério diagnóstico para NF1 foi adotado pelo *National Institutes of Health* (NIH) em 1987 e atualizado em 1990 e é baseado na presença de duas ou mais das seguintes características: (a) seis ou mais manchas café-com-leite (MCCL) com mais de 5 mm de extensão em pacientes antes da puberdade ou com mais de 15 mm em pacientes depois da puberdade; (b) dois ou mais neurofibromas de qualquer tipo ou um neurofibroma plexiforme; (c) sardas nas regiões axilares ou inguinais; (d) glioma óptico; (e) dois ou mais nódulos de Lisch; (f) uma lesão óssea característica, como displasia do osso esfenóide ou afilamento dos ossos longos do córtex com ou sem pseudoartroses, e (g) quadro incompleto porém possuindo um parente em primeiro grau (pais, irmãos ou filhos) que satisfaz os critérios do NIH (Gutmann *et al.*, 1997). Dentre as características acima citadas, as mais frequentes são as manchas café-com-leite, os neurofibromas cutâneos ou subcutâneos, os nódulos de Lisch e as sardas ou efélides, que são consideradas como sendo do tipo *major*. Outras características



como escoliose, pseudoartrose, neoplasias, especialmente do tecido hematopoético, dificuldades na aprendizagem, baixa estatura e macrocefalia estão presentes em apenas uma minoria dos pacientes, sendo as duas últimas consideradas do tipo *minor* (Huson & Hughes, 1994, Messiaen *et al.*, 1997).

As manchas café-com-leite são lesões pigmentadas benignas que usualmente estão presentes no tronco, mas podem ser vistas em qualquer parte do corpo, embora sejam incomuns na face (Figura 1). Elas não são exclusivas de pacientes com NF1 e 11-25% dos indivíduos na população geral exibem uma ou duas de tais lesões. Clinicamente, não há diferenças entre as manchas café-com-leite dos pacientes com NF1 e aquelas presentes em indivíduos normais, exceto pelo número elevado entre os primeiros. São observadas em mais de 99% dos pacientes, geralmente ao nascimento ou após alguns meses ou anos de vida. Aumentam em tamanho e número durante a primeira década, especialmente nos dois primeiros anos (Farris & Grove, 1996, Ruggieri & Huson, 1999).

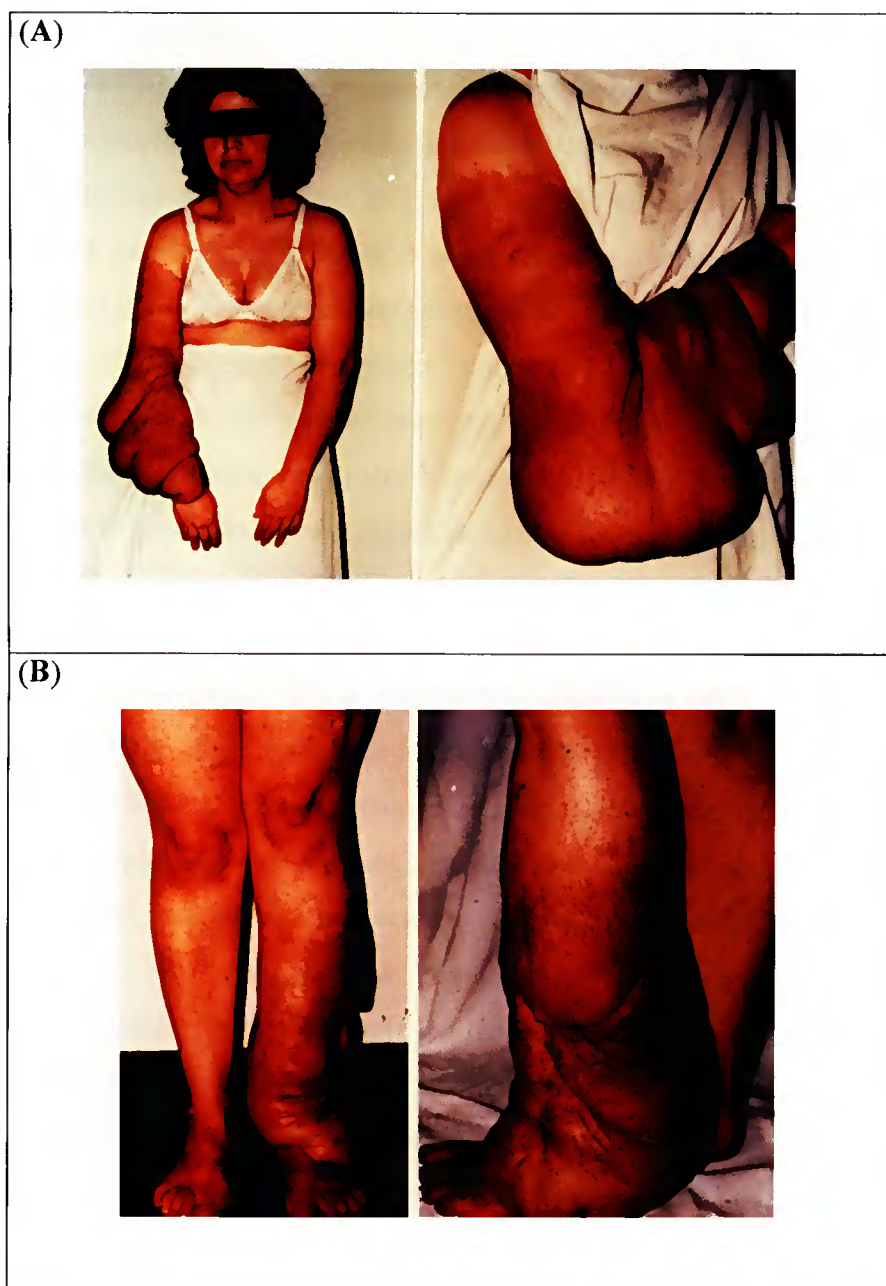
Os neurofibromas são tumores benignos que podem comprometer funções vitais, como a visão e a audição, em decorrência de compressão nervosa (Figuras 1 e 2). Localizam-se no tecido cutâneo e subcutâneo ou podem estender-se ao longo do trajeto de um nervo sendo, nesse último caso, denominados plexiformes (Goloni-Bertollo, 1994). Os dois primeiros são os mais freqüentes e atingem 67% e 24% dos pacientes, respectivamente, enquanto os plexiformes são de ocorrência congênita e observados em cerca de 5% dos casos (Farris & Grove, 1996).

Os neurofibromas cutâneos ou dérmicos movem-se junto com a pele, apresentam textura amolecida, raramente provocam dor mas, algumas vezes, causam prurido e podem aparecer em qualquer parte do corpo (Ruggieri, 1999). Os neurofibromas subcutâneos, ao contrário, são profundos na pele, mostram consistência firme e podem ser doloridos (Huson & Hughes, 1994) enquanto os plexiformes apresentam-se flácidos, embora ocasionalmente exibam fibras de nervos hipertrofiados em seu interior. A pele que sobrepõe esse último tipo é freqüentemente anormal e pode ser hiperpigmentada, hipertrofiada ou mostrar



**Figura 1** – Fotos de pacientes com NF1 mostrando manchas café-com-leite (A) e neurofibromas cutâneos (B), cedidas gentilmente pela Profa. Dra. Eny Maria Goloni-Bertollo.





**Figura 2** – Fotos de pacientes com NF1 apresentando neurofibromas plexiformes em membros superiores (A) e inferiores (B), cedidas gentilmente pela Profa. Dra. Eny Maria Goloni-Bertollo.

excessivo crescimento de pêlos. Os neurofibromas plexiformes costumam causar problemas estéticos e psicológicos sérios, além de intensas dificuldades motoras, mas sua ressecção completa por cirurgia infelizmente é um processo complexo devido à natureza difusa dessas lesões e à sua alta vascularização. Além disso, o resultado da intervenção cirúrgica é incerto porque o crescimento da lesão após sua retirada é um fenômeno comum (Ruggieri & Huson, 1997, Korf, 1999).

Os neurofibromas dérmicos normalmente aparecem após a pré-adolescência, quando se tornam numerosos, mas não possuem potencial para transformação neoplásica. Os neurofibromas plexiformes, por outro lado, atingem o tecido vizinho devido ao seu crescimento aberrante e podem originar tumores malignos da bainha do nervo periférico, freqüentemente referidos como neurofibrossarcomas ou schwannomas malignos (Gutmann *et al.*, 1997, Korf, 1999). Aproximadamente 2% a 6% dos pacientes com NF1 desenvolvem tais tumores (Serra *et al.*, 1997), que constituem a principal causa de morte e a neoplasia mais comum nesses pacientes (Rasmussem & Friedman, 2000). Outros processos neoplásicos menos comuns incluem glioma óptico, astrocitoma, feocromocitoma, rabdomiossarcoma e leucemia mielóide crônica juvenil (Gutmann *et al.*, 1997, Rasmussen & Friedman, 2000).

Uma característica importante em NF1 são os nódulos de Lisch, que foram descritos em 1937 por Karl Lisch e compreendem elevações arredondadas da superfície da íris, com coloração variando de transparente a amarelo ou marrom (Figura 3). Tais nódulos, considerados exclusivos desse tipo de neurofibromatose, são assintomáticos e não levam a qualquer complicação oftalmológica. São úteis para confirmação do diagnóstico e facilmente detectáveis em pessoas com íris claras. Em pessoas com íris castanhas ou negras são de difícil visualização, sendo melhor observados ao exame com lâmpada de fenda. Cerca de 5% das crianças afetadas com menos de três anos têm os nódulos, que são mais freqüentes na puberdade e aumentam em número com a idade, atingindo 90% dos adultos com mais de 20 anos (Goloni-Bertollo, 1994, Huson & Hughes, 1994, Farris & Grove, 1996, Ruggieri & Huson, 1999).

As efélides, também denominadas sardas, possuem coloração semelhantes às manchas café-com-leite, porém exibem tamanho menor (1-3 mm) e não estão relacionadas com exposição ao sol. Na maioria dos pacientes, são vistas nas regiões axilares ou inguinais em número igual ou superior a três, mas também são observadas na nuca, embaixo do queixo e na região submamária na mulher (Figura 4). Podem manifestar-se ao nascimento, mas são mais comuns na adolescência e na idade adulta, atingindo cerca de 90% dos afetados no caso das sardas axilares e 50 a 60% no caso das inguinais e submamárias (Gutmann *et al.*, 1997, Ruggieri & Huson, 1999).

A predisposição a doenças mielóides é citada por vários autores e, ao contrário das demais características, está restrita à infância, sendo os meninos mais afetados do que as meninas. O risco dessas doenças em portadores de NF1 é 200 a 500 vezes o risco de crianças normais. A leucemia mielogênica crônica juvenil (JCML) é a mais comum embora a leucemia mielogênica aguda (AML) e a síndrome mielodisplásica com monossomia 7 também sejam observadas, essa última especialmente como uma neoplasia secundária. Considerando que os sinais clínicos de neurofibromatose nem sempre são detectados nos primeiros anos da infância, é possível que crianças do sexo masculino com leucemia tenham, na verdade, mutações genéticas responsáveis pela NF1 (Shannon *et al.*, 1992, Shannon *et al.*, 1994, Luria *et al.*, 1997, Side *et al.*, 1997, 1998, Maris *et al.*, 1997, Garicochea *et al.*, 1998, Watanabe *et al.*, 1998).

## **b) Base Genética da NF1**

O gene responsável pela neurofibromatose tipo 1, designado *NF1*, foi mapeado na região pericentromérica do cromossomo 17 por análise de ligação (Barker *et al.*, 1987) e clonado por Cawthon *et al.* (1990a), Viskochil *et al.* (1990) e Wallace *et al.* (1990). Seu mapeamento foi facilitado pela descrição de dois pacientes com NF1 não relacionados apresentando translocações envolvendo a banda cromossômica 17q11.2 (Schmidt *et al.*, 1987, Ledbetter *et al.*, 1989). Sua organização genômica completa só foi relatada em 1995 por Li e colaboradores.





**Figura 3** – Foto apresentando os nódulos de Lisch, considerados exclusivos de NF1, cedida gentilmente pela Profª. Dra. Eny Maria Goloni-Bertollo.



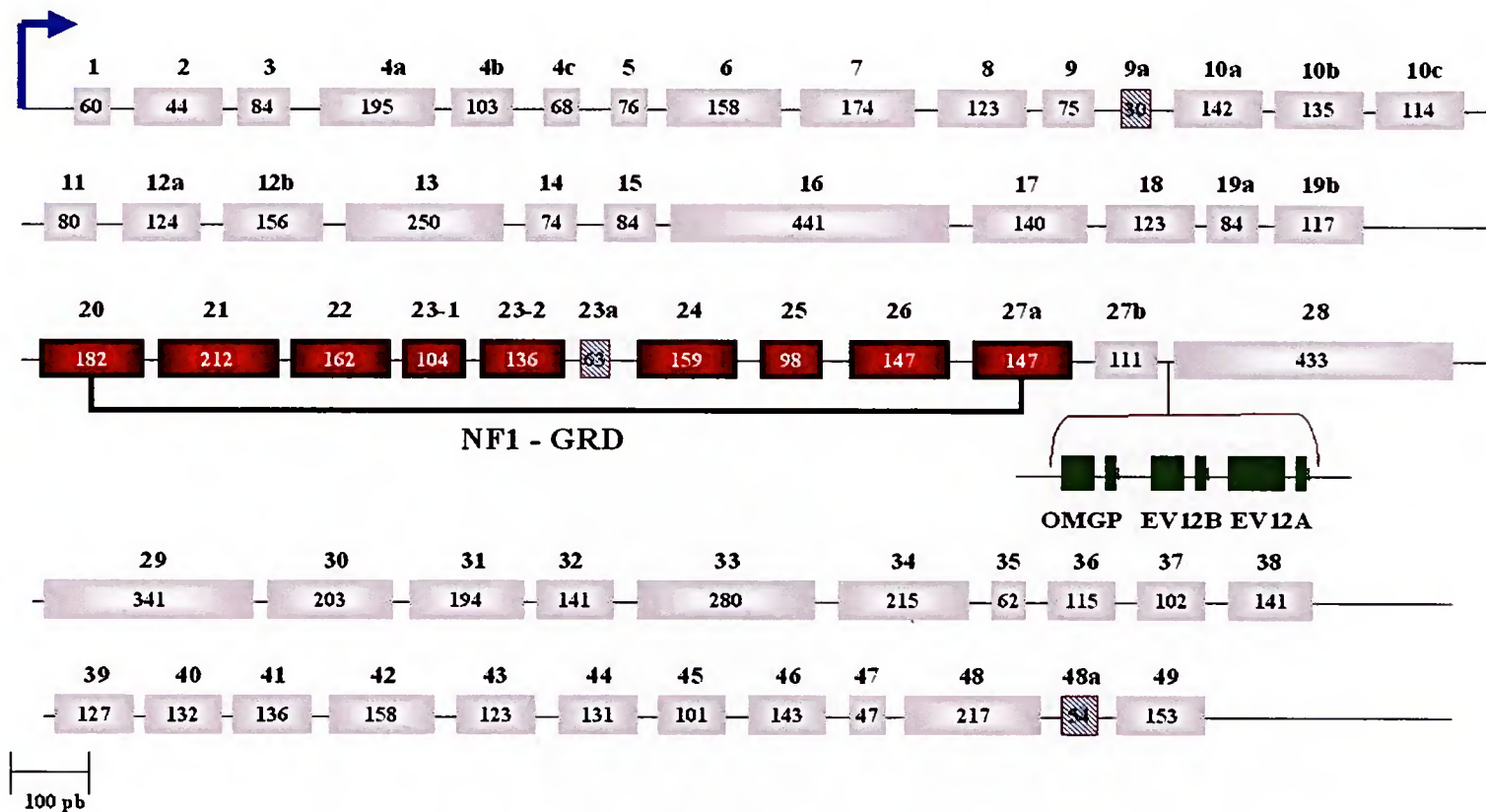
**Figura 4** – Foto apresentando paciente com NF1 e efélides axilares, cedida gentilmente pela Profª. Dra. Eny Maria Goloni-Bertollo.



O gene *NF1* contém 60 exons distribuídos em 350 Kb do DNA genômico e possui uma região 3' não traduzida (3'-UTR) de 3,2 Kb contida no último exon (Figura 5). Seu transcrito de 12 Kb codifica uma proteína denominada neurofibromina com 2818 aminoácidos e peso molecular de 327 KDa (Maynard *et al.*, 1997).

Uma região dessa proteína é estrutural e funcionalmente homóloga às proteínas ativadoras da função GTPase (GAPs) de mamíferos, que aceleram a hidrólise da proteína  $p21^{ras}$ -GTP para  $p21^{ras}$ -GDP convertendo-a, desse modo, da forma ativa para a inativa (Figura 6). Essa região, conhecida como NF1-GRD, estende-se por aproximadamente 360 aminoácidos e é correspondente aos exons 20-27a (resíduos 1125-1537) (Ballester *et al.*, 1990, Martin *et al.*, 1990, Xu *et al.*, 1990, Maynard *et al.*, 1997).

Na verdade, os membros da família de proteínas  $p21^{ras}$ , que são codificados pelos genes *H-Ras*, *K-Ras* e *N-Ras*, ciclam entre o estado ativo ( $p21^{ras}$ -GTP) e inativo ( $p21^{ras}$ -GDP) e desempenham papel central na diferenciação e no crescimento celular, transduzindo sinais da membrana plasmática ao núcleo por meio de seus efetores. A cascata de sinalização é iniciada por fatores de crescimento que, após ligação a seu receptor de membrana, induzem a autofosforilação desse último e sua associação ao complexo formado pelos fatores de troca de guanina (GEFs), como o SOS, e pela proteína Grb2. O complexo interage com as proteínas  $p21^{ras}$ , que estão ancoradas covalentemente à membrana plasmática por um grupo farnesil. O SOS estimula, então, a troca de  $p21^{ras}$ -GDP por  $p21^{ras}$ -GTP. Nessa forma ativa, a  $p21^{ras}$  interage com efetores secundários, que incluem as quinases Raf, MEK e ERK, e induz uma série de fosforilações em proteínas alvo citoplasmáticas e nucleares, resultando em divisão celular (Figura 7). As proteínas  $p21^{ras}$  apresentam baixa atividade GTPase intrínseca, que é modulada pelas GAPs, responsáveis pela elevação da hidrólise de GTP e, portanto, reguladores negativos das  $p21^{ras}$ . A neurofibromina, por meio da região NF1-GRD, funciona como uma GAP autêntica para  $p21^{ras}$ .



**Figura 5** - Diagrama do gene *NF1* mostrando os seus 49 exons melhor caracterizados. Os números acima e no interior dos retângulos representam os exons e seus respectivos tamanhos em pares de base (pb), respectivamente. O domínio relacionado ao GAP (NF1-GRD), correspondente aos exons 20-27a, está representado em vermelho, os genes intrônicos (*OMGP*, *EVI2B*, *EVI2A*) em verde e os exons de *splicing* alternativo (9a, 23a e 48a) estão sombreados de azul (adaptado de Viskochil, 1999).

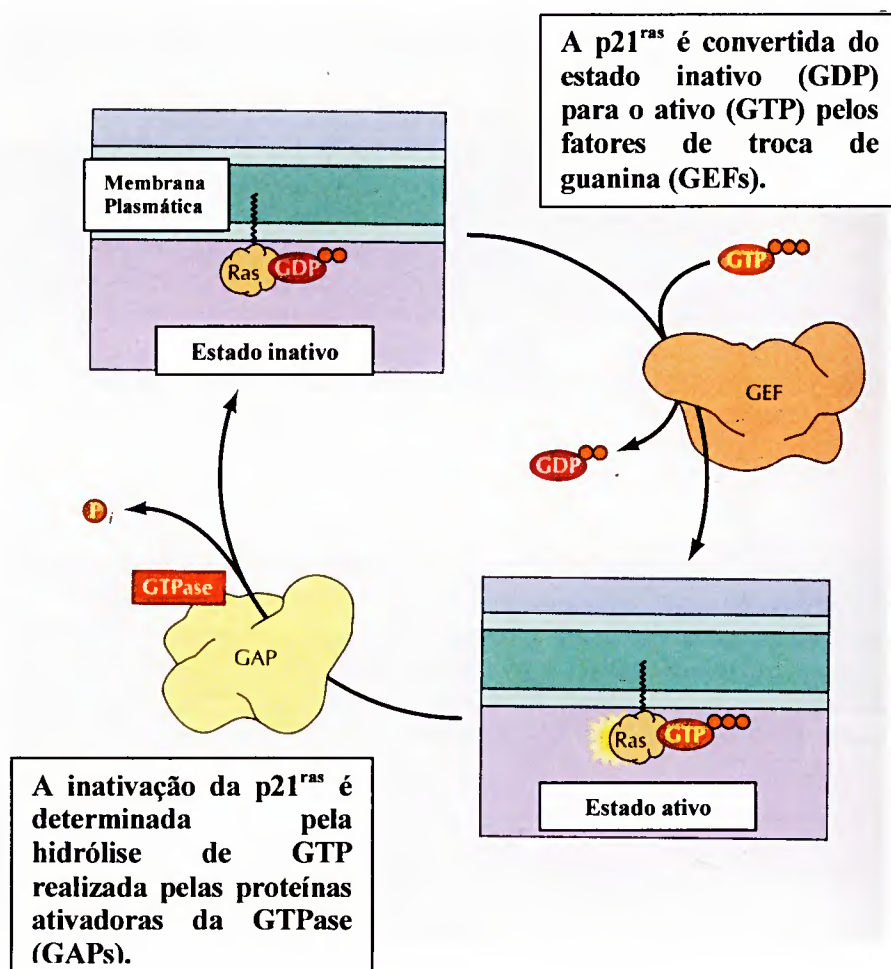


Figura 6 – Regulação das proteínas p21<sup>ras</sup> (adaptado de Cooper, 1997).

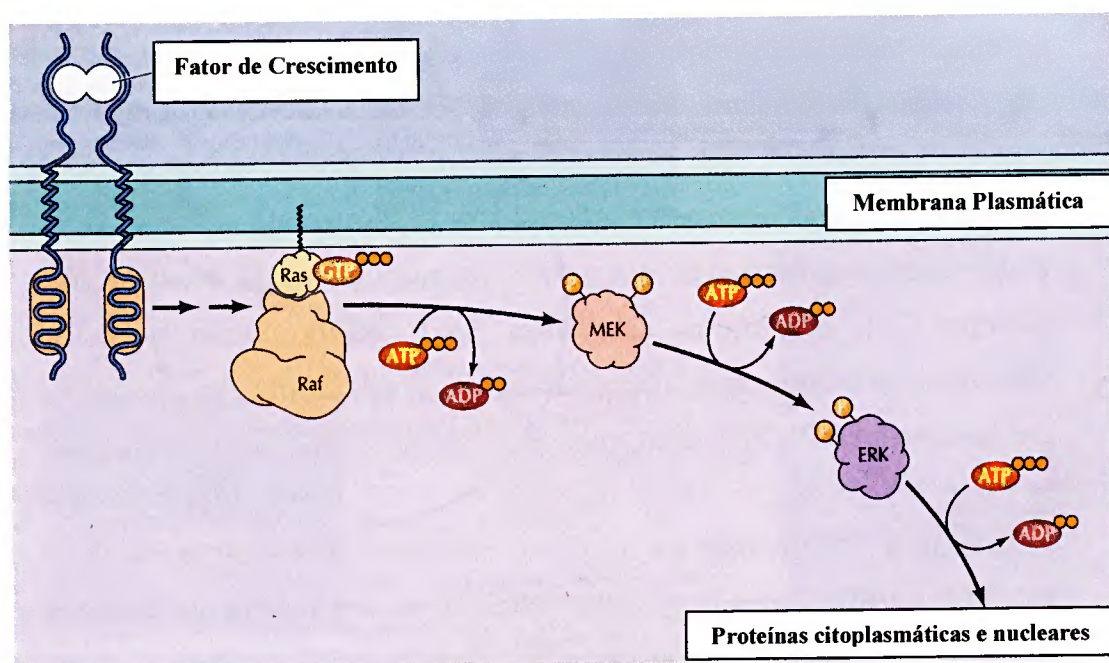
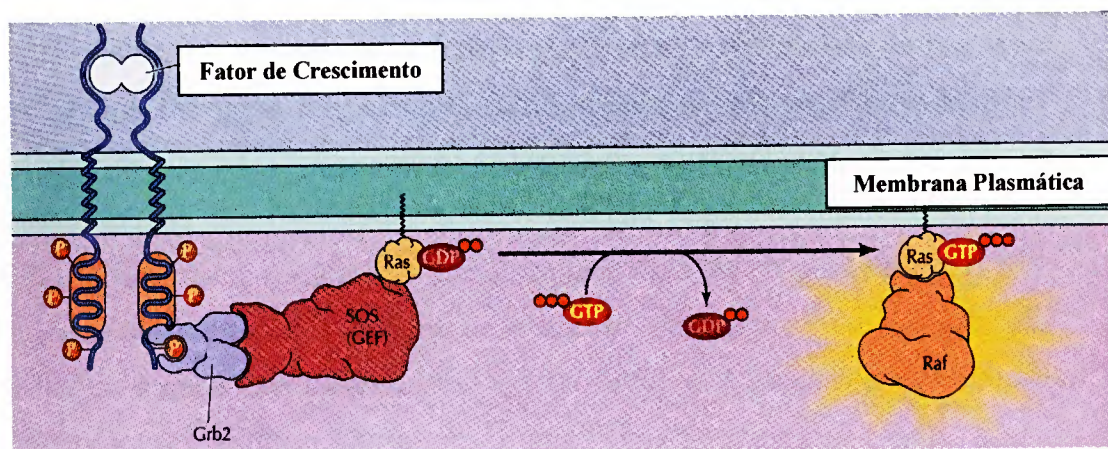


Figura 7 – Cascata de sinalização p21<sup>ras</sup> (adaptado de Cooper, 1997).



Mutações oncogênicas nos genes *Ras* ou inativação do *NF1* favorecem o estado ativo ( $p21^{\text{ras}}$ -GTP) e, conseqüentemente, resultam na estimulação permanente da cascata de sinais e no excesso de divisão celular (Abelson & Wash, 1993, Cooper, 1997, Weiss *et al.*, 1999). Realmente, os resultados de pesquisas em algumas linhagens celulares de neurofibrossarcoma têm demonstrado níveis elevados de  $p21^{\text{ras}}$ -GTP e expressão reduzida da neurofibromina, provavelmente como resultado de mutações no gene *NF1* nessas células (Gutmann & Collins, 1992). Tais achados e a presença freqüente de neoplasias em pacientes com NF1 sugerem que a neurofibromina pode participar do processo de malignização nesses casos em decorrência de mutações ou deleções somáticas do alelo normal (Rasmussen & Friedman, 2000).

O gene *NF1* apresenta três exons de *splicing* alternativo: exons 9a, 23a e 48a (Danglot *et al.*, 1995). O exon 9a, também denominado 9br, foi identificado por Danglot *et al.* (1995) e, quando transcrito, insere 30 nucleotídeos (10 aminoácidos entre os resíduos 420 e 421 da proteína), o que resulta em um RNAm destituído do domínio relacionado ao GAP. É expresso abundantemente no sistema nervoso central mas sua função permanece desconhecida (Danglot *et al.*, 1995, Gutmann *et al.*, 1999).

O exon 23a, por outro lado, está localizado dentro do domínio relacionado ao GAP e insere 63 nucleotídeos no RNAm (21 aminoácidos na proteína). A isoforma denominada GRD2 (GAP relacionada ao domínio 2) é expressa predominantemente nas células de Schwann e produz uma proteína com atividade GTPase, porém com capacidade reduzida para regular  $p21^{\text{ras}}$  (Gutmann *et al.*, 1993, Danglot *et al.*, 1995).

O exon 48a está localizado próximo ao terminal 3' e insere 54 nucleotídeos no RNAm (18 aminoácidos entre os resíduos 2771 e 2772 da proteína). A isoforma correspondente, denominada 3'ALT (*splicing* alternativo 3'), foi encontrada em níveis elevados em músculos cardíaco, esquelético e liso (Gutmann *et al.*, 1993, Danglot *et al.*, 1995).

Segundo Gutmann *et al.* (1995), há quatro isoformas diferentes da neurofibromina. A neurofibromina tipo 1 normal não contém os aminoácidos



codificados pelos exons 9a, 23a e 48a, é um excelente regulador da  $p21^{\text{ras}}$  e predomina no cérebro. A neurofibromina tipo 2 (GRD2) é decorrente da transcrição do exon 23a e, como citado acima, tem capacidade reduzida para atuar como GAP. As neurofibrominas tipo 3 e 4 são expressas em tecido muscular, sendo a primeira determinada pelo *splicing* apenas do exon 48a (3'ALT) e a outra dos exons 23a e 48a. A identificação dos tipos 3 e 4 em tecidos musculares constituiu um achado inesperado em virtude das poucas anormalidades musculares presentes em pacientes com a doença.

Outra descoberta interessante durante o estudo do gene *NF1* foi a presença de um pseudogene *AK3* (adenilato kinase-3) localizado no intron 37 (Xu *et al.*, 1992) e de três genes contidos no intron 27b. Esses últimos, denominados *OMGP* (Viskochil *et al.*, 1991), *EVI2A* (Cawthon *et al.*, 1990b) e *EVI2B* (Cawthon *et al.*, 1991), são transcritos em sentido oposto ao do gene *NF1* e sua contribuição para a doença é incerta (Gutmann & Collins, 1992). A OMGP (*oligodendrocyte myelin glycoprotein*) é uma glicoproteína de membrana que aparece no sistema nervoso central (SNC) humano durante a mielinização e parece funcionar como uma molécula de adesão celular. Johnson *et al.* (2000) relataram uma mutação *missense* nesse gene em pacientes com NF1 e esclerose múltipla, essa última doença caracterizada por múltiplas placas de desmielinização no SNC.

Os outros dois genes, *EVI2A* e *EVI2B*, são os homólogos humanos de *Evi-2A* e *Evi-2B* de murinos, que estão envolvidos no desenvolvimento de leucemias nesses animais. É interessante que a leucemia mielogênica crônica juvenil ocorre mais freqüentemente em pacientes com NF1 do que na população geral, o que poderia estar relacionado com mutações simultâneas em *NF1* e *EVI2A* (ou *EVI2B*). Entretanto, os relatos de pacientes com deleção total do gene *NF1* e, portanto, também dos genes intrônicos, não referem a manifestação de leucemia (Shen *et al.*, 1996). Assim, o significado biológico desses três genes permanece desconhecido.

Uma característica particular do gene *NF1* é a sua alta taxa de mutação (entre  $3.10^{-5}$  e  $1.10^{-4}$  por gameta por geração), 100 vezes mais alta que a média (Lázaro *et al.*, 1996). Segundo Upadhyaya *et al.* (1995), essa alta taxa de mutação



é decorrente do grande tamanho do gene ou da presença de seqüências altamente mutáveis. Hulsebos *et al.* (1996) acreditam que pseudogenes correspondentes a cópias inativas de NF1 espalhadas pelo genoma são reservatórios de mutações e, durante a meiose, sofrem recombinação com o gene *NF1* funcional por conversão gênica. Realmente, cerca de 50% dos pacientes com NF1 não apresentam história familiar da doença e constituem mutações novas (Maynard *et al.*, 1997). Entre essas, mais de 90% são de origem paterna, ressaltando uma taxa mutacional diferente entre os sexos (Jadayel *et al.*, 1990, Stephens *et al.*, 1992). Entretanto, segundo Lázaro *et al.* (1996), Valero *et al.* (1997), Upadhyaya *et al.* (1998) e Correa *et al.* (2000) as grandes deleções gênicas são mais comumente de origem materna.

A penetrância do gene *NF1* é completa, ou seja, sua capacidade de expressão quando presente tem sido estimada em 100%. Contudo, a diversidade das manifestações clínicas é muito ampla (Farris & Grove, 1996). Tal variabilidade é detectada tanto entre pacientes não aparentados como entre aqueles de uma mesma família, sendo possível observar indivíduos gravemente afetados com descendentes pouco afetados e vice-versa. Alguns portadores exibem tão poucas características que o diagnóstico fica difícil de ser atingido (Goloni-Bertollo, 1994). A ampla variabilidade do fenótipo NF1 até em indivíduos com a mesma mutação aponta para outros fatores envolvidos na determinação das manifestações clínicas, entre eles, genes modificadores e fatores ambientais (Easton *et al.*, 1993, Riccardi, 1993, Rasmussen & Friedman, 2000).

Embora a NF1 seja uma das doenças hereditárias mais comuns, relativamente poucas mutações têm sido identificadas em nível molecular. Isso provavelmente ocorre pelas dificuldades na análise de um gene com grande número de exons, pela presença de diversos pseudogenes e em virtude da ampla variedade de mutações (Messiaen *et al.*, 1997). Outras possíveis explicações incluem a falta de sensibilidade dos métodos de detecção empregados ou o fato de que muitas mutações ocorrem em segmentos do gene ainda não investigados (Ishioka *et al.*, 1995).

A presença de diversos pseudogenes dificulta a análise de amostras de DNA genômico devido à sua co-amplificação em reações de PCR cujo alvo é o *NF1* (Horn *et al.*, 1996). Tais seqüências já foram mapeadas nos cromossomos 2, 12, 14, 15, 18, 20, 21 e 22 e possuem homologia maior do que 90% com alguns exons e introns do gene *NF1* (Legius *et al.*, 1992, Cummings *et al.*, 1993, Purandare *et al.*, 1995a, Hulsebos *et al.*, 1996).

A maioria dos estudos não encontrou uma relação clara entre mutações em *NF1* e manifestações clínicas. Entretanto, estudos realizados por Kayes *et al.* (1994), Wu *et al.* (1995, 1997b), Leppig *et al.* (1996, 1997), Colman *et al.* (1996), Riva *et al.* (1996), Upadhyaya *et al.* (1998), Riva *et al.* (2000) e Correa *et al.* (2000) mostraram que a deleção total do gene parece estar associada com manifestações fenotípicas distintas, que incluem início precoce de um grande número de neurofibromas cutâneos, características faciais dismórficas e déficit cognitivo. Entretanto, nem todos os pacientes com tal fenótipo exibem perdas de grandes seqüências (Tonsgard *et al.*, 1997). Estudos realizados por Valero *et al.* (1997) identificaram cinco deleções que removiam a maior parte do gene *NF1* (~225 kb) em seis pacientes e somente um deles exibiu o fenótipo caracterizado por fâcies dismórfica, retardo mental (RM) e múltiplos neurofibromas cutâneos. Em 1998, Rasmussen e colaboradores também identificaram cinco pacientes com deleção total do gene que não apresentaram o fenótipo característico.

A correlação das mutações com as características clínicas é o grande objetivo das investigações de alterações no gene *NF1*. Tal tipo de correlação traz benefícios para o processo de aconselhamento genético dos pacientes, colabora com o diagnóstico clínico, principalmente dos casos com características incomuns ou com poucos sinais, e permite um diagnóstico pré-natal seguro. Além disso, é importante no esclarecimento das consequências fenotípicas das mutações, contribuindo para o mapeamento dos segmentos gênicos mais sujeitos a alterações e, principalmente, para o entendimento dos mecanismos que resultam nessa doença (Zhong *et al.*, 1993).





## II. OBJETIVOS

A identificação e caracterização de mutações em *NF1* e a descrição dos afetados constituem o primeiro passo para a descoberta de aspectos da neurofibromatose tipo 1, incluindo a possibilidade de *hotspots* regionais no gene, variabilidade de expressão da doença e correlação entre genótipo e sintomas clínicos. O presente trabalho teve como objetivos:

1. Investigar a presença de mutações nos exons 28, 29, 31 e 37 e também na região NF1-GRD (exon 20-27a) do gene *NF1* em pacientes com diagnóstico ou suspeita de Neurofibromatose Tipo 1 e de crianças leucêmicas. Os exons 28, 29, 31 e 37 foram escolhidos porque estão entre os mais frequentemente atingidos por mutações citadas na literatura consultada enquanto a escolha dos exons correspondentes à região NF1-GRD foi decorrente dessa região estar relacionada ao GAP, que tem por função mediar a regulação da atividade da p21<sup>ras</sup>.

2. Correlacionar os achados moleculares observados com o fenótipo dos pacientes e com os dados da literatura e contribuir, assim, para o mapeamento dos segmentos gênicos mais sujeitos a alterações e para a caracterização dos efeitos fenotípicos das mutações. Se factível, avaliar a participação de mutações constitucionais no gene *NF1* no desenvolvimento de leucemia mielóide em crianças.

3. Sempre que possível, utilizar os dados obtidos para o processo de Aconselhamento Genético dos pacientes.

### III. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa/CEP e Conselho Nacional de Ética em Pesquisa/CONEP (processo no. 25000.024092/99-76) e foram obtidos termos de consentimento livre e esclarecido de todos os pacientes estudados.

#### III. 1. Caracterização dos pacientes

No presente trabalho, foram estudados 55 pacientes portadores de NF1 e três pacientes com leucemia, além de dez indivíduos saudáveis, sem características clínicas de NF1 ou leucemia, que foram utilizados como controle.

##### Pacientes portadores de NF1

Foram estudados 55 indivíduos portadores de NF1, 48 pertencentes a famílias diferentes. Os pacientes selecionados fazem acompanhamento no Centro de Pesquisas e Atendimento em Neurofibromatose (CEPAN) da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), SP, e foram escolhidos independentemente de sexo, idade e etnia. Foram priorizados os adultos, principalmente porque esse grupo oferece facilidade maior para colheita de sangue e exibe quadro clínico mais definido, tendo em vista que a NF1 é uma doença progressiva.

A colheita de informações de todos os pacientes foi realizada de acordo com ficha padronizada que incluiu dados de identificação, antecedentes pessoais e familiares, heredograma e resultados de exames físicos e laboratoriais (Apêndice 1). A esses foram somados dados detalhados colhidos em investigações anteriores, cujos objetivos compreenderam análises clínica e psicológica (Goloni-Bertollo, 1994, Machado, 1998), oftalmológica (Teixeira, 1999) e radiológica (Muniz, 1998).

Os pacientes foram, portanto, avaliados sob muitos aspectos, com ênfase inicial para os sinais característicos da NF1 (manchas café-com-leite, neurofibromas, nódulos de Lisch, efélides). Para definição da frequência de manchas café-com-leite (MCCL) e neurofibromas, foram utilizadas as categorias



baixa (quando o número do sinal era facilmente contado e em número menor ou igual a 50), média (quando houve certa dificuldade na contagem de sinais e o número deles atingia de 51 a 150) e alta (acima de 150 sinais). No caso de efélides ou sardas, as categorias baixa, média e alta corresponderam às frequências de até quatro, de cinco a oito e com mais de oito efélides, respectivamente. Diferentemente, os nódulos de Lisch foram considerados com frequência baixa, média e alta quando apareciam em número de até três, de quatro a seis e com número maior do que seis, respectivamente (Tabela 1). A localização de um sinal foi considerada difusa quando a característica foi observada em mais do que três partes diferentes do corpo.

**Tabela 1** – Classificação das frequências de manchas café-com-leite (MCCL), neurofibromas, efélides e nódulos de Lisch nos pacientes com NF1 estudados.

| Característica     | Frequência (n° de sinais) |        |      |
|--------------------|---------------------------|--------|------|
|                    | Baixa                     | Média  | Alta |
| MCCL/neurofibromas | 50                        | 51-150 | >150 |
| Efélides           | 1-4                       | 5-8    | >8   |
| Nódulos de Lisch   | 1-3                       | 4-6    | >6   |

Na Tabela 2, estão apresentados os dados sobre idade, sexo, cor de pele, profissão, escolaridade, estatura, perímetro cefálico, recorrência de NF1 na família e idade de início das manifestações da doença nos 55 pacientes estudados. A Tabela 3 mostra o resumo dos achados obtidos após avaliação clínica, psicológica, radiológica, eletroencefalográfica e eletrocardiográfica desses pacientes. A frequência e a localização de manchas café-com-leite, neurofibromas, nódulos de Lisch e efélides são apresentadas na Tabela 4. As alterações oculares características da neurofibromatose são mostradas na Tabela 5 e as Tabelas 6 e 7 são referentes a outras alterações oculares e vícios de refração observados nos

pacientes. A Tabela 8 mostra as alterações ósseas detectadas ao exame radiológico enquanto os resultados das avaliações psicológicas referentes a quociente de inteligência (QI), disfunções neurológicas, depressão, ansiedade e déficit perceptivo motor são apresentados na Tabela 9. Para as avaliações psicológicas, foram utilizados, respectivamente, os seguintes instrumentos (Spilberger *et al.*, 1979, American Psychiatric Association, 1989): escalas WECHSLER de inteligência, teste de BENDER, inventário BECK de depressão, inventário de depressão para crianças, inventário de ansiedade traço-estado (IDATE), formas adulto e infantil e manual de diagnóstico e estatística de distúrbios mentais (DSM-III-R). Para cada variável foi estabelecida a classificação em leve, moderada e grave. Na Tabela 10, estão os dados eletroencefalográficos (EEG) e eletrocardiográficos (ECG) e na Tabela 11 as outras características menos frequentes ou não típicas da NF1. Os caracteres coloridos das Tabelas 2 a 11 referem-se a pacientes que apresentaram dados moleculares alterados. Tal anotação foi utilizada para facilitar a leitura do capítulo de Resultados.

#### Pacientes com leucemia

Um dos objetivos do projeto incluiu a avaliação de amostras de crianças com leucemia mielóide. Entretanto, o número de pacientes com tal doença atendidos no período em questão foi pequeno, atingindo apenas três amostras arquivadas, que foram provenientes do Instituto Nacional do Câncer (INCA), Rio de Janeiro, e gentilmente cedidas pela Dra. Claudete Esteves Klumb. Os dados desses pacientes constam da Tabela 12.

#### Grupo controle

O grupo controle foi formado por dez indivíduos normais, sem características clínicas de NF1 ou doenças hematopoéticas. Seus dados estão apresentados na Tabela 13.



**Tabela 2** – Caracterização dos pacientes com NF1 estudados quanto a idade (anos), sexo, cor da pele, profissão, escolaridade, estatura em metros, perímetro cefálico/PC em centímetros, recorrência na família e idade de manifestação da NF1 em anos.

| Paciente | Protocolo | Família * | Idade † | Sexo | Cor | Profissão   | Escolaridade | Estatura (m)/BE | PC (cm)/MCF | Recorrência | Início sinais NF1 | dos da |
|----------|-----------|-----------|---------|------|-----|-------------|--------------|-----------------|-------------|-------------|-------------------|--------|
| 1        | 85        | 57a       | 17      | M    | P   | estudante   | 2            | NA              | NA          | +           | 0-1               |        |
| 2        | 48        | 32        | 56      | F    | P   | vendedora   | 1            | 1,17/+          | 58/+        | +           | 5                 |        |
| 3        | 47        | 51        | 39      | F    | P   | do lar      | 1            | NA              | NA          | +           | 22                |        |
| 4        | 75        | 56        | 38      | F    | P   | faxineiro   | 3            | 1,60/-          | 64/+        | +           | 14                |        |
| 5        | 63        | 34        | 35      | M    | B   | lavrador    | 1            | 1,67/-          | 60/+        | +           | 7                 |        |
| 6        | 65        | 38b       | 31      | M    | B   | mecânico    | 1            | 1,54/+          | 59/+        | +           | 26                |        |
| 7        | 44        | 38b       | 60      | F    | B   | do lar      | 1            | 1,43/+          | 58/+        | +           | 40                |        |
| 8        | 45        | 49        | 37      | M    | B   | marceneiro  | 5            | 1,71/-          | 59/+        | +           | 17                |        |
| 9        | 28        | 03c       | 41      | M    | B   | vendedor    | 3            | 1,58/+          | 57/-        | +           | 7                 |        |
| 10       | 06        | 20        | 47      | F    | B   | do lar      | 1            | 1,53/-          | 58/+        | -           | 18                |        |
| 11       | 46        | 50        | 68      | F    | B   | do lar      | 1            | 1,38/+          | 56/-        | +           | 10                |        |
| 12       | 04        | 46        | 18      | F    | P   | estudante   | 4            | 1,54/-          | NA          | +           | 10                |        |
| 13       | 29        | 04        | 14      | M    | B   | estudante   | 2            | 1,69/-          | 56/-        | -           | 3                 |        |
| 14       | 01        | 45        | 09      | M    | B   | estudante   | 2            | 1,32/-          | 53/-        | -           | 0-1               |        |
| 15       | 66        | 40        | 11      | M    | P   | estudante   | E            | 1,40/-          | 56/-        | -           | 1                 |        |
| 16       | 18        | 09        | 52      | F    | B   | do lar      | 1            | 1,61/-          | 58/+        | -           | 17                |        |
| 17       | 23        | 28        | 31      | F    | P   | do lar      | 1            | 1,58/-          | 60/+        | +           | 15                |        |
| 18       | 14        | 39        | 39      | F    | P   | do lar      | 1            | 1,65/-          | 56/-        | +           | 15                |        |
| 19       | 15        | 01        | 43      | F    | B   | lavradora   | 1            | 1,62/-          | 58/+        | +           | 18                |        |
| 20       | 20        | 41        | 36      | F    | P   | do lar      | 1            | 1,42/+          | 55/-        | +           | 9                 |        |
| 21       | 99        | 77        | 26      | F    | P   | do lar      | 1            | 1,50/+          | 58/+        | +           | 0-1               |        |
| 22       | 95        | 73        | 36      | F    | B   | do lar      | 1            | NA              | NA          | -           | 0-1               |        |
| 23       | 34        | 47        | 60      | F    | P   | do lar      | 6            | 1,56/-          | 61/+        | -           | 10                |        |
| 24       | 92        | 70        | 27      | F    | B   | do lar      | 1            | 1,62/-          | 61/+        | -           | 24                |        |
| 25       | 79        | 60        | 41      | F    | B   | do lar      | 1            | NA              | NA          | -           | 18                |        |
| 26       | 12        | 33        | 12      | M    | B   | estudante   | 2            | 1,60/-          | 62/+        | -           | 3                 |        |
| 27       | 91        | 69        | 28      | M    | B   | mecânico    | 5            | NA              | NA          | -           | 12                |        |
| 28       | 86        | 66        | 46      | F    | P   | do lar      | 6            | 1,35/+          | 56/-        | -           | 15                |        |
| 29       | 53        | 16d       | 33      | F    | P   | faxineira   | 1            | 1,33/+          | 56/-        | +           | 7                 |        |
| 30       | 25        | 16d       | 23      | F    | P   | faxineira   | 1            | 1,47/+          | 55/-        | +           | 7                 |        |
| 31       | 97        | 68        | 35      | F    | P   | do lar      | 1            | 1,49/+          | 59/+        | +           | 17                |        |
| 32       | 03        | 06        | 52      | M    | P   | func. públ. | 5            | 1,70/-          | 57/-        | +           | 13                |        |
| 33       | 30        | 05        | 62      | F    | P   | do lar      | 1            | 1,42/+          | 58/+        | -           | 20                |        |
| 34       | 96        | 75        | 21      | M    | P   | pedreiro    | 1            | 1,60/+          | 59/+        | -           | 16                |        |
| 35       | 27        | 23        | 41      | F    | B   | do lar      | 1            | 1,56/-          | 60/+        | -           | 2                 |        |
| 36       | S         | S         | 37      | M    | P   | porteiro    | 1            | 1,74/-          | 60/+        | -           | 14                |        |
| 37       | 90        | 57a       | 48      | M    | P   | lavrador    | 6            | NA              | NA          | +           | 27                |        |
| 38       | 88        | 67        | 37      | F    | B   | do lar      | 1            | 1,62/-          | 53/-        | +           | 10                |        |
| 39       | 80        | 61        | 12      | M    | B   | estudante   | 2            | 1,71/-          | 56/-        | -           | 4                 |        |
| 40       | 43        | 17e       | 19      | F    | B   | estudante   | 5            | 1,55/-          | 58/+        | +           | 12                |        |
| 41       | 50        | 74        | 02      | F    | B   | NA          | NA           | 0,88/-          | NA          | +           | NA                |        |
| 42       | 93        | 71        | 19      | F    | P   | estudante   | 4            | 1,53/-          | NA          | +           | 0-1               |        |
| 43       | 35        | 07        | 50      | F    | B   | do lar      | 1            | 1,49/+          | 58/+        | -           | NA                |        |
| 44       | 81        | 62        | 26      | M    | P   | lavrador    | 1            | 1,73/-          | 58/-        | -           | 13                |        |
| 45       | 13        | 36f       | 30      | F    | P   | do lar      | 1            | 1,45/+          | 53/-        | +           | 10                |        |
| 46       | 21        | 36f       | 52      | F    | P   | do lar      | 1            | 1,50/+          | 59/+        | +           | 10                |        |
| 47       | 54        | 03c       | 03      | M    | B   | NA          | NA           | 0,89/-          | 53/-        | +           | 2                 |        |
| 48       | 62        | 30        | 26      | M    | B   | mecânico    | 1            | 1,80/-          | 54/-        | -           | 15                |        |
| 49       | 55        | 17        | 49      | F    | B   | do lar      | 1            | 1,55/-          | 57/-        | +           | 15                |        |
| 50       | 31        | 08        | 19      | M    | P   | estudante   | 1            | NA              | NA          | -           | 14                |        |
| 51       | 87        | 57a       | 42      | F    | B   | do lar      | 1            | 1,47/+          | 54/-        | +           | 26                |        |
| 52       | 37        | 02        | 16      | M    | P   | vendedor    | 1            | 1,53/+          | 56/-        | +           | 2                 |        |
| 53       | S         | Sg        | 33      | M    | B   | marceneiro  | 5            | 1,56/+          | 58/-        | +           | 0-1               |        |
| 54       | S         | Sg        | 04      | F    | B   | NA          | NA           | 0,98/-          | 52/-        | +           | 0-1               |        |
| 55       | S         | S         | 20      | M    | P   | NA          | 1            | 1,72/-          | 60/+        | -           | NA                |        |

\* a, b, c, d, e, f, g = indivíduos pertencentes à mesma família; S = indivíduo sem número de protocolo e família; † = idade na qual os dados foram obtidos; M = masculino; F= feminino; P = preto + pardo; B = branco; 1 = 1º grau incompleto; 2 = cursando 1º grau; 3 = 1º grau completo; 4 = cursando 2º grau; 5 = 2º grau completo; 6 = analfabeto; E = frequentou escola especial por 2 anos; NA = não analisado ou não se aplica; BE = baixa estatura, MCF = macrocefalia, + = presença do sinal; - = ausência do sinal



Tabela 3 – Resumo dos achados obtidos após avaliação clínica, psicológica, radiológica, eletroencefalográfica/EEG e eletrocardiográfica/ECG dos pacientes com NFI estudados.

| Paciente | MCCL | Neurofibroma |   | Efélides | Alterações oculares |        | AO | Alterações psicológicas |        | Alterações |     |
|----------|------|--------------|---|----------|---------------------|--------|----|-------------------------|--------|------------|-----|
|          |      | d            | p |          | NL                  | outras |    | RM                      | outras | EEG        | ECG |
| 1        | +    | -            | - | +/+      | NA                  | NA     | +  | lim                     | +      | NA         | NA  |
| 2        | +    | +            | + | +/-      | +                   | +      | +  | -                       | +      | -          | +   |
| 3        | +    | +            | + | +/NR     | +                   | +      | -  | NA                      | NA     | -          | -   |
| 4        | +    | +            | - | +/-      | +                   | +      | +  | -                       | +      | -          | -   |
| 5        | +    | +            | - | +/-      | -                   | +      | +  | +                       | +      | -          | +   |
| 6        | +    | +            | - | +/-      | NA                  | NA     | -  | NA                      | +      | +          | -   |
| 7        | +    | +            | - | +/-      | +                   | +      | +  | NA                      | +      | -          | +   |
| 8        | +    | +            | - | +/-      | +                   | +      | +  | -                       | +      | NA         | -   |
| 9        | +    | +            | + | +/-      | +                   | +      | +  | lim                     | +      | +          | -   |
| 10       | +    | +            | - | +/-      | +                   | +      | +  | +                       | +      | -          | +   |
| 11       | +    | +            | - | +/-      | +                   | +      | +  | +                       | +      | +          | -   |
| 12       | +    | +            | - | +/+      | +                   | +      | +  | +                       | +      | NA         | +   |
| 13       | +    | +            | + | +/-      | +                   | -      | +  | -                       | +      | -          | -   |
| 14       | +    | +            | + | -        | -                   | -      | +  | -                       | +      | -          | +   |
| 15       | +    | +            | - | +/+      | +                   | +      | +  | lim                     | +      | +          | +   |
| 16       | +    | +            | + | -        | -                   | +      | +  | +                       | +      | -          | +   |
| 17       | +    | +            | - | +/NR     | NA                  | NA     | -  | NA                      | NA     | -          | NA  |
| 18       | +    | +            | - | +/NR     | +                   | +      | +  | +                       | +      | +          | +   |
| 19       | +    | +            | - | +/+      | +                   | +      | +  | +                       | +      | -          | -   |
| 20       | +    | +            | + | +/+      | +                   | +      | +  | +                       | +      | -          | -   |
| 21       | +    | +            | + | +/NR     | NA                  | NA     | +  | NA                      | NA     | NA         | NA  |
| 22       | +    | +            | + | +/NR     | +                   | +      | +  | lim                     | +      | NA         | NA  |
| 23       | +    | +            | - | +/-      | -                   | +      | -  | -                       | +      | NA         | +   |
| 24       | +    | +            | + | +/+      | +                   | +      | -  | lim                     | +      | NA         | NA  |
| 25       | +    | +            | - | +/+      | +                   | +      | +  | NA                      | NA     | -          | +   |
| 26       | +    | +            | - | +/-      | +                   | -      | +  | lim                     | +      | -          | -   |
| 27       | +    | +            | + | +/NR     | +                   | +      | +  | -                       | +      | NA         | NA  |
| 28       | +    | +            | - | +/+      | NA                  | NA     | +  | +                       | +      | NA         | +   |
| 29       | +    | +            | - | +/-      | -                   | +      | +  | +                       | +      | -          | -   |
| 30       | +    | +            | - | +/NR     | +                   | -      | +  | lim                     | +      | +          | -   |
| 31       | +    | +            | - | +/+      | +                   | +      | +  | lim                     | +      | -          | NA  |
| 32       | +    | +            | - | +/NR     | +                   | +      | +  | -                       | +      | -          | +   |
| 33       | +    | +            | - | +/+      | +                   | +      | +  | +                       | +      | +          | +   |
| 34       | +    | +            | - | +/NR     | +                   | -      | +  | NA                      | NA     | NA         | NA  |
| 35       | +    | +            | + | +/NR     | +                   | +      | +  | +                       | +      | -          | -   |
| 36       | +    | +            | - | +/NR     | +                   | -      | +  | lim                     | +      | -          | NA  |
| 37       | +    | +            | + | +/+      | +                   | +      | NA | +                       | +      | -          | -   |
| 38       | +    | +            | + | +/+      | +                   | -      | +  | +                       | +      | NA         | +   |
| 39       | +    | +            | + | +/+      | +                   | +      | +  | NA                      | NA     | NA         | -   |
| 40       | +    | +            | + | +/NR     | +                   | +      | -  | -                       | +      | -          | -   |
| 41       | +    | -            | - | +/NR     | +                   | +      | -  | -                       | -      | -          | -   |
| 42       | +    | +            | - | +/NR     | +                   | +      | -  | NA                      | NA     | -          | -   |
| 43       | +    | +            | - | +/-      | +                   | +      | +  | NA                      | NA     | -          | +   |
| 44       | +    | +            | + | +/NR     | +                   | -      | +  | NA                      | NA     | NA         | NA  |
| 45       | +    | +            | - | +/NR     | +                   | +      | +  | lim                     | +      | -          | +   |
| 46       | +    | +            | - | +/NR     | +                   | +      | +  | NA                      | NA     | -          | +   |
| 47       | +    | +            | + | +/+      | +                   | +      | -  | NA                      | NA     | -          | -   |
| 48       | +    | +            | - | -        | -                   | NA     | -  | NA                      | NA     | +          | -   |
| 49       | +    | +            | - | +/NR     | +                   | +      | +  | -                       | +      | -          | -   |
| 50       | +    | +            | - | +/NR     | +                   | +      | +  | +                       | +      | -          | -   |
| 51       | +    | +            | - | +/NR     | NA                  | NA     | -  | +                       | +      | NA         | NA  |
| 52       | +    | +            | + | +/NR     | +                   | -      | +  | NA                      | NA     | -          | +   |
| 53       | +    | +            | + | +/NR     | +                   | +      | NA | -                       | +      | -          | NA  |
| 54       | +    | +            | + | +/NR     | -                   | +      | +  | -                       | NA     | NA         | -   |
| 55       | +    | +            | + | +/NR     | +                   | NA     | -  | -                       | -      | -          | NA  |

MCCL = manchas café-com-leite; d = dérmico; p = plexiforme; a = axilares; i = inguinais; NL = nódulos de Lisch; AO = alterações ósseas; RM = retardo mental; lim = QI limítrofe; + = presença do sinal clínico; - = ausência do sinal clínico; NA = não analisado; NR = não referido; +? = suspeito da alteração



Tabela 4 – Frequência (F) e localização (L) das manchas café-com-leite, neurofibromas, nódulos de Lisch e efélides nos pacientes com NFI estudados.

| Paciente | MCCL  |                 | Neurofibromas |                      | NL    |    | Efélides |     |           |    |
|----------|-------|-----------------|---------------|----------------------|-------|----|----------|-----|-----------|----|
|          | F     | L               | F             | L                    | F     | L  | axilares |     | inguinais |    |
|          |       |                 |               |                      |       |    | F        | L   | F         | L  |
| 1        | média | difusa          | -             | -                    | NA    | NA | alta     | bi  | NA        | bi |
| 2        | baixa | difusa          | média         | difusa               | alta  | bi | alta     | bi  | -         | -  |
| 3        | média | tronco          | média         | difusa               | baixa | bi | alta     | bi  | NR        | NR |
| 4        | A     | membros, tronco | alta          | difusa               | alta  | bi | alta     | bi  | -         | -  |
| 5        | lta   |                 |               |                      |       |    |          |     |           |    |
| 5        | média | difusa          | média         | difusa               | -     | -  | média    | bi  | -         | -  |
| 6        | média | difusa          | baixa         | difusa               | NA    | NA | alta     | bi  | -         | -  |
| 7        | alta  | difusa          | média         | difusa               | alta  | bi | alta     | bi  | -         | -  |
| 8        | baixa | difusa          | alta          | difusa               | alta  | bi | alta     | bi  | -         | -  |
| 9        | alta  | difusa          | média         | difusa               | alta  | bi | média    | bi  | -         | -  |
| 10       | alta  | difusa          | baixa         | tronco, face         | alta  | bi | alta     | bi  | -         | -  |
| 11       | alta  | difusa          | alta          | difusa               | alta  | bi | alta     | bi  | -         | -  |
| 12       | média | difusa          | baixa         | difusa               | alta  | bi | alta     | bi  | baixa     | bi |
| 13       | alta  | difusa          | baixa         | perna D, pescoço     | baixa | D  | alta     | bi  | -         | -  |
| 14       | baixa | tronco          | baixa         | tronco               | -     | -  | -        | -   | -         | -  |
| 15       | alta  | difusa          | baixa         | braço E              | média | bi | alta     | bi  | alta      | bi |
| 16       | baixa | difusa          | baixa         | pelve D, crânio      | -     | -  | -        | -   | -         | -  |
| 17       | baixa | tronco          | média         | difusa               | NA    | NA | NA       | bi  | NR        | NR |
| 18       | alta  | difusa          | média         | difusa               | baixa | bi | alta     | bi  | NR        | NR |
| 19       | alta  | difusa          | baixa         | difusa               | alta  | bi | alta     | bi  | média     | bi |
| 20       | alta  | difusa          | baixa         | difusa               | média | bi | alta     | bi  | alta      | bi |
| 21       | alta  | difusa          | média         | difusa               | NA    | NA | alta     | bi  | NR        | NR |
| 22       | alta  | difusa          | alta          | difusa               | média | bi | alta     | bi  | NR        | NR |
| 23       | alta  | difusa          | alta          | difusa               | -     | -  | alta     | uni | -         | -  |
| 24       | média | difusa          | baixa         | difusa               | baixa | bi | alta     | bi  | baixa     | bi |
| 25       | média | difusa          | média         | difusa               | alta  | bi | alta     | bi  | NA        | bi |
| 26       | baixa | difusa          | baixa         | axila, pescoço       | alta  | bi | média    | bi  | -         | -  |
| 27       | NA    | NA              | NA            | difusa               | alta  | bi | alta     | bi  | NR        | NR |
| 28       | baixa | difusa          | média         | difusa               | NA    | NA | alta     | bi  | alta      | bi |
| 29       | baixa | tronco          | baixa         | difusa               | -     | -  | alta     | bi  | -         | -  |
| 30       | média | difusa          | baixa         | difusa               | baixa | D  | média    | bi  | NR        | NR |
| 31       | alta  | difusa          | baixa         | difusa               | alta  | bi | alta     | bi  | média     | bi |
| 32       | baixa | difusa          | alta          | difusa               | baixa | bi | baixa    | bi  | NR        | NR |
| 33       | alta  | difusa          | alta          | difusa               | média | bi | média    | bi  | alta      | bi |
| 34       | média | difusa          | média         | difusa               | baixa | bi | alta     | bi  | NR        | NR |
| 35       | alta  | difusa          | alta          | difusa               | alta  | bi | alta     | bi  | NR        | NR |
| 36       | alta  | difusa          | alta          | difusa               | NR    | bi | alta     | bi  | NR        | NR |
| 37       | alta  | tronco          | alta          | difusa               | NR    | D  | alta     | bi  | alta      | bi |
| 38       | alta  | difusa          | alta          | difusa               | alta  | bi | alta     | bi  | alta      | bi |
| 39       | baixa | difusa          | média         | difusa               | alta  | E  | alta     | bi  | alta      | bi |
| 40       | alta  | difusa          | baixa         | difusa               | NA    | bi | alta     | bi  | NR        | NR |
| 41       | média | difusa          | -             | -                    | NA    | bi | média    | bi  | NR        | NR |
| 42       | média | difusa          | média         | difusa               | média | bi | baixa    | bi  | NR        | NR |
| 43       | média | difusa          | alta          | difusa               | baixa | bi | média    | bi  | -         | -  |
| 44       | alta  | difusa          | alta          | difusa               | NA    | bi | alta     | bi  | NR        | NR |
| 45       | alta  | difusa          | média         | difusa               | alta  | bi | alta     | bi  | NR        | NR |
| 46       | baixa | tronco          | alta          | difusa               | baixa | bi | alta     | bi  | NR        | NR |
| 47       | alta  | difusa          | baixa         | difusa               | baixa | E  | alta     | bi  | média     | bi |
| 48       | baixa | tronco          | baixa         | cabeça               | -     | -  | -        | -   | -         | -  |
| 49       | alta  | difusa          | média         | tronco, membros      | NR    | bi | alta     | bi  | NR        | NR |
| 50       | média | difusa          | alta          | difusa               | média | bi | média    | bi  | NR        | NR |
| 51       | média | difusa          | média         | difusa               | NA    | NA | alta     | bi  | NR        | NR |
| 52       | baixa | difusa          | baixa         | pescoço, face, ombro | baixa | bi | baixa    | bi  | NR        | NR |
| 53       | média | difusa          | média         | difusa               | alta  | bi | alta     | bi  | NR        | NR |
| 54       | baixa | tórax           | baixa         | reg. cervical        | -     | -  | média    | bi  | NR        | NR |
| 55       | alta  | membros difusa  | baixa         | difusa               | alta  | D  | alta     | bi  | NR        | NR |

MCCL = manchas café-com-leite; NL = nódulos de Lisch; bi = bilateral; D = direito; E = esquerdo; uni = unilateral; NR = não referido; NA = não analisado; - = ausência do sinal





Tabela 5 – Alterações oculares observadas nos pacientes com NF1 estudados.

| Paciente | Idade † | Nódulos de Lisch | Neurofibroma |            | Ptose | Nódulos de coróide | Glioma |        |
|----------|---------|------------------|--------------|------------|-------|--------------------|--------|--------|
|          |         |                  | pálpebra     | conjuntiva |       |                    | óptico | retina |
| 1        | NA      | NA               | NA           | NA         | NA    | NA                 | NA     | NA     |
| 2        | 56      | D/E              | -            | -          | -     | -                  | -      | -      |
| 3        | 39      | D/E              | -            | -          | -     | -                  | -      | -      |
| 4        | 39      | D/E              | D/E          | -          | -     | -                  | -      | -      |
| 5        | 36      | -                | -            | -          | -     | -                  | -      | -      |
| 6        | NA      | NA               | NA           | NA         | NA    | NA                 | NA     | NA     |
| 7        | 61      | D/E              | -            | -          | -     | -                  | -      | D/E    |
| 8        | 38      | D/E              | -            | -          | -     | -                  | -      | -      |
| 9        | 42      | D/E              | -            | -          | -     | -                  | -      | -      |
| 10       | 48      | D/E              | -            | -          | D     | -                  | -      | -      |
| 11       | 69      | D/E              | -            | -          | -     | -                  | -      | -      |
| 12       | 19      | D/E              | -            | -          | -     | -                  | -      | -      |
| 13       | 15      | D                | -            | -          | -     | -                  | -      | -      |
| 14       | 09      | -                | -            | -          | -     | -                  | -      | -      |
| 15       | 12      | D/E              | -            | -          | -     | -                  | -      | -      |
| 16       | 53      | -                | -            | -          | -     | -                  | -      | D/E    |
| 17       | NA      | NA               | NA           | NA         | NA    | NA                 | NA     | NA     |
| 18       | 44      | D/E              | D            | D          | D     | -                  | -      | -      |
| 19       | 44      | D/E              | -            | -          | -     | -                  | -      | -      |
| 20       | 37      | D/E              | -            | -          | -     | -                  | -      | -      |
| 21       | NA      | NA               | NA           | NA         | NA    | NA                 | NA     | NA     |
| 22       | 36      | D/E              | -            | -          | -     | -                  | -      | -      |
| 23       | 65      | -                | -            | -          | -     | -                  | -      | -      |
| 24       | 28      | D/E              | -            | -          | -     | -                  | -      | -      |
| 25       | 42      | D/E              | -            | -          | -     | -                  | -      | -      |
| 26       | 13      | D/E              | -            | -          | -     | -                  | -      | -      |
| 27       | 28      | D/E              | -            | -          | -     | -                  | -      | -      |
| 28       | NA      | NA               | NA           | NA         | NA    | NA                 | NA     | NA     |
| 29       | 35      | -                | -            | -          | -     | -                  | -      | -      |
| 30       | 28      | D                | -            | -          | -     | -                  | -      | -      |
| 31       | 35      | D/E              | -            | -          | -     | -                  | -      | -      |
| 32       | 57      | D/E              | D/E          | -          | -     | -                  | -      | D      |
| 33       | 63      | D/E              | -            | -          | -     | -                  | -      | -      |
| 34       | 23      | D/E              | -            | -          | -     | -                  | -      | -      |
| 35       | 46      | D/E              | D/E          | -          | -     | -                  | -      | -      |
| 36       | 37      | D/E              | -            | -          | -     | -                  | -      | -      |
| 37       | 50      | D                | D            | -          | -     | -                  | -      | -      |
| 38       | 38      | D/E              | -            | -          | -     | -                  | -      | -      |
| 39       | 13      | E                | -            | -          | -     | -                  | +?D/E  | -      |
| 40       | 24      | D/E              | -            | -          | -     | -                  | -      | -      |
| 41       | 05      | D/E              | -            | -          | -     | -                  | -      | -      |
| 42       | 19      | D/E              | -            | -          | -     | -                  | -      | -      |
| 43       | 55      | D/E              | -            | -          | -     | -                  | -      | -      |
| 44       | 29      | D/E              | -            | -          | -     | -                  | -      | -      |
| 45       | 34      | D/E              | -            | -          | -     | -                  | -      | -      |
| 46       | 56      | D/E              | D/E          | -          | -     | -                  | -      | -      |
| 47       | 05      | E                | D            | -          | -     | -                  | -      | -      |
| 48       | NA      | NA               | NA           | NA         | NA    | NA                 | NA     | NA     |
| 49       | 47      | D/E              | -            | -          | -     | -                  | -      | -      |
| 50       | 23      | D/E              | -            | -          | -     | -                  | -      | -      |
| 51       | NA      | NA               | NA           | NA         | NA    | NA                 | NA     | NA     |
| 52       | 21      | D/E              | -            | -          | -     | -                  | -      | -      |
| 53       | 32      | D/E              | -            | -          | -     | -                  | -      | -      |
| 54       | 04      | -                | -            | -          | -     | -                  | -      | -      |
| 55       | 20      | D                | +?           | NA         | NA    | NA                 | NA     | NA     |

D = direito; E = esquerdo; - = ausência da alteração; +? = suspeito da alteração; † = idade na qual os dados foram obtidos; NA = não analisado



Tabela 6 – Outras alterações oculares observadas nos pacientes com NF1 estudados.

| Paciente | Idade † | Pterígio | Estrabismo | Catarata | Glaucoma | Outros achados |
|----------|---------|----------|------------|----------|----------|----------------|
| 1        | NA      | NA       | NA         | NA       | NA       | NA             |
| 2        | 56      | D/E      | -          | -        | -        | -              |
| 3        | 39      | D/E      | -          | -        | -        | -              |
| 4        | 39      | -        | -          | -        | -        | -              |
| 5        | 36      | D/E      | -          | -        | -        | -              |
| 6        | NA      | NA       | NA         | NA       | NA       | NA             |
| 7        | 61      | -        | -          | -        | -        | -              |
| 8        | 38      | -        | -          | -        | -        | -              |
| 9        | 42      | -        | -          | -        | E        | a              |
| 10       | 48      | -        | -          | -        | -        | b, c           |
| 11       | 69      | -        | -          | +        | -        | -              |
| 12       | 19      | -        | XF         | -        | -        | -              |
| 13       | 15      | -        | -          | -        | -        | -              |
| 14       | 09      | -        | -          | -        | -        | -              |
| 15       | 12      | -        | -          | -        | -        | -              |
| 16       | 53      | D        | -          | -        | -        | a              |
| 17       | NA      | NA       | NA         | NA       | NA       | NA             |
| 18       | 44      | D        | -          | -        | -        | -              |
| 19       | 44      | D/E      | -          | -        | -        | d              |
| 20       | 37      | -        | -          | -        | -        | -              |
| 21       | NA      | NA       | NA         | NA       | NA       | NA             |
| 22       | 36      | -        | -          | -        | -        | -              |
| 23       | 65      | D/E      | -          | +        | -        | -              |
| 24       | 28      | -        | -          | -        | -        | -              |
| 25       | 42      | -        | XT         | -        | -        | e, f, g        |
| 26       | 13      | -        | -          | -        | -        | -              |
| 27       | 28      | -        | -          | -        | -        | -              |
| 28       | NA      | NA       | NA         | NA       | NA       | NA             |
| 29       | 35      | -        | -          | -        | -        | h, i           |
| 30       | 28      | -        | -          | -        | -        | -              |
| 31       | 35      | -        | -          | -        | -        | -              |
| 32       | 57      | D/E      | -          | -        | -        | -              |
| 33       | 63      | -        | -          | -        | -        | -              |
| 34       | 23      | -        | -          | -        | -        | -              |
| 35       | 46      | D/E      | -          | -        | -        | i              |
| 36       | 37      | -        | -          | -        | -        | -              |
| 37       | 50      | D        | -          | -        | -        | -              |
| 38       | 38      | -        | -          | -        | -        | -              |
| 39       | 13      | -        | -          | -        | -        | -              |
| 40       | 24      | -        | -          | -        | -        | -              |
| 41       | 05      | -        | -          | -        | -        | -              |
| 42       | 19      | D        | -          | -        | -        | -              |
| 43       | 55      | -        | -          | +        | -        | j              |
| 44       | NA      | NA       | NA         | NA       | NA       | NA             |
| 45       | 34      | -        | XF         | -        | -        | -              |
| 46       | 56      | -        | -          | -        | -        | -              |
| 47       | 05      | -        | -          | -        | -        | -              |
| 48       | NA      | NA       | NA         | NA       | NA       | NA             |
| 49       | 47      | -        | -          | -        | -        | -              |
| 50       | 23      | -        | -          | -        | D/E      | -              |
| 51       | NA      | NA       | NA         | NA       | NA       | NA             |
| 52       | 21      | -        | -          | -        | -        | -              |
| 53       | 32      | -        | -          | -        | -        | -              |
| 54       | 04      | -        | -          | -        | -        | -              |
| 55       | NA      | NA       | NA         | NA       | NA       | NA             |

† = idade na qual os dados foram obtidos; D = direito; E = esquerdo; + = presença da alteração; - = ausência da alteração; XF = exoforia; XT = exotropia; a = papilas com escavação; b = névo de íris; c = papilas aumentadas; d = xantelasma em pálpebra inferior bilateral; e = placa de coriorretinite cicatricial; f = descolamento de retina do olho direito e estafiloma de pólo posterior; g = estafiloma de pólo posterior do olho esquerdo; h = microftalmia e enoftalmia do olho esquerdo; i = papila de implantação oblíqua; j = drusas de retina; NA = não analisado

Tabela 7 – Vícios de refração nos pacientes com NF1 estudados.

| Paciente | Idade † | Miopia | Hipermetropia | Astigmatismo | Presbiopia |
|----------|---------|--------|---------------|--------------|------------|
| 1        | NA      | NA     | NA            | NA           | NA         |
| 2        | 56      | -      | +             | +            | +          |
| 3        | 39      | +      | -             | -            | +          |
| 4        | 39      | -      | -             | +            | -          |
| 5        | 36      | -      | +             | +            | -          |
| 6        | NA      | NA     | NA            | NA           | NA         |
| 7        | 61      | -      | +             | +            | +          |
| 8        | 38      | -      | +             | -            | -          |
| 9        | 42      | -      | -             | +            | +          |
| 10       | 48      | -      | +             | +            | +          |
| 11       | 69      | -      | +             | -            | +          |
| 12       | 19      | +      | -             | +            | -          |
| 13       | 15      | -      | -             | -            | -          |
| 14       | 09      | -      | -             | -            | -          |
| 15       | 12      | -      | +             | +            | -          |
| 16       | 53      | -      | +             | +            | +          |
| 17       | NA      | NA     | NA            | NA           | NA         |
| 18       | 44      | -      | -             | +            | +          |
| 19       | 44      | -      | +             | +            | +          |
| 20       | 37      | +      | -             | +            | -          |
| 21       | NA      | NA     | NA            | NA           | NA         |
| 22       | 36      | +      | -             | +            | -          |
| 23       | 65      | -      | +             | +            | +          |
| 24       | 28      | -      | +             | +            | -          |
| 25       | 42      | +      | -             | +            | +          |
| 26       | 13      | -      | +             | -            | -          |
| 27       | 28      | -      | +             | +            | -          |
| 28       | NA      | NA     | NA            | NA           | NA         |
| 29       | 35      | -      | +             | +            | -          |
| 30       | 28      | -      | -             | -            | -          |
| 31       | 35      | +      | -             | +            | -          |
| 32       | 57      | -      | +             | -            | +          |
| 33       | 63      | -      | -             | -            | +          |
| 34       | 23      | -      | -             | -            | -          |
| 35       | 46      | -      | -             | +            | +          |
| 36       | 37      | -      | -             | -            | -          |
| 37       | 50      | -      | -             | -            | +          |
| 38       | 38      | -      | -             | -            | -          |
| 39       | 13      | -      | -             | -            | -          |
| 40       | 24      | -      | +             | +            | -          |
| 41       | 05      | -      | +             | -            | -          |
| 42       | 19      | +      | -             | +            | -          |
| 43       | 55      | -      | +             | +            | +          |
| 44       | NA      | NA     | NA            | NA           | NA         |
| 45       | 34      | -      | -             | -            | -          |
| 46       | 56      | +      | -             | +            | +          |
| 47       | 05      | -      | +             | -            | -          |
| 48       | NA      | NA     | NA            | NA           | NA         |
| 49       | 47      | -      | -             | -            | +          |
| 50       | 23      | -      | -             | -            | -          |
| 51       | NA      | NA     | NA            | NA           | NA         |
| 52       | 21      | -      | -             | -            | -          |
| 53       | 32      | +      | -             | +            | -          |
| 54       | 04      | -      | +             | -            | -          |
| 55       | NA      | NA     | NA            | NA           | NA         |

† = idade na qual os dados foram obtidos, + = presença do vício de refração; - = ausência do vício de refração; NA = não analisado

Tabela 8 – Alterações ósseas observadas ao exame radiológico nos pacientes com NF1 estudados.

| Alteração                                                           | Paciente                                                                                         |
|---------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Escoliose                                                           | 2, 4, 5, 7, 9, 10, 11, 13, 15 16, 18, 19, 20, 22, 25, 27, 29, 31, 32, 35, 39, 43, 44, 45, 49, 54 |
| Cifose                                                              | 2, 4, 15, 18, 25, 29, 30, 33, 45                                                                 |
| Cifoescoliose                                                       | 2, 5, 15, 25, 29, 33, 36, 45, 46, 50                                                             |
| Peito escavado                                                      | 8, 9, 14, 20, 26, 27, 29, 38, 39, 44, 49, 54                                                     |
| Aumento dos forâmens de conjugação                                  | 1, 4, 5, 10, 12, 16, 22, 29, 39, 41, 50, 52, 54                                                  |
| Erosão da parede anterior do corpo vertebral                        | 9, 12, 16, 18, 19, 35, 39, 41, 54                                                                |
| Erosão da parede posterior do corpo vertebral ( <i>scalloping</i> ) | 1, 5, 10, 12, 16, 39, 41, 50, 52, 54                                                             |
| Erosão e irregularidade dos arcos costais                           | 2, 5, 7, 10, 12, 29, 39, 43, 44, 50, 52                                                          |
| Lesões osteolíticas                                                 | 26, 14                                                                                           |
| Cortical alterada                                                   | 2, 5, 11, 20, 25                                                                                 |
| Múltiplas imagens nodulares em partes moles                         | 5                                                                                                |
| Alargamento mediastinal sem causa definida                          | 2, 39                                                                                            |
| Alargamento mediastinal devido à meningocele                        | 10                                                                                               |
| Erosão do periósteeo e periostite                                   | 5                                                                                                |
| Vértebra de transição lombosacral                                   | 19, 32                                                                                           |
| Fibroma cortical                                                    | 2, 26                                                                                            |
| Espinha bífida                                                      | 1, 5, 13, 14, 15, 25, 34                                                                         |
| Fusão de vértebras cervicais                                        | 9                                                                                                |
| Alargamento do mediastino                                           | 10, 50, 52, 54                                                                                   |
| Geno valgo                                                          | 20                                                                                               |
| Alteração de morfologia vertebral                                   | 9, 29                                                                                            |
| Massa mediastinal                                                   | 10, 39, 52                                                                                       |
| Osteofitose                                                         | 5, 11, 16, 19, 33, 35                                                                            |
| Acunhamento do corpo vertebral                                      | 9, 11, 33                                                                                        |
| Redução de espaços intervertebrais                                  | 9, 10, 11, 19, 29                                                                                |
| Sacralização da apófise                                             | 43                                                                                               |
| Vértebra em limbus                                                  | 5                                                                                                |
| Destruição da apófise transversa                                    | 1, 12                                                                                            |
| Afilamento de pedículos                                             | 9, 16, 31                                                                                        |
| Hemivértebras                                                       | 25                                                                                               |
| Transparência alterada                                              | 10, 43                                                                                           |
| Lesões císticas                                                     | 14, 20, 25, 26, 28                                                                               |
| Aumento do volume das partes moles                                  | 11, 15, 16, 20                                                                                   |
| Distúrbios de crescimento                                           | 20, 50, 25                                                                                       |
| Aumento estriado do trabeculado ósseo                               | 1                                                                                                |
| Rótula bipartida                                                    | 19                                                                                               |
| Osteopenia                                                          | 7, 10, 11, 22, 31, 35, 43, 49, 50                                                                |
| Espondilolístese                                                    | 53                                                                                               |

Tabela 9 – Resultados da avaliação psicológica referentes a quociente de inteligência/QI, disfunções neurológicas, níveis de depressão, níveis de ansiedade e transtornos de déficit de atenção por hiperatividade.

| Paciente | QI    |                | Disfunção Neurológica |     | Depressão   | Ansiedade   |          | TDAH   |               |
|----------|-------|----------------|-----------------------|-----|-------------|-------------|----------|--------|---------------|
|          | valor | classificação  | DVPM                  | ICN |             | transitória | estável  | sinais | classificação |
| 1        | 72    | limitrofe      | +                     | +   | DM grave    | moderada    | moderada | 5      | -             |
| 2        | 88    | médio inferior | +                     | +   | DM leve     | leve        | leve     | 3      | -             |
| 3        | NA    | NA             | NA                    | NA  | NA          | NA          | NA       | NA     | NA            |
| 4        | 82    | médio inferior | +                     | +   | DM moderada | moderada    | grave    | 10     | moderado      |
| 5        | 70    | limitrofe      | NA                    | NA  | DM grave    | moderada    | leve     | 9      | leve          |
| 6        | NA    | NA             | NA                    | NA  | NA          | -           | leve     | 7      | leve          |
| 7        | NA    | NA             | NA                    | NA  | DM leve     | -           | -        | NA     | NA            |
| 8        | 88    | médio inferior | -                     | -   | DM moderada | leve        | moderado | 3      | -             |
| 9        | 77    | limitrofe      | +                     | +   | -           | leve        | leve     | 4      | -             |
| 10       | 63    | RM leve        | +                     | -   | DM moderada | moderada    | grave    | 1      | -             |
| 11       | 69    | RM leve        | +                     | +   | DM moderada | grave       | grave    | 11     | moderado      |
| 12       | 65    | RM leve        | +                     | +   | DM moderada | -           | moderada | 5      | -             |
| 13       | 81    | médio inferior | +                     | +   | DM moderada | moderada    | grave    | 5      | -             |
| 14       | 93    | médio          | +                     | +   | -           | leve        | grave    | 8      | leve          |
| 15       | 71    | limitrofe      | +                     | +   | -           | -           | -        | 9      | leve          |
| 16       | 68    | RM leve        | +                     | +   | DM grave    | -           | moderada | 8      | leve          |
| 17       | NA    | NA             | NA                    | NA  | NA          | NA          | NA       | NA     | NA            |
| 18       | 66    | RM leve        | +                     | +   | DM moderada | NA          | NA       | 9      | leve          |
| 19       | 70    | limitrofe      | +                     | +   | DM moderada | moderada    | grave    | 0      | -             |
| 20       | 63    | RM leve        | +                     | +   | -           | moderada    | moderada | 4      | -             |
| 21       | NA    | NA             | NA                    | NA  | NA          | NA          | NA       | NA     | NA            |
| 22       | 72    | limitrofe      | +                     | +   | DM moderada | leve        | -        | 2      | -             |
| 23       | 96    | médio          | +                     | +   | -           | -           | leve     | 9      | leve          |
| 24       | 70    | limitrofe      | +                     | +   | DM leve     | leve        | grave    | 8      | leve          |
| 25       | NA    | NA             | NA                    | NA  | NA          | NA          | NA       | NA     | NA            |
| 26       | 80    | limitrofe      | +                     | +   | DM grave    | leve        | grave    | 1      | -             |
| 27       | 90    | médio          | -                     | -   | DM leve     | -           | moderada | 5      | -             |
| 28       | 53    | RM leve        | +                     | +   | DM moderada | -           | moderada | 13     | moderado      |
| 29       | 51    | RM moderado    | +                     | +   | DM grave    | grave       | grave    | 10     | moderado      |
| 30       | 79    | limitrofe      | +                     | +   | DM grave    | grave       | grave    | 9      | leve          |
| 31       | 72    | limitrofe      | +                     | +   | DM leve     | leve        | moderado | 2      | -             |
| 32       | 116   | médio superior | -                     | -   | DM leve     | -           | moderado | 1      | -             |
| 33       | 62    | RM leve        | +                     | +   | DM moderada | moderada    | grave    | 4      | -             |
| 34       | NA    | NA             | NA                    | NA  | NA          | NA          | NA       | NA     | NA            |
| 35       | 56    | RM leve        | +                     | +   | DM severa   | grave       | grave    | 11     | moderado      |
| 36       | 73    | limitrofe      | +                     | +   | DM leve     | -           | leve     | 9      | leve          |
| 37       | 52    | RM leve        | +                     | +   | DM grave    | moderada    | grave    | 8      | leve          |
| 38       | 65    | RM leve        | +                     | -   | DM moderada | moderada    | grave    | 5      | -             |
| 39       | NA    | NA             | NA                    | NA  | NA          | NA          | NA       | NA     | NA            |
| 40       | 102   | médio          | -                     | -   | DM moderada | moderada    | grave    | 2      | -             |
| 41       | 78    | médio inferior | -                     | -   | -           | -           | -        | 11     | moderado      |
| 42       | NA    | NA             | NA                    | NA  | NA          | NA          | NA       | NA     | NA            |
| 43       | NA    | NA             | NA                    | NA  | NA          | NA          | NA       | NA     | NA            |
| 44       | NA    | NA             | NA                    | NA  | NA          | NA          | NA       | NA     | NA            |
| 45       | 70    | limitrofe      | +                     | +   | -           | moderada    | moderada | 3      | -             |
| 46       | NA    | NA             | NA                    | NA  | NA          | NA          | NA       | NA     | NA            |
| 47       | NA    | NA             | NA                    | NA  | NA          | NA          | NA       | NA     | NA            |
| 48       | NA    | NA             | NA                    | NA  | NA          | NA          | NA       | NA     | NA            |
| 49       | 97    | médio          | +                     | +   | DM moderada | grave       | moderada | 3      | -             |
| 50       | 60    | RM leve        | +                     | +   | DM moderada | grave       | grave    | 2      | -             |
| 51       | 60    | RM leve        | +                     | +   | DM moderada | -           | leve     | 4      | -             |
| 52       | NA    | NA             | NA                    | NA  | NA          | NA          | NA       | NA     | NA            |
| 53       | 84    | médio inferior | -                     | -   | DM leve     | -           | moderada | 4      | -             |
| 54       | 100   | médio          | -                     | -   | NA          | NA          | NA       | 7      | leve          |
| 55       | 78    | médio inferior | +                     | +   | DM leve     | -           | -        | 4      | -             |

RM = retardo mental; DVPM = déficit viso-perceptivo-motor; ICN = indícios de comprometimento neurológico; DM = depressão maior; TDAH = transtorno de déficit de atenção por hiperatividade; + = presença; - = ausência; NA = não analisado ou não se aplica



**Tabela 10** – Alterações eletroencefalográficas (EEG) e eletrocardiográficas (ECG) apresentadas pelos pacientes com NF1 estudados.

| Alteração                                                                          | Paciente                  |
|------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|
| <b>EEG</b>                                                                         |                           |
| Anormalidade paroxística no hemisfério cerebral esquerdo                           | 9, 15, 33, 48             |
| Lentificação difusa da atividade cerebral                                          | 30                        |
| Anormalidade paroxística anterior à esquerda                                       | 6, 9, 18                  |
| Ondas pontas na região temporal média esquerda                                     | 11                        |
| <b>ECG</b>                                                                         |                           |
| Taquicardia sinusal                                                                | 2, 16, 25, 28, 45, 46, 52 |
| Bradicardia sinusal                                                                | 10                        |
| Desvio do eixo elétrico QRS à esquerda                                             | 14, 23, 33                |
| Desvio do eixo elétrico QRS à direita                                              | 5                         |
| Baixa voltagem QRS em derivações periféricas                                       | 2                         |
| Bloqueio do ramo direito                                                           | 18, 38                    |
| Bloqueio incompleto do ramo direito                                                | 15                        |
| Transição lenta em derivações precordiais                                          | 2                         |
| Hemibloqueio anterior esquerdo                                                     | 32, 38                    |
| Possível área inativa inferior                                                     | 7                         |
| Extra sístole ventricular                                                          | 16, 23                    |
| Sobrecarga do ventrículo direito e alterações difusas da repolarização ventricular | 18                        |
| Arritmia sinusal                                                                   | 12                        |
| Bloqueio direcional antero-posterior                                               | 46                        |
| QRS de baixa voltagem no plano frontal                                             | 7                         |
| Ritmo sinusal com sobrecarga atrial e ventricular esquerda                         | 43                        |

**Tabela 11** – Outras características menos frequentes ou não típicas observadas nos pacientes com NF1 estudados.

| Característica                                                                                                                                          | Paciente                                                                                      |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|
| Convulsões                                                                                                                                              | 1, 15, 40, 43, 48, 50                                                                         |
| Hiperglicemia                                                                                                                                           | 2, 5, 45, 50                                                                                  |
| Cefaléia                                                                                                                                                | 1, 4, 5, 6, 9, 11, 12, 13, 15, 18, 19, 22, 24, 25, 26, 27, 29, 31, 33, 35, 43, 50, 51, 54, 55 |
| Disartria                                                                                                                                               | 17, 35, 47                                                                                    |
| Hérnia umbilical/inguinal                                                                                                                               | 3, 5, 16, 41, 47                                                                              |
| Hemorróida                                                                                                                                              | 1, 4, 7, 10, 16, 25, 32                                                                       |
| Problemas ginecológicos                                                                                                                                 | 2, 4, 10, 11, 12, 16, 19, 20, 23, 29                                                          |
| Infecções das vias aéreas                                                                                                                               | 1, 9, 12, 13, 14, 25, 26, 29, 35, 39, 41, 47                                                  |
| Hipertensão arterial                                                                                                                                    | 16, 18, 23, 33, 35, 43                                                                        |
| Problemas gástricos                                                                                                                                     | 9, 16, 22, 23, 25, 36, 43, 44                                                                 |
| Constipação intestinal                                                                                                                                  | 4, 10, 11, 12, 16, 20, 32, 50                                                                 |
| Agressividade                                                                                                                                           | 2, 13, 15, 29, 30                                                                             |
| Orelhas em abano                                                                                                                                        | 13, 15                                                                                        |
| Palato alto                                                                                                                                             | 13, 54                                                                                        |
| Implantação baixa das orelhas                                                                                                                           | 15                                                                                            |
| Prognatismo maxilar; fenda palpebral para cima; clinodactilia bilateral no 5ºdedo; prega simiesca na mão esquerda; narinas antevertidas; hiperatividade | 15                                                                                            |
| Língua geográfica                                                                                                                                       | 16                                                                                            |
| Mamilos supernumerários                                                                                                                                 | 19                                                                                            |
| Dislexia; orientação deficitária                                                                                                                        | 26                                                                                            |
| Assimetria facial                                                                                                                                       | 29, 47                                                                                        |
| Unhas displásicas; pele seca                                                                                                                            | 33                                                                                            |
| Sindactilia no 2º e 3º dedos dos pés                                                                                                                    | 37                                                                                            |
| Problemas psiquiátricos                                                                                                                                 | 35                                                                                            |
| Artrite                                                                                                                                                 | 22                                                                                            |
| Osteoporose                                                                                                                                             | 7, 16                                                                                         |
| Dificuldade urinária, paralisia em MMSSII                                                                                                               | 50                                                                                            |

MMSSII = membros superiores e inferiores



**Tabela 12** – Caracterização dos pacientes com leucemia quanto a idade (anos), sexo (M = masculino, F = feminino) e tipo de leucemia (LMC = leucemia mielóide crônica; LMCJ = leucemia mielóide crônica juvenil).

| Paciente | Idade | Sexo | Diagnóstico |
|----------|-------|------|-------------|
| L1       | ♦     | F    | ♦           |
| L2       | 21    | M    | LMC         |
| L3       | 14    | F    | LMCJ        |

♦ = dado não disponível

**Tabela 13** – Caracterização dos indivíduos controles quanto a idade (anos) e sexo (M = masculino, F = feminino).

| Controle | Idade | Sexo |
|----------|-------|------|
| C1       | 23    | F    |
| C2       | 19    | M    |
| C3       | 21    | F    |
| C4       | 26    | M    |
| C5       | 28    | F    |
| C6       | 24    | F    |
| C7       | 28    | M    |
| C8       | 24    | M    |
| C9       | 28    | M    |
| C10      | 23    | F    |

### III. 2. Métodos

#### a) Extração de DNA

##### Isolamento de linfócitos

Uma amostra de aproximadamente 10 mL de sangue periférico foi colhida em tubo *vacutainer* contendo anti-coagulante (EDTA) e homogeneizada logo em seguida. Posteriormente, 9 mL de sangue foram pipetados vagarosamente pelas paredes de um tubo de centrifuga contendo 6 mL de solução de Histopaque, previamente mantida à temperatura ambiente por cerca de uma hora. Os tubos foram centrifugados por 30 minutos a 1500 rpm para separação dos elementos sangüíneos: as hemáceas, na camada inferior; o plasma, na camada superior e, entre ambas, os linfócitos sobre o Histopaque. Essa camada de linfócitos foi aspirada com pipeta Pasteur e transferida para um novo tubo, que recebeu PBS até a marca de 15 mL. O material foi invertido cuidadosamente e centrifugado por 15 minutos a 1200 rpm. A maior parte do sobrenadante foi descartada e o *pellet* de linfócitos foi ressuscitado. Foi adicionado novo PBS e os passos de centrifugação e separação do *pellet* foram repetidos.

##### Extração de DNA genômico

A extração de DNA seguiu técnica descrita por Abdel-Rahman *et al.* (1994) com algumas modificações. Ao *pellet* ressuscitado em 1 mL de PBS, foram adicionados 3 mL do tampão de lise (TrisHCl 10 mM, NaCl 400mM, Na<sub>2</sub>EDTA 2mM), 200 µL de SDS 10%, 50 µL de proteinase K (20mg/mL) e 40 µL de RNase A (20mg/mL). Após digestão protéica a 37°C *overnight*, foi adicionado 1 mL de NaCl 6M (solução saturada), sendo o tubo agitado e, em seguida, colocado no gelo por 15 minutos. Após nova agitação, o material foi centrifugado por 15 minutos a 2000 rpm e o sobrenadante transferido para outro tubo ao qual foram adicionados 10 mL de etanol 100% gelado. O tubo foi invertido cuidadosamente e a precipitação do DNA foi observada. O DNA foi “pescado”, lavado com etanol 70%, seco à temperatura ambiente e ressuscitado em água Milli-Q autoclavada, sendo armazenado à temperatura de – 20 °C.

### b) Amplificação do DNA

A amplificação dos exons 20-27a, 28, 29, 31 e 37 do gene *NFI* foi feita segundo técnica de Saiki *et al.* (1992), com algumas modificações.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi processada em ciclador de temperatura, em volumes de 45 µl, contendo 100 ng de DNA genômico, Tris-HCl-KCl 10 mM (pH 8.3), MgCl<sub>2</sub> 2,0 a 3,0 mM, 200 µM de dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dCTP), 45 pmol de cada *primer*, 1U de Taq DNA polimerase e glicerol 0-5%, sobre os quais foram adicionados 20 µL de óleo mineral. Em todos os experimentos, um tubo sem DNA foi utilizado como controle negativo.

As condições de amplificação para os segmentos de interesse compreenderam uma etapa inicial de 5 minutos a 94°C para inativação de possíveis proteases e 27 ou 30 ciclos de 60 segundos a 94°C para desnaturação do DNA, 30-120 segundos para anelamento dos *primers* em temperaturas de 54-65°C e 90 segundos a 72°C para extensão das cadeias, seguidos de 7 minutos a 72°C para extensão final. Os produtos de amplificação gerados atingiram de 238 a 509 pares de base (pb) (Tabela 14).

Os *primers* utilizados para amplificação dos exons 20, 22, 23.1, 23.2, 23a, 24, 26, 28, 29, 31 e 37 do gene *NFI* foram sintetizados com seqüências descritas por Stark *et al.* (1991; 1992), Rodenhiser *et al.* (1993), Upadhyaya *et al.* (1996), Li *et al.* (1995) e Van Meyel *et al.* (1994). Para amplificação dos exons 21, 25 e 27a, foram desenhados *primers* com o auxílio do programa computacional "Primer 3" versão 0.2. As seqüências obtidas foram conferidas com aquelas presentes no banco de dados GENBANK [acessos U17683 – U17689 (exons 20-27a) e L03723 (exons 28, 29, 31 e 37)]. As seqüências desses *primers* estão descritas na Tabela 15.

Os produtos da reação de PCR foram separados em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio, juntamente com um marcador de 100 pb (Ladder Gibco DNA 100 pb), e visualizados sob iluminação ultravioleta para confirmação do sucesso da reação.

**Tabela 14** – Condições de amplificação e tamanho de produtos de PCR para os 14 exons do gene *NFI* estudados.

| Exon | Tamanho<br>exon (pb) | Segmento<br>amplificado (pb) | No. de<br>Ciclos | Anelamento          |                     |
|------|----------------------|------------------------------|------------------|---------------------|---------------------|
|      |                      |                              |                  | Temperatura<br>(°C) | Tempo<br>(segundos) |
| 20   | 182                  | 402                          | 30               | 54                  | 60                  |
| 21   | 212                  | 278                          | 30               | 60                  | 30                  |
| 22   | 162                  | 331                          | 30               | 55                  | 60                  |
| 23.1 | 104                  | 281                          | 30               | 58                  | 60                  |
| 23.2 | 136                  | 268                          | 30               | 56                  | 60                  |
| 23a  | 63                   | 447                          | 30               | 58                  | 60                  |
| 24   | 159                  | 236                          | 30               | 58                  | 60                  |
| 25   | 98                   | 266                          | 30               | 55                  | 60                  |
| 26   | 147                  | 342                          | 30               | 58                  | 60                  |
| 27a  | 147                  | 249                          | 30               | 60                  | 30                  |
| 28   | 433                  | 509                          | 30               | 55                  | 60                  |
| 29   | 341                  | 423                          | 27               | 65                  | 120                 |
| 31   | 194                  | 277                          | 30               | 55                  | 60                  |
| 37   | 102                  | 238                          | 30               | 55                  | 60                  |

Tabela 15- Sequências de *primers* utilizados para amplificação dos 14 exons estudados.

|                                                                                                     |                                                                                                   |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Exon 20<sup>a</sup></b><br>5' CCACCCTGGCTGATTATCG 3'<br>5' TAATTTTTGCTTCTCTTACATGC 3'            | <b>Exon 21<sup>b</sup></b><br>5' AGCAAGGCCATGTTAGTAAA 3'<br>5' CCCGCTTACTCTAATCACTTAC 3'          |
| <b>Exon 22<sup>a</sup></b><br>5' TGCTACTCTTTAGCTTCCTAC 3'<br>5' CCTTAAAAGAAGACAATCAGCC 3'           | <b>Exon 23.1<sup>a</sup></b><br>5' TTTGTATCATTCATTTTGTGTGTA 3'<br>5' AAAAACAGCGGTTCTATGTGAAAAG 3' |
| <b>Exon 23.2<sup>a</sup></b><br>5'CTTAATGTCTGTATAAGAGTCTC 3'<br>5' ACTTTAGATTAATAATGGTAATCTC 3'     | <b>Exon 23a<sup>a</sup></b><br>5'AGCCAGAAATAGTATACATGATTGGGT3'<br>5' CTATTTTCTGCCAGAATTAGTAGA 3'  |
| <b>Exon 24<sup>c</sup></b><br>5' CAAACCTTATACTCAATTCTCAACTC 3'<br>5'AAGGGGAATTTAAGATAGCTAGATTATC 3' | <b>Exon 25<sup>b</sup></b><br>5' TGTTTGATTTTAAAGTACTAGCAGA 3'<br>5' TGATTCAAACAGAGCAACTG 3'       |
| <b>Exon 26<sup>a</sup></b><br>5' GCTGTGTCTAATGTCAAGTCAC 3'<br>5' TTAAACGGAGAGTGTTCACTATC 3'         | <b>Exon 27a<sup>b</sup></b><br>5' TGTGTGAGTGCTAAATGTGAA 3'<br>5' CAACCAAAAAGAAAGCAATC 3'          |
| <b>Exon 28<sup>d</sup></b><br>5' TCTTTGTCTTTTTTGTCATTTTCC 3'<br>5' AGTCAAGAAAAGCAATGAATCGT 3'       | <b>Exon 29<sup>e</sup></b><br>5' TTCTTCTCCACTTCACCCCGTCAC 3'<br>5' GCAACAACCCCAAATCAAACCTGAAG 3'  |
| <b>Exon 31<sup>d</sup></b><br>5' TITCATTGACCATCACATGCTAAT 3'<br>5' CACAAAGGAGATACTAGATAAATAT 3'     | <b>Exon 37<sup>f</sup></b><br>5' TCATTCCGAGATTCACTTTAG 3'<br>5' AAAGTAACATTCAACACTGATA 3'         |

<sup>a</sup>segundo Li *et al.* (1995)

<sup>b</sup> sequência de primers desenhadas com auxílio do programa “Primer 3” descrito no endereço:  
[http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3\\_www.cgi](http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi)

<sup>c</sup> segundo Van Meyel *et al.* (1994 )

<sup>d</sup> segundo Stark *et al.* (1991, 1992)

<sup>e</sup> segundo Rodenhiser *et al.* (1993)

<sup>f</sup> segundo Upadhyaya *et al.* (1996)



### c) Análise do polimorfismo conformacional de cadeia simples de DNA (SSCP)

As amostras de DNA amplificadas por PCR foram submetidas à análise por SSCP. Esse método, descrito por Orita *et al.* (1989a, 1989b), compreende a desnaturação do DNA e sua aplicação em um gel de poliacrilamida não desnaturante. A visualização dos produtos permite a detecção de mutações de ponto em decorrência da migração diferencial da cadeia mutante no gel, que depende não somente do seu tamanho como também de sua sequência e conformação (Grompe, 1993).

O produto de PCR foi diluído em solução contendo formamida 98%, EDTA 10mM, pH 8.0, azul de bromofenol e xilenocianol 0,025%. A proporção de diluição do amplificado foi de 1:1 nessa solução. Já diluídas, as amostras sofreram desnaturação por aquecimento durante 10 minutos a 94°C e, em seguida, foram acondicionadas em gelo para impedir sua renaturação. Posteriormente, foi feita a eletroforese em gel de poliacrilamida 7,5% ou 10% a partir de instagel 50% e glicerol 0-5%, em voltagem constante (180V) à temperatura ambiente ou a 4°C, em presença de tampão TEB 0,5X (Tri-borato 90 mM pH 8.3; EDTA 4 mM) por aproximadamente 5 horas.

#### Coloração por nitrato de prata

Após eletroforese, os géis foram corados por nitrato de prata segundo Bassam & Caetano-Anollés (1993). Em uma primeira etapa, os géis foram fixados em solução fixadora contendo etanol 10% e ácido acético glacial 0,75% por 10 minutos, sob agitação leve, porém constante. Em seguida, foi realizada a coloração do gel por solução de nitrato de prata 0,3% por 10 minutos, também sob agitação constante. Para retirada do excesso de prata do gel, foram realizadas duas lavagens sucessivas com água Milli-Q, que não ultrapassaram um minuto de duração. Por fim, foi adicionada, sob agitação constante dos géis, uma solução reveladora contendo hidróxido de sódio 3% e formaldeído 0,3%, por tempo suficiente para que as bandas fossem visualizadas. A seguir, a revelação foi bloqueada com a solução fixadora inicial.

Os géis foram secos em papel celofane e glicerol 10%, segundo técnica



desenvolvida por Ceron *et al.* (1992), e arquivados.

#### d) Seqüenciamento automático

As amostras que apresentaram corrida anormal no gel de SSCP foram submetidas a seqüenciamento automático em seqüenciador ABI Prism 377 (*Applied Biosystems Inc*) previamente clonadas, ou não, em pUC18.

#### Precipitação das amostras para seqüenciamento

As amostras selecionadas foram reamplificadas em duplicata em reações de 45 µL e submetidas a eletroforese em gel de agarose 2% para confirmação do sucesso da reação. Os conteúdos das réplicas foram colocados em um único tubo e a ele adicionados 10% do volume total de acetato de sódio (NaOAc) 3M e o dobro do volume de etanol absoluto gelado. O material foi armazenado a -20°C *overnight* (16 horas) para precipitação do DNA.

Posteriormente, os produtos foram centrifugados 20 minutos a 12000 rpm, o sobrenadante foi descartado e as amostras foram mantidas à temperatura ambiente por aproximadamente duas horas para secar. Foram, então, eluídas em 10 µL de água milli-Q autoclavada e colocadas na estufa a 37°C por duas horas. Em seguida, foram aplicadas em gel de agarose *low melting* e a corrida eletroforética foi realizada a 100V por uma hora.

A etapa seguinte compreendeu a purificação do DNA com o Kit Concert<sup>TM</sup> Matrix Gel (GIBCO – BRL), seguindo as instruções do fabricante.

#### Purificação do DNA

A banda obtida no gel de agarose *low melting* foi recortada, colocada em tubo de 1,5mL e aquecida a 50°C com tampão de solubilização (L1), resina de sílica, tampão de lavagem (L2), tampão TE, para dissolução do gel, purificação e eluição do DNA. O produto assim obtido foi submetido a fosforilação e clonagem em vetor pUC18, utilizando-se o Kit SureClone<sup>TM</sup> Ligation (Amersham - Pharmacia), segundo as instruções do fabricante.



### Fosforilação e clonagem do produto em vetor pUC18

Inicialmente, o produto purificado foi fosforilado utilizando-se BK (*buffer* kinase), fragmento Klenow e PNK (T4 polinucleotídeo Kinase), foi centrifugado e recebeu fenol/clorofórmio. Posteriormente, foi clonado em vetor pUC18, com adição de tampão de ligação, DTT (dithiothreitol) e T4 DNA ligase. Esse material foi incubado a 16°C *overnight* para posterior transformação.

### Transformação

As bactérias *E. coli* foram transformadas e colocadas para crescer a 37°C *overnight* em placas de ágar contendo X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactosídeo) e IPTG (isopropil-β-D-galactosídeo). O X-gal é degradado pela enzima β-galactosidase, que é codificada pelo gene *Lac Z* localizado na extremidade do sítio *polycloning* do plasmídeo, o que resulta na formação de colônias azuis. A inserção do fragmento de DNA de interesse no sítio *polycloning* impede a atuação do promotor de *Lac Z* com conseqüente ausência da síntese dessa enzima e da coloração azul.

Foram selecionadas até oito colônias brancas de cada placa, tendo em vista que a probabilidade de pelo menos uma colônia com o fragmento mutado ( $P_{\text{alelo mutado}} = 50\%$ ) entre oito é igual a 99,6%. As bactérias foram colocadas para crescer a 37°C *overnight* em placa de 96 poços contendo meio líquido.

Posteriormente, foram realizadas reações de PCR com amostras das colônias e com *primers* específicos para o exon suspeito de mutação. O produto foi analisado por SSCP seguindo o protocolo descrito no item III.2.c.

Os clones com padrões alterados foram amplificados com *primers* sense e antissense do vetor pUC18 e, em seguida, o produto foi submetido à reação de amplificação para sequenciamento com 2 µL de *Big Dye Terminator* e 1 µL do *primer* sense do vetor pUC18 diluído para 3,2 pmol/µL. Essa última reação foi repetida com o *primer* antissense do vetor e, para os clones com padrão normal, apenas com o *primer* sense.



A reação de amplificação para seqüenciamento compreendeu uma primeira etapa de 2 segundos a 96°C para desnaturação da cadeia de DNA, 25 ciclos de 10 segundos a 96°C, 5 segundos para anelamento em temperatura de 50°C e 4 minutos a 60°C para extensão das cadeias.

Apenas uma amostra (exon 37) foi submetida a seqüenciamento direto (sem clonagem). Nesse caso, o produto de PCR foi precipitado, purificado com o Kit Concert e submetido à reação de amplificação com 2 µL de *Big Dye Terminator* e 2 µL de *primer* sense e antissense do exon 37 diluído para 1,6 pmol/µL. Essa reação compreendeu uma primeira etapa de 5 minutos a 95°C para desnaturação da cadeia de DNA, 30 ciclos de 30 segundos a 95°C, 20 segundos para anelamento em temperatura de 55°C e 4 minutos a 60°C para extensão das cadeias.

#### Precipitação

As amostras, colocadas em placa de 96 poços, foram precipitadas com 100 µL de etanol absoluto gelado, 5 µL de acetato de potássio (KOAc) 3M e 30 µL de água, homogeneizadas aproximadamente 30 vezes por inversão e incubadas por 15 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, foram centrifugadas por 30 minutos a 3200 rpm a 4°C e o sobrenadante foi descartado. Posteriormente, receberam 200 µL de etanol 70% e foram centrifugadas por 5 minutos a 3200 rpm a 4°C. O sobrenadante foi descartado e foi feita nova adição de etanol 70% e centrifugação. A placa foi então invertida e centrifugada por mais 3 minutos a 720 rpm e seca em estufa a 37°C por uma hora.

#### Desnaturação

Depois de precipitadas, as amostras receberam 1,5 µL de *loading buffer* (formamida e blue dextran) e foram homogeneizadas aproximadamente 25 vezes. Foram, então, desnaturadas por 2 minutos a 95°C e mantidas no gelo até o momento de aplicação no gel de poliacrilamida 5% do seqüenciador.



## IV. RESULTADOS

### IV.1. Avaliação clínica dos pacientes

#### Pacientes portadores de NF1

Foram analisadas 55 amostras de sangue de pacientes portadores de neurofibromatose tipo 1, 33 provenientes de indivíduos do sexo feminino e 22 do sexo masculino, com idades variando entre 2 e 68 anos (média = 33anos) e cor de pele branca (51%), preta ou parda (49%). Entre os adultos, a maioria (67%) não concluiu o primeiro grau ou nunca freqüentou a escola e, em 40%, o probando representava o único afetado na família.

Os dados antropométricos obtidos foram comparados com as curvas de normalidade estabelecidas para a população geral segundo a Tabela de Tanner-Whitethouse de 1966 (Jones, 1988). Foi considerado como tendo baixa estatura indivíduos que apresentavam o valor abaixo ou no limite do percentil três e, em relação ao perímetro cefálico (PC), os valores acima ou no limite de 98% indicaram a presença de macrocefalia ( $PC^{98\%}_{mulheres} \geq 58 \text{ cm} / PC^{98\%}_{homens} > 58 \text{ cm}$ ). Dos 55 indivíduos analisados, 19 (40%) apresentaram baixa estatura e 23 (51%) macrocefalia.

Os primeiros sinais da NF1 manifestaram-se geralmente na primeira ou na segunda década de vida (84%). Quanto às principais características clínicas, todos os pacientes apresentaram manchas café-com-leite com predomínio de freqüência alta e localização difusa na maioria dos casos estudados. Os neurofibromas e nódulos de Lisch mostraram freqüências variáveis e as efélides ou sardas axilares, por sua vez, exibiram geralmente freqüência alta. Na maioria dos casos, a localização dos neurofibromas foi difusa enquanto a dos nódulos de Lisch, quase sempre presentes nos afetados, e das sardas axilares foi predominantemente bilateral. Também foi repetidamente observado pterígio, neurofibroma de pálpebra e astigmatismo. Quanto à presença de neurofibroma plexiforme, a característica foi positiva em 20 dos casos e suspeita em outros dois.

A alteração óssea mais comum foi a escoliose, que apareceu em 47,3% dos casos investigados. Na investigação radiológica, também foram vistos em alguns pacientes: aumento do forâmen de conjugação, peito escavado, erosão e irregularidade dos arcos costais, cifoescoliose, erosão da parede posterior do corpo vertebral, cifose e erosão da parede anterior do corpo vertebral.

Quarenta dos pacientes estudados foram submetidos a avaliação psicológica, sendo detectado retardo mental (RM) leve em 13 (32,5%), RM moderado em um (2,5%) e inteligência limítrofe em 12 casos (30%). Os demais pacientes não apresentaram RM.

As alterações eletroencefalográfica (EEG) e eletrocardiográfica (ECG) mais freqüentes foram a anormalidade paroxística no hemisfério cerebral esquerdo e a taquicardia sinusal, respectivamente. Entre as características não típicas observadas em vários casos, podem ser citadas a cefaléia e as infecções das vias aéreas.

#### Pacientes com leucemia

Foram analisadas três amostras de pacientes com leucemia mielóide crônica, sendo dois pertencentes ao sexo feminino. Tais amostras foram procedentes do INCA e os dados clínicos não estiveram disponíveis para estudo.

#### Grupo controle

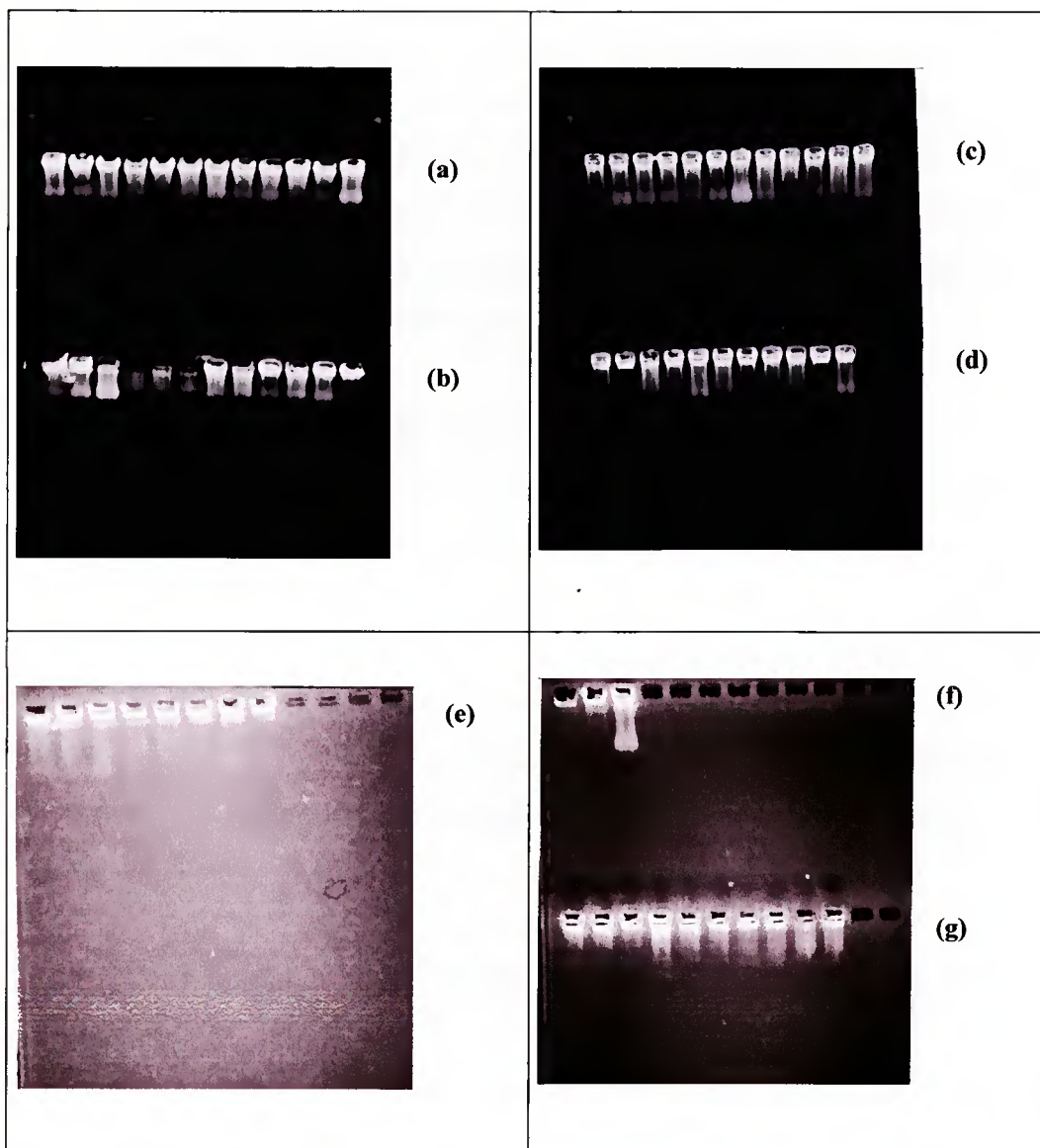
Foram analisadas dez amostras de indivíduos normais, sem características clínicas de NF1 ou doenças hematopoéticas, cinco do sexo feminino e cinco do sexo masculino, com idades entre 19 e 28 anos, que constituíram o grupo controle em relação aos dados moleculares.

### **IV.2. Extração, amplificação por PCR e análise pela técnica de SSCP**

#### **a) Extração de DNA**

O DNA de todas as 68 amostras de sangue (55 pacientes com NF1, três pacientes com leucemia e dez controles) foi extraído com sucesso. A Figura 8 mostra os resultados da corrida eletroforética em gel de agarose 1%, confirmando tal afirmação.





**Figura 8** – Foto de gel de agarose 1% corado com brometo de etídio mostrando os resultados da corrida eletroforética dos casos (a) 1-12 (linhas 1-12); (b) 13-24 (linhas 1-12); (c) 25-36 (linhas 1-12); (d) 37- 47 (linhas 1-11); (e) 48-55 (linhas 1-8); (f) L1-3 (linhas 1-3) e (g) C1-10 (linhas 1-10).



b) Amplificação pela reação em cadeia da polimerase (PCR)

A amplificação pela PCR dos exons 20-27a, 28, 29, 31 e 37 do gene *NFI* foi obtida para todas as 68 amostras.

Com o objetivo de otimizar as condições de amplificação de cada par de *primers*, foram realizados testes que determinaram as concentrações ideais de cloreto de magnésio ( $MgCl_2$ ) a serem utilizadas (2,0-3,0 mM) nas reações, bem como a presença ou não de glicerol (5% ou 10%). Tais testes foram realizados utilizando-se uma amostra de DNA escolhida ao acaso. A temperatura de *annealing* ótima para cada par de *primers* foi calculada com base na seguinte fórmula:

$$T_a = [4(C+G) + 2(A+T)] - 6$$

Os melhores resultados de amplificação ocorreram com a adição, ao mix de PCR, de  $MgCl_2$  na concentração de 2,0 mM (exons 20, 23a, 24 e 28); 2,5mM (exons 21, 26, 31 e 37) e 3,0mM (exons 22, 23.1, 23.2, 25, 27a e 29). Para os exons 21, 23.1, 23.2, 25 e 27a, as condições selecionadas incluíram a presença, no mix, de glicerol 5%. Para os exons 24 e 29, não foi realizado o teste de otimização das condições de PCR porque foram adotadas as condições citadas pela literatura para os *primers* em questão.

c) Análise do polimorfismo conformacional de cadeia simples de DNA (SSCP)

A técnica de SSCP foi utilizada para rastreamento de mutações nos exons 20-27a, 28, 29, 31 e 37 do gene *NFI*.

As condições de eletroforese em gel de poliacrilamida não desnaturante também foram otimizadas e os resultados observados variaram entre os diferentes exons (Tabela 16). A padronização dessas condições bem como daquelas de PCR, com conseqüente ausência de bandas inespecíficas e presença apenas de bandas de intensidade forte e bem definidas, facilitou a análise final dos dados e a seleção de possíveis mutações.

**Tabela 16** – Condições de SSCP utilizadas para os exons estudados.

| Exon | Concentração do gel | Temperatura | Glicerol |
|------|---------------------|-------------|----------|
| 20   | 7,5%                | 20-25°C     | 5%       |
| 21   | 7,5%                | 20-25°C     | 5%       |
| 22   | 7,5%                | 20-25°C     | 5%       |
| 23.1 | 10%                 | 4°C         | 0%       |
| 23.2 | 10%                 | 20-25°C     | 5%       |
| 23a  | 7,5%                | 4°C         | 5%       |
| 24   | 10%                 | 4°C         | 5%       |
| 25   | 7,5%                | 20-25°C     | 5%       |
| 26   | 10%                 | 4°C         | 5%       |
| 27a  | 10%                 | 20-25°C     | 5%       |
| 28   | 7,5%                | 20-25°C     | 5%       |
| 29   | 10%                 | 20-25°C     | 5%       |
| 31   | 7,5%                | 20-25°C     | 5%       |
| 37   | 10%                 | 20-25°C     | 5%       |

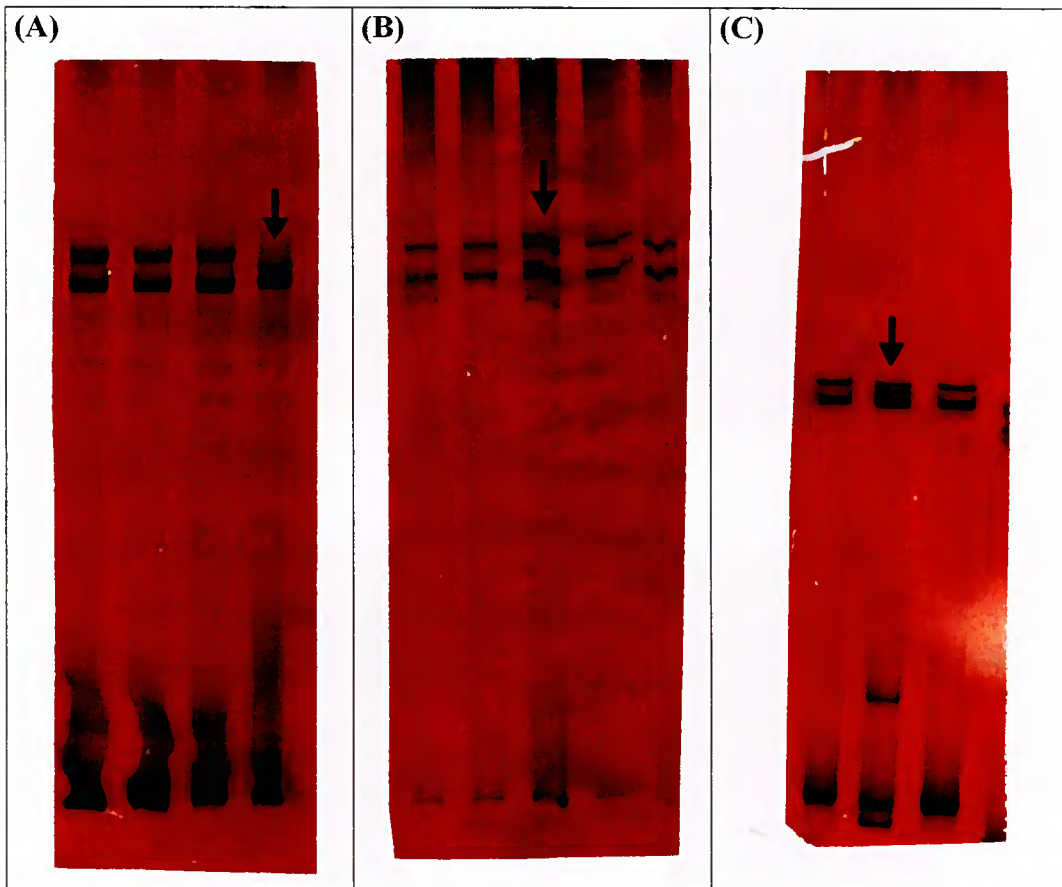
Das 68 amostras analisadas, dez provenientes dos pacientes com NF1 apresentaram padrões migratórios alterados no gel de SSCP para os exons 20 e 21 (Figura 9), 23.1, 24 e 26 (Figura 10), 23.2, 29 e 37 (Figura 11).

Os pacientes e os exons com padrões migratórios alterados compreendem os casos **24** e **34** (exon **20**), **32** (exon **21**), **8** (exon **23.1**), **26** (exon **23.2**), **18** (exon **24**), **16** e **36** (exon **26**), **33** (exon **29**) e **3** (exon **37**).

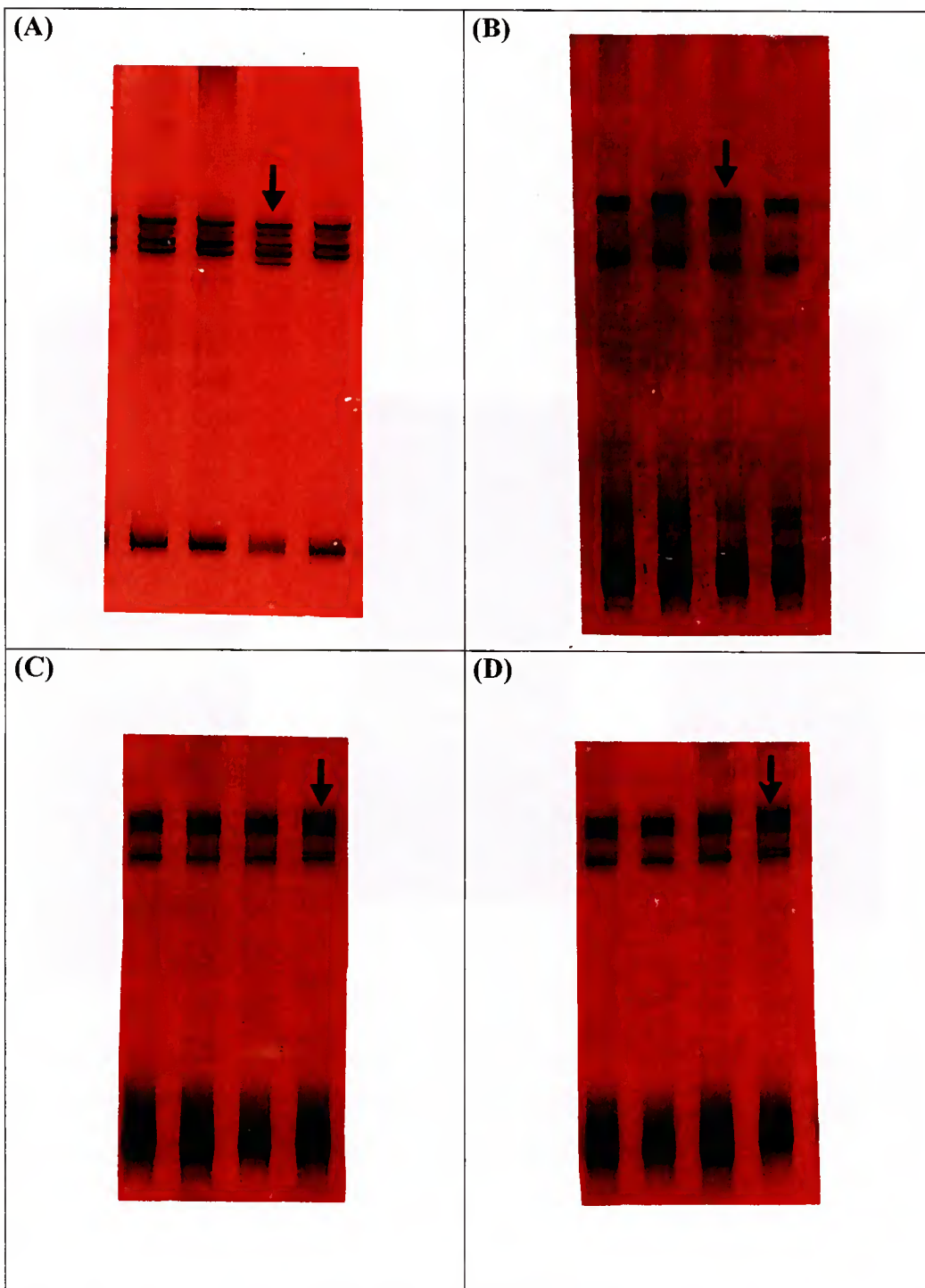
#### d) Seqüenciamento

Dez amostras com padrões eletroforéticos alterados no gel de SSCP foram submetidas a seqüenciamento para detecção de polimorfismos ou mutações. Os resultados dessa análise estão apresentados na Tabela 17 e nas Figuras 12– 25.

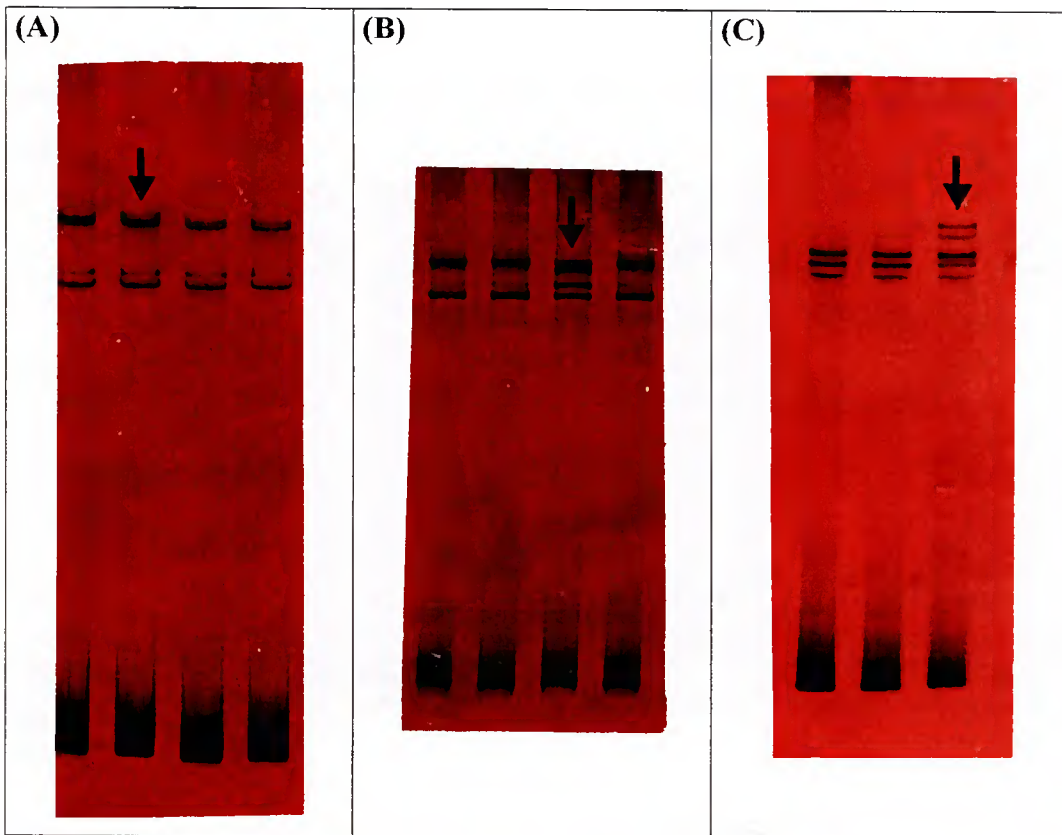
A Tabela 18 apresenta um quadro resumo das características apresentadas pelos pacientes com mutações nos exons estudados.



**Figura 9** – Gel de poliacrilamida 7,5%, corado com nitrato de prata, mostrando corridas eletroforéticas usuais e não usuais (indicadas pela seta) dos exons 20 (A e B- pacientes 24 e 34) e 21 (C- paciente 32) do gene *NF1*.



**Figura 10** – Gel de poliacrilamida 10% corado com nitrato de prata, mostrando corridas eletroforéticas usuais e não usuais (indicadas pela seta) dos exons 23.1 (A- paciente 8), 24 (B- paciente 18) e 26 (C e D- pacientes 16 e 36) do gene *NF1*.



**Figura 11** – Gel de poliacrilamida 10% corado com nitrato de prata, mostrando corridas eletroforéticas usuais e não usuais (indicadas pela seta) dos exons 23.2 (A- paciente 26), 29 (B- paciente 33) e 37 (C- paciente 3) do gene *NF1*.



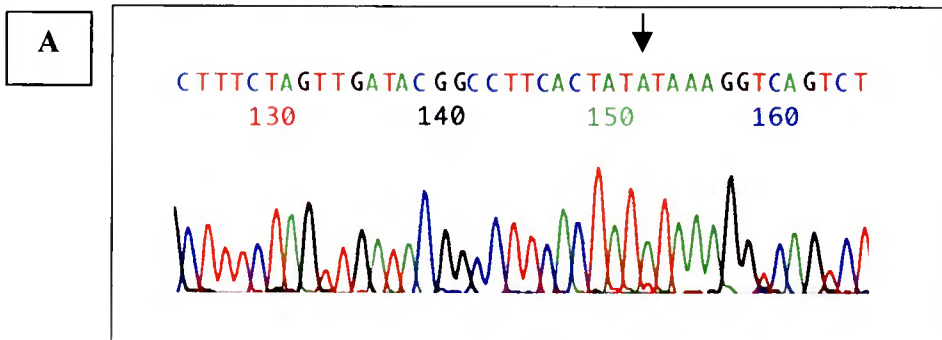
Tabela 17 – Caracterização das mutações do gene *NFI* encontradas em dez de 55 pacientes estudados.

| Caso | Exon/E<br>Intron/I | Idade | Sexo | Recorrência<br>familiar | Mutação         |               |           |                             |
|------|--------------------|-------|------|-------------------------|-----------------|---------------|-----------|-----------------------------|
|      |                    |       |      |                         | DNA             | Proteína      | Códon     | Tipo                        |
| 34   | I 19 b             | 21    | M    | -                       | 3315 – 27 G → A |               |           | intrônica                   |
| 24   | E 20               | 27    | F    | -                       | G3436A          | V1146I        | GTC → ATC | missense                    |
| 32   | E 21               | 52    | M    | +                       | 3525delAA       | del 1175-1176 |           | deleção , PTC 1193          |
| 8    | E 23.1             | 37    | M    | +                       | T3950C          | V1317A        | GTT → GCT | missense                    |
| 26   | E 23.2             | 12    | M    | -                       | A4067G          | E1356G        | GAA → GGA | missense                    |
| 18   | I 23.2             | 39    | F    | +                       | 4111– 1 G → A   |               |           | sítio AG de <i>splicing</i> |
| 16   | I 26               | 52    | F    | -                       | 4514 + 11 C → G |               |           | intrônica                   |
| 36   | I 26               | 37    | M    | -                       | 4514 + 11 C → G |               |           | intrônica                   |
| 33   | E 29               | 62    | F    | -                       | C5242T          | R1748X        | CGA → TGA | nonsense                    |
| 3    | E 37               | 39    | F    | +                       | A6801G          | Q2267Q        | CAA → CAG | silenciosa/ <i>splicing</i> |

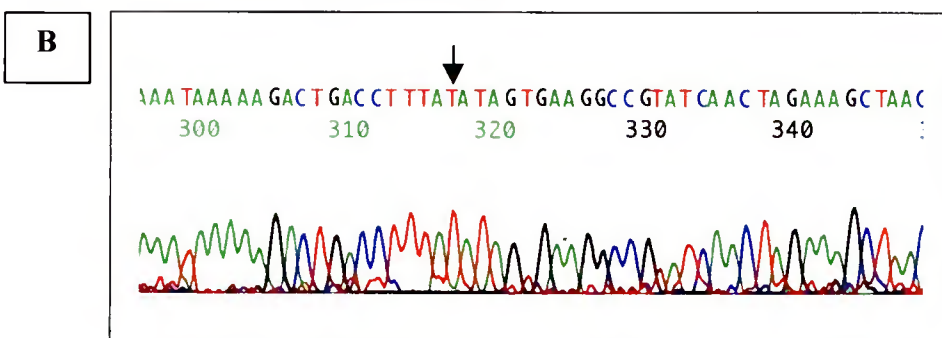
F = feminino, M = masculino, PTC = códon de terminação prematura  
V = valina, I = isoleucina, A =alanina, E =ácido glutâmico, G = glicina, Q = glutamina, R =arginina, X =*stop* códon, N = asparagina, S = serina  
AG =sítio acceptor



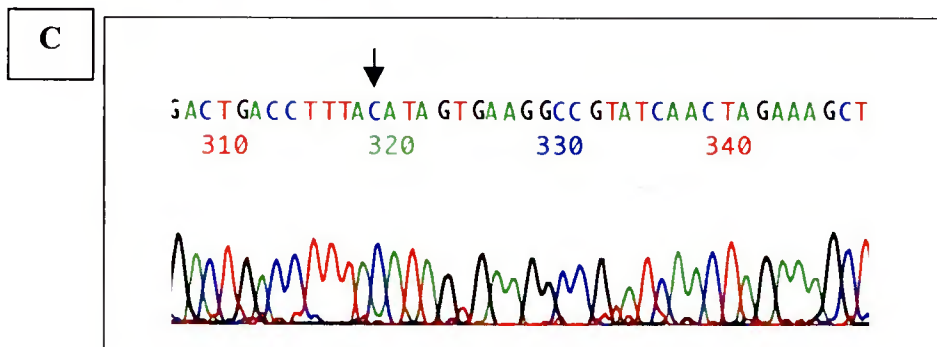
## intron 19b - fita sense



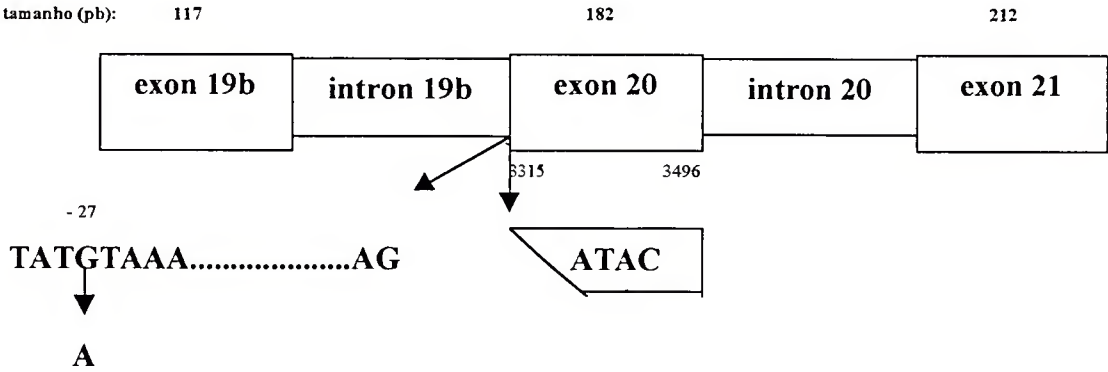
## intron 19b - fita antissense



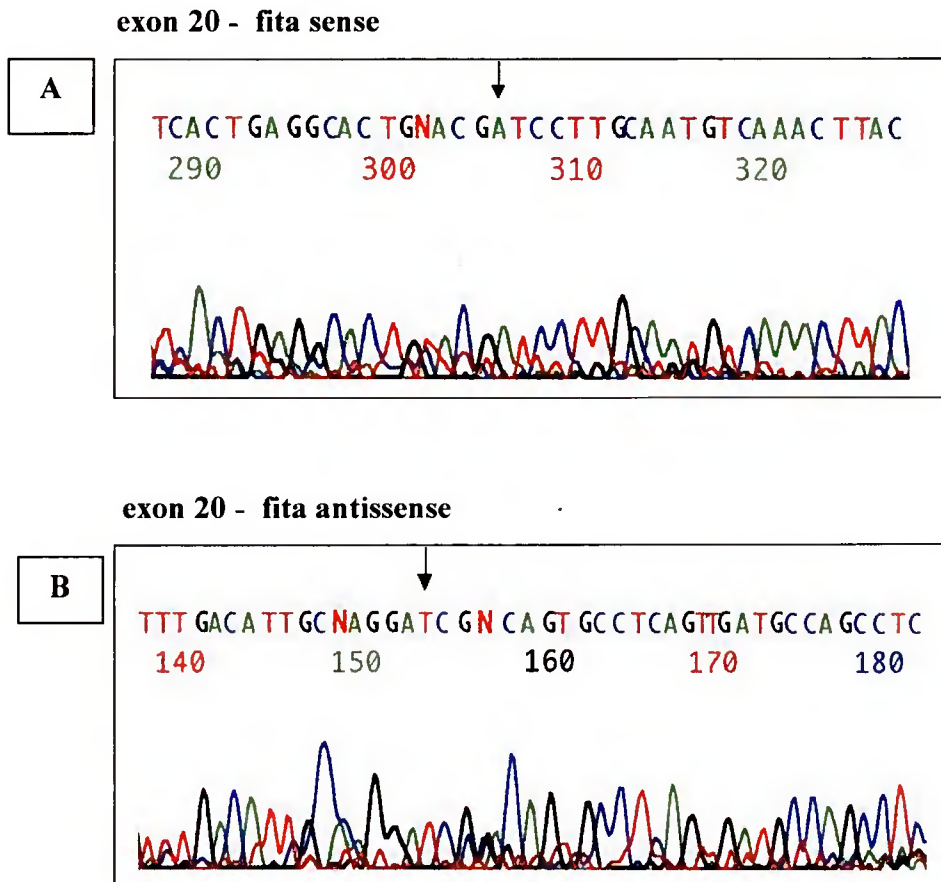
## intron 19b - fita antissense



**Figura 12** – Cromatogramas do paciente 34 mostrando a mutação 3315 – 27 G → A no intron 19b na fita sense (A), antissense (B) e na fita antissense normal correspondente (C).

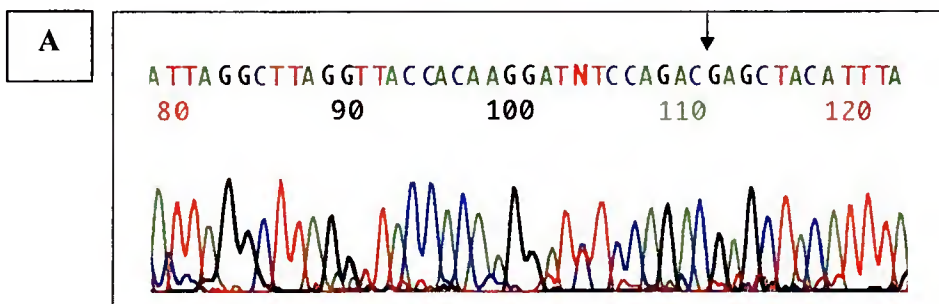


**Figura 13** – Representação esquemática da mutação no intron 19b (3315 - 27 G →A) presente no paciente 34.

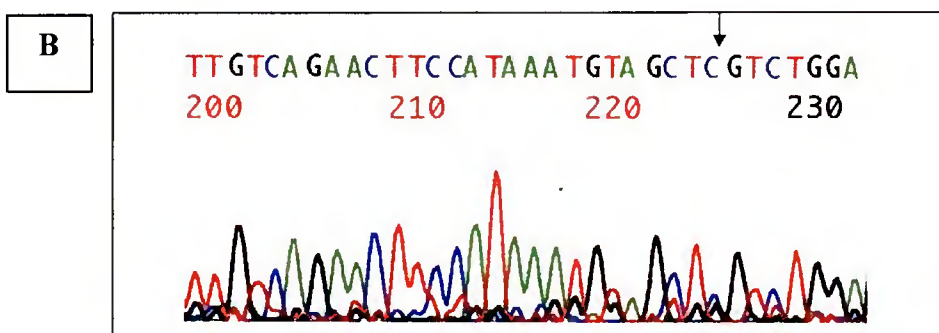


**Figura 14** – Cromatogramas do paciente 24 mostrando a alteração no códon 1146 (GTC→ATC) do exon 20 na fita sense (A) e a alteração CAG→TAG na fita antissense (B).

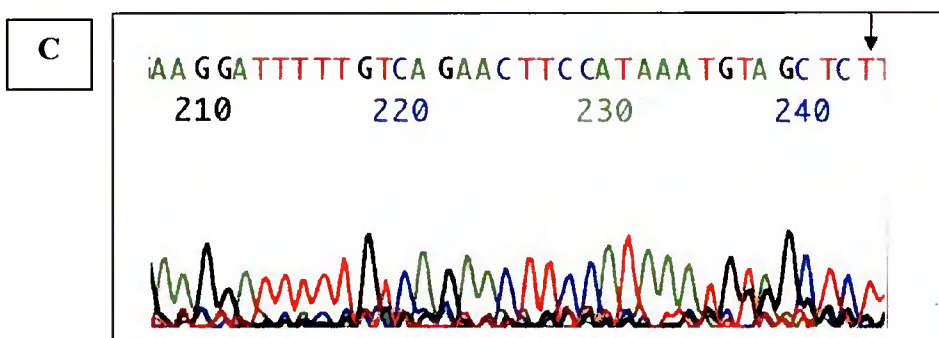
## exon 21 - fita sense



## exon 21 - fita antissense



## exon 21 - fita antissense



**Figura 15** – Cromatogramas do paciente 32 (exon 21) mostrando a deleção de duas adeninas na posição 3525 da fita sense (A) ou de duas timinas na fita antissense (B) do alelo mutado e a presença das timinas na fita antissense do alelo normal (C).

**Normal**

AA: L Q T R A T F M E V L T K I L Q Q G T E F D

Códon: CTC CAG ACA **A** AGA GCT ACA TTT ATG GAA GTT CTC ACA AAA ATC CTT CAA CAA GGC ACA GAA TTT GAC

Posição 3517

Nt 1173 1174 1175 1176

1194

**Mutante**

AA: L Q T S Y I Y G S S H K N P S T R H R I STOP

Códon: CTC CAG ACG AGC TAC ATT TAT GGA AGT TCT CAC AAA AAT CCT TCA ACA AGG CAC AGA ATT **TGA**

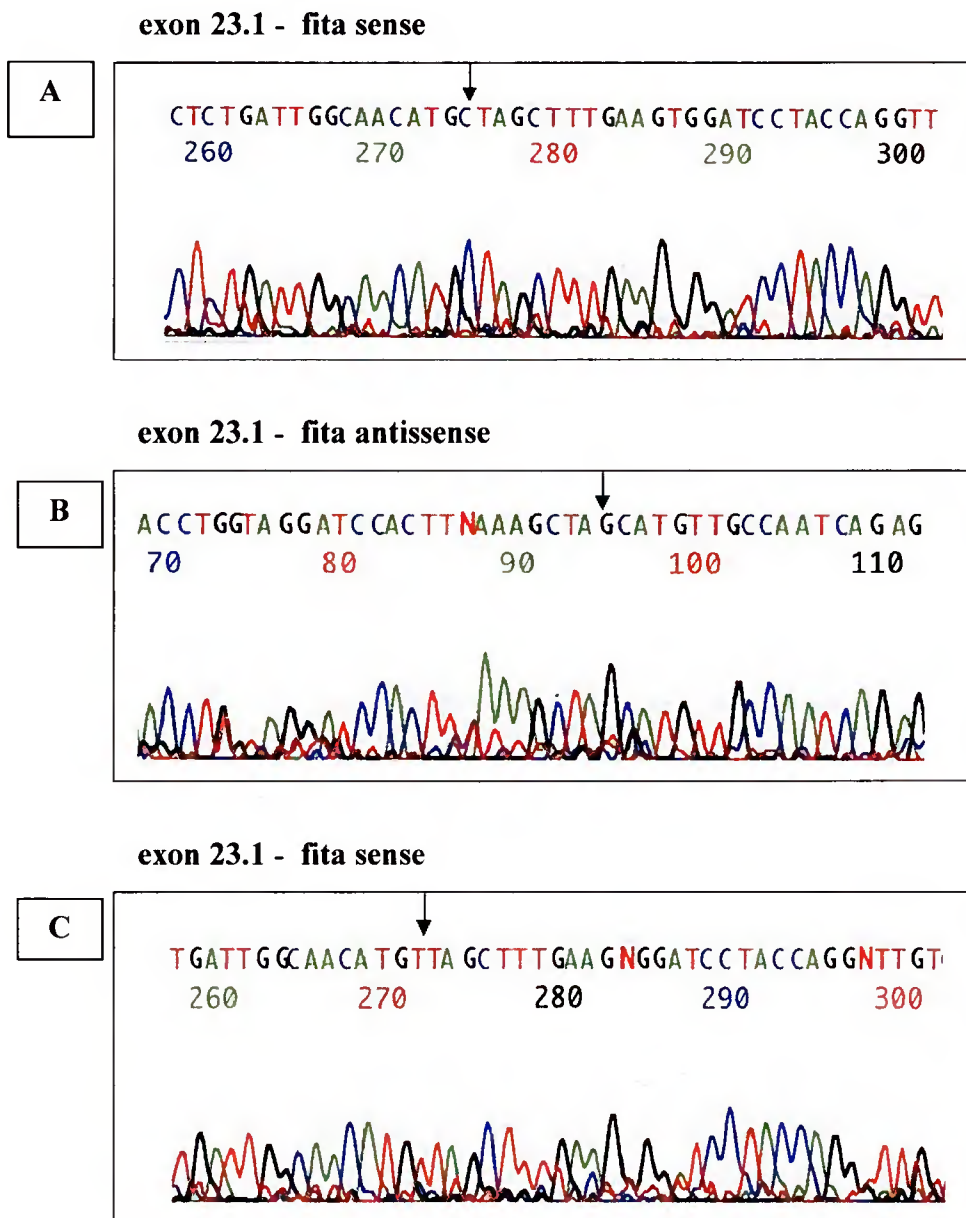
Posição 3517

Nt 1173 1174 1175 1176

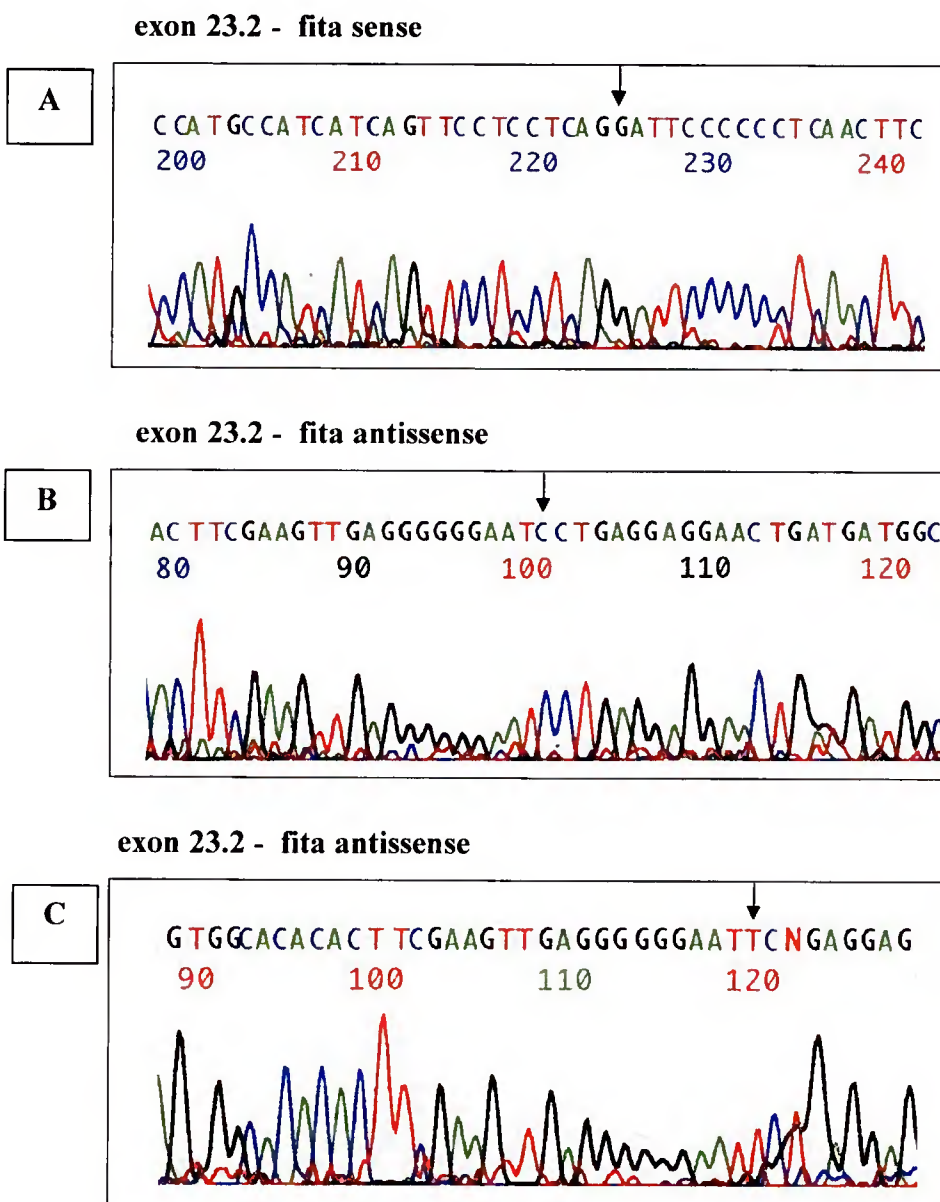
1193

**Figura 16** – Sequência de DNA e códons do alelo normal e mutante, com a sequência correspondente de aminoácidos (AA) da proteína no caso 32 (exon 21). A deleção de duas adeninas e o *stop* códon prematuro resultante da mudança na matriz de leitura são apresentados em vermelho e azul, respectivamente (Nt = nucleotídeo).



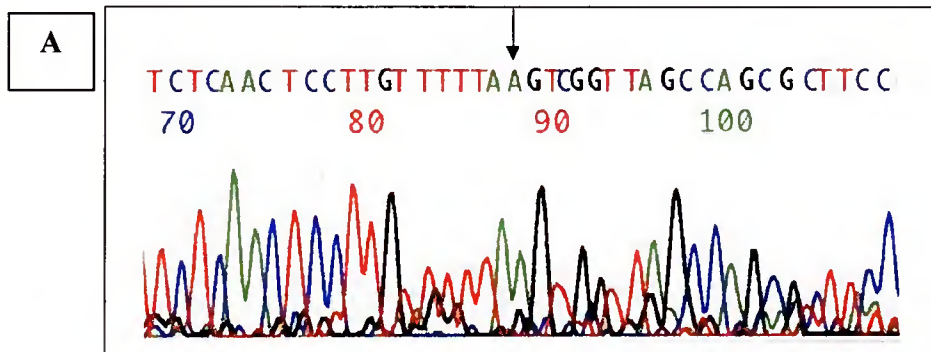


**Figura 17** – Cromatogramas do paciente 8 mostrando a alteração no códon 1317 (GTT→GCT) do exon 23.1 na fita sense (A), a alteração CAA→CGA na fita antissense (B) e a correspondente fita sense do alelo normal (C).

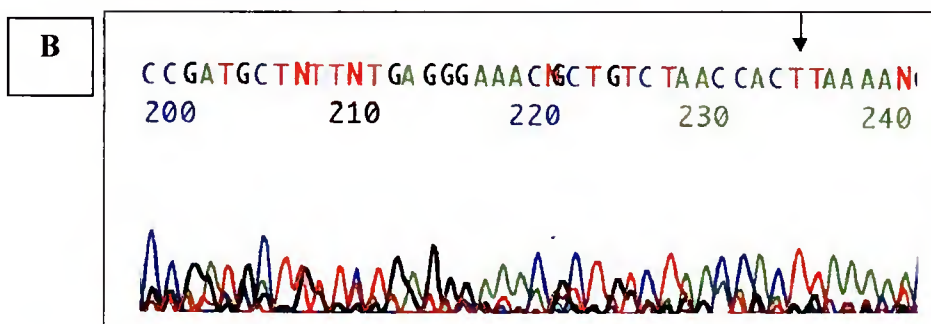


**Figura 18** – Cromatogramas do paciente 26 mostrando a alteração no códon 1356 (GAA→GGA) do exon 23.2 na fita sense (A), a alteração CTT→CCT na fita antissense (B) e a correspondente fita antissense do alelo normal (C).

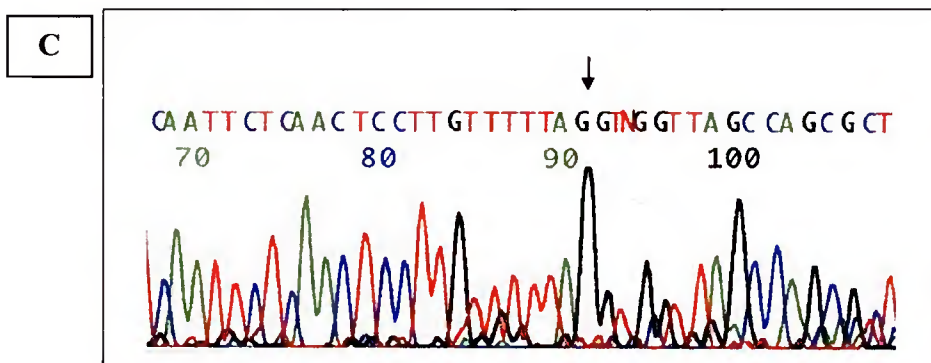
intron 23.2 - fita sense



intron 23.2 - fita antissense



intron 23.2 - fita sense



**Figura 19** – Cromatogramas do paciente 18 mostrando a mutação 4111 – 1 G → A no sítio acceptor de *splicing* do intron 23.2 na fita sense (A), antissense (B) e na fita sense normal correspondente (C).

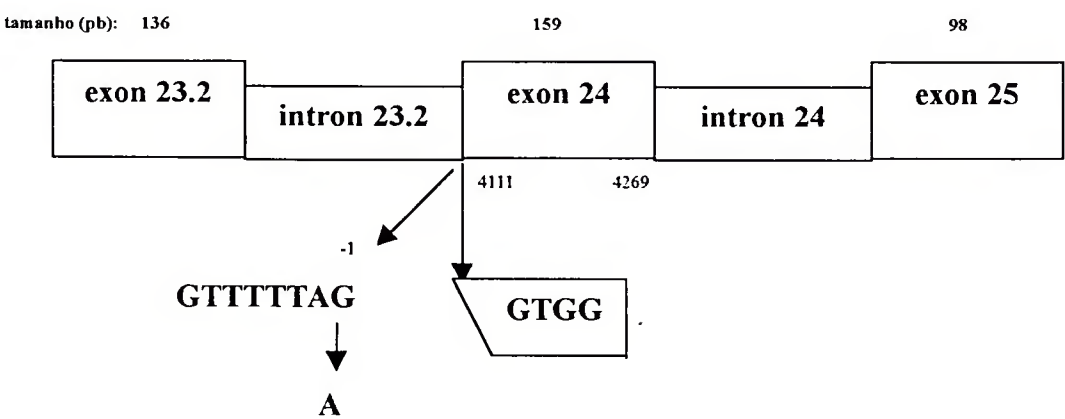
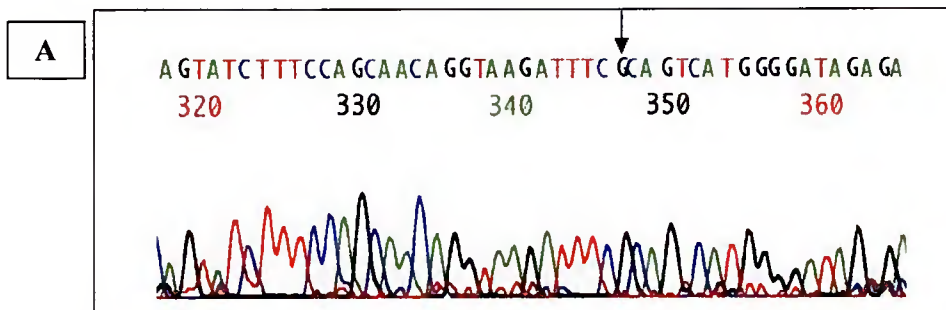
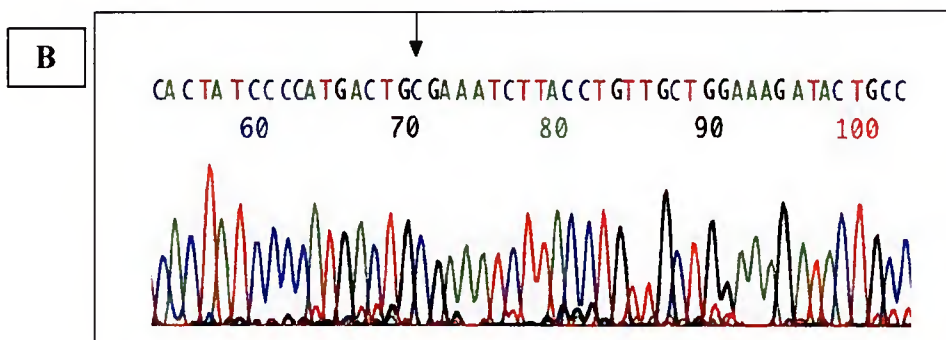


Figura 20 – Representação esquemática da mutação no sítio acceptor de *splicing* do intron 23.2 ( 4111 – 1G →A) presente no paciente 18.

## intron 26 - fita sense

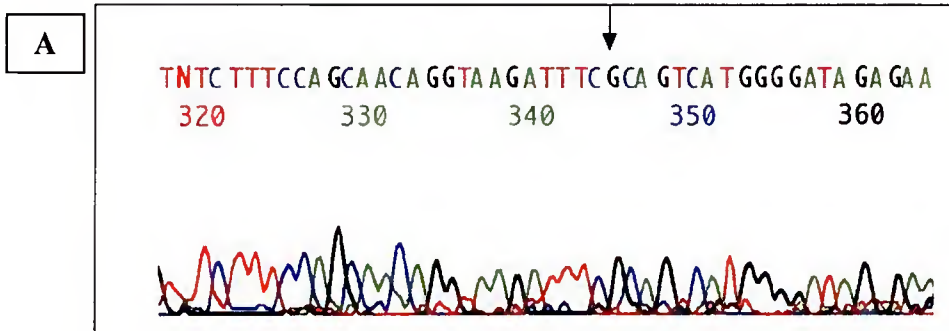


## intron 26 - fita antissense

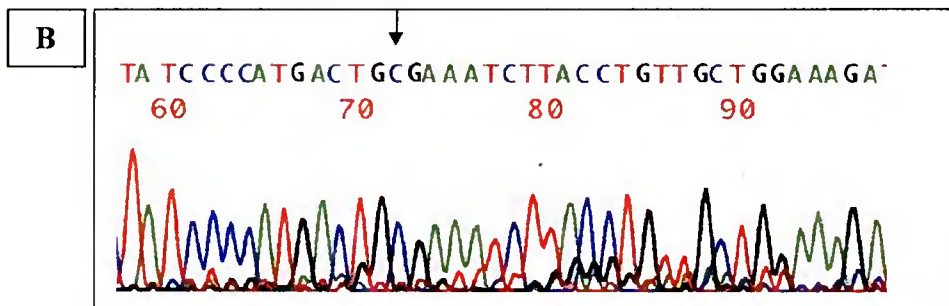


**Figura 21** – Cromatogramas do paciente 16 mostrando a mutação 4514 + 11C → G no intron 26 na fita sense (A) e antissense (B).

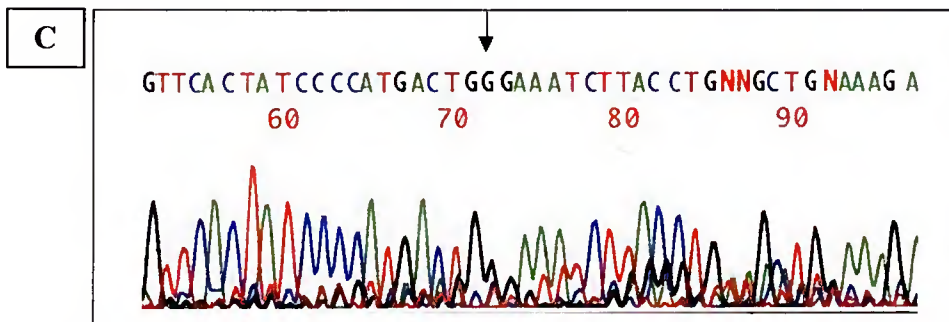
## intron 26 - fita sense



## intron 26 - fita antissense

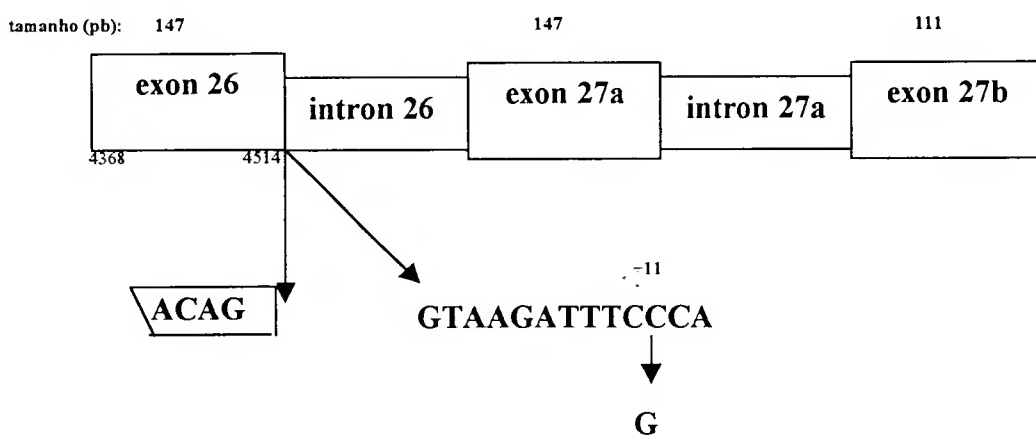


## intron 26 - fita antissense



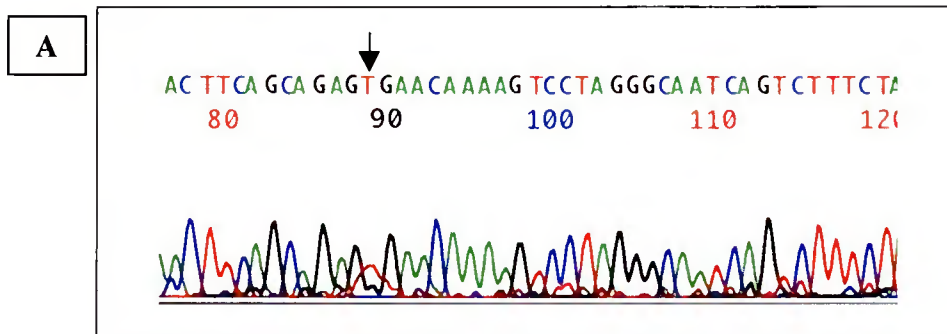
**Figura 22** – Cromatogramas do paciente 36 mostrando a mutação 4514 + 11C → G no intron 26 na fita sense (A), antissense (B) e na fita sense normal correspondente (C).



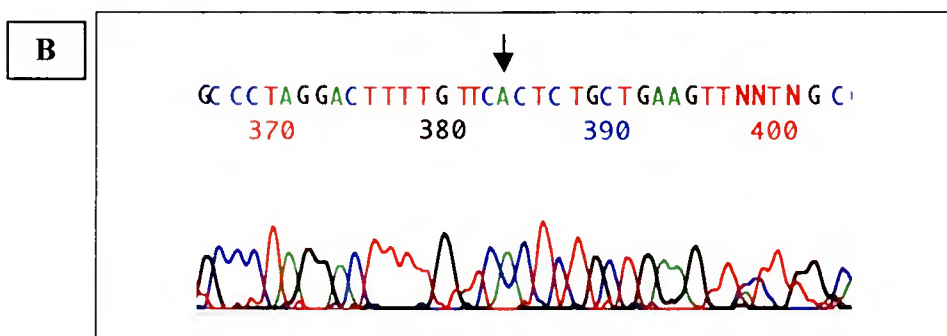


**Figura 23** – Representação esquemática da mutação no intron 26 (4514 + 11C→G) presente nos pacientes 16 e 36.

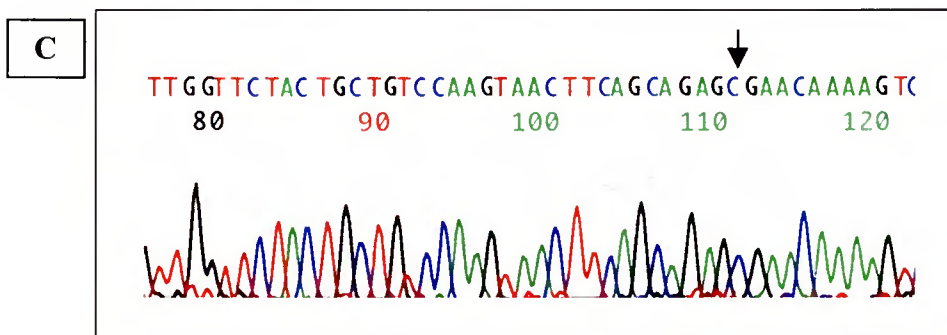
## exon 29 - fita sense



## exon 29 - fita antissense

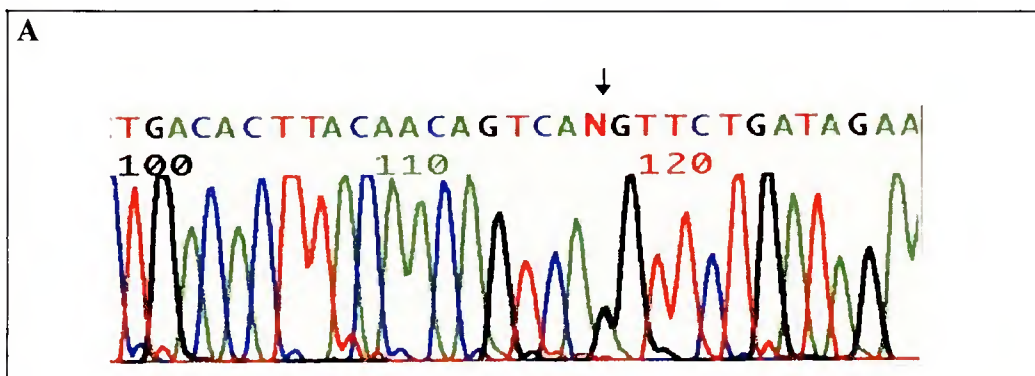


## exon 29 - fita sense

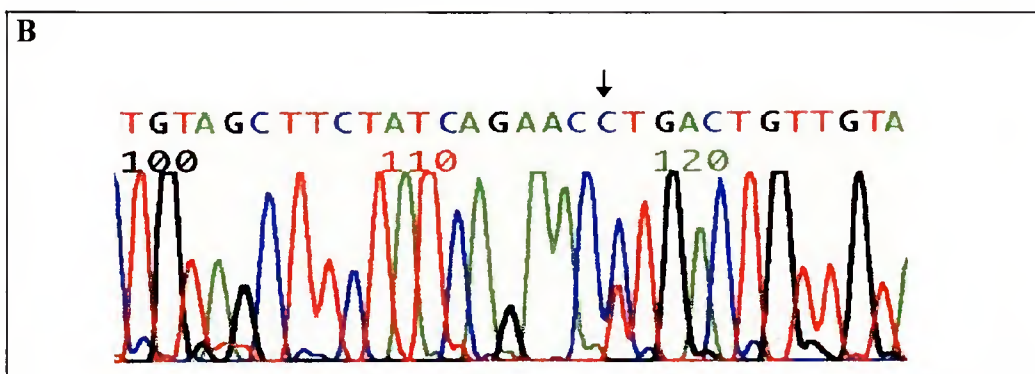


**Figura 24** – Cromatograma do paciente 33 mostrando a alteração no códon 1748 (CGA→TGA) do exon 29 na fita sense (A), a alteração GCT→ACT na fita antissense (B) e a correspondente fita sense do alelo normal (C).

## exon 37 – fita sense



## exon 37 – fita antissense



**Figura 25** – Cromatogramas do paciente 3 mostrando a alteração no códon 2267 CAA→CAG do exon 37 na fita sense (A) e a alteração GTT→GTC na fita antissense (B) e conseqüente criação de um sítio acepor de *splicing* (AG). Nesse caso, o seqüenciamento foi direto e, por isso, são observados os dois picos correspondentes às bases G e A (A) ou C e T (B).

Tabela 18- Características clínicas apresentadas pelos pacientes com mutações nos exons do gene *NF1*.

| caso | exon/E<br>intron/I | Major |        |     |          | Mínor |    | Alterações Importantes                                        |                                   |      |                                                         |                                                     |                                                                             |  |
|------|--------------------|-------|--------|-----|----------|-------|----|---------------------------------------------------------------|-----------------------------------|------|---------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|--|
|      |                    | MCCL  | NF c/p | NL  | Ea/i     | MCF   | BE | oculares                                                      | ósseas                            | RM   | EEG                                                     | ECG                                                 | outras                                                                      |  |
| 34   | I 19b              | ++    | ++     | +   | +++ / NR | +     | +  | -                                                             | -                                 | NA   | NA                                                      | NA                                                  | -                                                                           |  |
| 24   | E 20               | ++    | + / p  | +   | +++ / +  | +     | -  | -                                                             | -                                 | lim  | NA                                                      | NA                                                  | cefaléia                                                                    |  |
| 32   | E 21               | +     | +++    | +   | + / NR   | -     | -  | neurofibroma de pálpebra<br>glioma de retina<br>pterígio      | escoliose                         | -    | -                                                       | hemibloqueio anterior E                             | -                                                                           |  |
| 8    | E 23.1             | +     | +++    | +++ | +++ / -  | +     | -  | -                                                             | peito escavado                    | -    | NA                                                      | -                                                   | -                                                                           |  |
| 26   | E 23.2             | +     | +      | +++ | ++ / -   | +     | -  | -                                                             | peito escavado                    | lim  | -                                                       | -                                                   | cefaléia<br>infecções das vias aéreas<br>dislexia<br>orientação deficitária |  |
| 18   | I 23.2             | +++   | ++     | +   | +++ / NR | -     | -  | neurofibroma de pálpebra<br>e conjuntiva<br>ptose<br>pterígio | escoliose<br>cifose<br>scalloping | leve | anormalidade<br>paroxística anterior E                  | bloqueio ramo D<br>sobrecarga VD<br>repolarização V | cefaléia<br>hipertensão arterial                                            |  |
| 16   | I 26               | +     | + / p  | -   | -        | +     | -  | glioma de retina<br>pterígio<br>papilas com escavação         | escoliose<br>scalloping           | leve | -                                                       | taquicardia<br>sinusal<br>extra sístole V           | hipertensão arterial<br>língua geográfica<br>osteoporese<br>cardiopatia     |  |
| 36   | I 26               | +++   | +++    | +   | +++ / NR | +     | -  | -                                                             | cifo escoliose                    | lim  | -                                                       | NA                                                  | -                                                                           |  |
| 33   | E 29               | +++   | +++    | ++  | ++ / +++ | +     | +  | -                                                             | cifose<br>cifo escoliose          | leve | anormalidade<br>paroxística no<br>hemisfério cerebral E | desvio QRS E                                        | cefaléia<br>hipertensão arterial<br>unhas displásicas<br>pele seca          |  |
| 3    | E 37               | ++    | ++ / p | +   | +++ / NR | NA    | NA | pterígio                                                      | -                                 | NA   | -                                                       | -                                                   | -                                                                           |  |

MCCL = manchas café-com-leite, NF c/p = neurofibroma cutâneo/plexiforme, NL = nódulos de Lisch, E a/i = efélides axilares/inguinais, MCF = macrocefalia, BE = baixa estatura, RM = retardo mental, EEG = eletroencefalografia, ECG = eletrocardiografia, + = presença, - = ausência, + = frequência baixa, ++ = frequência média, +++ = frequência alta, NA = não analisado, NR = não referido, lim = limítrofe, D = direito, E = esquerdo, V = ventricular



## V. DISCUSSÃO

A neurofibromatose tipo 1 é causada por mutações no gene *NF1*, que se estende por 350 Kb do DNA genômico e contém 60 exons. O rastreamento de mutações em genes grandes como esse constitui, atualmente, um grande desafio, mas seus resultados são importantes porque permitem a obtenção de dados para o estabelecimento da correlação do genótipo com os sintomas clínicos da doença (Ainsworth *et al.*, 1993).

O *NF1 Genetic Analysis Consortium*, disponível na rede web (<http://www.nf.org/nf1gene/>), documentou mais de 240 mutações diferentes no gene *NF1* até fevereiro de 1999 (Tabela 19). A literatura convencional também descreve um grande número delas, bem como as características clínicas apresentadas por alguns desses pacientes (Apêndice 2, Tabelas 20-27). Tais mutações incluem pequenas e grandes deleções, pequenas e grandes inserções, mutações *nonsense*, *missense*, silenciosas, intrônicas e na região 3'UTR. Sua identificação tem sido possível com o emprego de uma variedade de métodos, tais como *Southern Blotting*, eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE), polimorfismo conformacional de cadeia simples (SSCP), análise por heteroduplex, eletroforese em gel com gradiente de temperatura (TGGE), eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE), teste da proteína truncada (PTT), entre outros. Convém ressaltar que a maioria das mutações detectadas encontra-se nos exons 28 a 36, pois esses foram os primeiros cujas seqüências foram publicadas (Cawthon *et al.*, 1990a), e também na região NF1-GRD (exons 20-27a), responsável pela regulação da proteína p21<sup>ras</sup>.

O presente estudo também investigou alterações nos exons 20-27a, 28, 29, 31 e 37 do gene *NF1*. Um dos objetivos compreendeu a avaliação de crianças com leucemia, particularmente leucemia mielóide crônica sem evidências clínicas de neurofibromatose. Considerando o fato de que esse grupo de leucemias mielóides é raro em crianças e comum em adultos, não surpreende o fato de que foram obtidas apenas três amostras.



**Tabela 19** – Sumário dos tipos de mutações em NF1\*.

| <b>Tipo de mutação</b>     | <b>Número de casos</b> |
|----------------------------|------------------------|
| Alteração cromossômica     | 4                      |
| Deleção completa do gene   | 18                     |
| Deleção de múltiplos exons | 38                     |
| Pequena deleção            | 55                     |
| Grande inserção            | 3                      |
| Pequena inserção           | 27                     |
| Mutação <i>nonsense</i>    | 43                     |
| Mutação <i>missense</i>    | 29                     |
| Mutação em intron          | 25                     |
| Mutação em 3'UTR           | 4                      |
| <b>TOTAL</b>               | <b>246</b>             |

\* *NF1 Genetic Analysis Consortium* (fevereiro, 1999)



Side *et al.* (1998) avaliaram 20 crianças com leucemia mielóide sem diagnóstico ou história familiar de NF1 pelo teste PTT. Três (15%) delas, com idades variando entre seis meses e três anos e do sexo masculino, apresentaram resultados positivos. Em 1997, o próprio Side e colaboradores fizeram o caminho inverso, analisando 18 crianças com NF1 e doenças mielóides durante um período de sete anos, detectaram mutações em oito delas (44%). Esses dados suportam o achado negativo de mutações do *NF1* nas três amostras analisadas. A probabilidade de detecção nesses casos é bastante baixa e deve atingir valores entre 0,34% e 8,5% aproximadamente (frequências de 15% e 44%, respectivamente).

Além das crianças com leucemia, foram avaliados 55 pacientes com NF1. Os resultados mostraram predomínio maior do sexo feminino, apesar da doença ser autossômica dominante e afetar igualmente homens e mulheres. Uma possível explicação para este achado é que as mulheres têm provavelmente maior disponibilidade para visitas ao hospital e devem procurar mais o médico em caso de doenças que causam problemas estéticos, como a neurofibromatose. A idade média da amostra estudada foi de 33 anos, pois foram priorizados os adultos que apresentam quadro clínico definido. A maioria dos pacientes pertencia a famílias com outros afetados e foi classificada como tendo cor de pele branca e baixo grau de escolaridade. A idade de manifestação da doença variou entre a primeira e a segunda décadas de vida, com um leve desvio favorecendo a primeira década. Esse resultado é esperado pois a neurofibromatose tipo 1 apresenta penetrância de 100% por volta dos cinco anos de idade (Ruggieri, 1999).

Dos 55 indivíduos analisados, 51% apresentaram macrocefalia e 40% baixa estatura. Segundo Ruggieri & Huson (1999), a macrocefalia é observada em 50% dos afetados e aproximadamente 30% dos pacientes estão abaixo do percentil três em estatura. Os valores encontrados na amostra estudada aproximam-se desses citados pela literatura, mas o seu significado segundo os autores acima referidos, não é bem entendido.

As MCCL, os neurofibromas, os nódulos de Lisch e as sardas ou efélides estão presentes na maioria dos indivíduos afetados e formam a base do critério



diagnóstico. Realmente, esse fato foi constatado pelo presente trabalho. Um resultado importante foi a frequência de neurofibromas plexiformes, cujo valor de 37% está bem acima do encontrado por vários autores, que atinge 5% a 15% aproximadamente (Ruggieri & Huson, 1997, Farris & Grove, 1996, Rasmussen & Friedman, 2000).

Em relação às malformações torácicas, incluindo peito escavado e peito carinado, Ruggieri & Huson (1999), em sua revisão sobre neurofibromatose, referem sua presença em 63% e 38% dos pacientes, respectivamente, enquanto a escoliose é observada em apenas 10% dos indivíduos. Os pacientes estudados neste trabalho apresentaram uma alta frequência de escoliose (47,3%) mas apenas 22% dos casos exibiram peito escavado. Ruggieri & Huson (1999) também comentam que 3 a 8% dos pacientes têm retardo mental (definido como  $QI < 70$ ). Dos indivíduos estudados, 32,5% apresentaram RM leve ( $QI = 50$  a  $55$  a  $\sim 70$ ) e 30% limítrofe ( $QI = 70$  a  $85$ ). Essas diferenças observadas em relação aos dados da literatura devem ser decorrentes dos tipos de avaliação psicológica utilizados. Os afetados também exibiram frequências elevadas de depressão e ansiedade. Tais resultados estão de acordo com a literatura, pois essas características são frequentemente encontradas em pacientes portadores de patologias orgânicas ou mentais crônicas (Taylor & Aspinwall, 1990). Por esse motivo, o acompanhamento e a avaliação psicológica completa são considerados importantes para minimizar esses sintomas e para melhorar significativamente o desempenho da maioria dos pacientes.

Alguns afetados, especialmente crianças, manifestam dores de cabeça, que podem ser o resultado de ansiedade ou depressão associada com a doença (Ruggieri, 1999). Nos indivíduos presentemente estudados, a cefaléia constituiu uma das características não típicas mais comuns, seguida secundariamente por infecções das vias aéreas. Essas últimas poderiam ser explicadas, segundo Ruggieri (1999), pela presença de neurofibromas intrapulmonares ou escoliose e, conseqüentemente, de problemas respiratórios, embora essa não seja a regra.

No presente trabalho, foi utilizada a técnica de SSCP para o rastreamento de mutações no gene *NFI*. Essa técnica tem sido amplamente utilizada por

diferentes autores (Cawthon *et al.*, 1990a, Estivill *et al.*, 1991, Stark *et al.*, 1991, 1992, Upadhyaya *et al.*, 1992, Li *et al.*, 1992, Shen & Upadhyaya, 1993, Zhong *et al.*, 1993, Anglani *et al.*, 1993, Colman *et al.*, 1993, Ainsworth *et al.*, 1993, Tassabehji *et al.*, 1993, Horiuchi *et al.*, 1994, Upadhyaya *et al.*, 1995, Gasparini *et al.*, 1996, Upadhyaya *et al.*, 1996, Upadhyaya *et al.*, 1997, Luria *et al.*, 1997, Skuse, 1998, Horiuchi *et al.*, 1998, Garicochea *et al.*, 1998, Watanabe *et al.*, 1998, Upadhyaya *et al.*, 1998, John *et al.*, 2000 e Ars *et al.*, 2000), especialmente porque suas principais vantagens incluem simplicidade, baixo custo, rapidez, utilização de marcação não radioativa, além de sensibilidade elevada (Nataraj *et al.*, 1999). Entretanto, a técnica exige a otimização das condições de PCR, para obtenção de produtos destituídos de seqüências inespecíficas, e também da corrida eletroforética em gel de poliacrilamida, para elevar a probabilidade de detecção de variantes de fita simples de DNA.

Esse método apresenta, como desvantagem, o tamanho limitado do fragmento a ser analisado. Nataraj *et al.* (1999), em sua revisão sobre metodologias, comentam que 90% das mutações podem ser detectadas em fragmentos de 200 pb mas esse valor diminui para 80% em fragmentos maiores que 200 pb e menores que 350 pb. Alguns autores, porém, não concordam com essa observação. Ravnik-Glavac *et al.* (1994), por exemplo, analisando fragmentos do gene da Fibrose Cística (*CFTR*) com tamanhos entre 309-933 pb, atingiram uma taxa de detecção de mutações maior do que 95%. O estudo realizado pelo próprio grupo de Nataraj *et al.* (1999) também observou mutações em fragmentos de até 600 pb. No presente trabalho, os maiores fragmentos corresponderam aos exons 28 (509 pb), 23a (447 pb), 29 (423 pb) e 20 (402 pb). Se o tamanho dos produtos de PCR for realmente limitante, é possível que alguns mutantes tenham sido perdidos, embora exons extensos como o 20 e o 29 tenham exibido bandas variantes bastante nítidas.

Nataraj *et al.* (1999) também referem que a adição de glicerol ao gel de SSCP normalmente melhora a sensibilidade de análise quando a corrida eletroforética é realizada à temperatura ambiente. Realmente, todos os exons que

tiveram suas condições de SSCP otimizadas à temperatura ambiente apresentavam glicerol em sua composição.

De acordo com Kutach *et al.* (1999), a utilização de temperaturas de corrida de 20-25°C e 4°C aumenta a probabilidade de detecção da maioria das mutações. Todos os exons estudados no presente trabalho foram submetidos a eletroforese nas duas condições acima citadas e também em concentrações variáveis de acrilamida/bis-acrilamida (A/B) e glicerol.

As fitas simples de DNA podem se reanelar antes e/ou durante a eletroforese. Para prevenir esse reanelamento, são recomendadas diluições apropriadas da amostra antes de sua aplicação no gel. Jaeckel *et al.* (1998) sugerem diluições de 1:1 ou 1:2 com *loading buffer* e salientam que, sobrecarregando o gel com muito produto de PCR, ocorre não somente o acúmulo de DNA de fita dupla, mas também o surgimento de padrões anormais de migração de DNA de fita simples. Nos casos presentemente estudados, a diluição utilizada foi de 1:1.

Na análise dos 55 pacientes com NF1, dez mutações foram identificadas, com recorrência familiar em quatro. Desse total, duas já haviam sido referidas por Valero *et al.* (1994), Boulandet *et al.* (2000) e Fahsold *et al.* (2000) e oito nunca foram descritas na literatura. Três foram do tipo *missense*, quatro ocorreram em sítios de *splicing* e as demais incluíram uma mutação silenciosa, uma deleção e uma mutação *nonsense*.

Muitas mutações já foram descritas nos exons 20, 21, 23.1, 23.2, 24, 26, 29 e 37, como pode ser observado nas Tabelas 20-26 (Apêndice 2). Os tipos identificados são amplamente dependentes das técnicas usadas para sua detecção. Esse fato deve ser responsável por um viés na representação daqueles que são mais facilmente ou mais dificilmente identificados, especialmente porque nenhum dos métodos é capaz de reconhecer todos os tipos de mutações (Rasmussen & Friedman, 2000).

Uma das técnicas empregadas no estudo do gene *NF1* é o PTT (teste da proteína truncada), que detecta os casos com truncamento da proteína. Esse tipo de alteração representa 80% das mutações, o que torna o teste bastante





recomendável pois tem como principal vantagem a capacidade de avaliar toda a região codificante do gene (Shen *et al.*, 1996). A mesma recomendação é válida para o estudo de outros genes extensos como o da Distrofia Muscular Duchene, que possui 79 exons. A técnica foi descrita por Roest *et al.* (1993) e suas etapas iniciais compreendem a extração de RNA e a obtenção do DNA complementar por RT-PCR, que é utilizado para transcrição e tradução *in vitro*. O produto é submetido a eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE), cuja análise permite a identificação de polipeptídeos truncados, o que indica terminação prematura da tradução. O tamanho do polipeptídeo evidencia o local do sítio da mutação e, desse modo, somente uma pequena parte do gene necessita ser seqüenciada. Apesar das vantagens citadas, convém ressaltar que essa técnica não detecta mutações *missense* e, de maneira geral, tem sido pouco utilizada no estudo do gene *NF1*, exceto nos trabalhos de Heim *et al.* (1995), Park & Pivnick (1998) e Osborn & Upadhyaya (1999). Realmente, o uso da técnica de PTT no presente trabalho não teria permitido a identificação das três mutações *missense* aqui relatadas.

Entre os pacientes estudados, foi observada uma frequência de mutações de 18%. Empregando as técnicas de análise por heteroduplex, TGGE, DGGE e SSCP para a análise de dois a 14 exons, Colman *et al.* (1997), Toliat *et al.* (2000), Valero *et al.* (1994) e Upadhyaya *et al.* (1997) encontraram valores variando entre 5-6%, enquanto Messiaen *et al.* (1997) e Gasparini *et al.* (1996) observaram frequências de 9,5% e 12,5%, respectivamente. Nos estudos utilizando a técnica de PTT feitos por Heim *et al.* (1995), Park & Pivnick (1998) e Osborn & Upadhyaya, (1999), as taxas de mutações foram muito mais elevadas e atingiram valores entre 53% e 73%. Assim, a baixa frequência presentemente observada deve ser consequência da investigação de um número relativamente baixo de exons.

Na tentativa de contornar as dificuldades no estudo de *NF1*, Fahsold *et al.* (2000) avaliaram 500 pacientes utilizando PTT, TGGE e seqüenciamento direto e detectaram 301 (60%) mutações, sendo 278 (55%) patogênicas. Também observaram similaridade das três técnicas na eficiência de detecção: 47% para

PTT, 54% para TGGE e 55% para seqüenciamento direto. No mesmo ano, Messiaen e colaboradores estudaram 67 pacientes e empregaram, além do PTT, análise por heteroduplex, FISH, *Southern Blotting* e análise citogenética. Foram identificadas mutações em 64 (95,5%) dos 67 pacientes (32 delas novas), que compreenderam 25 *nonsense*, 12 na matriz de leitura, 19 em sítios de *splicing*, seis do tipo *missense* e/ou pequenas deleções *in-frame*, uma deleção total do gene e uma translocação t(14;17)(q32;q11.2). Esses dois estudos mostram que o melhor instrumento para aumentar a taxa de detecção de mutações no gene *NF1* é o uso de técnicas diferentes.

No presente trabalho, foram encontradas três mutações *missense*. Enquanto a causa da doença nos pacientes com deleções, inserções e mutações *nonsense* é óbvia, os mecanismos pelos quais as mutações *missense* contribuem para a doença necessitam de caracterização adicional (Purandare *et al.*, 1994). As primeiras resultam na formação de proteínas funcionalmente nulas enquanto as mutações *missense* podem causar perda da função da proteína se ocorrerem em porções do gene altamente conservadas (Anglani *et al.*, 1993).

Duas das mutações *missense* identificadas (exons 20 e 23.1) resultaram na substituição do aminoácido valina por isoleucina ou alanina (casos 24 e 8). Os três aminoácidos pertencem aos mesmos grupos R-alifáticos não polares e, por isso, não devem ocasionar grandes mudanças na proteína. A outra mutação (caso 26) foi proveniente da substituição do ácido glutâmico por glicina no códon 1356 (exon 23.2), sendo o primeiro pertencente aos grupos R carregados negativamente e o outro aos grupos R alifáticos não polares. Como os grupos são bioquimicamente distintos, tal mutação deve produzir uma alteração significativa na proteína e afetar sua atuação. Entretanto, estudos estruturais e funcionais são necessários antes de qualquer conclusão a respeito. De qualquer modo, é interessante que nos três casos, além das características principais da doença, os pacientes apresentaram macrocefalia. A paciente 24 não manifestou qualquer alteração óssea, porém exibiu um neurofibroma plexiforme enquanto os outros dois pacientes apresentaram peito escavado.



A mutação silenciosa detectada no nucleotídeo 6801 do exon 37 (caso 3) provavelmente não deve ser responsável pela doença no paciente, pois não substitui o aminoácido codificado. Seria importante investigar se a mesma substituição está presente em outros membros da mesma família e segrega com a doença por que, em caso positivo, poderia representar um marcador interessante na avaliação de riscos nessa família. Convém salientar que várias mutações já foram descritas nesse exon e muitas delas ocorrem em uma sequência de 49 pb entre os nucleotídeos 6791 e 6841 (Upadhyaya *et al.*, 1996). Assim, mesmo sendo silenciosa, a mutação observada, que localiza-se nessa sequência, pode reforçar a idéia de que tal região é mais sujeita a alterações. É possível também que a substituição de base (CAA → CAG) tenha criado um sítio acceptor funcional e leve a *splicing* alternativo, com conseqüente deleção de parte do exon 37. É interessante que o quadro clínico desse caso é brando em relação aos dos outros nove pacientes com mutação.

Foi detectada uma mutação *nonsense* no exon 29 já descrita por Valero *et al.* (1994), Boulandet *et al.* (2000) e Fahsold *et al.* (2000). Valero *et al.* (1994) detectou essa mutação em uma família na qual a mãe afetada transmitiu a mutação para as suas duas filhas enquanto a paciente aqui relatada representa um caso esporádico (caso 33). Essa mutação ocorre em um dinucleotídeo CpG. No genoma humano, dinucleotídeos CpG mostram uma alta taxa de mutação e são responsáveis por aproximadamente 35% das mutações pontuais que causam doenças genéticas. Esse fenômeno é decorrente da desaminação da citosina metilada, o que origina timina. O exon 29 é particularmente rico em dinucleotídeos CpG mas outras posições dentro e ao redor do gene *NF1* também estão metiladas, como revelado pela perda dos sítios de restrição sensíveis à metilação. Juntas, essas observações levantam a possibilidade de que a metilação contribui para mutações que causam a NF1 (Valero *et al.*, 1994).

Também foram encontradas quatro mutações nos introns 19b, 23.2 e 26 (casos 34, 18, 16 e 36). Três dos quatro pacientes (18, 34 e 36) exibiram um fenótipo mais grave quanto às características major enquanto o caso 16 chama a

atenção pela ausência de algumas dessas características e pela presença de complicações associadas.

Maynard *et al.* (1997) detectaram uma mutação no sítio de *splicing* em dois pacientes não relacionados (2409 + 1 G→A) que resultou na geração de transcritos de RNAm anormais porque afetava o dinucleotídeo invariável GT do sítio doador. A mutação do intron 23.2 presentemente descrita também afeta o dinucleotídeo invariável AG e provavelmente produz efeito similar.

O presente trabalho observou, no total, 20% de alterações de *splicing* (pacientes 3 e 18). Estudos realizados por Ars e colaboradores em 2000 identificaram, utilizando a técnica cDNA-SSCP/HD, 52 mutações em 80 pacientes, sendo 32 delas novas. Dessas, 50% resultaram em alterações de *splicing*, 33% em alterações da matriz de leitura, 9% eram *nonsense*, 6% *missense* e 2% deleção de aminoácidos. A maioria das alterações de *splicing* não envolviam os dinucleotídeos conservados AG/GT e modificaram nucleotídeos distantes do limite exon/intron. Além disso, também observaram mutações *missense* que criaram novos sítios de *splicing*.

Um achado interessante no grupo estudado foi a frequência elevada de escoliose. Trabalhos realizados por Estivill *et al.* (1991), Ainsworth *et al.* (1993) e Zhong *et al.* (1993) detectaram mutações no exon 31 em pacientes com escoliose, sugerindo assim uma possível correlação entre essa característica clínica e o genótipo. Apesar dos pacientes aqui estudados exibirem uma incidência elevada de escoliose, em nenhum deles foi vista essa alteração. Também não apresentaram a substituição R1947X nesse exon, que ocorre em um dinucleotídeo CpG, é recorrente e responsável por 1-2% de todas aquelas já identificadas nesse segmento (Rasmussen & Friedman, 2000).

Nos pacientes 16 e 36, foi observada a mesma mutação no intron 26 e muitas características clínicas semelhantes mas outras distintas. Por exemplo, ambos apresentaram macrocefalia, MCCL, neurofibromas dérmicos, alterações ósseas e RM leve a limitrofe, mas apenas no segundo foram referidos nódulos de Lisch e sardas enquanto no primeiro foram vistas múltiplas alterações oculares, cardiopatia e neurofibroma plexiforme. Convém ressaltar que as alterações

oculares representadas como vícios de refração (miopia, hipermetropia, astigmatismo e presbiopia) constituem a causa mais comum de visão deficiente nos pacientes mas sua frequência parece não diferir daquela da população geral, sendo a presbiopia comum com o avançar da idade.

Colman *et al.* (1997) e Upadhyaya *et al.* (1996, 1997) também detectaram mutações idênticas em indivíduos não relacionados que levaram a dissimilaridade fenotípica entre eles. Esses dados da literatura associados àqueles aqui relatados evidenciam que genótipos iguais podem diferir quanto ao quadro clínico, sugerindo assim a ação de outros fatores na expressão fenotípica da doença.

A expressividade variável é uma das marcas da neurofibromatose tipo 1. Há variabilidade interfamiliar e intrafamiliar e, portanto, quadros clínicos diferentes em indivíduos com a mesma mutação. Alguns mecanismos têm sido propostos para explicar essa ampla extensão de manifestações e incluem heterogeneidade alélica, mutação no segundo alelo, mosaicismo somático, deleções de genes contíguos, genes modificadores e fatores ambientais (Carey & Viskochil, 1999).

Mutações únicas (como a 8042insA em neurofibromatose espinhal e a deleção de 3pb no exon 17 em NF/síndrome de Noonan) têm sido citadas para explicar as formas atípicas da neurofibromatose tipo 1 (Ars *et al.*, 1998, Carey *et al.*, 1998). Entretanto, mutações diferentes já foram identificadas nessas formas, o que implica na atuação de outros fatores para desencadeamento do quadro clínico (Tassabehji *et al.*, 1993, Bahuau *et al.*, 1998).

A mutação somática do segundo alelo suporta o papel do gene *NF1* como supressor de tumor e pode estar envolvida na formação de neoplasias em alguns afetados. Realmente, perda de heterozigosidade e inativação do alelo normal têm sido relatadas em neurofibromas dérmicos e doenças mielóides. Alterações genéticas adicionais, como ocorre em muitos tipos de câncer, também são vistas nos neurofibrossarcomas desses pacientes.

O mosaicismo, definido pela presença no mesmo indivíduo de dois ou mais tipos celulares geneticamente distintos, é uma outra explicação para a expressividade variável na NF1. O primeiro caso de mosaicismo foi relatado por

Lázaro *et al.* (1994, 1995a), que descreveram um paciente clinicamente normal com dois filhos afetados. Em 1996, Colman e colaboradores relataram um outro paciente que teve início de manifestação da doença aos 27 anos de idade, quando um neurofibroma foi descoberto. Wu *et al.* (1997a) e Rasmussen *et al.* (1998) descreveram mosaicismismo somático em indivíduos com deleção completa do gene e com fenótipo mais brando. É possível, então, que os mosaicos apresentem início tardio ou fenótipo mais brando

Easton *et al.* (1993) mostraram que alguns traços em NF1 (gliomas ópticos, convulsões, dificuldade na aprendizagem e escoliose) segregam em famílias e podem indicar a atuação, nesses casos, de genes epistáticos modificadores não ligados ao loco *NF1*. Outras evidências vêm de relatos sobre a predominância do sexo masculino em pacientes que exibem pseudoartrose da tíbia e de crianças com leucemia (Shannon *et al.*, 1992, Stevenson *et al.*, 1999).

A idéia de que genes contíguos ao loco *NF1* alteram a expressão fenotípica surgiu dos trabalhos realizados por Kayes *et al.* (1994), Wu *et al.* (1995, 1997b), Riva *et al.* (1996), Leppig *et al.* (1996, 1997), Tonsgard *et al.* (1997), Valero *et al.* (1997), Upadhyaya *et al.* (1998). Nos pacientes estudados por esses autores, foram observadas deleções do gene *NF1*, o que poderia estar associado à perda de genes adjacentes. Convém ressaltar que apenas a perda dos três genes contidos no intron 27b é conhecida e outros genes candidatos não têm sido identificados nas proximidades ou no loco *NF1*.

Com relação aos fatores ambientais, Riccardi (1993) tem sugerido que um trauma mecânico (na forma de uma ferida na pele) ocasiona o desenvolvimento de neurofibromas dérmicos. O ambiente endógeno, como os hormônios procedentes de anticoncepcionais ou presentes na gravidez, parecem também ter influência no aparecimento ou no agravamento de alguns sintomas mas não existem evidências concretas dessa associação.

A maioria da literatura consultada descreve os detalhes moleculares das amostras de pacientes com neurofibromatose mas são poucos os trabalhos que relacionam os achados com o quadro clínico do paciente. Esse fato provavelmente



ocorre porque o gene *NF1* apresenta uma das mais altas taxas de mutações para doenças humanas e, portanto, a maioria dos casos representa eventos únicos.

Muitos trabalhos também falham em estabelecer essa correlação porque avaliam poucos casos e, portanto, não conseguem atingir conclusões definitivas. Então, um maior número de indivíduos deve ser estudado por um conjunto grande de técnicas capazes de detectar um elevado número de mutações. O trabalho de Fahsol *et al.* (2000) preenche esse requisito, sendo notável pela riqueza de dados moleculares, porém falha quanto à caracterização clínica. O presente trabalho, ao contrário, apresenta dados clínicos minuciosos, o que é incomum nos estudos sobre neurofibromatose. A análise de uma casuística maior e o emprego de técnicas complementares, tais como o PTT, TGGE e FISH, provavelmente possibilitará conclusões mais consistentes nas relações fenótipo/genótipo.

Todos os pacientes com NF1 aqui estudados cumpriram os critérios propostos pelo NIH. Apesar desses critérios serem essenciais para o diagnóstico, Heim *et al.* (1995) detectaram uma mutação no exon 22 do gene *NF1* em uma criança que apresentava apenas MCCL e, portanto, não cumpria tais critérios. Buske *et al.* (1999) também relataram um paciente clinicamente negativo pelos mesmos critérios, dado que apresentava apenas duas MCCL, um neurofibroma, um nódulo de Lisch e um glioma óptico mas era molecularmente positivo para a doença. Esses exemplos enfatizam a importância da análise do gene *NF1* nos casos suspeitos e indicam a necessidade do uso flexível dos critérios diagnósticos, bem como do acompanhamento cuidadoso de crianças com manchas café-com-leite.

## VI. CONCLUSÕES

As principais conclusões obtidas no presente trabalho estão relacionadas a seguir:

1. Apesar das evidências na literatura de associação leucemia com neurofibromatose tipo 1, o presente trabalho não confirmou essa idéia provavelmente em função do número pequeno de pacientes estudados.

2. A idade de manifestação da doença variou entre a primeira e a segunda décadas de vida, com um leve desvio favorecendo a primeira década. Esse resultado é esperado pois a neurofibromatose tipo 1 apresenta penetrância de 100% por volta dos cinco anos de idade.

3. Entre os pacientes com NF1, 51% apresentaram macrocefalia e 40% baixa estatura. Os valores encontrados aproximam-se daqueles citados pela literatura mas o seu significado, não é bem entendido.

4. Os neurofibromas plexiformes foram observados com frequência de 37%, valor este bem acima do encontrado por vários autores, que atinge 5% a 15% aproximadamente.

5. Os pacientes estudados neste trabalho apresentaram uma alta frequência de escoliose (47,3%) mas apenas 22% dos casos exibiram peito escavado. Além disso, 32,5% apresentaram RM leve (QI = 50 a 55 a ~70) e 30% limítrofe (QI = 70 a 85).

6. A técnica de SSCP utilizada foi capaz de detectar 10 mutações (18%) e, portanto, não apóia a idéia de que fragmentos acima de 200 pb são mais dificilmente detectadas. No presente trabalho, os maiores fragmentos corresponderam aos exons 28 (509 pb), 23a (447 pb), 29 (423 pb) e 20 (402 pb). Se o tamanho dos produtos de PCR for realmente limitante, é possível que alguns mutantes tenham sido perdidos, embora exons extensos como o 20 e 29 tenham exibido bandas variantes bastante nítidas.

7. Mutações distintas levaram a fenótipos diferentes mas mutações iguais também levaram a fenótipos diferentes. Esse achado provavelmente é decorrente da presença de mutações somáticas no segundo alelo, mutações em outros genes



ou deleções contíguas, efeito de genes modificadores, mosaicismo e fatores ambientais.



## VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-RAHMAN, S. Z.; NOURALDEEN, A. M.; AHMED, A. E.; Molecular interaction of [2, 3-<sup>14</sup>C] acrylonitrile with DNA in gastric tissue of rat. *J. Biochem. Toxicol.*, v. 9, p. 191-198, 1994.

ABELSON, R. & WALSH, M. Function and Regulation of Ras. *Annu. Rev. Biochem.*, v. 62, p. 851-891, 1993.

AINSWORTH, P. J.; RODENHISER, D. I.; COSTA, M.T. Identification and characterization of sporadic and inherited mutations in exon 31 of the neurofibromatosis (NF1) gene. *Hum. Genet.*, v. 91, p. 151-156, 1993.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. (Diagnostic and statistical manual of mental disorders – DSM-III-R). Tradução: Lúcia Siqueira Barbosa. São Paulo: Manole, 1989, 602p.

ANGLANI, F.; MURGIA, A.; BEDIN, S.; BRESIN, E.; BERNARDI, F.; CLEMENTI, M.; TENCONI, R. A new disease-causing mutation in the GAP-related domain of the NF1 gene. *Hum. Mol. Genet.*, v. 2, no. 7, p. 1057-1059, 1993.

ARS, E.; KRUYER, H.; GAONA, A.; CASQUERO, P.; ROSELL, J.; VOLPINI, V.; SERRA, E.; LÁZARO, C.; ESTIVILL, X. A Clinical Variant of Neurofibromatosis Type 1: Familial Spinal Neurofibromatosis with a Frameshift Mutation in the NF1 Gene. *Am. J. Hum. Genet.*, v. 62, p. 834-841, 1998.

ARS, E.; SERRA, E.; GARCIA, J.; KRUYER, H.; GAONA, A.; LÁZARO, C.; ESTIVILL, X. Mutations affecting mRNA splicing are the most common molecular defects in patients with neurofibromatosis type 1. *Hum. Mol. Genet.*, v. 9, no. 2, p. 237-247, 2000.

BAHUAU, M.; HOUDAYER, C.; ASSOULINE, B.; BLANCHET-BARDON, C.; LE MERRER, M.; LYONNET, S.; GIRAUD, S.; RÉCAN, D.; LAKHDAR, H.; VIDAUD, M.; VIDAUD, D. Novel Recurrent Nonsense Mutation Causing Neurofibromatosis Type 1 (NF1) in a Family Segregating Both NF1 and Noonan Syndrome. *Am. J. Med. Genet.*, v. 75, p. 265-272, 1998.

BALLESTER, R.; MARCHUK, D.; BOGUSKI, M.; SAULINO, A.; LETCHER, R.; WIGLER, M.; COLLINS, F. S. The NF1 locus encodes a protein functionally related to mammalian GAP and yeast IRA proteins. *Cell*, v. 63, p. 851-859, 1990.

BARKER, D.; WRIGHT, E.; NGUYEN, K.; CANNON, L.; FAIN, P.; GOLDAR, D.; BISHOP, D. T.; CAREY, J.; BATY, B.; KIVLIN, J.; WILLARD, H.; WAYE, J. S.; GREIG, G.; LEINWAND, L.; NAKAMURA, Y.; O'CONNEL, P.; LEPPERT, M.; LALOUEL, J. M.; WHITE, R.; SKOLNICK, M. Gene for von Recklinghausen Neurofibromatosis Is in the Pericentromeric Region of Chromosome 17. *Science*, v. 236, p. 1100-1102, 1987.

BASSAM, B. J.; CAETANO-ANOLLÉS, G. Silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, v. 42, p. 181-188, 1993.

BOULANDET, E. G.; PANTEL, J.; CAZENEUVE, C.; GIJN, M. V.; VIDAUD, D.; LEMAY, S.; MARTIN, J.; ZELLER, J.; REVUZ, J.; GOOSSENS, M.; AMSELEM, S.; WOLKENSTEIN, P. NF1 gene analysis focused on CpG-rich exons in a cohort of 93 patients with neurofibromatosis type 1. *Hum. Mutat.*, v. 16, no. 3, p. 274-275, 2000.

BUSKE, A.; GEWIES, A.; LEHMANN, R.; RÜTHER, K.; ALGERMISSSEN, B.; NÜRNBERG, P.; TINSCHERT, S. Recurrent *NF1* Gene Mutation in a Patient with Oligosymptomatic Neurofibromatosis Type 1 (NF1). *Am. J. Med. Genet.*, v. 86, p. 328-330, 1999.

CAREY, J. C.; STEVENSON, D. A.; OTA, M.; NEIL, S.; VISKOCHIL, D. H. Is there a NF/Noonan syndrome? II. Documentation of the clinical and molecular aspects of an important family. *Proc. Greenwood Genet. Center*, v. 17, p. 52-53, 1998.

CAREY, J. C.; VISKOCHIL, D. H. Neurofibromatosis Type 1: A Model Condition for the Study of the Molecular Basis of Variable Expressivity in Human Disorders. *Am. J. Med. Genet.*, v. 89, p. 7-13, 1999.

CAWTHON, R. M.; WEISS, R.; XU, G.; VISKOCHIL, D.; CULVER, M.; STEVENS, J.; ROBERTSON, M.; DUNN, D.; GESTELAND, R.; O'CONNELL, P.; WHITE, R. A Major Segment of the Neurofibromatosis Type 1 Gene: cDNA Sequence, Genomic Structure, and Point Mutations. *Cell*, v.62, p. 193-201, 1990a.

CAWTHON, R. M.; ANDERSEN, L. B.; BUCHBERG, A. M.; XU, G.; O'CONNELL, P.; VISKOCHIL, D.; WEISS, R. B.; WALLACE, M. R.; MARCHUK, D. A.; CULVER, M.; STEVENS, J.; JENKINS, N. A.; COPELAND, N. G.; COLLINS, F. S.; WHITE, R. cDNA sequence and genomic structure of Evi2B, a gene lying within an intron of the neurofibromatosis type 1 gene. *Genomics*, v. 9, p. 446-460, 1991.

CAWTHON, R. M.; O'CONNEL, P.; BUCHBERG, A. M.; VISKOCHIL, D.; WEISS, R. B.; CULVER, M.; STEVENS, J.; JENKINS, N. A.; COPELAND, N. G.; WHITE, R. Identification and characterization of transcripts from the neurofibromatosis 1 region: the sequence and genomic structure of EV12 and mapping of other transcripts. *Genomics*, v. 7, p. 555-565, 1990b.

CERON, C. R.; SANTOS, J. R.; CAMPOS-BICUDO, H. E. M The use of gelatin to dry cellophane wound slab gels in an embroidering hoop. *Rev. Brasil. Genet.*, v. 15, no. 1, p. 201-203, 1992.

COLMAN, S. D.; ABERNATHY, C. R.; HO, V. T.; WALLACE, M. R. Four frameshift mutations in neurofibromatosis type 1 caused by small insertions. *J. Med. Genet.*, v. 34, p. 579-581, 1997.

COLMAN, S. D.; COLLINS, F. S.; WALLACE, M. R. Characterization of a single base-pair deletion in neurofibromatosis type 1. *Hum. Mol. Genet.*, v. 2, no. 10, p. 1709-1711, 1993.

COLMAN, S.D.; RASMUSSEN, S. A.; HO, V.T.; ABERNATHY, C.R.; WALLACE, M. R. Somatic Mosaicism in a Patient with Neurofibromatosis Type 1. *Am. J. Hum. Genet.*, v. 58, p. 484-490, 1996.

COOPER, G. M. **The Cell – A Molecular Approach.** Washington: ASM Press, 1997. 673p.

CORREA, C. L.; BREMS, H.; LÁZARO, C.; MARYNEN, P.; LEGIUS, E. Unequal Meiotic Crossover: A Frequent Cause of *NF1* Microdeletions. *Am. J. Hum. Genet.*, v. 66, p. 1969-1974, 2000.

CUMMINGS, L. M.; GLATFELTER, A.; MARCHUK, D. A. *NF1*-related loci on



chromosomes 2, 12, 14, 15, 20, 21, and 22: A potential role for gene conversion in the high spontaneous mutation rate of NF1? *Am. J. Hum. Genet. (suppl)*, v. 53, p. 672, 1993.

DANGLLOT, G.; RÉGNIER, V.; FAUVET, D.; VASSAL, G.; KUJAS, M.; BERNHEIM, A. Neurofibromatosis 1 (*NF1*) mRNAs expressed in the central nervous system are differentially spliced in the 5' part of the gene. *Hum. Mol. Genet.*, v. 4, no. 5, p. 915-920, 1995.

EASTON, D. F.; PONDER, M. A.; HUSON, S. M.; PONDER, B. A. J. An Analysis of Variation in Expression of Neurofibromatosis (NF) Type I (NFI): Evidence for Modifying Genes. *Am. J. Hum. Genet.*, v. 53, p. 305-313, 1993.

EISENBARTH, I.; BEYER, K.; KRONE, W.; ASSUM, G. Toward a Survey of Somatic Mutation of the *NF1* Gene in Benign Neurofibromas of Patients with Neurofibromatosis Type 1. *Am. J. Hum. Genet.*, v. 66, p. 393-401, 2000.

ESTIVILL, X.; LÁZARO, C.; CASALS, T.; RAVELLA, A. Recurrence of a nonsense mutation in the *NF1* gene causing classical neurofibromatosis type 1. *Hum. Genet.*, v. 88, p. 185-188, 1991.

FAHSOLD, R.; HOFFMEYER, S.; MISCHUNG, C.; GILLE, C.; EHLERS, C.; KÜCÜKCEYLAN, N.; ABDEL-NOUR, M.; GEWIES, A.; PETERS, H.; KAUFMANN, D.; BUSKE, A.; TINSCHERT, S.; NÜRNBERG, P. Minor Lesion Mutational Spectrum of the Entire *NF1* Gene Does Not Explain Its High Mutability but Points to a Functional Domain Upstream of the GAP-Related Domain. *Am. J. Hum. Genet.*, v. 66, p. 790-818, 2000.

FARRIS, S. R.; GROVE, A. S. Jr. Orbital and Eyelid Manifestations of Neurofibromatosis: A Clinical Study and Literature Review. *Ophthalm. Plast. Reconstr. Surg.*, v. 12, no. 4, p. 245-259, 1996.

GARICOCHEA, B.; GIORGI, R.; ODONE, V. F.; DORLHIAC-LLACER, P. E.; BENDIT, I. Mutational analysis of N-RAS and GAP-related domain of the neurofibromatosis type 1 gene in chronic myelogenous leukemia. *Leuk. Res.*, v. 22, p. 1003-1007, 1998.

GASPARINI, P.; D'AGRUMA, L.; DE CILLIS, G. P.; BALESTRAZZI, P.;



MINGARELLI, R.; ZELANTE, L. Scanning the first part of the neurofibromatosis type 1 gene by RNA-SSCP: identification of three novel mutations and two new polymorphisms. *Hum. Genet.*, v. 97, p. 492-495, 1996.

GOLONI-BERTOLLO, E. M. **Estudo Citogenético e Genético-Clínico em Neurofibromatose**. São José do Rio Preto, 1994. 185p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas, área de Concentração em Genética) - Universidade Estadual Paulista, UNESP.

GROMPE, M. The rapid detection of unknown mutations in nucleic acids. *Nat. Genet.*, v. 5, p. 111-117, 1993.

GUTMANN, D. H.; ANDERSEN, L. B.; COLE, J. L.; SWAROOP, M.; COLLINS, F. S. An alternatively-spliced mRNA in the carboxy terminus of the neurofibromatosis type 1 (*NF1*) gene is expressed in muscle. *Hum. Mol. Genet.*, v. 2, no. 7, p. 989-992, 1993.

GUTMANN, D. H.; AYLSWORTH, A.; CAREY, J. C.; KORF, B.; MARKS, J.; PYERITZ, R. E.; RUBENSTEIN, A.; VISKOCHIL, D. The Diagnostic Evaluation and Multidisciplinary Management of Neurofibromatosis 1 and Neurofibromatosis 2. *JAMA*, v. 278, no. 1, p. 51-57, 1997.

GUTMANN, D. H.; COLLINS, F. S. Recent Progress Toward Understanding the Molecular Biology of Von Recklinghausen Neurofibromatosis. *Ann. Neurol.*, v. 31, no. 5, p. 555-561, 1992.

GUTMANN, D. H.; GEIST, R. T.; ROSE, K.; WRIGHT, D. E. Expression of Two New Protein Isoforms of the Neurofibromatosis Type 1 Gene Product, Neurofibromin, in Muscle Tissues. *Developmental Dynamics*, v. 202, p. 302-311, 1995.

GUTMANN, D. H.; ZHANG, Y.; HIRBE, A. Developmental Regulation of a Neuron-Specific Neurofibromatosis 1 Isoform. *Ann. Neurol.*, v. 46, no. 5, p. 777-782, 1999.

HEIM, R. A.; KAM-MORGAN, L. N. W.; BINNIE, C. G.; CORNS, D. D.; CAYOUE, M. C.; FARBER, R. A.; AYLSWORTH, A. S.; SILVERMAN, L. M.; LUCE, M. C. Distribution of 13 truncating mutations in the neurofibromatosis





1 gene. *Hum. Mol. Genet.*, v. 4, no. 6, p. 975-981, 1995.

HOFFMEYER, S.; ASSUM, G.; KAUFMANN, D.; SCHWENK, K.; KRONE, W. A deletion in the 5'-region of the neurofibromatosis type 1 (NF1) gene. *Hum. Genet.*, v. 94, p. 97-100, 1994.

HOFFMEYER, S.; NÜNBERG, P.; RITTER, H.; FAHSOLD, R.; LEISTNER, W.; KAUFMANN, D.; KRONE, W. Nearby Stop Codons in Exons of the Neurofibromatosis Type 1 Gene Are Disparate Splice Effectors. *Am. J. Hum. Genet.*, v. 62, p. 269-277, 1998.

HORIUCHI, T.; HATTA, N.; MATSUMOTO, M.; OHTSUKA, H.; COLLINS, F. S.; KOBAYASHI, Y.; FUJITA, S. Nonsense mutations at Arg-1947 in two cases of familial neurofibromatosis type 1 in Japanese. *Hum. Genet.*, v. 93, p. 81-83, 1994.

HORIUCHI, T.; HATTA, N.; WATANABE, I.; KOBAYASHI, Y.; WALLACE, M. R.; SHIRAKATA, Y.; OHTSUKA, H.; FUJITA, S. Identification of Two Novel Mutations (1448 delA and Q682X) in the NF1 Gene and Analysis for Nonsense Mutations in Patients With Neurofibromatosis Type 1. *Hum. Mutat. (suppl)*, v. 1, p. 547-549, 1998.

HORN, D.; ROBINSON, P. N.; BÖDDRICH, A.; BUSKE, A.; TINSCHERT, S.; NÜRNBERG, P. Three novel mutations of the NF1 gene detected by temperature gradient gel electrophoresis of exons 5 and 8. *Electrophoresis*, v. 17, p. 1559-1563, 1996.

HULSEBOS, T. J. M.; BIJLEVELD, E. H.; RIEGMAN, P. H. J.; SMINK, L. J.; DUNHAM, I. Identification and characterization of *NF1*-related loci on human chromosomes 22, 14 and 2. *Hum. Genet.*, v. 98, p. 7-11, 1996.

HUSON, S. M.; HUGHES, R. A. C. **The neurofibromatosis: a pathogenetic and clinical overview.** New York: Chapman & Hall Medical, 1994. 487p.

HUTTER, P.; ANTONARAKIS, S. E.; DELOZIER-BLANCHET, C. D.; MORRIS, M. A. Exon skipping associated with A→G transition at +4 of the IVS33 splice donor site of the neurofibromatosis type 1 (NF1) gene. *Hum. Mol. Genet.*, v. 3, no. 4, p. 663-665, 1994.



ISHIOKA, C.; BALLESTER, R.; ENGELSTEIN, M.; VIDAL, M.; KASSEL, J.; THE, I.; BERNARDS, A.; GUSELLA, J. F.; FRIEND, S. H. A functional assay for heterozygous mutations in the GTPase activating protein related domain of the neurofibromatosis type 1 gene. *Oncogene*, v. 10, p. 841-847, 1995.

JADAYEL, D.; FAIN, P.; UPADHYAYA, M.; PONDER, M. A.; HUSON, S. M.; CAREY, J.; FRYER, A.; MATHEW, C. G. P.; BARKER, D. F.; PONDER, B. A. J. Paternal origin of new mutations in Von Recklinghausen neurofibromatosis. *Nature*, v. 343, p. 558-559, 1990.

JAECKEL, S.; EPPLEN, J. T.; KAUTH, M.; MITERSKI, B.; TSCHENSTSCHER, F.; EPPLEN, C. Polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism or how to detect reliably and efficiently each sequence variation in many samples and many genes. *Electrophoresis*, v.19, p. 3055-3061, 1998.

JOHN, A. M.; RUGGIERI, M.; FERNER, R.; UPADHYAYA, M. A search for evidence of somatic mutations in the *NF1* gene. *J. Med. Genet.*, v. 37, p. 44-49, 2000.

JOHNSON, M. R.; FERNER, R. E.; BOBROW, M.; HUGHES, R. A. C. Detailed analysis of the oligodendrocyte myelin glycoprotein gene in four patients with neurofibromatosis 1 and primary progressive multiple sclerosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, v. 68, p. 643-646, 2000.

JONES, K. L. **Smith's Recognizable Patterns of Human Malformation**. 4 ed. Philadelphia: W. B. Saunders Co, 1988. 778p.

KAYES, L. M.; BURKE, W.; RICCARDI, V. M.; BENNETT, R.; EHRLICH, P.; RUBENSTEIN, A.; STEPHENS, K. Deletions Spanning the Neurofibromatosis I Gene: Identification and Phenotype of Five Patients. *Am. J. Hum. Genet.*, v. 54, p. 424-436, 1994.

KLOSE, A.; AHMADIAN, M. R.; SCHUELKE, M.; SCHEFFZEK, K.; HOFFMEYER, S.; GEWIES, A.; SCHMITZ, F.; KAUFMANN, D.; PETERS, H.; WITTINGHOFFER, A.; NÜRNBERG, P. Selective disactivation of neurofibromin GAP activity in neurofibromatosis type 1 (NF1). *Hum. Mol. Genet.*, v. 7, no. 8, p. 1261-1268, 1998b.



KLOSE, A.; ROBINSON, P. N.; GEWIES, A.; KLUWE, L.; KAUFMANN, D.; BUSKE, A.; TINSCHERT, S.; PETERS, H. Two novel mutations in exons 19a and 20 and a BsaI polymorphism in a newly characterized intron of the neurofibromatosis type 1 gene. *Hum. Genet.*, v. 102, p. 367-371, 1998a.

KLOSE, A.; PETERS, H.; HOFFMEYER, S.; BUSKE, A.; LÜDER, A.; HESS, D.; LEHMANN, R.; NÜRNBERG, P.; TINSCHERT, S. Two Independent Mutations in a Family With Neurofibromatosis Type 1. *Am. J. Med. Genet.*, v. 83, p. 6-12, 1999.

KORF, BR NNFF International NF1 Genetic Analysis Consortium Web site. <http://www.clam.com/nf/nf1gene/1997>.

KORF, B. R. Plexiform Neurofibromas. *Am. J. Med. Genet.*, v. 89, p. 31-37, 1999.

KUTACH, L. S.; BOLSHAKOV, S.; ANANTHASWAMY, H. N. Detection of mutations and polymorphisms in the p53 tumor suppressor gene by single-strand conformation polymorphism analysis. *Electrophoresis*, v. 20, p. 1204-1210, 1999.

LÁZARO, C.; GAONA, A.; AINSWORTH, P.; TENCONI, R.; VIDAUD, D.; KRUYER, H.; ARS, E.; VOLPINI, V.; ESTIVILL, X. Sex differences in mutational rate and mutational mechanism in the NF1 gene in neurofibromatosis type 1 patients. *Hum. Genet.*, v. 98, p. 696-699, 1996.

LÁZARO, C.; GAONA, A.; LYNCH, M.; KRUYER, H.; RAVELLA, A.; ESTIVILL, X. Molecular Characterization of the Breakpoints of a 12-kb Deletion in the *NFI* Gene in a Family Showing Germ-Line Mosaicism. *Am. J. Hum. Genet.*, v. 57, p. 1044-1049, 1995a.

LÁZARO, C.; KRUYER, H.; GAONA, A.; ESTIVILL, X. Two further cases of mutation R1947X in the NF1 gene: screening for a relatively common recurrent mutation. *Hum. Genet.*, v. 96, p. 361-363, 1995b.

LÁZARO, C.; RAVELLA, A.; GAONA, A.; VOLPINI, V.; ESTIVILL, X. Neurofibromatosis type 1 due to germ-line mosaicism in a clinically normal father. *N. Engl. J. Med.*, v. 331, p. 1403-1407, 1994.

LEDBETTER, D. H.; RICH, D. C.; O'CONNEL, P.; LEPPERT, M.; CAREY, J. C. Precise Localization of NFI to 17q11.2 by Balanced Translocation. *Am. J. Hum. Genet.*, v. 44, p. 20-24, 1989.

LEGIUS, E.; HALL, B. K.; WALLACE, M. R.; COLLINS, F. S.; GLOVER, T. W. Ten base pair duplication in exon 38 of the NF1 gene. *Hum. Mol. Genet.*, v. 3, no. 5, p. 829-830, 1994.

LEGIUS, E.; MARCHUK, D. A.; HALL, B. K.; ANDERSEN, L. B.; WALLACE, M. R.; COLLINS, F. S.; GLOVER, T. W. NF1-related locus on chromosome 15. *Genomics*, v. 13, p. 1316-1318, 1992.

LEPPIG, K. A.; KAPLAN, P.; VISKOCHIL, D.; WEAVER, M.; ORTENBERG, J.; STEPHENS, K. Familial Neurofibromatosis 1 Microdeletions: Cosegregation With Distinct Facial Phenotype and Early Onset of Cutaneous Neurofibromata. *Am. J. Med. Genet.*, v. 73, p. 197-204, 1997.

LEPPIG, K. A.; VISKOCHIL, D.; NEIL, S.; RUBENSTEIN, A.; JOHNSON, V. P.; ZHU, X. L.; BROTHMAN, A. R.; STEPHENS, K. The detection of contiguous gene deletions at the neurofibromatosis 1 locus with fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet. Cell. Genet.*, v. 72, p. 95-98, 1996.

LI, Y.; BOLLAG, G.; CLARK, R.; STEVENS, J.; CONROY, L.; FULTS, D.; WARD, K.; FRIEDMAN, E.; SAMOWITZ, W.; ROBERTSON, M.; BRADLEY, P.; MCCORMICK, F.; WHITE, R.; CAWTHON, R. Somatic Mutations in the Neurofibromatosis 1 Gene in Human Tumors. *Cell*, v. 69, p. 275-281, 1992.

LI, Y.; O'CONNEL, P.; BREIDENBACH, H. H.; CAWTHON, R.; STEVENS, J.; XU, G.; NEIL, S.; ROBERTSON, M.; WHITE, R.; VISKOCHIL, D. Genomic Organization of the Neurofibromatosis 1 Gene (NF1). *Genomics*, v. 25, p. 9-18, 1995.

LURIA, D.; AVIGAD, S.; COHEN, I. J.; STARK, B.; WEITZ, R.; ZAIZOV, R. p53 Mutation as the Second Event in Juvenile Chronic Myelogenous Leukemia in a Patient with Neurofibromatosis Type 1. *Cancer*, v. 80, no. 10, p. 2013-2018, 1997.

MACHADO, L. A. Avaliação Clínica, Cromossômica e Molecular em



**Pacientes Portadores de Neurofibromatose.** Botucatu, 1998. 159p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas, área de Concentração em Genética) - Universidade Estadual Paulista, UNESP.

MARIS, J. M.; WIERSMA, S. R.; MAHGOUB, N.; THOMPSON, P.; GEYER, R. J.; HURWITZ, C. G. H.; LANGE, B. J.; SHANNON, K. M. Monosomy 7 Myelodysplastic Syndrome and Other Second Malignant Neoplasms in Children with Neurofibromatosis Type 1. *Cancer.*, v. 79, p. 1438-1446, 1997.

MARTIN, G. A.; VISKOCHIL, D.; BOLLAG, G.; MCCABE, P. C.; CROSIER, W. J.; HAUBRUCK, H.; CONROY, L.; CLARK, R.; O'CONNEL, P.; CAWTHON, R. M.; INNIS, M. A.; MCCORMICK, F. The GAP-related domain of the neurofibromatosis type 1 gene product interacts with ras p21. *Cell*, v. 63, p. 843-849, 1990.

MAYNARD, J.; KRAWCZAK, M.; UPADHYAYA, M. Characterization and significance of nine novel mutations in exon 16 of the neurofibromatosis type 1 (NF1) gene. *Hum. Genet.*, v. 99, p. 674-676, 1997.

MESSIAEN, L. M.; CALLENS, T.; MORTIER, G.; BEYSEN, D.; VANDENBROUCKE, I.; VAN ROY, N.; SPELEMAN, F.; PAEPE, A. D. Exhaustive mutation analysis of the NF1 gene allows identification of 95% of mutations and reveals a high frequency of unusual splicing defects. *Hum. Mutat.*, v. 15, no. 6, p. 541-555, 2000.

MESSIAEN, L. M.; CALLENS, T.; ROUX, K. J.; MORTIER, G. R.; DE PAEPE, A.; ABRAMOWICZ, M.; PERICAK-VANCE, M. A.; VANCE, J. M.; WALLACE, M. R. Exon 10b of the *NF1* gene represents a mutational hotspot and harbors a recurrent missense mutation Y489C associated with aberrant splicing. *Genet. Med.*, v. 1, no. 6, p. 248-253, 1999.

MESSIAEN, L.; CALLENS, T.; DE PAEPE, A.; CRAEN, M.; MORTIER, G. Characterization of two different nonsense mutations, C6792A and C6792G, causing skipping of exon 37 in the NF1 gene. *Hum. Genet.*, v. 101, p. 75-80, 1997.

MUNIZ, M. P. **Investigação Radiológica de Pacientes Portadores de Neurofibromatose.** São José do Rio Preto, 1998. 143p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde – área de Concentração em Medicina Interna) - Faculdade de





Medicina, FAMERP.

NATARAJ, A. J.; OLIVOS-GLANDER, I.; KUSUKAWA, N.; HIGHSMITH, W. E. Single-strand conformation polymorphism and heteroduplex analysis for gel-based mutation detection. *Electrophoresis*, v. 20, p. 1177-1185, 1999.

ORITA, M.; IWAHANA, H.; KANAZAWA, H.; HAYASHI, K.; SEKIYA, T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single strand conformation polymorphisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, v. 86, p. 2766-2770, 1989a.

ORITA, M.; SUZUKI, Y.; SEKIYA, T.; HAYASHI, K. Rapid and Sensitive Detection of Point Mutations and DNA Polymorphisms Using the Polymerase Chain Reaction. *Genomics*, v. 5, p. 874-879, 1989b.

OSBORN, M. J.; UPADHYAYA, M. Evaluation of the protein truncation test and mutation detection in the *NF1* gene: mutational analysis of 15 known and 40 unknown mutations. *Hum. Genet.*, v. 105, p. 327-332, 1999.

PARK, K. C.; CHOI, H. O.; PARK, K. H.; KIM, K. H.; EUN, H. C. A nonsense mutation at Arg-1947 in the *NF1* gene in a case of neurofibromatosis type 1 in a Korean patient. *J. Hum. Genet.*, v. 45, no. 2, p. 84-85, 2000.

PARK, V. M.; PIVNICK, E. K. Neurofibromatosis type 1 (*NF1*): a protein truncation assay yielding identification of mutations in 73% of patients. *J. Med. Genet.*, v. 35 p. 813-820, 1998.

PETERS, H.; HESS, D.; FAHSOLD, R.; SCHULKE, M. A novel mutation L1425P in the GAP-region of the *NF1* gene detected by temperature gradient gel electrophoresis (TGGE). *Hum. Mutat.*, v. 13, no. 4, p. 337, 1999.

PURANDARE, S. M.; BREIDENBACH, H. H.; LI, Y.; ZHU, X. L.; SAWADA, S.; NEIL, S. M.; BROTHMAN, A.; WHITE, R.; CAWTHON, R.; VISKOCHIL, D. Identification of Neurofibromatosis 1 (*NF1*) Homologous Loci by Direct Sequencing, Fluorescence *in Situ* Hybridization, and PCR Amplification of Somatic Cell Hybrids. *Genomics*, v. 30, p. 476-485, 1995a.



PURANDARE, S. M.; LANYON, W. G.; ARNGRIMSSON, R.; CONNOR, J. M. Characterisation of a novel splice donor mutation affecting position +1 in intron 18 of the NF-1 gene. *Hum. Mol. Genet.*, v. 4, no. 4, p. 767-768, 1995b.

PURANDARE, S. M.; LANYON, W. G.; CONNOR, J. M. Characterisation of inherited and sporadic mutations in neurofibromatosis type-1. *Hum. Mol. Genet.*, v. 3, no. 7, p. 1109-1115, 1994.

RASMUSSEN, S. A.; COLMAN, S. D.; HO, V. T.; ABERNATHY, C. R.; ARN, P. H.; WEISS, L.; SCHWARTZ, C.; SAUL, R. A.; WALLACE, M. R. Constitutional and mosaic large NF1 gene deletions in neurofibromatosis type 1. *J. Med. Genet.*, v. 35, p. 468-471, 1998.

RASMUSSEN, S. A.; FRIEDMAN, J. M. *NF1* Gene and Neurofibromatosis 1. *Am. J. Epidemiol.*, v. 151, no. 1, p. 33-40, 2000.

RAVNIK-GLAVAC, M.; GLAVAC, D.; DEAN, M. Sensitivity of single-strand conformation polymorphism and heteroduplex method for mutation detection in the Cystic-Fibrosis gene. *Hum. Mol. Genet.*, v. 3, p. 801-807, 1994.

RICCARDI, V. M. Genotype, Malleotype, Phenotype, and Randomness: Lessons from Neurofibromatosis-I (NF-I). *Am. J. Hum. Genet.*, v. 53, p. 301-304, 1993.

RICCARDI, V. M. Neurofibromatosis: clinical heterogeneity. *Curr. Probl. Cancer*, v. 8, no. 2, p. 1-34, 1982.

RIVA, P.; CASTORINA, P.; MANOUKIAN, S.; DALPRÁ, L.; DONEDA, L.; MARINI, G.; DEN DUNNEN, J.; LARISSA, L. Characterization of a cytogenetic 17q11.2 deletion in an NF1 patient with a contiguous gene syndrome. *Hum. Genet.*, v. 98, p. 646-650, 1996.

RIVA, P.; CORRADO, L.; NATACCI, F.; CASTORINA, P.; WU, B. L.; SCHNEIDER, G. H.; CLEMENTI, M.; TENCONI, R.; KORF, B. R.; LARIZZA, L. *NF1* Microdeletion Syndrome: Refined FISH Characterization of Sporadic and Familial Deletions with Locus-Specific Probes. *Am. J. Hum. Genet.*, v. 66, p. 100-109, 2000.

ROBINSON, P. N.; BÖDDRICH, A.; PETERS, H.; TINSCHERT, S.; BUSKE, A.; KAUFMANN, D.; NÜRNBERG, P. Two recurrent nonsense mutations and a 4 bp deletion in a quasi-symmetric element in exon 37 of the NF1 gene. *Hum. Genet.*, v. 96, p. 95-98, 1995.

ROBINSON, P. N.; BUSKE, A.; NEUMANN, R.; TINSCHERT, S.; NURNBERG, P. Recurrent 2-bp deletion in exon 10c of the NF1 gene in two cases of von Recklinghausen neurofibromatosis. *Hum. Mutat.*, v. 7, p. 85-88, 1996.

RODENHISER, D. I.; COULTER-MACKIE, M. B.; SINGH, S. M. Evidence of DNA methylation in the neurofibromatosis type 1 (NF1) gene region of 17q11.2. *Hum. Mol. Genet.*, v. 2, no. 4, p. 439-444, 1993.

RODENHISER, D. I.; JUNG, J. H.; GILLET, J. M.; HOVLAND, K.; ANDREWS, J.; AINSWORTH, P. J.; COULTER-MACKIE, M.; SINGH, S. M. A five-base pair deletion (7118 delTTTTA) identified within neurofibromatosis (NF1) exon 39. *Hum. Mutat.*, v. 9, no. 5, p. 473, 1997.

ROEST, P. A. M.; ROBERTS, R. G.; SUGINO, S.; VAN OMMEM, G. J. B.; DEN DUNNEN, J. T. Protein truncation test (PTT) for rapid detection of translation-terminating mutations. *Hum. Mol. Genet.*, v. 2, no. 10, p. 1719-1721, 1993.

RUGGIERI, M. The different forms of neurofibromatosis. *Child's Nerv. Syst.*, v. 15, p. 295-308, 1999.

RUGGIERI, M.; HUSON, S. M. The neurofibromatoses. An overview. *Ital. J. Neurol. Sci.*, v. 20, p. 89-108, 1999.

RUGGIERI, M.; HUSON, S. M. What's new in neurofibromatosis? *Curr. Pediatr.*, v. 7, p. 167-176, 1997.

SAIKI, R. K. The design and optimization of the PCR. In: Erlich, H. A. (Ed.) **PCR technology - Principles and applications for DNA amplification**. New York: Oxford University Press, 1992. p. 7-16.



SCHMIDT, M. A.; MICHELS, V. V.; DEWALD, G. W. Cases of neurofibromatosis with rearrangements of chromosome 17 involving band 17q11.2. *Am. J. Med. Genet.*, v. 28, p. 771-777, 1987.

SERRA, E.; PUIG, S.; OTERO, D.; GAONA, A.; KRUYER, H.; ARS, E.; ESTIVILL, X.; LÁZARO, C. Confirmation of a Double-Hit Model for the NF1 Gene in Benign Neurofibromas. *Am. J. Hum. Genet.*, v. 61, p. 512-519, 1997.

SHANNON, K. M.; O'CONNEL, P.; MARTIN, G. A.; PADERANGA, D.; OLSON, K.; DINNDORF, P.; MCCORMICK, F. Loss of the normal *NF1* allele from the bone marrow of children with type 1 neurofibromatosis and malignant myeloid disorders. *N. Engl. J. Med.*, v. 330, p. 597-601, 1994.

SHANNON, K. M.; WATTERSON, J.; JOHNSON, P.; O'CONNEL, P.; LANGE, B.; SHAH, N.; STEINHERTZ, P.; KAN, Y. W.; PRIEST, J. R. Monosomy 7 Myeloproliferative Disease in Children with Neurofibromatosis, Type 1: Epidemiology and Molecular Analysis. *Blood*, v. 79, no. 5, p. 1311-1318, 1992.

SHEN, M. H.; HARPER, P. S.; UPADHYAYA, M. Neurofibromatosis type 1 (NF1): the search for mutations by PCR-heteroduplex analysis on Hydrolink gels. *Hum. Mol. Genet.*, v. 2, no. 11, p. 1861-1864, 1993.

SHEN, M. H.; HARPER, P. S.; UPADHYAYA, M. Molecular genetics of neurofibromatosis type 1 (NF1). *J. Med. Genet.*, v. 33, p. 2-17, 1996.

SHEN, M. H.; UPADHYAYA, M. A de novo nonsense mutation in exon 28 of the neurofibromatosis type 1 (NF1) gene. *Hum. Genet.*, v. 92, p. 410-412, 1993.

SIDE, L. E.; EMANUEL, P. D.; TAYLOR, B.; FRANKLIN, J.; THOMPSON, P.; CASTLEBERRY, R. P.; SHANNON, K. M. Mutations of the *NF1* Gene in Children With Juvenile Myelomonocytic Leukemia Without Clinical Evidence of Neurofibromatosis Type 1. *Blood*, v. 92, no. 1, p. 267-272, 1998.

SIDE, L.; TAYLOR, B.; CAYOUE, M.; CONNER, E.; THOMPSON, P.; LUCE, M.; SHANNON, K. Homozygous Inactivation of the *NF1* Gene in Bone Marrow Cells From Children With Neurofibromatosis Type 1 and Malignant Myeloid Disorders. *N. Engl. J. Med.*, v. 336, no. 24, p. 1713-1720, 1997.



SKUSE, G. R. Identification of an Insertion and Accompanying Deletion in Exon 31 of the Neurofibromatosis Type 1 Gene. *Hum. Mutat. (suppl)*, v. 1, p. 550-552, 1998.

SPIELBERGER, C. D.; GORSUCH, R. L.; LUSHENE, R. E. **Inventário de Ansiedade (traço-estado)**. IDATE. Tradução: Angela M. B. Biaggio e Luis Natalício, CEPA, Rio de Janeiro, 1979.

STARK, M.; ASSUM, G.; KAUFMANN, D.; KEHRER, H.; KRONE, W. Analysis of segregation and expression of an identified mutation at the neurofibromatosis type 1 locus. *Hum. Genet.*, v. 90, p. 356-359, 1992.

STARK, M.; ASSUM, G.; KRONE, W. A small deletion and an adjacent base exchange in a potential stem-loop region of the neurofibromatosis 1 gene. *Hum. Genet.*, v. 87, p. 685-687, 1991.

STEPHENS, K.; KAYES, L.; RICCARDI, V. M.; RISING, M.; SYBERT, V. P.; PAGON, R. A. Preferential mutation of the neurofibromatosis type 1 gene in paternally derived chromosomes. *Hum. Genet.*, v. 88, p. 279-282, 1992.

STEVENSON, D. A.; BIRCH, P. H.; FRIEDMAN, J. M.; VISKOCHIL, D. H.; BALESTRAZZI, P.; BONI, S.; KUSKE, A.; KORF, B. R.; NIIMURA, M.; PIVNICK, E. K.; SCHORRY, E. K.; SHORT, M. P.; TENCONI, R.; TONSGARD, J. H.; CAREY, J. C. Descriptive analysis of tibial pseudoartrosis in patients with neurofibromatosis 1. *Am. J. Med. Genet.*, v. 84, p. 413-419, 1999.

TASSABEHJI, M.; STRACHAN, T.; SHARLAND, M.; COLLEY, A.; DONNAI, D.; HARRIS, R.; THAKKER, N. Tandem Duplication within a Neurofibromatosis Type 1 (NFI) Gene Exon in a Family with Features of Watson Syndrome and Noonan Syndrome. *Am. J. Hum. Genet.*, v. 53, p. 90-95, 1993.

TAYLOR, S. E.; ASPINWALL, L. G. Psychosocial aspects of chronic illness. In: COSTA, P. T., VANDEN BOS, G. R. **Psychological aspects of serious illness chronic conditions fatal diseases and clinical care**. Washington, B. C.: American Psychological Association, 1990, p. 3-60.

TEIXEIRA, M. F. **Investigação de Alterações Oculares em Pacientes Portadores de Neurofibromatose**. São José do Rio Preto, 1999. 119p.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde – área de Concentração em Medicina Interna) - Faculdade de Medicina, FAMERP.

TOLIAT, M. R.; ERDOGAN, F.; GEWIES, A.; FAHSOLD, R.; BUSKE, A.; TINSCHERT, S.; NÜRNBERG, P. Analysis of the *NF1* gene by temperature gradient gel electrophoresis reveals a high incidence of mutations in exon 4b. *Electrophoresis*, v. 21, p. 541-544, 2000.

TONSGARD, J. H.; YELAVARTHI, K. K.; CUSHNER, S.; SHORT, M. P.; LINDGREN, V. Do NF1 Gene Deletions Result in a Characteristic Phenotype? *Am. J. Med. Genet.*, v. 73, p. 80-86, 1997.

TROFATTER, J. A.; MACCOLLIN, M. M.; RUTTER, J. L.; MURRELL, J. R.; DUYAO, M. P.; PARRY, D. M.; ELDRIDGE, R.; KLEY, N.; MENON, A. G.; PULASKI, K.; HAASE, V. H.; AMBROSE, C. M.; MUNROE, D.; BOVE, C.; HAINES, J. L.; MARTUZA, R. L.; MACDONALD, M. E.; SEIZINGER, B. R.; SHORT, M. P.; BUCKLER, A. J.; GUSELLA, J. F. A Novel Moesin-, Ezrin-, Radixin-like Gene is a Candidate for the Neurofibromatosis 2 Tumor Suppressor. *Cell*, v. 72, p. 791-800, 1993.

UPADHYAYA, M.; MAYNARD, J.; OSBORN, M.; HUSON, S. M.; PONDER, M.; PONDER, B. A. J.; HARPER, P. S. Characterisation of germline mutations in the neurofibromatosis type 1 (NF1) gene. *J. Med. Genet.*, v. 32, p. 706-710, 1995.

UPADHYAYA, M.; SHEN, M.; CHERRYSON, A.; FARNHAM, J.; MAYNARD, J.; HUSON, S. M.; HARPER, P. S. Analysis of mutations at the neurofibromatosis 1 (NF1) locus. *Hum. Mol. Genet.*, v. 1, no. 9, p. 735-740, 1992.

UPADHYAYA, M.; OSBORN, M. J.; MAYNARD, J.; KIM, M. R.; TAMANOI, F.; COOPER, D. N. Mutational and functional analysis of the neurofibromatosis type 1 (NF1) gene. *Hum. Genet.*, v. 99, p. 88-92, 1997.

UPADHYAYA, M.; OSBORN, M.; MAYNARD, J.; HARPER, P. Characterization of Six Mutations in Exon 37 of Neurofibromatosis Type 1 Gene. *Am. J. Med. Genet.*, v. 67, p. 421-423, 1996.

UPADHYAYA, M.; RUGGIERI, M.; MAYNARD, J.; OSBORN, M.; HARTOG, C.; MUDD, S.; PENTTINEN, M.; CORDEIRO, I.; PONDER, M.; PONDER, B.





A. J.; KRAWCZAK, M.; COOPER, D. N. Gross deletions of the neurofibromatosis type 1 (NF1) gene are predominantly of maternal origin and commonly associated with a learning disability, dysmorphic features and developmental delay. *Hum. Genet.*, v. 102, p. 591-597, 1998.

VALERO, M. C.; VELASCO, E.; MORENO, F.; HERNÁNDEZ-CHICO, C. Characterization of four mutations in the neurofibromatosis type 1 gene by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *Hum. Mol. Genet.*, v. 3, no. 4, p. 639-641, 1994.

VALERO, M. C.; PASCUAL-CASTROVIEJO, I.; VELASCO, E.; MORENO, F.; HERNÁNDEZ-CHICO, C. Identification of de novo deletions at the NF1 gene: no preferential paternal origin and phenotypic analysis of patients. *Hum. Genet.*, v. 99, p. 720-726, 1997.

VAN MEYEL, D. J.; RAMSAY, D. A.; CHAMBERS, A. F.; MACDONALD, D. R.; CAIRNCROSS, J. G. Absence of Hereditary Mutations in Exons 5 Through 9 of the p53 Gene and Exon 24 of the Neurofibromin Gene in Families with Glioma. *Ann. Neurol.*, v. 35, no. 1, p. 120-122, 1994.

VISKOCHIL, D. Neurofibromatosis. *Am. J. Med. Genet.*, v. 89, p. v-viii, 1999.

VISKOCHIL, D.; BUCHBERG, A. M.; XU, G.; CAWTHON, R. M.; STEVENS, J.; WOLF, R. K.; CULVER, M.; CAREY, J. C.; COPELAND, N. G.; JENKINS, N. A.; WHITE, R.; O'CONNEL, P. Deletions and a Translocation Interrupt a Cloned Gene at the Neurofibromatosis Type 1 Locus. *Cell*, v. 62, p. 187-192, 1990.

VISKOCHIL, D.; CAWTHON, R.; O'CONNEL, P.; XU, G.; STEVENS, J.; CULVER, M.; CAREY, J.; WHITE, R. The gene encoding the oligodendrocyte-myelin glycoprotein is embedded within the neurofibromatosis type 1 gene. *Mol. Cell Biol.*, v. 11, p. 906-912, 1991.

WALLACE, M. R.; ANDERSEN, L. B.; SAULINO, A. M.; GREGORY, P. E.; GLOVER, T. W.; COLLINS, F. S. A *de novo* Alu insertion results in neurofibromatosis type 1. *Nature*, v. 353, p. 864-866, 1991.

WALLACE, M. R.; MARCHUK, D. A.; ANDERSEN, L. B.; LETCHER, R.;



ODEH, H. M.; SAULINO, A. M.; FOUNTAIN, J. W.; BRERETON, A.; NICHOLSON, J.; MITCHELL, A. L.; BROWNSTEIN, B. H.; COLLINS, F. S. Type 1 Neurofibromatosis Gene: Identification of a Large Transcript Disrupted in Three NF1 Patients. *Science*, v. 249, p. 181-186, 1990.

WATANABE, I.; HORIUCHI, T.; HATTA, N.; MATSUMOTO, M.; KOIKE, K.; KOJIMA, S.; OHGA, S.; FUJITA, S. Analysis of Neurofibromatosis Type 1 Gene Mutation in Juvenile Chronic Myelogenous Leukemia. *Acta Haematol.*, v. 100, p. 22-25, 1998.

WEISS, B.; BOLLAG, G.; SHANNON, K. Hyperactive Ras as a Therapeutic Target in Neurofibromatosis Type 1. *Am. J. Med. Genet.*, v. 89, p. 14-22, 1999.

WIMMER, K.; ECKART, M.; STADLER, P. F.; REHDER, H.; FONATSCH, C. Three different premature stop codons lead to skipping of exon 7 in neurofibromatosis type I patients. *Hum. Mutat.*, v. 16, no. 1, p. 90-91, 2000.

WU, B. L.; AUSTIN, M. A.; SCHNEIDER, G. H.; BOLES, R. G.; KORF, B. R. Deletion of the Entire *NF1* Gene Detected by FISH: Four Deletion Patients Associated with Severe Manifestations. *Am. J. Med. Genet.*, v. 59, p. 528-535, 1995.

WU, B. L.; BOLES, R. G.; YAARI, H.; WEREMOWICZ, S.; SCHNEIDER, G. H.; KORF, B. R. Somatic mosaicism for deletion of the entire *NF1* gene identified by FISH. *Hum. Genet.*, v. 99, p. 209-213, 1997a.

WU, B. L.; SCHNEIDER, G. H.; KORF, B. R. Deletion of the Entire *NF1* Gene Causing Distinct Manifestations in a Family. *Am. J. Med. Genet.*, v. 69, p. 98-101, 1997b.

WU, R.; LÓPEZ-CORREA, C.; RUTKOWSKI, J. L.; BAUMBACH, L. L.; GLOVER, T. W.; LEGIUS, E. Germline Mutations in NF1 Patients With Malignancies. *Genes, Chrom. Cancer*, v. 26, p. 376-380, 1999.

XU, G.; LIN, B.; TANAKA, K.; DUNN, D.; WOOD, D.; GESTELAND, R.; WHITE, R.; WEISS, R.; TAMANOI, F. The catalytic domain of the neurofibromatosis type 1 gene product stimulates ras GTPase and complements ira mutants of *S. cerevisiae*. *Cell*, v. 63, p. 835-841, 1990.

XU, G.; O'CONNEL, P.; STEVENS, J.; WHITE, R. Characterization of human adenylate kinase 3 (AK3) cDNA and mapping of the AK3 pseudogene to an intron of the NF1 gene. *Genomics*, v. 13, p. 537-542, 1992.

ZHONG, J.; SPIEGEL, R.; BOLTSHAUSER, E.; SCHMID, W. Two novel mutations: 5108delAG and 5816insG in the NF1 gene detected by SSCP analysis. *Hum. Mol. Genet.*, v. 2, no. 9, p. 1491-1492, 1993.



**APÊNDICE 1****CEPAN – Centro de Pesquisa em Neurofibromatose****Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto****PROTOCOLO DE NEUROFIBROMATOSE**

Protocolo NF no.

Família

RG HB

Data

**I. Identificação**

Nome:

Data Nasc.:

Idade:

anos

Sexo:

Cor:

Profissão:

Naturalidade:

Procedência:

Endereço:

Fone p/ contato:

**II. Dados Familiares**

Nome do Pai:

Data Nasc.:

Profissão:

Nome da Mãe:

Data Nasc.:

Profissão:

**III. Antecedentes Pessoais**

Pré-Natal:

RN:

Escolaridade:

Dificuldades:

Doenças Prévias:

Medicamentos em Uso:

Hábitos: Fuma ( )

Bebe ( )

Outros:

**IV. Antecedentes Familiares**

Patologias:

Consangüinidade: S ( )

N ( )

Tipo:

Heredograma:

**V. Exame Físico**

Perímetro Cefálico (PC):

Estatura (E):

Peso (P):

**A. Exame Genético-Clínico**

1. Idade de Manifestação da NF:  
Associação com Gravidez:

2. MCCL: S ( ) N ( )

Localização:

Quantidade:

Tamanho:

Pigmentação: Hipo ( ) Hiper ( )

3. Sardas Axilares: S ( ) N ( )  
Unilateral ( ) Bilateral ( )  
Quantidade:

4. Sardas Inguinais: S ( ) N ( )  
Unilateral ( ) Bilateral ( )  
Quantidade:

5. Neurofibroma: S ( ) N ( )  
Localização:  
Quantidade:  
Tamanho:  
Pigmentação: S ( ) N ( )  
Textura:  
Plexiformes: ( ) Nodulares: ( ) Difusos: ( )  
Histopatológico:  
Lâmina No.  
Contagem de Mastócitos:

6. Outros Tumores:

7. Deformidades Ósseas: S ( ) N ( )  
Tipo Clínico:  
Localização:

8. Documentação Fotográfica: S ( ) N ( )

9. Extraído DNA: S ( ) N ( )

10. Avaliação citogenética: S ( ) N ( )



**B. Exame Oftalmológico****1. Tratamento Prévio:**

|           |       |       |        |        |
|-----------|-------|-------|--------|--------|
| Cirurgia: | S ( ) | N ( ) | Tipo:  |        |
| Oclusão:  | S ( ) | N ( ) | OD ( ) | OE ( ) |
| Óculos:   | S ( ) | N ( ) |        |        |
| OD:       | cc    | cil   | adição |        |
| OE:       | cc    | cil   | adição |        |

**2. Acuidade Visual:**

|               |        |        |
|---------------|--------|--------|
| Sem correção: | OD ( ) | OE ( ) |
| Com correção: | OD ( ) | OE ( ) |

**3. Refração:**

|              |              |
|--------------|--------------|
| Dinâmica: OD | Estática: OD |
| OE           | OE           |

**4. Desvios:**

|              |  |
|--------------|--|
| Tipo:        |  |
| Rotações: OD |  |
| OE           |  |

**5. Órbita:**

|                     |
|---------------------|
| Exoftalmometria: OD |
| OE                  |

**6. Biomicroscopia:****a) Pálpebras**

|               |        |        |
|---------------|--------|--------|
| Ptose:        | OD ( ) | OE ( ) |
| Neurofibroma: | OD ( ) | OE ( ) |
| Plexiforme:   | OD ( ) | OE ( ) |
| MCCL:         | OD ( ) | OE ( ) |
| Outros:       |        |        |

**b) Conjuntivas**

|                |        |        |
|----------------|--------|--------|
| Neurofibromas: | OD ( ) | OE ( ) |
| Outros:        |        |        |

**c) Esclera**

|                |        |        |
|----------------|--------|--------|
| Neurofibromas: | OD ( ) | OE ( ) |
| Outros:        |        |        |

**d) Córnea**

|                         |        |        |
|-------------------------|--------|--------|
| Ceratocone:             | OD ( ) | OE ( ) |
| Espessamento de nervos: | OD ( ) | OE ( ) |
| Outros:                 |        |        |

**e) Íris**

|                   |       |       |
|-------------------|-------|-------|
| Nódulos de Lisch: | S ( ) | N ( ) |
| Quantidade:       | OD:   | OE:   |

Outros  
f) Cristalino  
Catarata: OD ( ) OE ( )

7. Pio:

OD: mmHg  
OE: mmHg

8. Fundoscopia:

Papilas:  
Mácula:  
Retina:

9. Gonioscopia: S ( ) N ( )  
OD ( ) OE ( )

10. Fluoresceinografia: S ( ) N ( )  
OD ( ) OE ( )

11. Campimetria: S ( ) N ( )  
OD ( ) OE ( )

12. Outros:

### C. Exame Neurológico

Achados:

Exames complementares solicitados: EEG ( ) Mielografia ( )

Líquor ( ) Eletroneuromiografia ( ) Arteriografia ( )

Achados:

### D. Exame Otorrinolaringológico

Audiometria: S ( ) N ( ) Achados:

1. Pescoço:

Linfonodos: S ( ) N ( ) Localização:

Alteração Tireóide: S ( ) N ( ) Tipo:

Obs.:

2. Alteração Laringe:

Cordas Vocais ( ) Epiglote ( ) Falsas Cordas ( ) Aritenóides ( )

Fossa Piriforme ( )

Obs.:





## 3. Alteração Boca e Orofaringe:

Língua ( ) Amígdalas ( ) Palato ( ) Faringe ( )

Obs.:

## 4. Alteração Nasofaringe:

Abóbada ( ) Parede Lateral ( ) Fosseta Rosenmuller ( )

Obs.:

## 5. Alteração Nariz e Seios Paranasais:

Septos ( ) Cornetos ( ) Meato ( )

Obs.:

## 6. Alteração Ouvidos:

Pavilhões Auditivos ( ) Membrana Direita ( ) Membrana Esquerda ( )

Weber: Direito ( ) Medial ( ) Esquerdo ( )

Rinné: Direito ( ) Esquerdo ( )

Schwabach: Direito ( ) Esquerdo ( )

## 7. Exame Extra Oral:

Assimetria Facial: S ( ) N ( )

Maxila ( ) Mandíbula ( ) Zigomático ( ) ATM ( )

Hipoplasias Ósseas: S ( ) N ( )

Maxila ( ) Mandíbula ( ) Zigomático ( ) ATM ( )

Hiperplasias Ósseas: S ( ) N ( )

Maxila ( ) Mandíbula ( ) Zigomático ( ) ATM ( )

Hiperplasias de Tecido Mole da Face: S ( ) N ( )

Terço Médio ( ) Terço Inferior ( )

Neurofibroma Plexiforme Facial: S ( ) N ( )

Afetando (F. M. = Função Motora): F.M. Facial ( ) F.M. do

Hipoglosso ( ) F.M. do Trígêmeo ( ) Vias Aéreas ( )

Deglutição ( )

## 8. Exame Intra Oral:

Macroglossia: S ( ) N ( )

Tumores Linguais: S ( ) N ( ) Tipo:

Hipertrofia Papilas Fungiformes da Língua: S ( ) N ( )

Lesões em: Palato ( ) Mucosa Gengival ( ) Mucosa Bucal ( )

Assoalho da Boca ( )

Número de Cáries:

Maloclusão: S ( ) N ( )

Mordida Cruzada: S ( ) N ( ) Anterior ( )

Posterior ( )

Dentes: Impactados ( ) Deslocados ( )

Perdidos ( )

Deformação do Espaço Periodontal: S ( ) N ( )



## 9. Achados Radiológicos:

Alterações Intra-Ósseas: S ( ) N ( )  
 Alargamento do Forame Alveolar Inferior ( )  
 Canal Mandibular ( )  
 Forame Mentoniano ( )  
 Lesões Radiolúcidas: S ( ) N ( )  
 Maxila ( ) Mandíbula ( ) Zigomático ( ) ATM ( )  
 Lesões Radiopacas: S ( ) N ( )  
 Maxila ( ) Mandíbula ( ) Zigomático ( ) ATM ( )  
 Alterações de Estrutura de Suporte Dental: S ( ) N ( )  
 Iniciais ( ) Periodontite ( ) Periodontose ( )  
 Neoplasias: S ( ) N ( )  
 Maxila ( ) Mandíbula ( ) Zigomático ( ) ATM ( )

## E. Avaliação Psicológica

## 1. Rendimento Intelectual:

Superior ( ) Médio ( ) Médio Inferior ( ) Limítrofe ( )  
 RM Leve ( ) RM Moderado ( ) RM Severo ( ) RM Profundo ( )

## 2. Aspectos Viso-Perceptivo-Motor:

Déficit Viso-Perceptivo-Motor: S ( ) N ( )  
 Indícios de Possível Comprometimento Neurológico: S ( ) N ( )

## 3. Distúrbios de Déficit de Atenção por Hiperatividade:

Leve ( ) Moderado ( ) Grave ( )

## 4. Ansiedade:

Traço: Leve ( ) Moderado ( ) Grave ( )  
 Estado: Leve ( ) Moderado ( ) Grave ( )

## 5. Depressão:

Distímia: S ( ) N ( )  
 Depressão Maior: Leve ( ) Moderado ( ) Grave ( )

## 6. Habilidades de Enfrentamento:

Comportamento/Ação: Positiva ( ) Negativa ( )  
 Cognitiva/Pensamento: Positiva ( ) Negativa ( )  
 Emocional/Afetivo: Positiva ( ) Negativa ( )

## F. Outras Avaliações

## 1. Aparelho Circulatório: S ( ) N ( )

Tipo:

PA: Pulso:



2. Aparelho Respiratório: S ( ) N ( )  
Tipo:
3. Aparelho Digestivo: S ( ) N ( )  
Tipo:
4. Distúrbios do Metabolismo: S ( ) N ( )  
Tipo:
5. Sinais e Sintomas:  
Prurido: S ( ) N ( )  
Outros:
6. Outros:  
Obs.:

## VI. Estudo Radiológico

### 1. RX Tórax

- Deformidade Torácica: S ( ) N ( )  
Peito Escavado ( ) Erosão de Arcos Costais ( )  
Escoliose ( ) Cifose ( ) Cifo escoliose ( )  
Transparência Alterada ( )  
Cúpulas Diafragmáticas Livres ( )  
Área Cardíaca dentro dos Limites da Normalidade ( )  
Outras:

### 2. RX Coluna Vertebral

- Escoliose ( ) Cifose ( ) Cifo escoliose ( ) Acunhamento ( )  
Erosão da Parede Posterior ( ) Erosão da Parede Anterior ( )  
Aumento dos Forames de Conjugação ( ) Meningocele ( ) Redução  
dos Espaços Intervertebrais ( )  
Outras:

### 3. RX Crânio

- Volume Alterado ( ) Calcificações ( ) Sela Turca Alterada ( )  
Radiotransparências ( ) Displasia do Esfenóide ( ) Alargamento dos  
Forames Ópticos ( ) Aumento dos Condutos Auditivos Internos ( )  
Outras:

### 4. RX MMSS e MMII

- Transtorno de Crescimento ( ) Arqueamento ( ) Aumento  
Estriado dos Ossos Tubulares ( ) Erosão do Perióstio ( )  
Fraturas Incompletas ( ) Lesões Císticas ( ) Cortical Alterada ( )  
Pseudoartroses ( )  
Outras:



**5. Tomografia Computadorizada**

Gliomas Ópticos ( )      Astrocitomas ( )      Meningeoma ( )  
Displasia da Asa do Esfenóide ( )      Neuroma do Acústico ( )  
Ganglioglioma ( )      Neurofibroma Central ( )      Aumento do Tronco  
Cerebral ( )      Aumento dos Hemisférios ( )      Neurofibromas  
Plexiformes de Órbita ( )      Neurofibromas do Couro Cabeludo ( )  
Outros:

**6. Ultrassom do Abdômem Total**

Aorta e Veia Cava Inferior Normais ( )      Fígado, Baço, Pâncreas e Rins  
Normais ( )  
Vesícula e Vias Biliares Normais ( )      Bexiga Urinária Alterada ( )  
Útero e Ovários Normais ( )      Próstata Alterada ( )  
Massa Abdominal Presente ( )  
Outros:

**VII. Outros Exames Complementares**

Hemograma:

Na:                      K:                      Uréia:                      Creatina:

Glicemia:

ECG:                      EGG:

Outros:

Observações:



## APÊNDICE 2

**Tabela 20** – Deleção de exons inteiros ou de múltiplos exons, incluindo introns correspondentes.

| REFERÊNCIA                         | EXON/INTRON              |
|------------------------------------|--------------------------|
| Hoffmeyer <i>et al.</i> , 1994     | del exon 3               |
| Colman <i>et al.</i> , 1996        | del exon 4 – intron 39   |
| Korf, 1997                         | del exon 5               |
| Osborn & Upadhyaya, 1999           | 1466 del 62- exon 10b    |
| Osborn & Upadhyaya, 1999           | 2252 del 74 – exon 14    |
| Osborn & Upadhyaya, 1999           | del exon 37              |
| Osborn & Upadhyaya, 1999           | 6858 del 141 – intron 37 |
| Korf, 1997                         | del exon 33              |
| Korf, 1997                         | del exon 1-38            |
| Korf, 1997                         | del exon 1-38            |
| Korf, 1997                         | del intron 27-38         |
| Korf, 1997                         | del intron 26-27         |
| Heim <i>et al.</i> , 1995          | del exon 10c - 12a       |
| Korf, 1997                         | del intron 27-exon 38    |
| Korf, 1997                         | del intron 24-exon 38    |
| Korf, 1997                         | del intron 27b           |
| Korf, 1997                         | del intron 38            |
| Lazaro <i>et al.</i> , 1994; 1995a | del intron 31- 39        |
| Korf, 1997                         | del intron 26-38         |
| Korf, 1997                         | del exon 5 – intron 39   |
| Korf, 1997                         | del intron 27b-38        |
| Korf, 1997                         | del intron 27            |
| Korf, 1997                         | del exon 1 – intron 27   |
| Upadhyaya <i>et al.</i> , 1995     | del intron 27-41         |
| Upadhyaya <i>et al.</i> , 1995     | del intron 38-41         |
| Upadhyaya <i>et al.</i> , 1995     | del intron 38            |
| Viskochil <i>et al.</i> , 1990     | del 190 kb               |
| Viskochil <i>et al.</i> , 1990     | del 40 kb                |
| Viskochil <i>et al.</i> , 1990     | del 11 kb                |
| Upadhyaya <i>et al.</i> , 1992     | del 40 kb                |
| Upadhyaya <i>et al.</i> , 1992     | del 80 kb                |
| Upadhyaya <i>et al.</i> , 1992     | del 90 kb                |
| Korf, 1997                         | del 123pb – exon 6       |
| Heim <i>et al.</i> , 1995          | del (731-835)– exon 6    |

Tabela 21 – Pequenas deleções (cDNA = DNA complementar).

| REFERÊNCIA                     | EXON/CÓDON (cDNA) | TIPO              |
|--------------------------------|-------------------|-------------------|
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000   | 3/220             | delG              |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000   | 4a/426            | delATTTT          |
| Ars <i>et al.</i> , 2000       | 4a/446            | delA              |
| Upadhyaya <i>et al.</i> , 1998 | 4b/495            | delTGTT           |
| Osborn & Upadhyaya, 1999       | 4b/495            | delTGTT           |
| Toliat <i>et al.</i> , 2000    | 4b/ 496           | delGT             |
| Korf, 1997                     | 4b/498            | delT              |
| Toliat <i>et al.</i> , 2000    | 4b/ 499           | delTGTT           |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000   | 4b/ 499           | delTGTT           |
| Ars <i>et al.</i> , 2000       | 4b/527            | delAT             |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000   | 4b/ 527           | delA              |
| Ars <i>et al.</i> , 2000       | 4b/580            | delC              |
| Korf, 1997                     | 5/658             | delT              |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000   | 5/703             | delTA             |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000   | 6/754             | delT              |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000   | 6/838             | delATAA           |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000   | 6/887             | delA              |
| Hoffmeyer <i>et al.</i> , 1998 | 7/918             | delT              |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000   | 7/918             | delT              |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000   | 7/955             | delAG             |
| Osborn & Upadhyaya, 1999       | 7/1019            | delCT             |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000   | 7/1019            | delCT             |
| Osborn & Upadhyaya, 1999       | 8/1127            | delTGAT           |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000   | 9/1255            | delA              |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000   | 10a/1338          | delA              |
| Horiuchi <i>et al.</i> , 1998  | 10a/1448          | delA              |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000   | 10b/1484          | delCC             |
| Robinson <i>et al.</i> , 1996  | 10c/1541          | delAG             |
| Robinson <i>et al.</i> , 1996  | 10c/1541          | delAG             |
| Osborn & Upadhyaya, 1999       | 10c/1541          | delAG             |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000   | 10c/1541          | delAG             |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000   | 10c/1546          | delC              |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000   | 12a/1756          | delACTA           |
| Ars <i>et al.</i> , 2000       | 12a/1758          | delTA             |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000   | 12b/1935          | delG              |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000   | 13/2027           | delC              |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000   | 13/2190           | delCCTCT          |
| Korf, 1997                     | 14/2272           | delAG             |
| Maynard <i>et al.</i> , 1997   | 16/2665           | delA              |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000   | 16/2666           | delC              |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000   | 16/2674           | delA              |
| Maynard <i>et al.</i> , 1997   | 16/2760           | delG              |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000   | 16/2844           | delA              |
| Shen <i>et al.</i> , 1993      | 17/2970-2972      | delAAT/delATG     |
| Messiaen <i>et al.</i> , 2000  | 17/2970-2972      | delAAT            |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000   | 17/2970           | delAAT            |
| Heim <i>et al.</i> , 1995      | 18/3050 e 3051    | delAATT e delATTA |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000   | 18/3060           | delA              |
| Korf, 1997                     | 19a/3150/51/52    | delGG             |
| Park & Privnick, 1998          | 19a/3151          | delGG             |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000   | 19a/3178          | delG              |
| Messiaen <i>et al.</i> , 2000  | 19a/3193          | delC              |
| Upadhyaya <i>et al.</i> , 1998 | 20/3456           | delACTC           |
| Upadhyaya <i>et al.</i> , 1997 | 20/3456           | delACTC           |
| Osborn & Upadhyaya, 1999       | 20/3456           | delACTC           |
| Ars <i>et al.</i> , 2000       | 20/3456           | delACTC           |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000   | 20/3456           | delACTC           |
| Upadhyaya <i>et al.</i> , 1997 | 20/3460           | delAA             |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000   | 21/3525           | delAA             |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000   | 21/3643           | delATG            |
| Korf, 1997                     | 22/3731           | delC              |
| Upadhyaya <i>et al.</i> , 1997 | 22/3731-3732      | delT              |
| Upadhyaya <i>et al.</i> , 1997 | 22/3737           | delT              |
| Osborn & Upadhyaya, 1999       | 22/3737           | delT              |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000   | 22/3737           | delTGTT           |
| Ars <i>et al.</i> , 2000       | 22/3759           | delCTACC          |
| Ars <i>et al.</i> , 2000       | 22/3818           | delCT             |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000   | 22/3822           | delCT             |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000   | 23.1/3909         | delT              |

cont



cont

|                                  |                                 |                                       |
|----------------------------------|---------------------------------|---------------------------------------|
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000     | 23.1/3911                       | delTT                                 |
| Korf, 1997                       | 23.1/3937                       | delGATT                               |
| Korf, 1997                       | 23.1/3938                       | delATTG                               |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000     | 23.2/4016                       | delTT                                 |
| Upadhyaya <i>et al.</i> , 1997   | 23.2/4071-4076                  | delC                                  |
| Upadhyaya <i>et al.</i> , 1997   | 23.2/4071-4076                  | delC                                  |
| Osborn & Upadhyaya, 1999         | 23.2/4071                       | delC                                  |
| Heim <i>et al.</i> , 1995        | 23.2/4088-4110                  | del23pb                               |
| Upadhyaya <i>et al.</i> , 1997   | 24/4155-4156                    | delA                                  |
| Osborn & Upadhyaya, 1999         | 24/4155                         | delA                                  |
| Korf, 1997                       | 24/4183                         | delC                                  |
| Anglani <i>et al.</i> , 1993     | 24/4190                         | delTT                                 |
| Korf, 1997                       | 24/4247                         | delG                                  |
| Korf, 1997                       | 24/4152                         | delA                                  |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000     | 25/4311                         | delAGAA                               |
| Korf, 1997                       | 26/4424                         | delTT                                 |
| Korf, 1997                       | 26/4425                         | delTT                                 |
| Korf, 1997                       | 26/4426                         | delTT                                 |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000     | 26/4431                         | delC                                  |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000     | 26/4486                         | delA                                  |
| Upadhyaya <i>et al.</i> , 1995   | 27a/4572                        | delC                                  |
| Upadhyaya <i>et al.</i> , 1995   | 27a/4630                        | delA                                  |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000     | 27b/4703                        | delC                                  |
| Korf, 1997                       | 28/5168                         | delTC                                 |
| Korf, 1997                       | 28/5205                         | delAGTAA                              |
| Side <i>et al.</i> , 1997        | 28/4914                         | delCTCT                               |
| Korf, 1997                       | 28/4969                         | delTCTATA                             |
| Korf, 1997                       | 28/4975                         | delTCTATA                             |
| Colman <i>et al.</i> , 1993      | 28/5010                         | delG                                  |
| Colman <i>et al.</i> , 1993      | 28/4869                         | del1pb                                |
| Side <i>et al.</i> , 1997        | 28/5024                         | delTT                                 |
| Zhong <i>et al.</i> , 1993       | 28/5108                         | delAG                                 |
| Wu <i>et al.</i> , 1999          | 28/4967                         | delTCTATA                             |
| Messiaen <i>et al.</i> , 2000    | 28/5033                         | delG                                  |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000     | 28/5050                         | delAGGCTTG                            |
| Shen & Upadhyaya, 1993           | 28/5077ou5078 até<br>5089ou5090 | delAAACTGGCTGAGC/del<br>AACTGGCTGAGCA |
| Stark <i>et al.</i> , 1991; 1992 | 28/5123 ou 5124                 | delCCACC/ delCACCT                    |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000     | 28/5152                         | delG                                  |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000     | 28/5168                         | delTC                                 |
| John <i>et al.</i> , 2000        | 29/5272                         | delC                                  |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000     | 29/5248                         | delAAA                                |
| Korf, 1997                       | 29/5386                         | delTG                                 |
| Park & Pivnick, 1998             | 29/5453                         | delTT                                 |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000     | 29/5484                         | delTT                                 |
| Messiaen <i>et al.</i> , 2000    | 30/5567                         | delTT                                 |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000     | 30/5584                         | delAC                                 |
| Korf, 1997                       | 30/5587                         | delTTTAA                              |
| Korf, 1997                       | 30/5672                         | delGTAA                               |
| Korf, 1997                       | 30/5679                         | delACTG                               |
| Messiaen <i>et al.</i> , 2000    | 31/5798                         | delC                                  |
| Valero <i>et al.</i> , 1994      | 31/5843                         | delAA                                 |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000     | 31/5847                         | delAG                                 |
| Skuse, 1998                      | 31/                             | del28pb                               |
| Korf, 1997                       | 31/5880                         | delGACCATC                            |
| Ars <i>et al.</i> , 2000         | 31/5887                         | delA                                  |
| Korf, 1997                       | 32/5949                         | delA                                  |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000     | 33/6220                         | delG                                  |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000     | 34/6468                         | delC                                  |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000     | 34/6470                         | delTT                                 |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000     | 34/6471                         | delC                                  |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000     | 35/6604                         | delTT                                 |
| Upadhyaya <i>et al.</i> , 1996   | 37/6839                         | delTAC                                |
| Robinson <i>et al.</i> , 1995    | 37/6789                         | delTTAC                               |
| Hoffmeyer <i>et al.</i> , 1998   | 37/6789                         | delTTAC                               |
| Hoffmeyer <i>et al.</i> , 1998   | 37/6789                         | delTTAC                               |
| Messiaen <i>et al.</i> , 2000    | 37/6789                         | delTTAC                               |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000     | 37/6789                         | delTTAC                               |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000     | 37/6797                         | delGT                                 |
| Korf, 1997                       | 37/6810                         | delAGAAG                              |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000     | 39/7095                         | delTT                                 |
| Ars <i>et al.</i> , 2000         | 39/7096                         | delAACTTT                             |

cont



cont.

|                                 |                |               |
|---------------------------------|----------------|---------------|
| Korf, 1997                      | 39.7096        | delAACTTT     |
| Korf, 1997                      | 39.7096        | delAACTTT     |
| Rodenhiser <i>et al.</i> , 1997 | 39.7118        | delTTTTTA     |
| John <i>et al.</i> , 2000       | 40.7168        | delGA         |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000    | 40.7208        | delGA         |
| Heim <i>et al.</i> , 1995       | 41.7260        | delIT         |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000    | 41.7268        | delCA         |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000    | 41.7285        | delC          |
| Ars <i>et al.</i> , 2000        | 41.7337        | delC          |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000    | 41.7367        | delCC         |
| Osborn & Upadhyaya, 1999        | 42.7458        | delC          |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000    | 43.7369        | delIT         |
| Shen <i>et al.</i> , 1993       | 44.7745-7754   | delTTCTCTTGGA |
| Messiaen <i>et al.</i> , 2000   | 45.7884        | delGT         |
| Korf, 1997                      | 46.8040 e 8041 | delT e delT   |
| Messiaen <i>et al.</i> , 2000   | 46.8016        | delA          |
| Korf, 1997                      | 46.8016        | delA          |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000    | 46.8024        | delC          |
| Osborn & Upadhyaya, 1999        | 47.8081        | delC          |
| Ars <i>et al.</i> , 2000        | 48.8134        | delAA         |

Tabela 22 – Inserções (cDNA = DNA complementar).

| REFERÊNCIA                      | EXON/CÓDON<br>(cDNA) | TIPO          |
|---------------------------------|----------------------|---------------|
| Upadhyaya <i>et al.</i> , 1992  |                      | ins10kb       |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000    | 3/227                | insA          |
| Toliat <i>et al.</i> , 2000     | 4b/540               | insA          |
| Messiaen <i>et al.</i> , 2000   | 4c/603               | insT          |
| Ars <i>et al.</i> , 2000        | 5/717                | insTCCCACAG   |
| Ars <i>et al.</i> , 2000        | 5/723                | insA          |
| Korf, 1997                      | 7/985                | insA          |
| Messiaen <i>et al.</i> , 2000   | 7/987                | insA          |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000    | 8/1111               | insT          |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000    | 10b/1398             | insT          |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000    | 10b/1436             | insA          |
| Messiaen <i>et al.</i> , 1999   | 10b/1465             | insC          |
| Ars <i>et al.</i> , 2000        | 10b/1465             | insT          |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000    | 10b/1519             | insT          |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000    | 12a/1817             | insT          |
| Korf, 1997                      | 12b/1998             | insCCTCT      |
| Heim <i>et al.</i> , 1995       | 13/2027              | insC          |
| Side <i>et al.</i> , 1997       | 13/2027              | insC          |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000    | 13/2027              | insC          |
| Messiaen <i>et al.</i> , 2000   | 13/2033              | insC          |
| Park & Pivnick, 1998            | 14/2320              | insA          |
| Maynard <i>et al.</i> , 1997    | 16/2779-2785         | insCCTGCTC    |
| Osborn & Upadhyaya, 1999        | 16/2537              | insTG         |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000    | 16/2845              | insT          |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000    | 16/2850              | insTT         |
| Korf, 1997                      | 17/2875              | insA          |
| Korf, 1997                      | 17/2972              | insT          |
| Klose <i>et al.</i> , 1998a     | 19a/3193             | insA          |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000    | 20/3394              | insAG         |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000    | 26/4374              | insT          |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000    | 26/4497              | insG          |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000    | 27a/4649             | insG          |
| Colman <i>et al.</i> , 1997     | 28/4873              | insA          |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000    | 28/4936              | insT          |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000    | 28/5055              | insT          |
| Tassabehji <i>et al.</i> , 1993 | 28/5095-5137         | ins42pb       |
| Colman <i>et al.</i> , 1997     | 29/5289              | insAA         |
| Boulandet <i>et al.</i> , 2000  | 29/5448              | insG          |
| Upadhyaya <i>et al.</i> , 1992  | 29/5451              | insC          |
| Upadhyaya <i>et al.</i> , 1992  | 29/5468              | insT          |
| Skuse, 1998                     | 31/                  | ins200pb      |
| Zhong <i>et al.</i> , 1993      | 31/5816              | insG          |
| Korf, 1997                      | 31/5843              | insA          |
| Korf, 1997                      | 31/5849              | insTT         |
| Ainsworth <i>et al.</i> , 1993  | 31/5852              | insTT         |
| Korf, 1997                      | 31/5873              | insC          |
| Wallace <i>et al.</i> , 1991    | intron 32            | insAlu        |
| Osborn & Upadhyaya, 1999        | 34/6487              | insA          |
| Purandare <i>et al.</i> , 1994  | 34/6519              | insG          |
| Ars <i>et al.</i> , 2000        | 35/6593              | insT          |
| Colman <i>et al.</i> , 1997     | 36/6709              | insC          |
| Hoffmeyer <i>et al.</i> , 1998  | 37/6790              | insTT         |
| Upadhyaya <i>et al.</i> , 1996  | 37/6791              | insA          |
| Colman <i>et al.</i> , 1997     | 37/6791              | insA          |
| Osborn & Upadhyaya, 1999        | 37/6791              | insA          |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000    | 37/6791              | insA          |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000    | 37/6792              | insA          |
| Legius <i>et al.</i> , 1994     | 38/6922              | insGATGAGGTCA |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000    | 39/7080              | insA          |
| Osborn & Upadhyaya, 1999        | 41/7267              | insA          |
| Osborn & Upadhyaya, 1999        | 41/7313              | insA          |
| Purandare <i>et al.</i> , 1994  | 42/7486              | insGG         |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000    | 42/7544              | insGA         |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000    | 43/7633              | insC          |
| Korf, 1997                      | 45/7900              | insT          |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000    | 46/7926              | insT          |
| Ars <i>et al.</i> , 1998, 2000  | 46/8042              | insA          |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000    | 47/8092              | insTT         |



Tabela 23 – Mutações *nonsense*.

| REFERÊNCIA                      | EXON | TIPO   |
|---------------------------------|------|--------|
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000    | 1    | W9X    |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000    | 1    | E19X   |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000    | 2    | Y49X   |
| Osborn & Upadhyaya, 1999        | 3    | Q83X   |
| Messiaen <i>et al.</i> , 2000   | 3    | Q83X   |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000    | 4b   | L161X  |
| Toliat <i>et al.</i> , 2000     | 4b   | L180X  |
| Toliat <i>et al.</i> , 2000     | 4b   | R192X  |
| Messiaen <i>et al.</i> , 2000   | 4b   | R192X  |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000    | 4b   | R192X  |
| Horn <i>et al.</i> , 1996       | 5    | Q239X  |
| Gasparini <i>et al.</i> , 1996  | 6    | W267X  |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000    | 6    | W267X  |
| Gasparini <i>et al.</i> , 1996  | 6    | Q282X  |
| Hoffmeyer <i>et al.</i> , 1998  | 7    | R304X  |
| Messiaen <i>et al.</i> , 2000   | 7    | R304X  |
| Messiaen <i>et al.</i> , 2000   | 7    | R304X  |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000    | 7    | R304X  |
| Ars <i>et al.</i> , 2000        | 7    | R304X  |
| Wimmer <i>et al.</i> , 2000     | 7    | R304X  |
| Wimmer <i>et al.</i> , 2000     | 7    | Q315X  |
| Wimmer <i>et al.</i> , 2000     | 7    | W336X  |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000    | 7    | K354X  |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000    | 9    | Y408X  |
| Osborn & Upadhyaya, 1999        | 9    | R416X  |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000    | 9    | R416X  |
| Messiaen <i>et al.</i> , 2000   | 10a  | W425X  |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000    | 10a  | W425X  |
| Heim <i>et al.</i> , 1995       | 10a  | R440X  |
| Osborn & Upadhyaya, 1999        | 10a  | R440X  |
| Messiaen <i>et al.</i> , 2000   | 10a  | R440X  |
| Messiaen <i>et al.</i> , 2000   | 10a  | R440X  |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000    | 10a  | R440X  |
| Messiaen <i>et al.</i> , 2000   | 10a  | R461X  |
| Messiaen <i>et al.</i> , 2000   | 10a  | R461X  |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000    | 10a  | R461X  |
| Messiaen <i>et al.</i> , 2000   | 10b  | Y489X  |
| Messiaen <i>et al.</i> , 2000   | 10c  | E524X  |
| Messiaen <i>et al.</i> , 2000   | 10c  | S536X  |
| Ars <i>et al.</i> , 2000        | 12a  | W599X  |
| Ars <i>et al.</i> , 2000        | 13   | R681X  |
| Ars <i>et al.</i> , 2000        | 13   | R681X  |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000    | 13   | R681X  |
| Horiuchi <i>et al.</i> , 1998   | 13   | Q682X  |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000    | 13   | Y692X  |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000    | 15   | Q786X  |
| Maynard <i>et al.</i> , 1997    | 16   | R816X  |
| Bahua <i>et al.</i> , 1998      | 16   | R816X  |
| John <i>et al.</i> , 2000       | 16   | R816X  |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000    | 16   | R816X  |
| Maynard <i>et al.</i> , 1997    | 16   | K908X  |
| Maynard <i>et al.</i> , 1997    | 16   | Y930X  |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000    | 16   | Q948X  |
| Messiaen <i>et al.</i> , 2000   | 17   | Q959X  |
| Messiaen <i>et al.</i> , 2000   | 17   | Q963X  |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000    | 18   | Y998X  |
| Heim <i>et al.</i> , 1995       | 18   | Q1017X |
| Messiaen <i>et al.</i> , 2000   | 20   | E1123X |
| Ars <i>et al.</i> , 2000        | 20   | S1140X |
| Messiaen <i>et al.</i> , 2000   | 21   | Q1174X |
| Ars <i>et al.</i> , 2000        | 21   | R1204X |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000    | 21   | E1210X |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000    | 21   | W1236X |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000    | 22   | R1241X |
| Eisenbarth <i>et al.</i> , 2000 | 22   | R1241X |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000    | 22   | W1258X |
| Heim <i>et al.</i> , 1995       | 22   | R1276X |
| Upadhyaya <i>et al.</i> , 1997  | 22   | R1276X |
| Side <i>et al.</i> , 1997       | 22   | R1276X |

cont.



cont.

|                                 |      |        |
|---------------------------------|------|--------|
| Osborn & Upadhyaya, 1999        | 22   | R1276X |
| Messiaen <i>et al.</i> , 2000   | 22   | R1276X |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000    | 22   | R1276X |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000    | 23.1 | R1306X |
| Park & Pivnick, 1998            | 23.1 | R1306X |
| Upadhyaya <i>et al.</i> , 1997  | 23.1 | W1314X |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000    | 23.2 | Q1336X |
| Eisenbarth <i>et al.</i> , 2000 | 23.2 | Q1341X |
| Upadhyaya <i>et al.</i> , 1997  | 23.2 | R1362X |
| Messiaen <i>et al.</i> , 2000   | 23.2 | R1362X |
| Messiaen <i>et al.</i> , 2000   | 23.2 | R1362X |
| Eisenbarth <i>et al.</i> , 2000 | 23.2 | R1362X |
| Osborn & Upadhyaya, 1999        | 23.2 | R1362X |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000    | 23.2 | R1362X |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000    | 24   | E1415X |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000    | 26   | W1491X |
| Side <i>et al.</i> , 1997       | 27a  | R1513X |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000    | 27a  | R1513X |
| Messiaen <i>et al.</i> , 2000   | 27a  | R1513X |
| Messiaen <i>et al.</i> , 2000   | 27a  | R1513X |
| Ars <i>et al.</i> , 2000        | 27a  | R1513X |
| Korf, 1997                      | 27a  | R1513X |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000    | 27a  | W1538X |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000    | 27b  | Y1573X |
| Korf, 1997                      | 28   | Y1613X |
| Korf, 1997                      | 28   | Y1613X |
| Korf, 1997                      | 29   | S1745X |
| Boulandet <i>et al.</i> , 2000  | 29   | R1748X |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000    | 29   | R1748X |
| Valero <i>et al.</i> , 1994     | 29   | Q1754X |
| Korf, 1997                      | 29   | S1755X |
| Messiaen <i>et al.</i> , 2000   | 29   | S1755X |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000    | 29   | Y1762X |
| Messiaen <i>et al.</i> , 2000   | 29   | S1765X |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000    | 29   | Q1777X |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000    | 29   | L1780X |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000    | 29   | Q1785X |
| Heim <i>et al.</i> , 1995       | 29   | Q1794X |
| Boulandet <i>et al.</i> , 2000  | 29   | W1810X |
| Korf, 1997                      | 29   | Q1820X |
| Valero <i>et al.</i> , 1994     | 29   | R1748X |
| Korf, 1997                      | 29   | S1755X |
| Cawthon <i>et al.</i> , 1990a   | 31   | R1947X |
| Estivill <i>et al.</i> , 1991   | 31   | R1947X |
| Ainsworth <i>et al.</i> , 1993  | 31   | R1947X |
| Horiuchi <i>et al.</i> , 1994   | 31   | R1947X |
| Valero <i>et al.</i> , 1994     | 31   | R1947X |
| Klose <i>et al.</i> , 1999      | 31   | R1947X |
| Lazaro <i>et al.</i> , 1995b    | 31   | R1947X |
| Lazaro <i>et al.</i> , 1995b    | 31   | R1947X |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000    | 31   | R1947X |
| Messiaen <i>et al.</i> , 2000   | 31   | R1947X |
| Park <i>et al.</i> , 2000       | 31   | R1947X |
| Messiaen <i>et al.</i> , 2000   | 31   | Q1966X |
| Luria <i>et al.</i> , 1997      | 31   | Q1972X |
| Heim <i>et al.</i> , 1995       | 33   | C2113X |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000    | 34   | L2189X |
| Heim <i>et al.</i> , 1995       | 35   | W2208X |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000    | 35   | E2210X |
| Osborn & Upadhyaya, 1999        | 35   | R2214X |
| Messiaen <i>et al.</i> , 2000   | 36   | R2237X |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000    | 36   | R2237X |
| Upadhyaya <i>et al.</i> , 1996  | 37   | Y2264X |
| Upadhyaya <i>et al.</i> , 1996  | 37   | Y2264X |
| Messiaen <i>et al.</i> , 1997   | 37   | Y2264X |
| Messiaen <i>et al.</i> , 1997   | 37   | Y2264X |
| Hoffmeyer <i>et al.</i> , 1998  | 37   | Y2264X |
| Hoffmeyer <i>et al.</i> , 1998  | 37   | Y2264X |
| Robinson <i>et al.</i> , 1995   | 37   | Y2264X |
| Buske <i>et al.</i> , 1999      | 37   | Y2264X |
| Messiaen <i>et al.</i> , 2000   | 37   | Y2264X |
| Messiaen <i>et al.</i> , 2000   | 37   | Y2264X |
| Ars <i>et al.</i> , 2000        | 37   | Y2264X |

cont.

cont.

|                                |    |        |
|--------------------------------|----|--------|
| Ars <i>et al.</i> , 2000       | 37 | Y2264X |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000   | 37 | Y2264X |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000   | 37 | L2280X |
| Upadhyaya <i>et al.</i> , 1996 | 37 | Q2281X |
| Upadhyaya <i>et al.</i> , 1996 | 37 | Q2281X |
| Upadhyaya <i>et al.</i> , 1998 | 40 | R2390X |
| Messiaen <i>et al.</i> , 2000  | 40 | K2401X |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000   | 40 | Q2413X |
| Messiaen <i>et al.</i> , 2000  | 41 | R2429X |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000   | 41 | R2429X |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000   | 42 | S2475X |
| Purandare <i>et al.</i> , 1994 | 42 | R2496X |
| Park & Pivnick, 1998           | 42 | R2496X |
| Messiaen <i>et al.</i> , 2000  | 42 | R2496X |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000   | 42 | R2496X |
| Heim <i>et al.</i> , 1995      | 42 | G2518X |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000   | 44 | Q2567X |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000   | 44 | Q2568X |
| Upadhyaya <i>et al.</i> , 1995 | 45 | R2616X |
| Upadhyaya <i>et al.</i> , 1998 | 45 | R2616X |
| Osborn & Upadhyaya, 1999       | 45 | R2616X |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000   | 45 | R2616X |



Tabela 24 – Mutações *missense* e silenciosas.

| REFERÊNCIA                     | EXON | TIPO   |
|--------------------------------|------|--------|
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000   | 2    | S56S   |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000   | 2    | S56S   |
| Upadhyaya <i>et al.</i> , 1998 | 3    | C93Y   |
| Messiaen <i>et al.</i> , 2000  | 3    | C93Y   |
| Ars <i>et al.</i> , 2000       | 4a   | I117S  |
| Korf, 1997                     | 4b   | D176H  |
| Upadhyaya <i>et al.</i> , 1998 | 4b   | D176E  |
| Toliat <i>et al.</i> , 2000    | 4b   | D176E  |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000   | 4b   | D176E  |
| Messiaen <i>et al.</i> , 2000  | 4b   | C187Y  |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000   | 4c   | L216P  |
| Gasparini <i>et al.</i> , 1996 | 7    | N335N  |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000   | 8    | L357P  |
| Messiaen <i>et al.</i> , 1999  | 10b  | Y489C  |
| Messiaen <i>et al.</i> , 1999  | 10b  | Y489C  |
| Messiaen <i>et al.</i> , 1999  | 10b  | Y489C  |
| Messiaen <i>et al.</i> , 1999  | 10b  | Y489C  |
| Messiaen <i>et al.</i> , 1999  | 10b  | Y489C  |
| Messiaen <i>et al.</i> , 2000  | 10b  | Y489C  |
| Messiaen <i>et al.</i> , 2000  | 10b  | Y489C  |
| Ars <i>et al.</i> , 2000       | 10b  | Y489C  |
| Ars <i>et al.</i> , 2000       | 10b  | Y489C  |
| Ars <i>et al.</i> , 2000       | 10b  | Y489C  |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000   | 10b  | Y491C  |
| Messiaen <i>et al.</i> , 1999  | 10b  | L508P  |
| Messiaen <i>et al.</i> , 1999  | 10b  | L508P  |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000   | 11   | L549P  |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000   | 12a  | K583R  |
| Upadhyaya <i>et al.</i> , 1998 | 12a  | L604V  |
| Gasparini <i>et al.</i> , 1996 | 12b  | G629R  |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000   | 12b  | S665F  |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000   | 13   | L695P  |
| Korf, 1997                     | 14   | L763P  |
| Korf, 1997                     | 14   | R765H  |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000   | 15   | W777S  |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000   | 15   | T780K  |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000   | 15   | H781P  |
| Maynard <i>et al.</i> , 1997   | 16   | L844R  |
| Boulandet <i>et al.</i> , 2000 | 16   | L844F  |
| Messiaen <i>et al.</i> , 2000  | 16   | L847P  |
| Maynard <i>et al.</i> , 1997   | 16   | L898P  |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000   | 16   | L847P  |
| Ars <i>et al.</i> , 2000       | 16   | G922S  |
| Wu <i>et al.</i> , 1999        | 16   | T940I  |
| Korf, 1997                     | 18   | M1035R |
| Messiaen <i>et al.</i> , 2000  | 19b  | V1093M |
| Gasparini <i>et al.</i> , 1996 | 20   | T1145T |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000   | 20   | N1156S |
| Purandare <i>et al.</i> , 1994 | 21   | G1166D |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000   | 22   | R1250P |
| Klose <i>et al.</i> , 1998b    | 22   | R1276P |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000   | 22   | R1276Q |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000   | 22   | G1277G |
| Purandare <i>et al.</i> , 1994 | 23.1 | S1311S |
| Korf, 1997                     | 23.2 | L1339R |
| Upadhyaya <i>et al.</i> , 1997 | 24   | R1391S |
| Upadhyaya <i>et al.</i> , 1998 | 24   | V1398D |
| Purandare <i>et al.</i> , 1994 | 24   | G1404G |
| Purandare <i>et al.</i> , 1994 | 24   | K1419R |
| Upadhyaya <i>et al.</i> , 1997 | 24   | K1419Q |
| Upadhyaya <i>et al.</i> , 1997 | 24   | K1423E |
| Upadhyaya <i>et al.</i> , 1997 | 24   | K1423E |
| Upadhyaya <i>et al.</i> , 1997 | 24   | K1423E |
| Upadhyaya <i>et al.</i> , 1997 | 24   | K1423E |
| Upadhyaya <i>et al.</i> , 1998 | 24   | K1423E |
| Upadhyaya <i>et al.</i> , 1998 | 24   | K1423E |
| Li <i>et al.</i> , 1992        | 24   | K1423E |
| Peters <i>et al.</i> , 1999    | 25   | L1425P |
| Ars <i>et al.</i> , 2000       | 25   | L1425P |

cont.

cont.

|                                |    |        |
|--------------------------------|----|--------|
| Korf, 1997                     | 26 | N1504S |
| Upadhyaya <i>et al.</i> , 1997 | 26 | S1468G |
| Watanabe <i>et al.</i> , 1998  | 28 | E1699D |
| Purandare <i>et al.</i> , 1994 | 29 | N1776N |
| Korf, 1997                     | 29 | R1849G |
| Messiaen <i>et al.</i> , 2000  | 29 | R1849Q |
| Messiaen <i>et al.</i> , 2000  | 29 | R1849Q |
| Ars <i>et al.</i> , 2000       | 29 | R1849Q |
| Ars <i>et al.</i> , 2000       | 29 | R1849Q |
| Ars <i>et al.</i> , 2000       | 29 | R1849Q |
| Cawthon <i>et al.</i> , 1990a  | 31 | L1932P |
| Upadhyaya <i>et al.</i> , 1992 | 34 | L2143M |
| Korf, 1997                     | 34 | G2169C |
| Korf, 1997                     | 34 | Y2171R |
| Messiaen <i>et al.</i> , 2000  | 37 | K2286N |
| Wu <i>et al.</i> , 1999        | 38 | L2317P |
| Horiuchi <i>et al.</i> , 1998  | 41 | K2435K |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000   | 44 | Q2567Q |
| Korf, 1997                     | 45 | T2609A |
| Korf, 1997                     | 45 | T2609A |
| Upadhyaya <i>et al.</i> , 1995 | 45 | T2610A |
| Korf, 1997                     | 45 | R2616Q |

Tabela 25 – Mutações em introns.

| REFERÊNCIA                      | TIPO                      | ALTERAÇÃO                 |
|---------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000    | 204 + 1 G→ T intron 2     | exon 2 não transcrito     |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000    | 204 + 2 T→ G intron 2     | exon 2 não transcrito     |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000    | 205 – 1 G→ A intron 2     | exon 3 não transcrito     |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000    | 586 + 1 G→ A intron 4b    | exon 4b não transcrito    |
| Horn <i>et al.</i> , 1996       | 655 – 1 G→ A intron 4c    | exon 5 não transcrito     |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000    | 655 – 2 A→ T intron 4c    | exon 5 não transcrito     |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000    | 888 + 1 G→ A intron 6     | exon 6 não transcrito     |
| Klose <i>et al.</i> , 1999      | 889 – 2 A→G intron 6      | exon 7 não transcrito     |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000    | 1062 + 67 T→ C intron 7   |                           |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000    | 1063 – 13 G→ A intron 7   |                           |
| Korf, 1997                      | 1185 + 1 A intron 8       | exon 8 não transcrito     |
| Horn <i>et al.</i> , 1996       | 1185 + 1 G→T intron 8     | exon 8 não transcrito     |
| Eisenbarth <i>et al.</i> , 2000 | 1260 + 1 G→ A intron 9    |                           |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000    | 1641 + 1 G→ T intron 10c  | exon 10c não transcrito   |
| Side <i>et al.</i> , 1997       | 1642 – 8 G intron 10c     | mudança na matriz leitura |
| Purandare <i>et al.</i> , 1994  | 1721 + 3 A→ G intron 11   | exon 11 não transcrito    |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000    | 1721 + 3 G intron 11      | exon 11 não transcrito    |
| Korf, 1997                      | 1845 + 1 T intron 12a     |                           |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000    | 2252 – 31A→ T intron 13   |                           |
| Maynard <i>et al.</i> , 1997    | 2409 + 1G→A intron 16     |                           |
| Maynard <i>et al.</i> , 1997    | 2409 + 1G→A intron 16     |                           |
| Upadhyaya <i>et al.</i> , 1998  | 2409 + 1 A→G intron 15    |                           |
| Korf, 1997                      | 2851-6 del CTTT intron 16 | exon 17 não transcrito    |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000    | 2991 – 1 G→ A intron 17   | exon 18 não transcrito    |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000    | 2991 – 2 A→ G intron 17   | exon 18 não transcrito    |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000    | 2991 – 1 G→ C intron 17   | exon 18 não transcrito    |
| Purandare <i>et al.</i> , 1995b | 3113 + 1 G→A intron 18    | exon 18 não transcrito    |
| Klose <i>et al.</i> , 1998a     | 3496 + 2 T→ C intron 20   | exon 20 não transcrito    |
| Upadhyaya <i>et al.</i> , 1997  | 3709 – 2 A→G intron 21    |                           |
| Upadhyaya <i>et al.</i> , 1997  | 3975 – 2 A→G intron 23.1  |                           |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000    | 3975 – 2 A→ G intron 23.1 | exon 23.2 não transcrito  |
| Upadhyaya <i>et al.</i> , 1997  | 4110 + 1 G→ A intron 23.2 |                           |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000    | 4110 + 1 G→C intron 23.2  | exon 23.2 não transcrito  |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000    | 4368 – 1 G→ T intron 25   | exon 26 não transcrito    |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000    | 4514 + 1 G→A intron 26    | exon 26 não transcrito    |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000    | 4515 – 2 A→ G intron 26   | exon 27a não transcrito   |
| Boulandet <i>et al.</i> , 2000  | 5206 – 2 A→G intron 28    | exon 29 não transcrito    |
| Korf, 1997                      | 5546 + 2 G intron 29      | exon 29 não transcrito    |
| Purandare <i>et al.</i> , 1994  | 5749 + 2 T→ G intron 30   | exon 30 não transcrito    |
| Side <i>et al.</i> , 1997       | 5749 + 332 G intron 30    |                           |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000    | 5943 + 1 G→ A intron 31   | exon 31 não transcrito    |
| Wu <i>et al.</i> , 1999         | 5944 – 5 G intron 31      |                           |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000    | 5944 – 5 A→G intron 31    | exon 32 não transcrito    |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000    | 5944 – 2 A→ G intron 31   | exon 32 não transcrito    |
| Hutter <i>et al.</i> , 1994     | 6364 + 4 A→ G intron 33   | exon 33 não transcrito    |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000    | 6579 + 2 T→G intron 34    | exon 34 não transcrito    |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000    | 6579 + 45 T→A intron 34   |                           |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000    | 6579 + 87G→A intron 34    |                           |
| Korf, 1997                      | 6579 + 18 G intron 34     | códon de terminalização   |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000    | 6642 – 1 G→T intron 35    | exon 36 não transcrito    |
| Side <i>et al.</i> , 1997       | 6756 + 3A→ G intron 36    |                           |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000    | 6756 + 1 G→ A intron 36   | exon 36 não transcrito    |
| Korf, 1997                      | 7259 – 17 C→ T intron 40  |                           |
| Korf, 1997                      | 7259 – 14 C→ T intron 40  |                           |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000    | 7907 + 1 G→ A intron 45   | exon 45 não transcrito    |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000    | 7908 – 2 A→G intron 45    | exon 46 não transcrito    |
| Fahsold <i>et al.</i> , 2000    | 8050 + 20 A→ G intron 46  |                           |

Tabela 26 – Mutações na região 3'UTR.

| REFERÊNCIA | TIPO    |
|------------|---------|
| Korf, 1997 | G85724A |
| Korf, 1997 | G85724A |
| Korf, 1997 | G85724A |
| Korf, 1997 | A88856G |

**Tabela 27** – Correlação das mutações apresentadas por pacientes portadores de NF1 com as respectivas características clínicas\* referidas pela literatura consultada (cDNA = DNA complementar).

| REFERÊNCIA                       | EXON/CÓDON (cDNA)            | TIPO                                | MC | NF | NL | E | RD | SP | SC | RM | BE | LE | OUTRAS **  |
|----------------------------------|------------------------------|-------------------------------------|----|----|----|---|----|----|----|----|----|----|------------|
| Hoffmeyer <i>et al.</i> , 1994   | 3/                           | del84pb                             | X  | X  | X  | X |    |    | X  |    |    |    | a          |
| Horn <i>et al.</i> , 1996        | intron 4c                    | 655 – 1 G→A                         | X  |    |    | X |    |    |    |    |    |    |            |
| Horn <i>et al.</i> , 1996        | 5/715                        | Q239X                               | X  | X  | X  | X |    |    | X  |    |    |    |            |
| Gasparini <i>et al.</i> , 1996   | 6/801                        | W267X                               | X  | X  |    |   |    |    |    |    |    |    | b          |
| Gasparini <i>et al.</i> , 1996   | 6/844                        | Q282X                               | X  | X  |    |   |    |    |    |    |    |    | c          |
| Horn <i>et al.</i> , 1996        | intron 8                     | 1185 + 1 G→T                        | X  | X  |    | X |    |    |    |    |    |    |            |
| Gasparini <i>et al.</i> , 1996   | 12b/1885                     | G629R                               | X  | X  |    | X |    |    |    |    |    |    |            |
| Park & Pivnick, 1998             | 14/2320                      | insA                                | X  | X  |    | X |    | X  |    |    |    |    | d          |
| Shen <i>et al.</i> , 1993        | 17/2970-2972                 | delAAAT delATG                      | X  | X  |    | X | X  | X  |    |    |    |    |            |
| Purandare <i>et al.</i> , 1995   | intron 18                    | 3113 + 1 G→A                        | X  | X  |    |   |    |    |    |    | X  |    |            |
| Park & Pivnick, 1998             | 19a/3151                     | delGG                               | X  | Xp |    | X |    |    |    |    |    |    | d, e       |
| Klose <i>et al.</i> , 1998a      | 19a/3193                     | insA                                | X  | X  |    |   |    |    |    |    |    |    | f          |
| Klose <i>et al.</i> , 1998a      | intron 20                    | 3496 + 2 T→C                        | X  | X  |    | X |    |    | X  |    |    |    |            |
| Klose <i>et al.</i> , 1998b      | 22/3827                      | R1276P                              | X  | X  |    |   | X  |    |    |    |    |    | b, g       |
| Park & Pivnick, 1998             | 23.1/3916                    | R1306X                              | X  | X  |    | X | X  |    |    |    |    |    | d          |
| Upadhyaya <i>et al.</i> , 1997   | 23.2/4071-4076               | delC                                | X  | X  |    |   |    |    |    |    |    |    | g, h       |
| Upadhyaya <i>et al.</i> , 1997   | 23.2/4071-4076               | delC                                | X  | Xp |    | X |    |    |    |    |    |    | i, j       |
| Upadhyaya <i>et al.</i> , 1997   | 24/4173                      | R1391S                              | X  | X  |    |   |    |    | X  |    |    |    |            |
| Upadhyaya <i>et al.</i> , 1995   | 27a/4630                     | delA                                | X  | X  |    | X |    |    |    |    |    |    |            |
| Upadhyaya <i>et al.</i> , 1995   | 27a/4572                     | delC                                | X  | Xp |    | X |    |    |    | X  |    |    | l          |
| Colman <i>et al.</i> , 1997      | 28/4873                      | insA                                | X  | X  |    |   |    |    |    |    |    | X  |            |
| Stark <i>et al.</i> , 1991; 1992 | 28/5123 ou 5124              | delCCACC / delCACCT                 | X  | X  | X  | X |    |    |    |    |    |    |            |
| Colman <i>et al.</i> , 1993      | 28/5010                      | delIG                               |    |    | X  | X | X  |    |    | X  |    | X  |            |
| Zhong <i>et al.</i> , 1993       | 28/5108                      | delAG                               | X  | Xp |    | X |    |    |    |    |    |    | m, n       |
| Tassabehji <i>et al.</i> , 1993  | 28/5095-5137                 | dup42pb                             | X  |    |    | X |    | X  |    | X  |    |    | d, e, o, p |
| Shen & Upadhyaya, 1993           | 28/5077ou5078 até 5089ou5090 | delAAACTGGCTGA GC/delAACTGGCTG AGCA | X  | Xp |    | X |    |    |    |    |    |    |            |
| Colman <i>et al.</i> , 1997      | 29/5289                      | insAA                               |    | Xp |    |   |    |    |    |    |    |    | m          |
| Park & Pivnick, 1998             | 29/5453                      | delIT                               | X  |    |    |   | X  |    |    |    |    |    | d          |
| Estévil <i>et al.</i> , 1991     | 31/5842                      | R1947X                              | X  | Xp | X  | X |    |    | X  |    |    |    | q          |
| Ainsworth <i>et al.</i> , 1993   | 31/5842                      | R1947X                              | X  | X  |    | X |    |    | X  |    |    |    | r          |
| Horiuchi <i>et al.</i> , 1994    | 31/5842                      | R1947X                              | X  | X  |    |   |    |    |    |    |    |    |            |
| Ainsworth <i>et al.</i> , 1993   | 31/5852                      | insTT                               | X  | Xp |    |   |    |    | X  |    | X  |    |            |
| Zhong <i>et al.</i> , 1993       | 31/5816                      | insG                                | X  | X  |    |   |    |    | X  |    |    |    |            |
| Luria <i>et al.</i> , 1997       | 31/5916                      | Q1972X                              | X  |    |    |   | X  |    |    |    |    | X  | s, t       |
| Wallace <i>et al.</i> , 1991     | intron 32                    | insAlu                              |    | X  | X  | X |    |    |    |    |    |    | l          |
| Hutter <i>et al.</i> , 1994      | intron 33                    | 6364 + 4A→G                         | X  | X  |    |   | X  |    |    |    |    |    |            |
| Colman <i>et al.</i> , 1997      | 36/6709                      | insC                                | X  | Xp |    | X | X  |    |    |    |    |    | b, u, v    |
| Colman <i>et al.</i> , 1997      | 37/6791                      | insA                                | X  | X  |    | X | X  |    |    |    |    |    | l          |
| Robinson <i>et al.</i> , 1995    | 37/6792                      | Y2264X                              | X  | X  | X  | X |    |    | X  |    |    |    |            |
| Upadhyaya <i>et al.</i> , 1996   | 37/6841                      | Q2281X                              | X  | X  |    |   |    |    |    |    |    |    | x          |
| Upadhyaya <i>et al.</i> , 1996   | 37/6841                      | Q2281X                              | X  | X  | X  | X |    |    |    | X  |    |    |            |
| Upadhyaya <i>et al.</i> , 1996   | 37/6791                      | insA                                | X  | X  |    | X |    |    | X  |    |    |    |            |
| Upadhyaya <i>et al.</i> , 1996   | 37/6839                      | delTAC                              | X  | X  |    | X |    |    |    |    |    |    | u, z, w    |
| Messiaen <i>et al.</i> , 1997    | 37/6792                      | Y2264X                              | X  | X  | X  |   | X  |    |    |    |    |    |            |
| Messiaen <i>et al.</i> , 1997    | 37/6792                      | Y2264X                              | X  |    |    | X | X  |    |    |    |    |    |            |
| Legius <i>et al.</i> , 1994      | 38/6922                      | insGATGAGGTCA                       | X  | X  |    | X |    |    |    |    |    |    | g          |
| Park & Pivnick, 1998             | 42/7486                      | R2496X                              | X  | Xp |    | X |    |    |    |    | X  |    | d, e       |
| Shen <i>et al.</i> , 1993        | 44/7745-7754                 | delTTCTCTTGA                        | X  | X  |    |   |    |    |    |    |    |    | y          |
| Upadhyaya <i>et al.</i> , 1995   | 45/7846                      | R2616X                              | X  | Xp |    | X |    |    |    |    |    |    |            |
| Upadhyaya <i>et al.</i> , 1995   | 45/7828                      | T2610A                              | X  | X  |    | X |    |    |    |    |    |    |            |
| Ars <i>et al.</i> , 1998         | 46/8042                      | insA                                | X  | X  | X  |   |    |    |    |    |    |    | k          |

\*MC= manchas café-com-leite; NF= neurofibromas; p= plexiforme; NL= nódulos de Lisch; E= efêlides; RD= retardo no desenvolvimento; SP= estenose pulmonar; SC= escoliose; RM= retardo mental; BE= baixa estatura; LE= leucemia.

\*\*OUTRAS: a= hiperpigmentação periorbital; b= glioma óptico; c= angioma; d= hipertelorismo; e= ptose; f= angiolipoma; g= schwannoma maligno; h= neuropatia axonal; i= deformidade espinal torácica; j= atrofia cerebral; l= macrocefalia; m= pseudoartroses; n= tórax afunilado; o= estrabismo; p= implantação baixa das orelhas; q= malformação de vértebras; r= hipopigmentação facial; s= infecções respiratórias; t= erupção cutânea papulonodular facial; u= hipertensão; v= hipotelorismo; x= paralisia nervosa de Bell's; z= retinopatia; w= estenose da artéria renal; y= cistadenoma ovariano; k= neurofibromatose espinal.

## IX. RESUMO

Neurofibromatose tipo 1 é uma doença autossômica dominante comum. É causada por mutações no gene *NF1*, que compreende 60 exons e está localizado na região cromossômica 17q11.2. O produto do gene *NF1*, neurofibromina, apresenta homologia parcial as proteínas ativadoras de GTPase (GAP). O domínio NF1 relacionado ao GAP (NF1-GRD) codificado pelos exons 20-27a tem sido mostrado regular a p21<sup>ras</sup>.

A pesquisa por mutações em NF1 tem sido dificultada pelo grande tamanho do gene e a alta taxa de mutação. No presente estudo, um total de 55 pacientes com NF1 não relacionados e três crianças com leucemia foram avaliados para mutações em 14 exons (exons 20-27a, 28, 29, 31 e 37) por polimorfismo conformacional de cadeia simples (SSCP). Nove diferentes mutações foram identificadas em um total de dez pacientes. Dessas, sete eram novas e juntas compreendem três *missense* (V1146I, V1317A e E1356G), quatro mutações em introns (3315 – 27 G → A, 4111 – 1G → A e 4514 + 11 C → G), uma *nonsense* (R1748X), uma deleção (3525delAA) e uma mutação silenciosa (Q2267Q). Correlações genótipo-fenótipo foram investigadas, mas nenhuma associação particular foi detectada. Esses resultados seriam úteis para a elucidação da base molecular da NF1.

Palavras-chave: neurofibromatose tipo 1; mutações; gene *NF1*; leucemia; PCR-SSCP.





## X. ABSTRACT

Neurofibromatosis type 1 (NF1) is a common autosomal dominant disorder. It is caused by mutations in the *NF1* gene, which comprises 60 exons and is located on chromosome region 17q11.2. The *NF1* gene product, neurofibromin, displays partial homology to GTPase-activating protein (GAP). The NF1 GAP-related domain (NF1-GRD) encoded by exons 20-27a has been shown to down-regulate p21<sup>ras</sup>.

The search for NF1 mutations has been hampered by the overall size of the gene and the high mutation rate. In the present study, a total of 55 unrelated NF1 patients and three children with leukemia were screened for mutations in fourteen exons (20-27a, 28, 29, 31 and 37) by single-strand conformation polymorphism (SSCP). Nine different mutations were identified in a total of ten patients. Of these, seven are novel and together comprise three missense (V1146I, V1317A and E1356G), four mutations in introns (3315 – 27 G → A, 4111 – 1 G → A and 4514 + 11 C → G), one nonsense (R1748X), one deletion (3525delAA) and one silent mutation (Q2267Q). Genotype-phenotype correlations have been investigated, but no particular association has been detected. These results should be useful for the further elucidation of the molecular basis of NF1.

Key-words: neurofibromatosis type 1; mutations; gene *NF1*; leukemia; PCR-SSCP.



